



HAL
open science

Caractérisation de la transmission des capulavirus, des géminivirus d'un nouveau genre dont l'originalité est la transmission par puceron

Faustine Ryckebusch

► To cite this version:

Faustine Ryckebusch. Caractérisation de la transmission des capulavirus, des géminivirus d'un nouveau genre dont l'originalité est la transmission par puceron. Microbiologie et Parasitologie. Montpellier SupAgro, 2020. Français. NNT : 2020NSAM0006 . tel-04083436

HAL Id: tel-04083436

<https://theses.hal.science/tel-04083436v1>

Submitted on 27 Apr 2023

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En biologie des interactions : mécanismes des interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques

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

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

Caractérisation de la transmission des capulavirus,
des géminivirus d'un nouveau genre
dont l'originalité est la transmission par puceron

Présentée par Faustine RYCKEBUSCH

Le 13 mars 2020

Sous la direction de Michel PETERSCHMITT et de Nicolas SAUVION

Devant le jury composé de

M. Henryk Hanokh CZOSNEK, Professeur émérite, Université hébraïque de Jérusalem

Mme Tatiana TIMCHENKO, Chargée de recherche, CNRS Paris Saclay – I2BC

Mme Anne-Nathalie VOLKOFF, Directrice de recherche, INRAE Montpellier – UMR DGIMI

M. Michel PETERSCHMITT, Chargé de recherche, CIRAD Montpellier – UMR BGPI

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Directeur de thèse

Invités

M. Vincent RAQUIN, Post-doctorant, CNRS Université Lyon 1 – LBBE & IGFL

M. Nicolas SAUVION, Ingénieur de recherche, INRAE Montpellier – UMR BGPI

Examineur

Co-directeur de thèse



"Si vous êtes curieux de nature, vous êtes heureux car vous savez qu'en bord de chemin,
l'extraordinaire se cache dans l'ordinaire"

Marc Giraud

Table des matières

Liste des abréviations et des acronymes.....	8
Liste des espèces virales et maladies citées	11
Liste des figures et tableaux.....	14
Avant-propos	19
Introduction.....	25
I. Définition d'un virus	28
II. Voies de transmission des virus	28
1. Chez les vertébrés	29
2. Chez les plantes	29
III. Vecteurs d'arbovirus	29
1. Chez les vertébrés	29
2. Chez les plantes	29
IV. Les hémiptères	32
1. Taxonomie	32
2. Traits de vie des hémiptères vecteurs de géminivirus	34
V. Mode d'alimentation et lien avec l'anatomie des organes chez les vecteurs d'arbovirus	36
1. Chez les vertébrés	36
2. Chez les plantes	40
VI. Mode de transmission des arbovirus	46
1. La transmission vectorielle mécanique	46
2. La transmission vectorielle biologique	47
VII. <i>Luteoviridae</i>	59
1. Généralités	59
2. Gamme d'hôte.....	59
3. Tropisme tissulaire dans la plante.....	60
4. Gamme de vecteur	60
5. Cycle de transmission dans le vecteur	60
6. Déterminants moléculaires de la transmission par vecteur.....	62
VIII. <i>Nanoviridae</i>	63
1. Généralités	63
2. Organisation génomique	64
3. Gamme d'hôte.....	64

4. Transmission.....	66
IX. <i>Geminiviridae</i>	68
1. Généralités	68
2. Organisation génomique et fonction des différentes protéines.....	69
3. Réplication virale	71
4. Transmission des géminivirus.....	72
X. <i>Capulavirus</i>	79
1. Généralités	79
2. Organisation génomique	81
3. Homologies de séquence	81
4. Considérations épidémiologiques	83
5. Vecteurs et mode de transmission.....	86
6. Caractérisation du pathosystème de l'ALCV	91
XI. Objectifs de la thèse	97
1. Premier chapitre.....	97
2. Deuxième chapitre	98
3. Troisième chapitre.....	98
4. Quatrième chapitre	99
Chapitre 1 :	101
Spécificité de la transmission vectorielle des capulavirus.....	101
Publication numéro 1 :	103
Alfalfa leaf curl virus is transmitted by <i>Aphis craccivora</i> in a highly specific circulative manner ...	103
Chapitre 2 :	139
Caractéristiques du cycle de transmission de l'ALCV par le puceron <i>Aphis craccivora</i>.....	139
Publication numéro 2 :	141
Alfalfa leaf curl virus is efficiently acquired by its aphid vector <i>Aphis craccivora</i> but inefficiently transmitted.....	141
Chapitre 3 :	178
Etude de la co-acquisition et de la co-transmission d'un nanovirus et d'un géminivirus par le même puceron vecteur	178
Publication numéro 3 :	179
Co-acquired nanovirus and geminivirus exhibit a contrasted localization within their common aphid vector.....	179
Chapitre 4 :	205
Recherche d'interactants potentiels des capulavirus avec leur puceron vecteur	205
I. Contexte	207

II. Principe du système double-hybride en levure.....	208
1. Principe général.....	208
2. Principe de la technique classique	208
3. Variante split-ubiquitine.....	210
III. Principe de la sélection sur milieu auxotrophe du kit DUALhunter	212
IV. Protocole de mise en place du système double-hybride split-ubiquitine	212
V. Résultats.....	214
1. Vérification du génotype auxotrophe du clone de levures NMY51	214
2. Construction du plasmide avec le gène de la CP de l'ALCV et vérification de l'expression de la protéine en levure	214
3. Test d'interaction de la CP de l'ALCV avec des protéines contrôles	217
4. Mise au point de la stringence du milieu de criblage.....	217
5. Criblage des interactions entre la CP de l'ALCV et des protéines de <i>Aphis craccivora</i> exprimées par la banque d'ADNc.....	219
6. Contrôle de l'intégration des plasmides de la banque d'ADNc dans les levures transformées	219
7. Identification par séquençage des protéines de <i>Aphis craccivora</i> qui ont potentiellement interagit avec la CP de l'ALCV	223
8. Validation en levure de l'interaction des protéines candidates isolées avec la CP de l'ALCV	223
9. Test de la spécificité de l'interaction des protéines candidates isolées avec un témoin négatif	223
10. Test préliminaire de validation en dehors du système double-hybride levure	226
VI. Discussion.....	226
1. La sphingomyéline phosphodiesterase 4	226
2. La protéine transmembranaire 165	230
3. Le transporteur d'acides aminés proton-dépendant CG1139	232
4. Autres candidats potentiels.....	234
5. Conclusion	237
Discussion générale.....	239
I. Epidémiologie de la transmission des capulavirus par puceron	241
1. Spécificité de la transmission vectorielle des capulavirus	241
2. Efficacité de transmission des capulavirus.....	242
3. Mode de transmission des capulavirus	244
4. Influence des conditions environnementales	245
5. Etiologie de la maladie et adaptation à l'hôte	247
II. Biologie de la transmission des capulavirus	250
1. Des caractéristiques classiques de la transmission par géminivirus	250

2. Tentative d'explication de l'efficacité de transmission relativement faible de l'ALCV	252
Perspectives	257
I. Une menace pour l'agriculture ?	259
II. Un outils pour l'étude des mécanismes d'interaction insecte vecteur / géminivirus.....	260
Annexes	261
I. Matériels et méthodes	263
1. Matériels.....	263
2. Construction de la banque d'ADNc des pucerons.....	266
3. Protocole de vérification du génotype auxotrophe du clone de la levure NMY51.....	266
4. Protocole de construction du plasmide avec le gène de la protéine d'intérêt	267
5. Protocole de vérification de l'expression de la protéine d'intérêt	269
6. Protocole du test d'interaction de notre protéine d'intérêt avec des protéines contrôles....	272
7. Protocole de mise au point de la stringence du milieu de criblage	272
8. Criblage des interactions entre la protéine d'intérêt et les protéines exprimées par la banque d'ADNc.....	273
9. Contrôle de l'intégration des plasmides de la banque d'ADNc dans les levures transformées	274
10. Identification par séquençage des protéines candidates à l'interaction avec notre protéine d'intérêt.....	274
11. Protocole de validation en levure de l'interaction des protéines candidates isolées avec notre protéine d'intérêt	276
12. Protocole de validation en levure de l'interaction spécifique des protéines candidates isolées	276
13. Test préliminaire de validation en dehors du système double-hybride levure	276
Références	279
Liste des communications orales, posters et publications	302

Liste des abréviations et des acronymes

AAP : Acquisition Access Period

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMG : Anterior midgut

ARN : Acide ribonucléique

BET : Bromure d'éthidium

BL : Basal lamina

BtPRPG : Protéine de reconnaissance des peptidoglycanes chez *B. tabaci*

CP : Protéine de capsid

Cpm : Protéine mineure de la capsid

Cub : C-terminale de la protéine ubiquitine

CypB : Cyclophiline B

dpi : Days post infection

dsRNA : ARN double brin

EPG : Electropénétrographie

ephR : Membrane-bound Ephrin receptor

EtOH : Ethanol

FISH : Hybridation in situ en fluorescence

GFP : Green fluorescent protein

GSA : Glande salivaire accessoire

GSP : Glande salivaire principale

HC : Helper component

Hsp70 : Heat shock protein

IAP : Inoculation Access Period

ICTV : Comité International de Taxonomie des Virus

IR : Région intergénique

MAMP : Microbe-associated molecular pattern

MEAM1 : Biotype B Middle East-Asia Minor 1

MED : Biotype Q Méditerranéen ou Mediterranean cryptic species

MGP : Midgut protein

MP : Protéine de mouvement

mTORC1 : Mammalian complex 1 of rapamycin target

NGS : Next Generation Sequencing

NinaC : Neither inactivation nor afterpotential protéine C

NSP : Nuclear shuttle protein

Nub : N-terminale de la protéine ubiquitine

NubG : Moitié N-terminale de la protéine ubiquitine

ORF : Cadre de lecture

P7-1 : Protéine non-structurale

PAT : Proton-associated amino acid transporteur

PBS : Phosphate-buffered saline

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PFA : Paraformaldehyde

PGRP : Protéine de reconnaissance des peptidoglycanes

Pns10 : Protéine non-structurale 10

qPCR : PCR quantitative

RACH : Récepteur nicotinique de l'acétylcholine

Rep : Protéine de réplication

RT : Room temperature

RT* : Read-through clivée

SD : Synthetic Defined medium

SIR : Petite région intergénique

SMase : Sphingomyélinase

SMPD4 : Sphingomyéline phosphodiesterase 4

TB : Corps à transmission

TD : Tubes digestifs

TMEM165 : Protéine transmembranaire 165

TOR : Target of rapamycine

VF : Virus factories

Y2H : Double hybride en levure ou Yeast two hybrid system

Liste des espèces virales et maladies citées

AAV : *Argentina Alfalfa Viruses*

ACMV : *African cassava mosaic virus*

ADD : *Alfalfa dwarf disease*

ADV : *Alfalfa dwarf cytorhabdovirus*

AEV-1 : *Alfalfa enamovirus-1*

ALCV : *Alfalfa leaf curl virus*

AMV : *Alfalfa mosaic virus*

ASFV : *African swine fever virus*

BBTV : *Banana bunchy top virus*

BCTV : *Beet curly top virus*

BLRV : *Bean leafroll virus*

BMV : *Brome mosaic virus*

BWYV : *Beet Western Yellows virus*

BYDV : *Barley yellow dwarf virus*

CABYV : *Cucurbit Aphid-Borne Yellows Virus*

CaMV : *Cauliflower mosaic virus*

CBDV : *Cardamom bushy dwarf virus*

CFDV : *Coconut foliar decay virus*

CHKV : *Chikungunya virus*

CLCuRV : *Cotton leaf curl Rajasthan virus*

CLCuV : *Cotton leaf curl virus*

CMV : *Cucumber mosaic virus*

CoRSV : *Coffee ringspot virus*

CTFV : *Colorado tick fever virus*

CYDV : *Cereal yellow dwarf virus*
DENV : *Dengue virus*
DHOV : *Dhori Virus*
EcmLV : *Euphorbia caput-medusae latent virus*
FBNSV : *Faba bean necrotic stunt virus*
FBNYV : *Faba bean necrotic yellows virus*
FbSLCV : *French bean severe leaf curl virus*
FCO : *Ovine catarrhale fever virus*
CCHFV : *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*
RVFV : *Rift Valley Fever virus*
HIV : *Human immunodeficiency virus*
JcDV : *Junonia coenia densovirus*
JEV : *Japanese encephalitis virus*
LIYV : *Lettuce infectious yellows virus*
ONNV : *O' nyong nyong virus*
ORUV : *Orungo virus*
PEMV : *Pea enation mosaic virus*
PeWBVYV : *Pepper whitefly-borne vein yellows virus*
PGSV : *Passion fruit green spot virus*
PILV : *Plantago lanceolata latent virus*
PLRV : *Potato leafroll virus*
PVY : *Potato virus Y*
RDV : *Rice dwarf virus*
RGDV : *Rice gall dwarf virus*
RGSV : *Rice grassy stunt virus*
SbDV : *Soybean dwarf virus*
SCSV : *Subterannean clover stunt virus*

SINV : *Sindbis virus*

SRBSDV : *Southern rice black-streaked dwarf virus*

TGMV : *Tomato golden mosaic virus*

THOV : *Thogoto virus*

TLCV : *Tobacco leaf curl virus*

TMV : *Tobacco mosaic tobamovirus*

ToLCNDV : *Tomato leaf curl New Delhi virus*

TSWV : *Tomato spotted wilt virus*

TUYV : *Turnip yellows virus*

TYLCCNV : *Tomato yellow leaf curl China virus*

TYLCSV : *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus*

TYLCV : *Tomato yellow leaf curl virus*

VSV : *Vesicular stomatitis virus*

WNV : *West Nile virus*

YFV : *Yellow Fever virus*

ZIKV : *Zika virus*

Liste des figures et tableaux

Introduction

- Figure 1.** Schéma des différentes voies de transmission des virus de vertébrés
- Figure 2.** Schéma des différentes voies de transmission des phytovirus
- Figure 3.** Illustration de quelques représentants des vecteurs d'arbovirus de vertébrés
- Figure 4.** Illustration de quelques représentants des vecteurs d'arbovirus de plantes
- Figure 5.** Phylogénie datée du super-ordre des Hemipteroïdes (Paraneoptera) qui contient notamment l'ordre des Hémiptères
- Figure 6.** Planche de dessins des familles représentatives des hémiptères
- Figure 7.** Cycle de développement (holocycle) et de reproduction des pucerons
- Figure 8.** Organisation des pièces buccales d'un moustique
- Figure 9.** Schéma anatomique des organes du moustique en lien avec la transmission virale
- Figure 10.** Schéma de l'organisation tissulaire d'une plante dicotylédone
- Figure 11.** Schéma de l'organisation des pièces buccales d'un puceron
- Figure 12.** Anatomie du système digestif des hémiptères
- Figure 13.** Organisation cellulaire des glandes salivaires principales et accessoires de puceron
- Figure 14.** Trajet des stylets du puceron dans les tissus de la plante
- Figure 15.** Illustration du mode de transmission non-circulant des hémiptères
- Figure 16.** Extrémité des stylets maxillaires du puceron, l'acrostyle, récepteur des virus non-circulants
- Figure 17.** Représentation schématique du mode de transmission circulant propagatif chez les cicadelles
- Figure 18.** Trajet du lutéovirus barley yellow dwarf virus (BYDV) dans le corps de son puceron vecteur
- Figure 19.** Schéma de l'organisation génomique des virus de la famille *Nanoviridae*
- Figure 20.** Localisation par immunofluorescence du banana bunchy top virus dans les intestins et glandes salivaires du puceron *Pentalonia nigronervosa*
- Figure 21.** Organisation génomique des différents genres de la famille *Geminiviridae*
- Figure 22.** Hémiptères vecteurs des virus appartenant aux différents genres de la

famille *Geminiviridae*

Figure 23. Circulation du TYLCV dans son insecte vecteur, l'aleurode *Bemisia tabaci*

Figure 24. Photo en microscopie électronique à transmission d'une purification des virions de l'euphorbia caput-medusae latent virus à partir d'un plant de *Nicotiana benthamiana* infecté par agro-inoculation

Figure 25. Arbres phylogénétiques des séquences du génome complet, et de la protéine de capsidite d'isolats représentatifs dans les genres de la famille *Geminiviridae*

Figure 26. Symptômes sur luzerne et fève probablement associés à une co-infection avec l'ALCV

Figure 27. Planche de symptômes observés sur des plantes infectées par un capulavirus

Figure 28. Espèces de pucerons décrites comme vectrices de capulavirus

Figure 29. Schéma récapitulatif des connaissances sur les quatre espèces de capulavirus

Figure 30. Illustration de la résistance à la sécheresse de la luzerne

Figure 31. Carte de l'Europe, du Moyen-Orient, et de l'Amérique du Sud indiquant les différentes routes et les dates approximatives de dispersion de la luzerne cultivée à partir de son centre d'origine présumé

Figure 32. Stades de développement de femelles parthénogénétiques de l'espèce *Aphis craccivora* appartenant à une population trouvée sur *Robinia pseudoacacia*

Chapitre 1 : Spécificité de la transmission vectorielle des capulavirus

Figure 1. Neighbor joining tree showing the genetic distances among members of the *Aphis craccivora* group and members of related species, based on the cytochrome oxidase 1 gene

Figure 2. Box-plots showing the amount of ALCV DNA in vector aphids (*Aphis craccivora* Robinia) and non-vector aphids

Figure 3. Box-plots showing amount of ALCV DNA in the midgut, head, and hemolymph in vector aphids (*Aphis craccivora* Robinia) and non-vector aphids

Figure 4. Localization of ALCV DNA by FISH in dissected anterior midguts of vector and non-vector aphids of ALCV

Figure 5. Density plots showing the frequency distribution of section areas of fluorescent ALCV-specific aggregates observed in dissected midguts and salivary glands of vector and

non-vector *Aphis craccivora* aphids

Table 1. Transmission tests of three capulaviruses with aphids of various species.

Table 2. Detection of compatible plant/aphid/capulavirus trios to assess the transmission specificity of capulaviruses by aphids

Table 3. Transmission tests of ALCV with *Aphis craccivora* populations

Table 4. Frequency of midgut and salivary glands in which ALCV-specific aggregates were detected by FISH in vector and non-vector aphids

Supplementary Figure 1. Morphological comparisons between specimens of a population of *Aphis craccivora sensu stricto* and specimens of a euphorbia population of black-backed South African aphids

Supplemental Table 1. Description of aphid species and populations used in this study and associated references.

Chapitre 2 : Caractéristiques du cycle de transmission de l'ALCV par le puceron *Aphis craccivora*

Figure 1. Histological localization of ALCV DNA in plants tissues by FISH

Figure 2. EPG design, and *Aphis craccivora* feeding behavior associated with ALCV acquisition

Figure 3. Kinetics of ALCV accumulation in *Aphis craccivora*

Figure 4. Transmission rate of ALCV by *Aphis craccivora* individuals and relationship with their viral amount (a) and the number of individuals per test plant (b)

Figure 5. Relationship between AAP duration and transmission rate of ALCV by *Aphis craccivora*

Figure 6. ALCV persistence in *Aphis craccivora* cellular compartments

Table 1. Description of the seven transmission tests designed to estimate the minimum latency and inoculation periods

Table 2. Comparing the fitness of *Aphis craccivora* individuals that acquired ALCV to that of non-infected individuals

S1 Table. Description of the eight transmission tests designed to estimate the transmission rate of ALCV by *Aphis craccivora* as a function of the number of individuals per test plants

Chapitre 3 : Etude de la co-acquisition et de la co-transmission d'un nanovirus et d'un géminivirus par le même puceron vecteur

Figure 1. Localization of FBNSV and ALCV DNA in broad bean host plants

Figure 2. Accumulation of FBNSV and ALCV in aphid vectors

Figure 3. Localization of ALCV and FBNSV DNA in anterior midgut cells of *Aphis craccivora*

Table 1. FBNSV and ALCV DNA detection in broad bean leaf discs after aphid inoculation

Table 2. Co-transmission testing of FBNSV and ALCV

Chapitre 4 : Recherche d'interactants potentiels des capulavirus avec leur puceron vecteur

Figure 33. Schéma du système double-hybride classique

Figure 34. Schéma représentant le fonctionnement du système double-hybride split ubiquitine en levure dans le kit DUALhunter

Figure 35. Test de l'auxotrophie du clone de levure NMY51

Figure 36. Révélation en western-blot de l'expression des protéines de fusion ost4-pDHB1 CP-Cub-LexA-VP16 (à gauche) et ost4-pDHB1 LargeT-Cub-LexA-VP16 (à droite) en levure transformées avec le plasmide pDHB1-CP et pDHB1-LargeT

Figure 37. Test de l'interaction de l'appât avec différentes protéines proies sur milieu SD-TL, SD-TLH et SD-TLHA

Figure 38. Test de stringence en fonction de la concentration en 3-AT dans le milieu SD-TLH

Figure 39. Exemple de résultats obtenus lors du criblage de la banque d'ADNc d'*Aphis craccivora* face à la protéine appât

Figure 40. Exemple de gel d'électrophorèse d'une PCR réalisée sur les clones de levure issue du criblage sur milieu SD-TLHA

Table 1. Résultats de séquençage des plasmides de la librairie qui expriment les protéines candidates à une interaction avec l'appât

Table 2. Plasmides de la librairie détectés plusieurs fois dans le criblage

Table 3. Test de croissance sur milieu SD-TLHA de levures contenant la CP de l'ALCV suite à leur transformation avec des plasmides candidats de la librairie, préalablement isolés en bactérie

Table 4. Test de la spécificité de l'interaction des protéines candidates avec la CP de l'ALCV

en utilisant le plasmide pDHB1-LargeT comme contrôle négatif

Figure 41. Observation en microscopie confocale du co-marquage de l'ADN de la CP de l'ALCV et de la TMEM 165 marquée avec des anticorps anti-TMEM165 humaine dans les cellules épithéliales de l'intestin antérieur moyen du puceron *Aphis craccivora*

Figure 42. Aperçu des interactions entre les virus et la voie des sphingolipides

Figure 43. Représentation schématique de la topologie de la protéine TMEM165 prédite dans la cellule membranaire

Figure 44. Schéma de l'activation de la voie mTORC1 (mammalian complex 1 of rapamycin target) par PAT (Proton associated Amino acid Transporteur) qui correspond à notre candidat

Table 5. Caractéristiques des protéines de *Aphis craccivora* qui ont été identifiées comme candidates pour une interaction avec la CP de l'ALCV

Avant-propos

En 2006, le comité international de taxonomie des virus (ICTV) répertoriait 766 espèces de virus infectant les plantes contre près du double aujourd'hui (10^{ème} rapport de l'ICTV). Cette augmentation récente est vraisemblablement liée pour une certaine part aux activités humaines qui engendrent une exposition croissante des écosystèmes cultivés à de nouveaux virus et vecteurs (Jones, 2009). On peut citer par exemple l'accroissement des échanges commerciaux ou l'évolution des agroécosystèmes en lien avec la déforestation, la réduction de diversité des plantes cultivées et leur monoculture. Le changement climatique, par son impact sur les niches écologiques des organismes, peut révéler de nouveaux virus (Anderson, 2014). Cependant, la raison majeure de la découverte accrue de nouveaux virus au cours des dix dernières années est liée aux progrès du séquençage à haut débit (NGS - Next Generation Sequencing) et au développement de la métagénomique virale (Stobbe et Roossinck, 2014). Par le passé, les maladies causées par des virus étaient toujours découvertes avant la description de leur agent causal. Par exemple, on retrouve des traces écrites de la présence de la poliomyélite dans l'Égypte ancienne, 3700 ans avant J.C., alors que le virus lui-même ne fût associé aux symptômes qu'en 1909 par Landsteiner and Popper. Les virus qu'il restait à découvrir étaient en général ceux qui, par absence d'induction de maladie, n'avaient pas attiré l'attention. Il serait cependant imprudent de considérer que leur potentiel de nuisance serait absent dans un contexte de changement continuels des agroécosystèmes et de l'augmentation des activités humaines. De plus en plus, la découverte de nouveaux virus n'est plus nécessairement initiée par une pathologie particulière mais résulte des opérations de sondage sans a priori dans des agroécosystèmes. Cette nouvelle façon d'aborder les microorganismes a le mérite de ne plus les considérer nécessairement comme des nuisibles mais comme des êtres vivants occupant une niche écologique dans un agroécosystème. Ceci étant dit, ce nouveau regard sur les microorganismes n'élimine pas l'existence de nuisances potentielles pour les hôtes (Mokili, 2012). Elle appelle à une vigilance d'autant plus grande que la description de ces nouvelles séquences virales ne donne que peu d'informations sur leur pouvoir pathogène. Pour estimer le risque réel que représente ces virus pour l'agriculture, il est nécessaire de les caractériser sur le plan biologique, et notamment de déterminer leur prévalence, leur gamme d'hôte et leur mode de transmission.

La famille *Geminiviridae* représente le premier groupe viral en nombres d'espèces et en importance économique chez les phytovirus (Inoue-Nagata, 2016). D'ailleurs, les toutes premières traces écrites d'une maladie causée par un phytovirus faisait déjà mention d'un géminivirus, le tobacco leaf curl virus (TLCV) (Osaki, 1985). Cette maladie est décrite dans un recueil de poème de 752 avant J.C par l'impératrice japonaise Kōken qui fait état de symptômes de jaunisse sur *Eupatorium lindleyanum* (Van der Want and Dijkstra, 2006) :

*Dans ce village
Il semble geler en continu
Car la plante que j'ai aperçu
Dans le champ en été
Déjà jaunissait*

Des millénaires plus tard, de nouvelles espèces de géminivirus continuent d'être découvertes à la fois par la présence de symptômes et par les techniques de séquençage à haut débit sans à priori. En 2013, plusieurs nouvelles espèces de géminivirus très divergentes ont été découvertes par métagénomique. Ces séquences sont maintenant regroupées au sein d'un nouveau genre viral nommé *Capulavirus*. Plus encore que leur organisation génomique ou leur divergence de séquence, la particularité des capulavirus tient à la nature de leur insecte vecteur. Auparavant, les hémiptères vecteurs de géminivirus étaient connus pour appartenir aux familles des Cicadellidae (Kvarnheden, 2016 ; Varsani, 2014a ; Varsani, 2014b), Aleyrodidae (Czosnek, 2012), et Membracidae (Kumar, 2019). La démonstration de la transmission de deux capulavirus par des pucerons (Aphididae) a élargi la gamme connue des vecteurs de géminivirus (Roumagnac, 2015 ; Susi 2017).

Mon projet de thèse est né de l'originalité de la vection de ces géminivirus par pucerons. En effet, alors que des maladies causées par des géminivirus ont été décrites il y a plus d'un siècle, comment pouvait-on expliquer que les géminivirus transmis par puceron - le groupe d'hémiptères qui transmet le plus de virus de plante - n'ont été découverts fortuitement que récemment au bénéfice de recherches en métagénomique virale. L'importance économique de ces géminivirus transmis par puceron était à établir et leurs caractéristiques épidémiologiques à définir. La découverte d'un tout nouveau genre de géminivirus m'a amené à répondre à trois questions élémentaires : Quelle est la spécificité de transmission par vecteur des capulavirus ? Cette transmission est-elle efficace ? Suit-elle les mêmes caractéristiques que celles des géminivirus transmis par d'autres vecteurs ? La résolution de ces questions a structuré ma thèse qui d'une part s'est attachée à décrire les paramètres de la transmission des capulavirus (Chapitres 1 et 2) et d'autre part à tirer bénéfices du modèle puceron pour tenter d'améliorer

nos connaissances sur les mécanismes d'interaction entre les géminivirus et leurs insectes vecteurs (chapitres 3 et 4). Le **premier chapitre** est consacré à la **spécificité de transmission** vectorielle des capulavirus. Le **deuxième chapitre** décrit les **caractéristiques majeures de la transmission** des capulavirus. La singularité de la découverte tardive de géminivirus transmis par puceron m'a incité à les comparer aux nanovirus, des virus de même nature génomique que les géminivirus, mais dont seuls les pucerons ont été décrits comme vecteurs. Grâce à un puceron, à la fois vecteur d'un capulavirus et d'un géminivirus, j'ai pu comparer leurs **voies de circulation au sein des mêmes individus**. Cette comparaison est décrite dans le **troisième chapitre**. Le **quatrième chapitre** est consacré à la recherche d'**intéreactants protéiques** entre un capulavirus et son insecte vecteur en vue de la découverte de potentiels récepteurs impliqués dans la transmission des capulavirus et éventuellement des géminivirus de manière générale. Enfin, je clôturerai ce manuscrit par une discussion sur les perspectives de la transmission des géminivirus par puceron d'un point de vue épidémiologique et l'apport global des connaissances acquises sur ce nouveau genre viral.

Introduction

La transmission des virus par insectes étant au cœur de mon sujet de thèse, j'ai souhaité rapprocher dans mon introduction les connaissances qui existent entre la transmission des virus de plantes et celles des virus de vertébrés. Les nombreux parallèles me paraissent non seulement enrichissants pour le lecteur, mais reflètent aussi le parcours que j'ai réalisé entre mon stage de fin d'étude à l'Institut Pasteur et mon arrivée en thèse au CIRAD. A la suite de cela, je vous inviterai à me suivre sur les traces de la découverte des géminivirus transmis par pucerons, les capulavirus, afin de percer les enjeux fondamentaux et épidémiologiques de ma thèse.

I. Définition d'un virus

Un virus est généralement constitué d'un ensemble d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique, de type ARN (acide ribonucléique) ou ADN (acide désoxyribonucléique), à l'exception des mimivirus et des cytomégalovirus qui possèdent un génome composé d'ADN et d'ARN (Huang et Johnson, 2000 ; Raoult, 2004). Ces molécules sont isolées dans une coque protectrice éventuellement enveloppée d'une couche de (lipo) protéines. Cette entité est incapable de croître en taille, en volume ou de subir des divisions binaires pour se multiplier. Elle doit nécessairement se multiplier (se répliquer) en exposant son génome à la machinerie cellulaire de son hôte qui lui permettra de synthétiser et assembler ses constituants. On comprend très vite, qu'un virus en dehors de son hôte est inerte, et voué à la dégradation. Son parasitisme cellulaire obligatoire exerce une contrainte forte sur sa capacité à se maintenir dans un environnement cellulaire vivant. Les hôtes n'étant pas éternel, son défi majeur est de se déplacer dans un nouvel hôte, avant que celui qui l'héberge ne meurt. Cette étape critique est appelée transmission.

II. Voies de transmission des virus

Les virus sont présents dans une large gamme d'organismes incluant bactéries, archées, plantes, champignons, animaux et même virus, ces organismes occupant eux-mêmes des niches écologiques très variées (océans, sol, aérosols) (Scola, 2008). Cette diversification d'hôtes et d'environnement les oblige à adapter leurs moyens de transmission à leurs modes de vie. Ici nous comparerons les modes de transmission des virus de vertébrés aux virus de plantes.

1. Chez les vertébrés

Les modes de transmission des virus de vertébrés sont divers (**Fig. 1**). Ils peuvent impliquer des voies d'entrées naturelles (ex : respiratoire, orale, sexuelle), une transmission zoonotique (ex : morsure par un animal infecté, piqûre par un arthropode vecteur), une transmission par voie parentérale (ex : transfusion sanguine), une transmission materno-fœtale (ex : trans-placentaire) ou bien encore plus rarement une transmission mécanique (ex : contact sans blessure) ([Loehle, 1995](#)).

2. Chez les plantes

A contrario, la transmission par contact sans blessure de plante à plante est impossible car les cellules végétales sont entourées d'une paroi rigide pecto-cellulosique, barrière que les virus sont incapables de traverser de manière autonome ([Yarwood, 1957](#)). Certains sont néanmoins transmis de manière mécanique lorsque l'intégrité de cette barrière est brisée (ex : greffage, blessure) ou bien par transmission verticale (ex : graine, pollen, propagation végétative) (**Fig. 2**). L'immense majorité des phytovirus est transmise à une nouvelle plante hôte par l'intermédiaire d'un organisme tiers, appelé vecteur.

III. Vecteurs d'arbovirus

1. Chez les vertébrés

Les principaux vecteurs d'arbovirus de vertébrés, appartiennent à la sous-classe des acariens (ou Acari) comme les tiques (ordre Ixodida), et à la classe des insectes (ou Insecta) en particulier l'ordre des diptères (ou Diptera) (**Fig. 3**). Parmi ces derniers, sont essentiellement concernés les phlébotomes (famille Psychodidae), les culicoïdes (famille Ceratopogonidae) et les moustiques (famille Culicidae).

2. Chez les plantes

Les arthropodes vecteurs de virus de plantes appartiennent également aux groupes des acariens et des insectes. Les acariens phytophages vecteurs de virus appartiennent à l'ordre des Prostigmata, et les familles les plus importantes sont les faux tétranyques (Tenuipalpidae), et les ériophyides (Eriophyidae) ([Chagas, 2003](#) ; [Malagnini, 2016](#)). Chez les insectes, la majorité des vecteurs appartiennent aux ordres des hémiptères (Hemiptera) et des thrips (Thysanoptera).

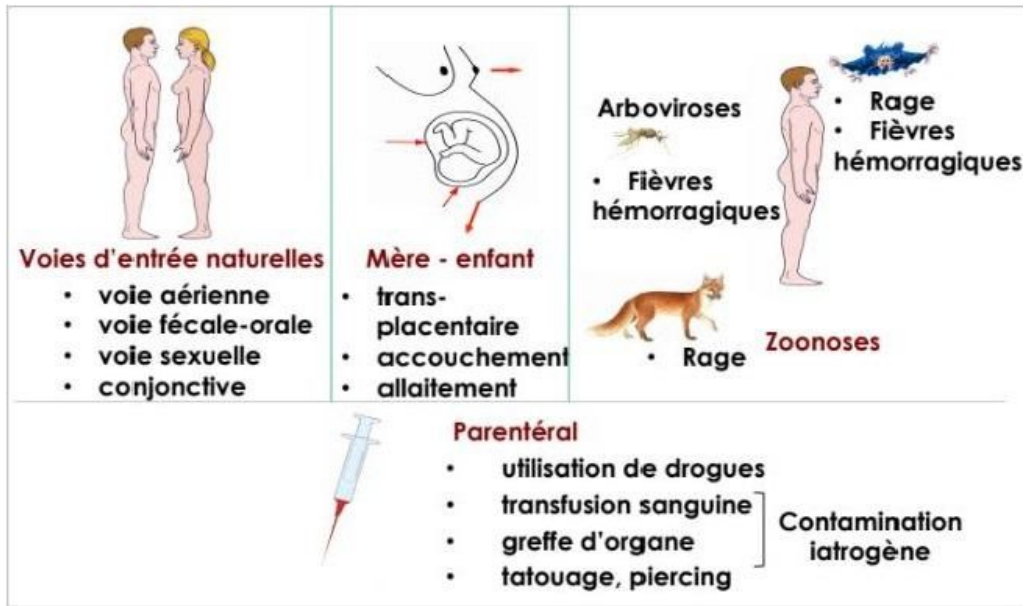


Figure 1 : Schéma des différentes voies de transmission des virus de vertébrés. (Maria Dimitrova et Mario Keller)

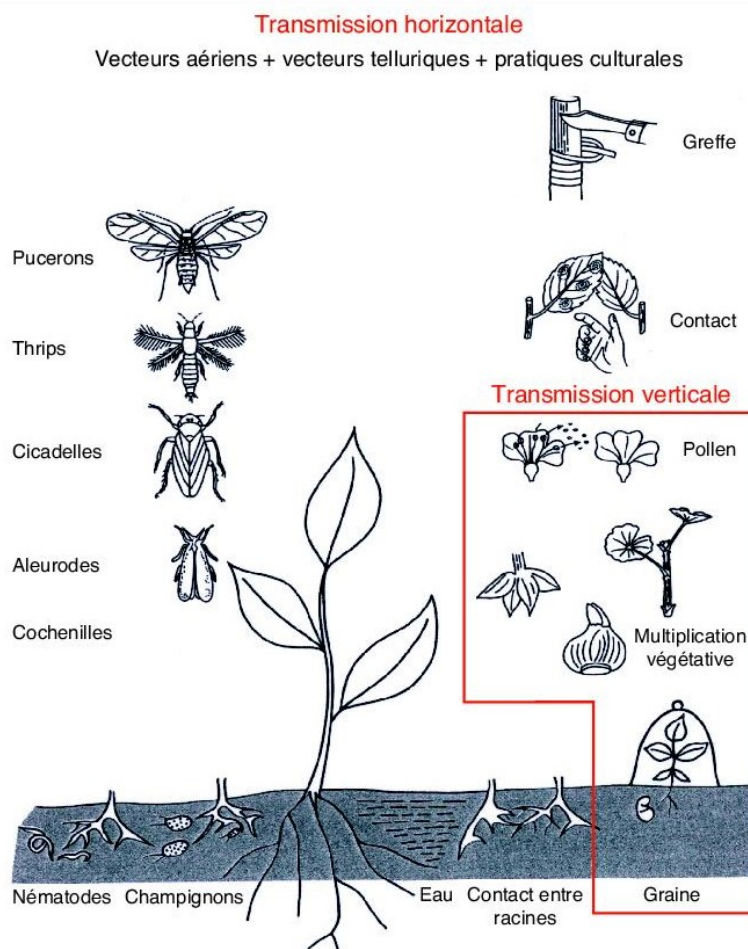


Figure 2 : Schéma des différentes voies de transmission des phytovirus. (Iskra-Caruana, 2003)

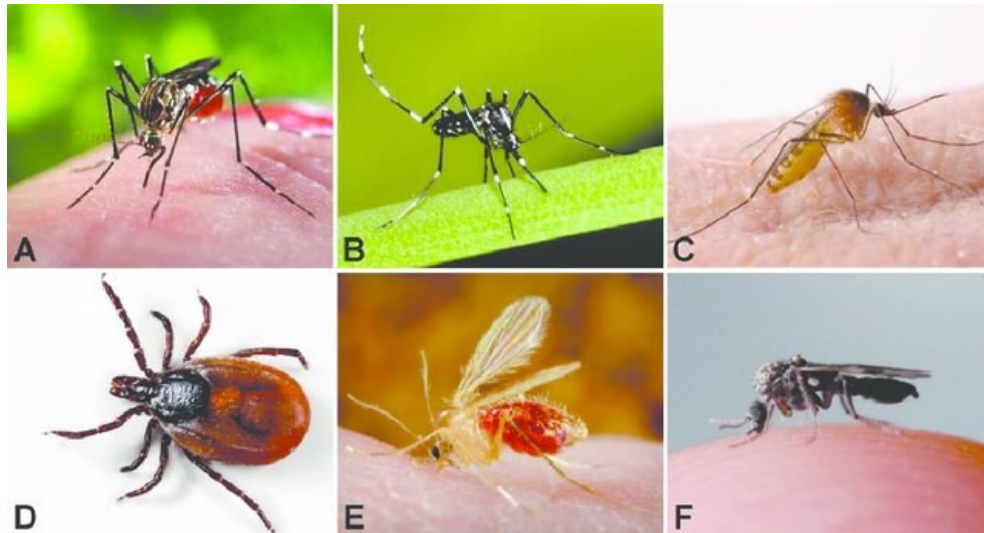


Figure 3 : Illustration de quelques représentants des vecteurs d'arbovirus de vertébrés.

(A) Le moustique *Aedes aegypti* qui transmet le virus de la dengue (DENV), le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus Zika (ZIKV) et le chikungunya (CHIKV). (B) Le moustique *Aedes albopictus* qui transmet sensiblement les mêmes virus que *A. aegypti*. (C) Le moustique *Culex pipiens* est le vecteur du virus du Nil occidental (WNV), de l'encéphalite japonaise (JEV). (D) La tique *Ixodes scapularis* transmet le virus de la méningo-encéphalite à tique (VMET). (E) Le phlébotome *Phlebotomus papatasi* qui transmet plusieurs sérotypes viraux qui causent la fièvre pappataci. (F) Le culicoïde *Culicoides imicola* qui transmet le virus de la fièvre catarrhale (FCO) (CIRAD).

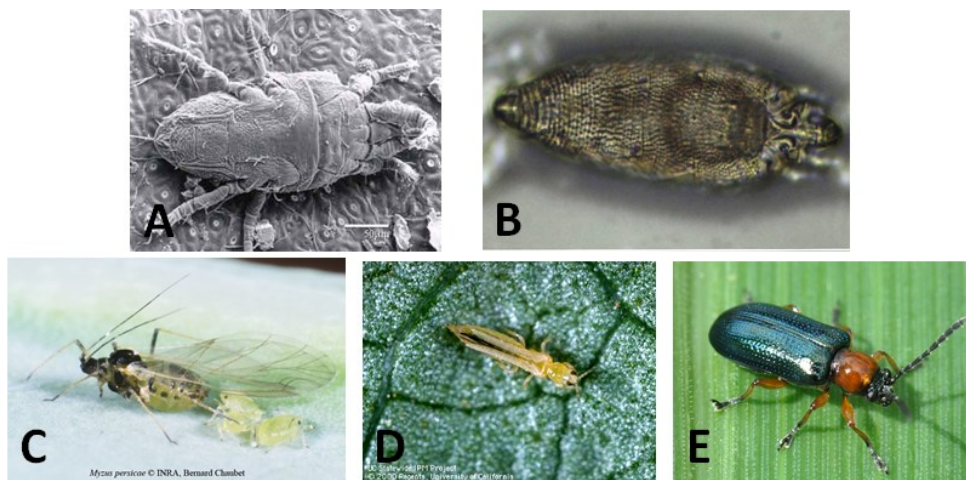


Figure 4 : Illustration de quelques représentants des vecteurs d'arbovirus de plantes.

(A) L'acarieu faux tétranique *Brevipalpus phoenicis* vecteur du coffee ringspot virus (CoRSV) et du passion fruit green spot virus (PFGSV). (B) L'acarieu ériophyide *Colomerus vitis* transmet le grapevine pinot gris virus (GPGV) (photo de J.C Lutrand). (C) Le puceron *Myzus persicae* vecteur de plus de 100 phytovirus. (D) Le thrips *Frankliniella occidentalis* est le vecteur du tomato spotted wilt virus (TSWV). (E) Le léma à pied noir, *Oulema melanopus* est un coléoptère de la famille des Chrysomelidae vecteur du brome mosaic virus (BMV).

De manière occasionnelle les coléoptères (ordre des Coleoptera) sont également décrits comme vecteurs de phytovirus (Herrbach, 2013) (Fig. 4).

IV. Les hémiptères

Les plus nombreux vecteurs de virus de plante appartiennent à l'ordre des hémiptères que nous décrirons ici. Cette partie nous permettra de cerner les divergences évolutives qui séparent les différentes famille d'hémiptères, puisque c'est à ce groupe qu'appartiennent les insectes vecteurs de géminivirus (Conti et Lovisolo, 1984).

1. Taxonomie

Le mot "hémiptère" vient du grec *hémi* (demi) et *pteron* (ailes), et fait référence aux deux structures des ailes supérieures de certains hémiptères (ex : punaises) : coriaces près de la tête et membraneuses près de l'abdomen. L'ordre des hémiptères se caractérise aussi par : i) des pièces buccales piqueuses avec un long rostre articulé ii) l'absence de palpes maxillaires et labiales (organes sensoriels) et iii) des antennes longues. Il se divise en quatre sous-ordres que sont les Heteroptera (punaises), les Coleorrhyncha, et ceux qui nous intéresseront particulièrement à savoir les **Auchenorrhyncha** et les **Sternorrhyncha** (Johnson, 2018) (Fig. 5).

Auchenorrhyncha vient du grec *auchen* (cou), et *rhyncos* (nez). Cela fait référence à la position du rostre de ces insectes, dont l'extrémité est visible à proximité de leur cou. Les Auchenorrhyncha sont subdivisés en deux infra-ordres : les **Fulgoromorpha** (planhoppers) et les **Cicadomorpha**. Chez les Fulgoromorpha, la super-famille Fulgoroidea est la seule à compter des représentants encore vivants dont les **cixiidées** (Cixiidae), les **delphacides** (Delphacidae), et les **fulgores** (Fulgoridae) qui sont des vecteurs de phytovirus (Wefels, 2015 ; Moeini, 2019). Les Cicadomorpha, comptent trois super-familles les **Cercopoidea** (cercopes, spittlebugs or froghoppers), les **Cicadoidea** (cigales, cicadas), et les **Membracoidea**. Des vecteurs de phytovirus sont présents chez les Membracoidea avec les familles **Cicadellidae** (cicadelles, leafhoppers) et **Membracidae** (membracides, treehoppers).

Le deuxième sous-ordre qui nous intéressera ici est les **Sternorrhyncha**, du grec *sterno* (thorax). Combiné à *rhyncos*, cela signifie que l'extrémité du rostre de ces insectes est située à proximité du thorax, au milieu de la première paire de patte.

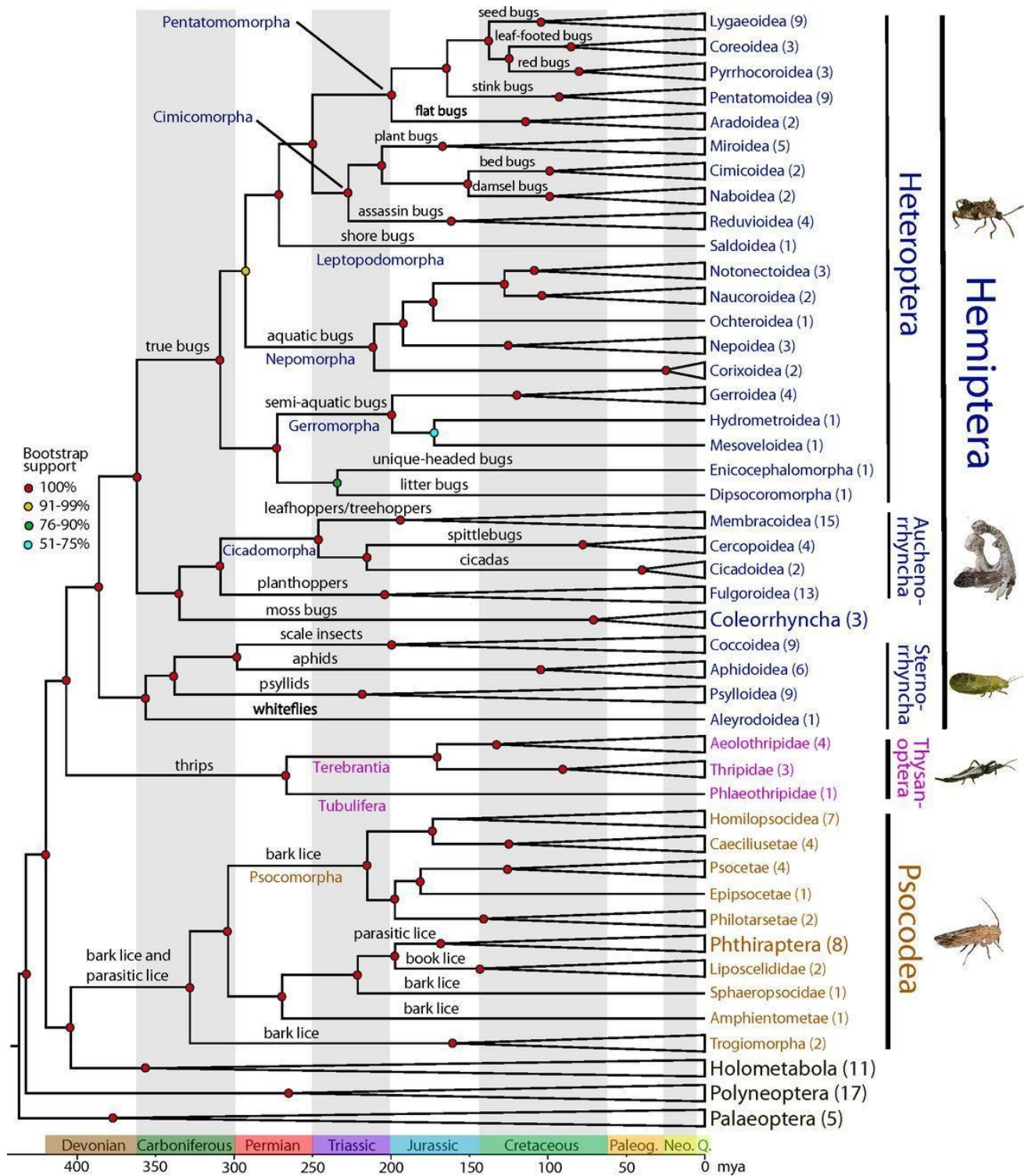


Figure 5 : Phylogénie datée du super-ordre des Hemipteroïdes (Paraneoptera) qui contient notamment l'ordre des Hémiptères. Les couleurs des cercles indiquent la solidité du nœud. L'échelle de temps est en millions d'années (Johnson, 2018).

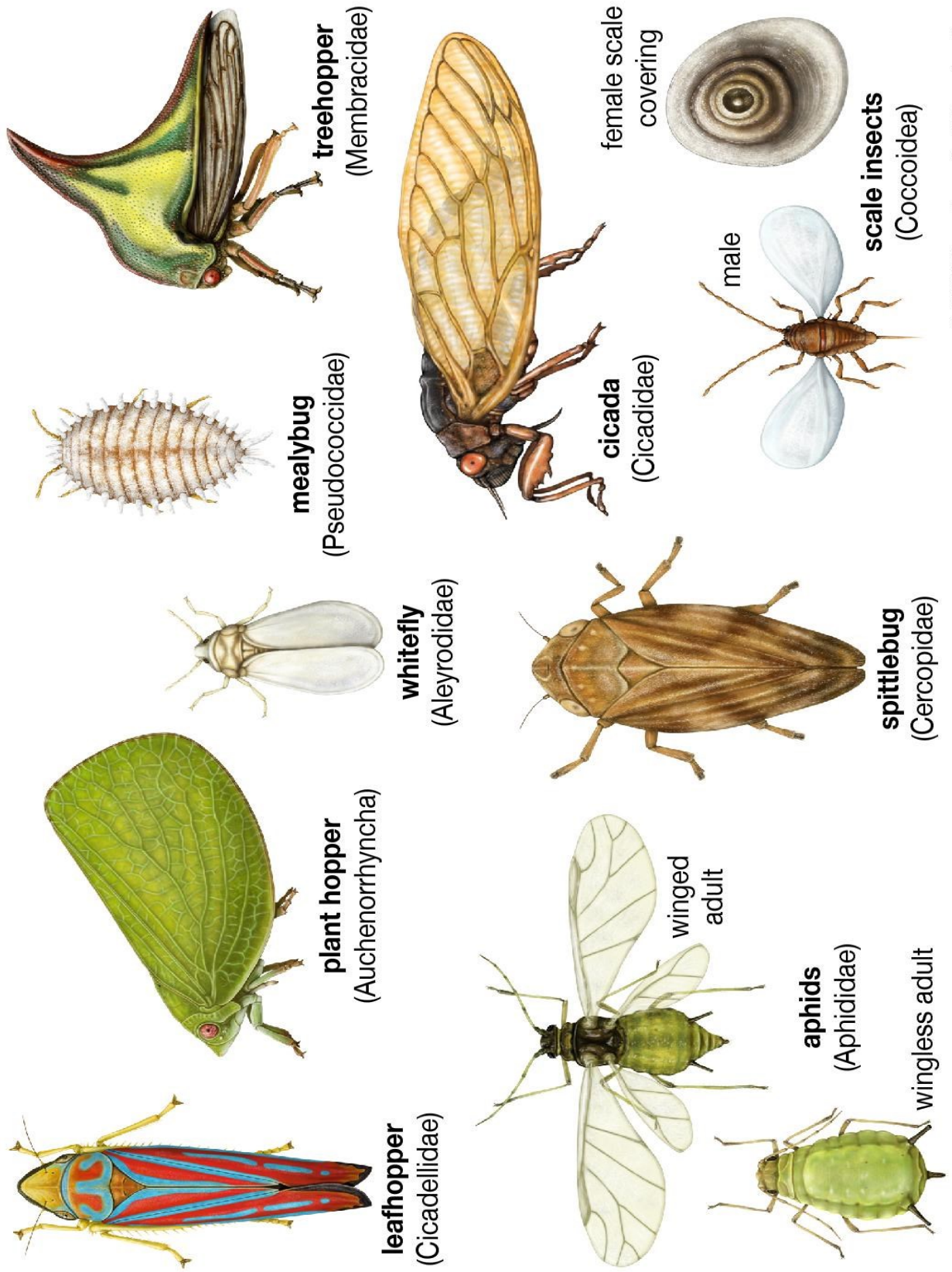
Les insectes appartenant à ce sous-ordre, sont divisés en cinq super-familles : **Aleyrodoidea** (aleurodes, whiteflies), **Aphidoidea** (pucerons, aphids), **Coccoidea** (cochenilles, coccids), **Psylloidea** (psylles, psylloids or jumping-plant lice), **Phylloxeroidea** (adelgids and phylloxerans). Des vecteurs de virus ont été décrits uniquement chez les aleurodes, les pucerons et les cochenilles (Herrbach, 2016). Ainsi, chez les Sternorrhyncha, seuls les insectes appartenant aux super-familles Phylloxeroidea et les Psylloidea ne sont pas décrits à l'heure actuelle comme vecteurs de virus. Néanmoins, certaines espèces de psylles sont connues pour transmettre des bactéries (phytoplasmes ou Liberibacters) ayant un très fort impact en agriculture (ex: Huanglongbing des *Citrus*) (Gottwald, 2010 ; Kumari, 2019).

Les hémiptères vecteurs de géminivirus appartiennent à la fois au sous-ordre des Auchenorrhynques avec les familles **Cicadellidae**, **Membracidae**, et au sous-ordre des Sternorrhyncha avec les familles **Aleyrodidae** et **Aphididae** (Fig. 6). L'histoire évolutive de ces insectes a pu être retracée grâce à la complémentarité de fouilles archéologiques et d'analyses génétiques de l'ARN 18S (Nel 2013). D'après Johnson et al. 2018, les ancêtres des Hemipteroides auraient divergés vers 380 millions d'années pour former les Sternorrhynques, alors que la divergence des Auchenorrhynques se serait opérée plus tard vers 310 millions d'années. La diversification du groupe des hémiptères s'est poursuivie avec le développement des Angiospermes (Vea et Grimaldi, 2016).

2. Traits de vie des hémiptères vecteurs de géminivirus

Les hémiptères ont un développement hétérométabole. Par exemple, la femelle puceron donne naissance à une larve qui lui ressemble et qui va subir quatre stades larvaires avec des mues entre chaque stade, jusqu'à devenir un adulte. Les larves vivent et se nourrissent de la même manière que l'adulte.

Les pucerons, contrairement aux cicadelles, membracides et aleurodes, ont la faculté de produire différents morphes (aptères *versus* ailés) à partir d'un même patrimoine génétique. Ce sont les conditions environnementales qui déterminent les morphes et notamment la densité de population, les conditions climatiques, la photopériode, la présence de prédateurs et la qualité nutritive de l'hôte. La capacité d'exprimer des phénotypes différents à partir d'un même génome est appelé polyphénisme. Plus précisément, pour les membres de la famille Aphididae, il s'agit d'un polyphénisme de dispersion lui permettant d'établir selon le besoin, des colonies aptères qui resteront sur la plante ou des formes ailées pour se déplacer sur de longues distances (Braendle, 2006).



© 2013 Encyclopædia Britannica, Inc.

Figure 6 : Planche de dessins des familles représentatives des hémiptères (Issu de Encyclopedia Britannica).

Tous les hémiptères se reproduisent de manière sexuée. Certains cependant peuvent présenter des phases de reproduction asexuée (parthénogénèse, dite non-obligatoire) (ex: aleurodes, psylles). Les pucerons font figure d'exception car à l'inverse leur reproduction est essentiellement (voire parfois exclusivement) parthénogénétique. Les pucerons sont en effet dotés d'un polyphénisme de reproduction qui leur donne le choix de produire des formes sexuées (mâle ou femelle ovipare) pour produire l'œuf qui survivra à l'hiver, ou bien une forme asexuée (femelle vivipare) pour faire de la parthénogénèse (Simon, 2010). En milieu tempéré, un cycle complet (holocycle) comporte une alternance entre reproduction sexuée et asexuée (Fig. 7). A la fin de l'été, le raccourcissement des jours et donc de la photopériode induit la formation de formes sexuées mâle et femelle qui donneront naissance à un œuf pendant l'automne. Ces œufs vont rester en diapause obligatoire pendant l'hiver. Au début du printemps, les femelles « fondatrices » éclosent pour donner de nouvelles colonies parthénogénétiques. La reproduction par parthénogénèse continue jusqu'à la fin de l'été. Ce mode de reproduction permet une multiplication exponentielle en un laps de temps très court, ce qui peut engendrer des pullulations spectaculaires et très impactantes pour les plantes.

V. Mode d'alimentation et lien avec l'anatomie des organes chez les vecteurs d'arbovirus

Les vecteurs d'arbovirus de vertébrés et ceux de plantes se différencient principalement par leur mode d'alimentation, qui a conduit à l'apparition d'organes spécialisés dans la prise alimentaire chez ces arthropodes.

1. Chez les vertébrés

a. Mode d'alimentation

Chez les vecteurs d'arbovirus de vertébrés, les tiques sont les seules à être hématophage tout au long de leur vie indépendamment du morphe sexuel et de leur stade de développement. Chez les espèces de phlébotomes, de culicoïdes et de moustiques vecteurs seules les femelles sont hématophages. Cette alimentation sanguine après reproduction permet la maturation des œufs. Il n'y a donc que les femelles reproductrices qui sont susceptibles de transmettre des arbovirus. En période de pré-reproduction, les mâles adultes et les femelles sont nectarivores (Harrington, 2001).

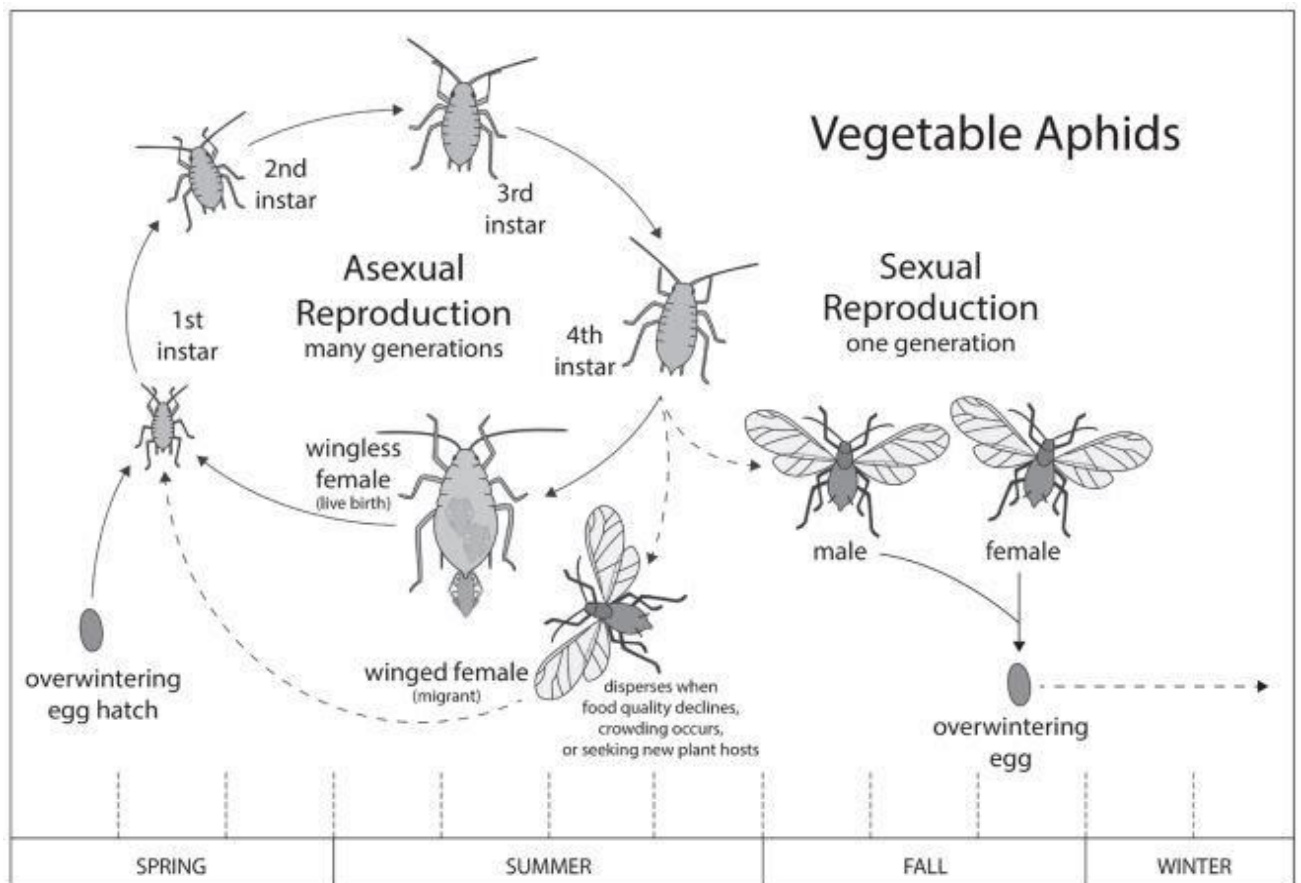


Figure 7 : Cycle de développement (holocycle) et de reproduction des pucerons. De nombreuses espèces vivent sur des plantes ligneuses de l'automne au printemps puis migrent sur des plantes cultivées en été ([Issu de Utah State University](#)).

b. Organes impliqués dans la transmission des virus

i. Pièces buccales

Les pièces buccales des moustiques forment une trompe aussi appelée proboscis. A l'intérieur de cet organe, on distingue les mandibules, les maxilles et le labre qui ont un rôle de perforation (**Figure 8**). Le labre sert aussi chez ces insectes à la sussion du sang. On compte en plus l'hypopharynx qui est creusé d'un canal salivaire. Tous ces organes (ou stylets) contenus dans le proboscis sont entourés par le labium qui forme une gouttière. Le labium ne pénètre pas la peau de l'hôte contrairement aux stylets qu'il renferme (Hudson, 1970).

ii. Tube digestif et glandes salivaires

Chez les moustiques, à la suite des pièces buccales, on trouve dans le canal alimentaire le pharynx, l'œsophage avec deux diverticules dorsaux et un diverticule ventral appelé jabot (**Fig. 9**). Les diverticules servent à accumuler les liquides autres que le sang comme les sucres. Plus en aval, on distingue l'estomac (ou intestin moyen) qui se distend considérablement lors des repas sanguins. La structure de son épithélium change en modulant la forme de plusieurs organites, et en microscopie électronique, des plaques opaques apparaissent dans les cellules (Okuda, 2002). Une structure protéique chitineuse est aussi sécrétée par l'épithélium qui est nommé membrane péritrophique (Kato, 2002). Cette structure n'est pas présente chez le puceron bien qu'elle ait été retrouvée chez d'autres hémiptères comme les cicadelles. Pour l'heure, aucun lien direct avec la transmission virale n'a pu être établi, et elle serait impliquée dans la défense immunitaire au niveau du tractus digestif (Chapman, 1985). Contrairement aux arbovirus de plante, les arbovirus de vertébrés transmis par moustique ne peuvent entrer dans leur vecteur que par l'intestin moyen, et leur entrée n'est possible qu'avant la formation de la membrane péritrophique (Franz, 2015). Enfin, à la jonction entre l'intestin moyen et l'intestin postérieur, débouchent des tubes de Malpighi qui constituent l'appareil sécréteur de l'insecte. L'intestin postérieur est successivement formé par l'iléon, le côlon et l'ampoule rectale puis l'anus.

Un autre organe qui joue un rôle clef dans la transmission des arbovirus de plantes et de vertébré est la glande salivaire. Chez le moustique, elles sont au nombre de deux et sont situées en position latéro-ventrale dans le thorax. Un canal salivaire commun les relie à la face inférieure du pharynx (Coleman, 2007).

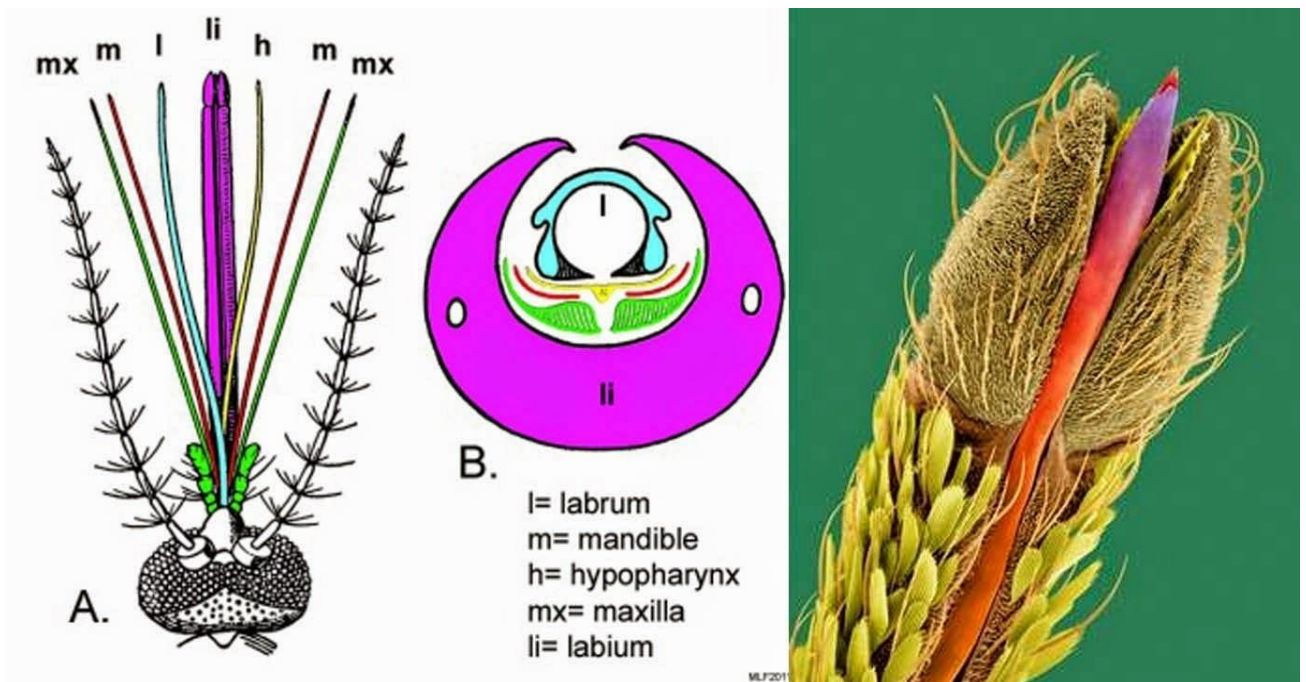


Figure 8 : Organisation des pièces buccales d'un moustique. A droite, schéma en vue longitudinale et transversale des pièces buccales. A gauche, photographie en microscopie électronique à balayage (MEB) colorisée artificiellement.

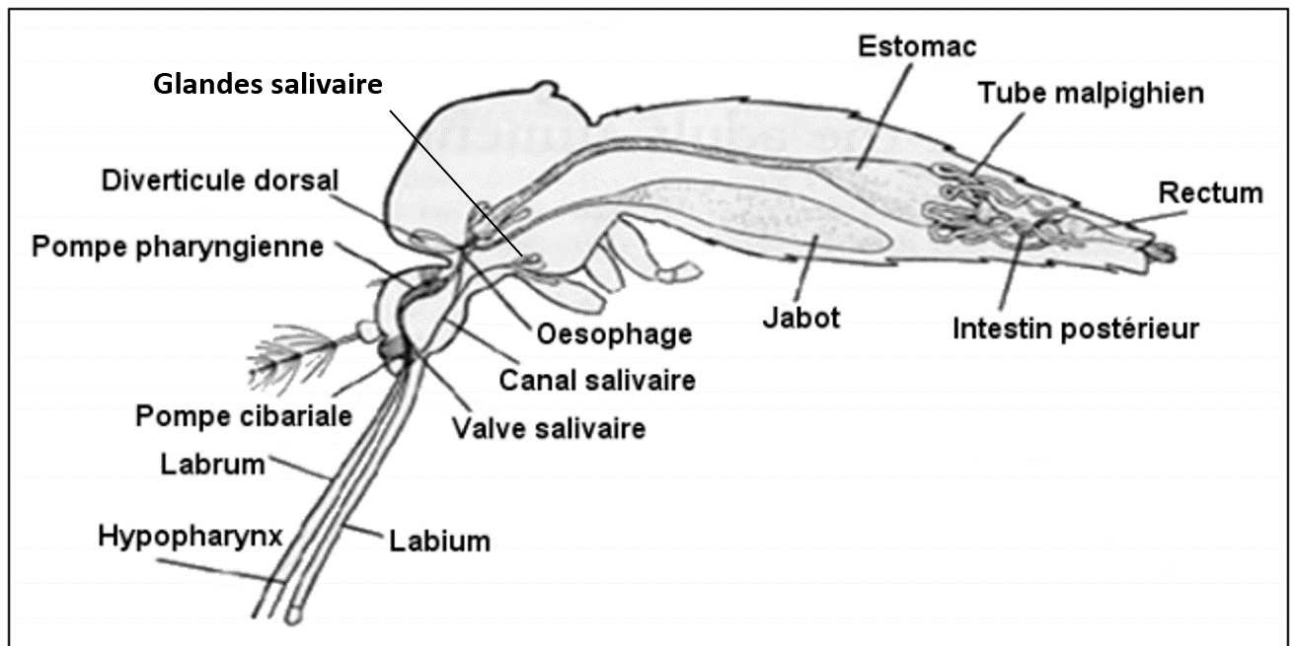


Figure 9 : Schéma anatomique des organes du moustique en lien avec la transmission virale. (Halstead, 2008)

c. Déroulement du repas pour un insecte hématophage

Voyons maintenant comment certains des organes du moustique présentés ci-dessus peuvent intervenir dans la transmission des virus lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Lorsqu'un arthropode vecteur d'arbovirus arrive sur son hôte vertébré, les pièces buccales du vecteur pénètrent la barrière cutanée. Une salive est tout de suite injectée puis le sang est aspiré vers l'œsophage de l'arthropode. Les tiques sont telmophages, c'est-à-dire que les pièces-buccales provoquent la formation d'un micro-hématome à partir duquel l'arthropode aspire le sang. Les moustiques sont eux solénophages, c'est-à-dire qu'ils prélèvent le sang directement dans les capillaires cutanés. Les pièces buccales des moustiques sont allongées et souples leur permettant de sonder les tissus cutanés à la recherche d'un capillaire sanguin et de le cathétériser. Lors d'une acquisition virale, le virus présent dans le sang parvient jusqu'à l'intestin moyen de l'arthropode. A cause de la membrane péritrophique, les virus ne disposent que de quelques heures pour franchir la paroi du tube digestif avant de se répandre dans les autres organes. Le franchissement de la paroi de l'intestin moyen constitue la première barrière appelée barrière d'infection. Si celle-ci est franchie le virus peut se disséminer jusqu'aux glandes salivaires. Une seconde barrière devra être franchie appelée barrière de transmission, elle se situe entre les cellules productrices de salive et le canal salivaire. Si cette seconde barrière est franchie, le virus est excrété dans la salive, lui permettant d'infecter un nouvel hôte. Comme pour la période de latence des arbovirus de plante, on appelle période d'incubation extrinsèque le temps nécessaire au virus pour infecter les glandes salivaires après son arrivée dans l'intestin moyen.

2. Chez les plantes

a. Mode d'alimentation des hémiptères

Le régime alimentaire des vecteurs de virus de plante est de type « broyeur » ou « piqueurs-suceurs ». Par conséquent, leurs organes et en particulier leurs pièces buccales sont adaptées à la prise alimentaire dans les différents tissus de la plante.

b. Organisation des tissus d'une plante dicotylédone

Pour comprendre comment se déroule la phase d'alimentation chez les hémiptères, je rappelle ici brièvement quelle est l'organisation tissulaire des dicotylédones, puisque ce sont les plantes qui sont infectées par les virus que j'ai étudié (**Fig. 10**).

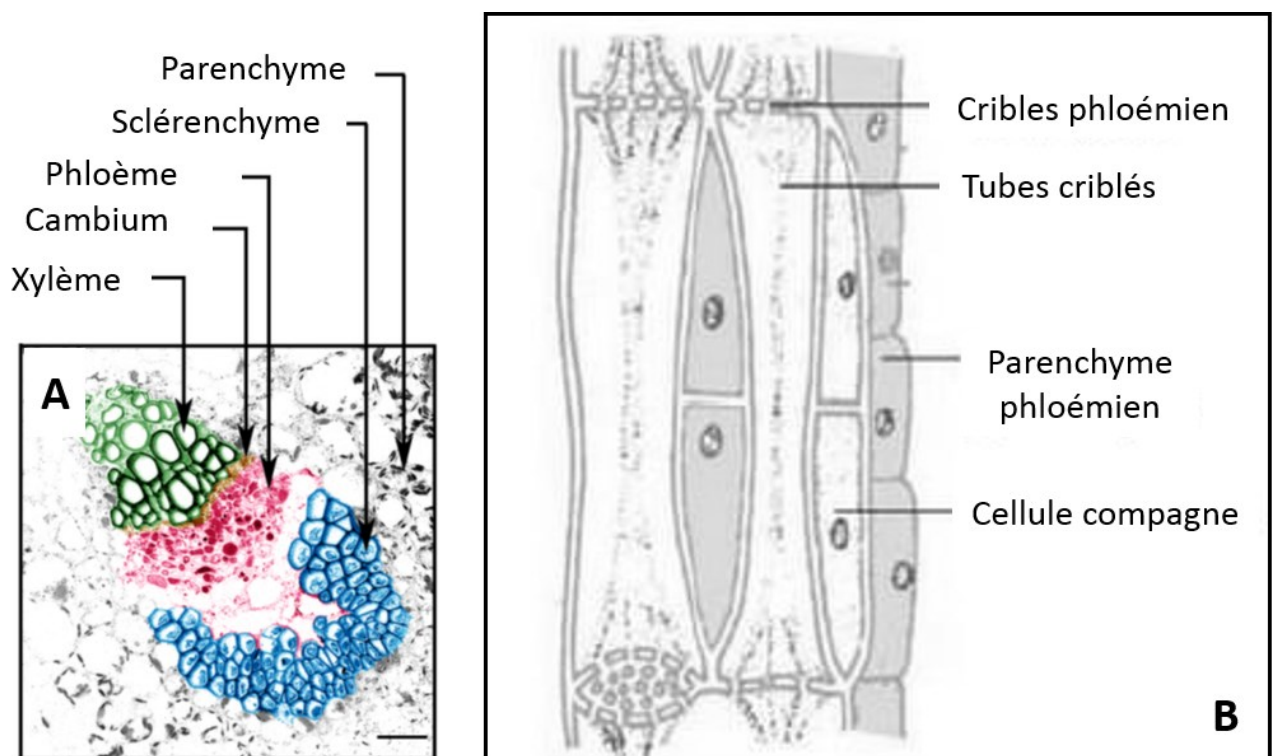


Figure 10 : Schéma de l'organisation tissulaire d'une plante dicotylédone. (A) Coupe anatomique transversale de pétiole de *Vicia faba* (fève). (B) Schéma d'une coupe transversale dans les tissus du phloème d'une dicotylédone.

La première couche de cellule de la plante qui la sépare de l'extérieur est l'épiderme. En dessous ce localise une zone appelée mésophylle qui contient les cellules du parenchyme. On trouve aussi des cellules de soutien appelées sclérenchyme, qui entourent les faisceaux vasculaires où circule les deux types de sève. Dans ces faisceaux vasculaires, on distingue le xylème qui conduit la sève brute, essentiellement composée d'eau et de sels minéraux, des tissus du phloème où circule la sève élaborée (Spanner, 1958). C'est cette dernière qui nous intéressera le plus puisque les pucerons se nourrissent le plus clair de leur temps de cette sève pour son contenu en sucres et en acides aminés. Plusieurs types cellulaires constituent le tissu phloémien. La sève élaborée circule dans les cellules des tubes criblés. Ce sont des cellules allongées qui ne contiennent pas de noyau mais qui sont perméables à leurs extrémités par des pores, aussi appelés cribles. Les cellules compagnes sont des cellules nucléées accolées aux tubes criblés. Il existe de nombreux plasmodesmes entre une cellule compagne et le tube criblé voisin. Les virus qui circulent dans le flux de la sève élaborée, empruntent ces structures pour pouvoir infecter la plante en systémie (Lucas, 1994). A côté des cellules compagnes, on trouve des cellules du parenchyme phloémien, elles aussi nucléées qui servent de réserve de nutriments. Enfin, le phloème et le xylème sont délimités par une fine couche de cellules indifférenciées appelée cambium (Hutchinson, 1964).

c. Organes impliqués dans la transmission des virus

i. Pièces buccales

Les hémiptères piqueurs-suceurs possèdent un appareil buccal adapté à la ponction de sève des plantes. Nous prendrons ici l'exemple des pucerons puisque notre étude a porté sur ce modèle et qu'ils constituent à l'égard des moustiques pour les arbovirus de vertébrés, les plus nombreux vecteurs de phytovirus (Ng, 2004 ; Marchi, 2018). Leur appareil buccal se compose d'un labium (aussi appelé rostre) qui comme chez les moustiques entoure les stylets. Cette gaine protectrice n'est pas non plus insérée dans la plante lors de la phase d'alimentation, mais à la différence des moustiques, le labium ne se plie pas. Par conséquent, il recouvre en permanence les stylets (Fig. 11). On compte dans le labium, une paire de stylets mandibulaires dans lesquels coulissent une paire de stylets maxillaires. C'est grâce à des mouvements de protraction-rétraction des stylets que le puceron va pouvoir explorer les tissus végétaux, jusqu'à ce que l'extrémité de ces stylets finissent par arriver dans leur site d'alimentation (en général le phloème pour les pucerons, plus rarement le xylème). Toute la longueur de la face intérieure des deux stylets maxillaires est sculptée par des crêtes et des rainures qui permettent d'une part de former le

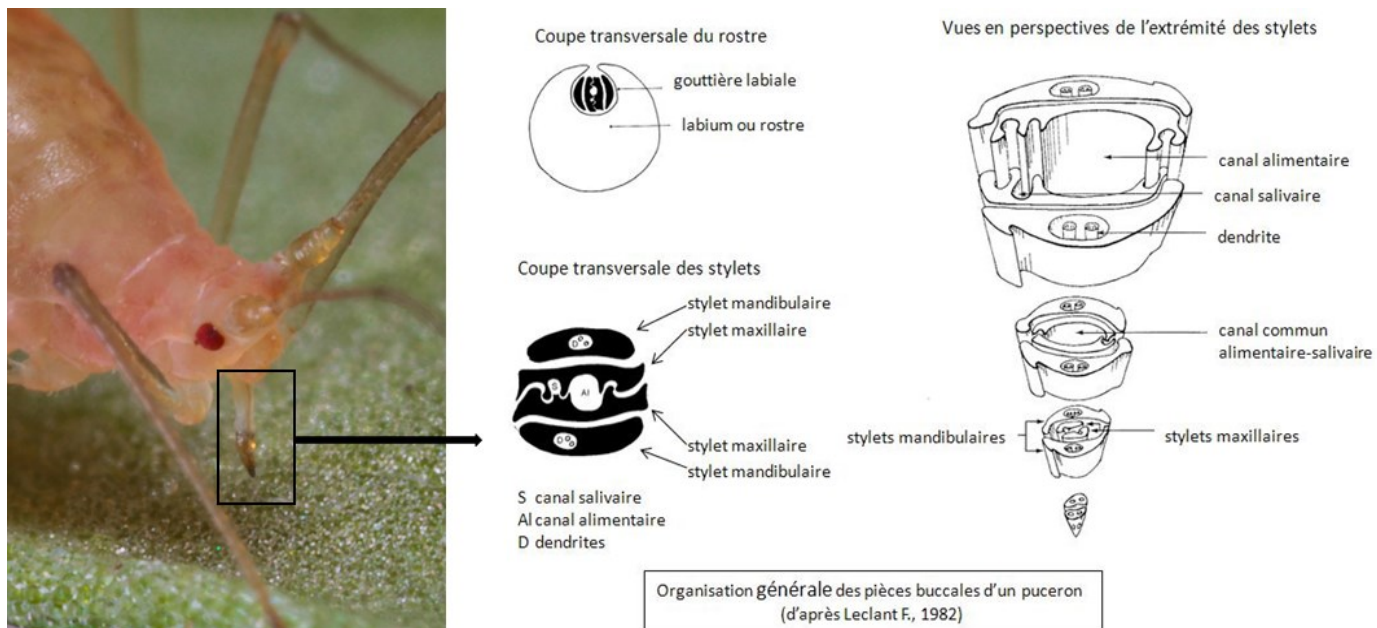


Figure 11 : Schéma de l'organisation des pièces buccales d'un puceron (Leclant, 1982).

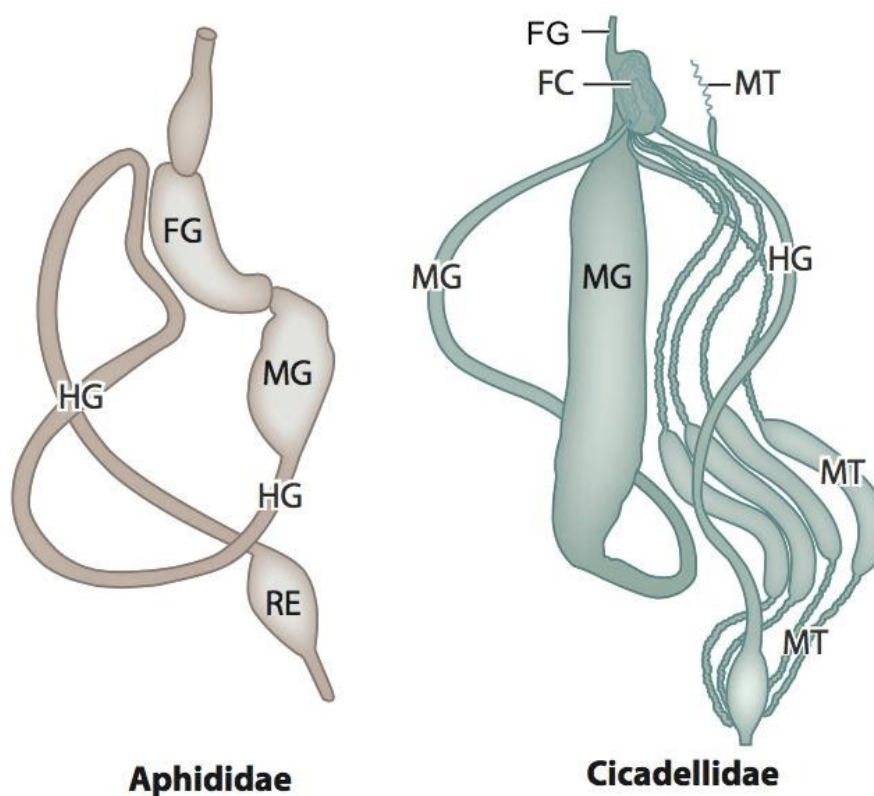


Figure 12 : Anatomie du système digestif des hémiptères (Blanc, 2014). A droite, organisation anatomique du tube digestif d'un puceron et à gauche, organisation anatomique du tube digestif d'une cicadelle. FG : Intestin antérieur ; MG : Intestin moyen ; HG : Intestin postérieur ; RE : Rectum ; MT : Tubules de Malpighi ; FC : Chambre filtrante.

canal alimentaire et le canal salivaire et d'autres part d'emboîter les stylets l'un à l'autre. Les canaux salivaires et alimentaires fusionnent à l'extrémité distale des stylets (Forbes, 1977).

ii. Tube digestif

L'organisation du tube digestif des cicadelles, aleurodes et pucerons est propre à chaque famille d'hémiptère, mais nous nous concentrerons sur celle des pucerons (Fig. 12). A la suite des pièces buccales, apparaît l'intestin antérieur (ou œsophage ou foregut) puis une valve cibariale dont la fonction est d'empêcher le flux-retour du bol alimentaire. S'en suit l'intestin moyen (ou midgut) divisé en une partie antérieure en forme de poche appelée intestin moyen antérieur (ou estomac ou anterior midgut) et une partie postérieure plus tubulaire appelée intestin moyen postérieur (ou posterior midgut). L'intestin moyen postérieur effectue une boucle qui remonte jusqu'à l'intestin moyen antérieur, puis redescend. Ces circonvolutions se poursuivent avec l'intestin postérieur (ou hindgut) avant de redevenir linéaire jusqu'au rectum de l'insecte (Goodchild, 1966).

Puisque les géminivirus dont nous allons parler ont aussi pour vecteur les cicadelles, membracides et aleurodes, je mentionnerai simplement quelques différences marquantes avec le tube digestif des pucerons que je viens de présenter. Globalement, les aleurodes et les cicadelles présentent un tube digestif plus complexe. On retrouve en plus chez ces hémiptères une chambre filtrante, organe impliqué dans la régulation de l'apport en eau de la sève ingérée pour en concentrer les éléments nutritifs. Sur la chambre filtrante des aleurodes, émergent deux petites oreilles nommées caecum, qui permettrait de mieux répartir l'hémolymphe (Ammar, 2017). Enfin, chez tous les hémiptères à l'exception des pucerons et des cochenilles, des tubes de Malpighi sont situés en partie postérieure de l'intestin moyen. A noter qu'il n'y en a que deux chez les aleurodes, hémiptères qui appartiennent aux sternorrhyncha comme les pucerons et les cochenilles. Cet organe a pour fonction l'excrétion, l'osmorégulation et l'immunité chez la plupart des insectes (Beyenbach, 2010).

iii. Glandes salivaires

Tout comme chez les arbovirus de vertébrés, c'est à partir des glandes salivaires que certains arbovirus de plante (transmis par des hémiptères selon le mode circulant, que nous décrirons plus loin), sont excrétés dans la salive du vecteur, provoquant l'infection d'une plante hôte. Les glandes salivaires de tous les hémiptères sont constituées de deux glandes principales (GSP) et de deux glandes accessoires (GSA) (Fig. 13). Néanmoins, les types cellulaires présents dans ces deux paires de glandes salivaires et leur nombre varient en fonction des familles et des

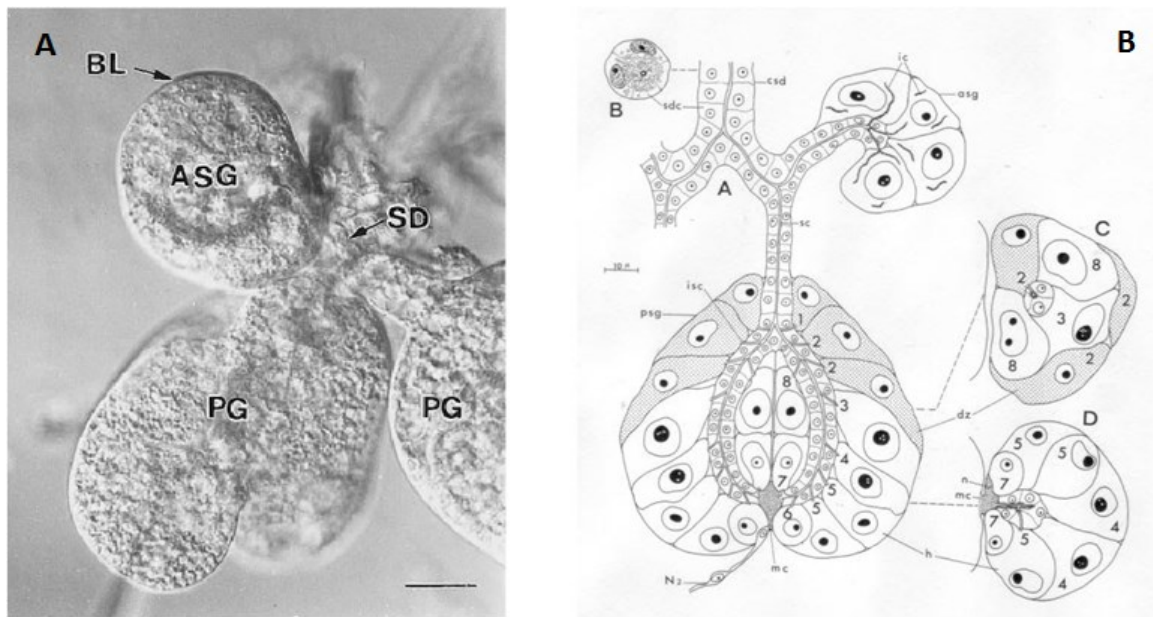


Figure 13 : Organisation cellulaire des glandes salivaires principales et accessoires de puceron (Weidemann, 1968 ; Ponsen, 1992 ; Peiffer, 1997). A droite, une photo en microscopie à contraste de phase des glandes salivaires du puceron *Sitobion avenae* et à gauche schéma des types cellulaires des glandes salivaires de *M. persicae*. PG : Glandes salivaires principales ; ASG : Glandes salivaires accessoires ; SD : canal salivaire

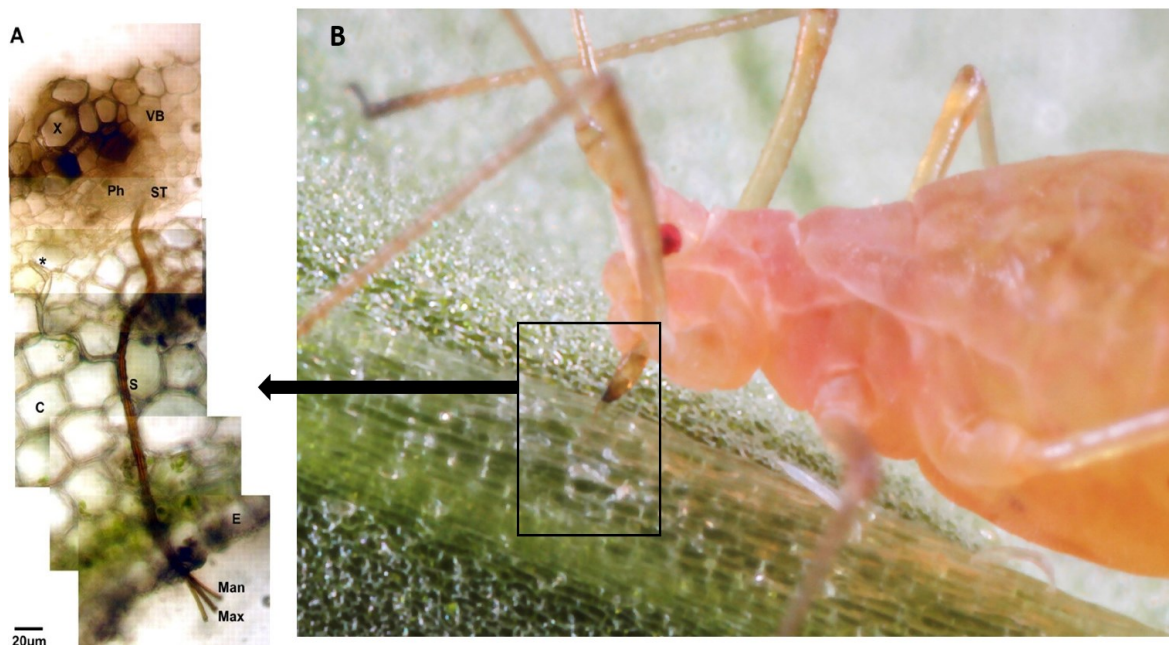


Figure 14 : Trajet des stylets du puceron dans les tissus de la plante (A) Observation en microscopie optique du trajet des stylets du puceron *Megoura viciae* dans *V. faba* (Hewer, 2011). (B) Photographie du puceron *Acyrthosiphon pisum* lors de la prise d'un repas sur *V. faba* (crédit : Bruno Serrate, INRAE CBGP).

espèces d'hémiptères concernés (Ponsen, 1992). Les GSP produisent la salive gélifiée composée de protéines impliquées dans la construction de la gaine salivaire et d'enzymes qui interviennent dans l'oxydation et l'hydrolyse de ces protéines. Les GSA produisent de manière intensive de la salive aqueuse contenant peu ou pas d'enzymes.

d. Comportement alimentaire des pucerons

Avant d'arriver dans les tissus vasculaires de la plante, les stylets des hémiptères circulent dans le mésophylle en empruntant des trajets différents, mais ont comme point commun de sécréter une gaine de salive gélifiée pour se frayer un chemin dans les tissus de la plante (Fig. 14). Les stylets des pucerons et des aleurodes circulent dans l'apoplasme des cellules de l'épiderme et du mésophylle, c'est-à-dire dans l'ensemble des interstices formés par les parois cellulaires. Pour les pucerons, au cours de ce cheminement, une première série de piqûres de quelques secondes est effectuée dans les cellules du mésophylle.

Cette action est appelée piqûre d'épreuve (Prado et Tjallingii, 1994 ; Tjallingii et Hogen Esch, 1993). Durant ces brèves piqûres, le puceron excrète de la salive aqueuse puis ingère un peu du contenu cellulaire pour le goûter et ainsi déterminer s'il s'agit d'une plante hôte dans laquelle il va pouvoir poursuivre la recherche de sève (Martin, 1997). Si le puceron estime que la plante est appétente, il enfonce plus profondément ses stylets, goûte de nouvelles cellules, jusqu'à atteindre le phloème, où il prélève de manière prolongée de la sève élaborée.

VI. Mode de transmission des arbovirus

Deux grands types de transmission sont décrits chez les vecteurs d'arbovirus de plantes et de vertébrés : la transmission mécanique et la transmission biologique. La transmission biologique par un arthropode vecteur est la plus fréquente (Kuno et Chang, 2005).

1. La transmission vectorielle mécanique

Chez les vertébrés, on appelle transmission mécanique la transmission virale par transport passif de pathogènes, par opposition à la transmission biologique associée à des mécanismes spécifiques de reconnaissance de l'insecte (Kuno et Chang, 2005). Ce sont les insectes diptères qui sont principalement responsables des transmissions mécaniques des arbovirus animaux (Carn, 1996). Ces insectes excrètent le virus sur le site d'alimentation, de trois façons possibles : par contact avec le sang présent sur les pièces-buccales, par régurgitation de sang contaminé ou par la sécrétion d'excréments contaminés pouvant souiller les plaies de l'animal hôte

(Baldacchino 2014, Hoch 1985). Ce mode de transmission requiert le maintien et la stabilité du virus en milieu extracellulaire. Les virus transmis selon ce mode de transmission ont un génome aussi bien à ARN (*Poxviridae*, *Asfarviridae*) qu'à ADN (*Retroviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*) (Kuno & Chang, 2005). Il est à noter que les arbovirus à ADN de vertébrés sont tous transmis de manière mécanique à l'exception de l'african swine fever virus (ASFV) de la famille *Asfarviridae* (Weaver & Reisen, 2010). Ce mode de transmission n'est pas occasionnel puisqu'il a par exemple contribué aux épidémies de Rift Valley fever en Afrique et du venezuelan equine encephalitis en Colombie (Hoch 1985 ; Weaver 1997). De plus, un virus transmis de manière mécanique peut cumuler plusieurs autres modes de transmission comme une transmission directe de vertébré à vertébré ou bien une transmission vectorielle biologique. Les arbovirus de plante peuvent être transmis comme mentionné plus tôt de manière mécanique sans l'intervention d'arthropodes lors de la présence de micro-blessures. Ils peuvent aussi être transmis de manière mécanique sous l'action d'insectes dont le régime alimentaire est de type « broyeur » (Coléoptères) qui provoquent des blessures sur les plantes où ils se nourrissent.

2. La transmission vectorielle biologique

Tous les arbovirus de vertébrés transmis de cette manière sont des virus à ARN sauf l'ASFV (Calisher et Karabatsos, 1988 ; Karabatsos, 1985). Les arbovirus de plantes transmis biologiquement par un arthropode vecteur sont aussi bien des virus avec un génome à ADN qu'à ARN (Feres, 2015).

a. Grandes étapes de la transmission des arbovirus de plante par leur insecte vecteur

Les grandes étapes de la transmission des arbovirus de vertébrés ayant été brièvement décrites dans la partie (VII 1.c Déroulement d'un repas sanguin pour un arthropode hématophage), nous nous focaliserons ici sur les grandes étapes de la transmission des arbovirus de plantes par les hémiptères vecteurs.

La première étape de la transmission vectorielle des arbovirus de plante par leur hémiptère vecteur est l'acquisition du virus sur une plante infectée. Cette acquisition peut avoir lieu dans différents tissus de la plante en fonction du tropisme de l'espèce virale concernée (restriction au phloème ou non) et du comportement alimentaire de l'hémiptère. Ainsi, l'acquisition virale peut avoir lieu au moment des piqûres d'épreuves ou du gobage dans le parenchyme ou lors des phases d'alimentation prolongée dans le phloème de la plante. La durée d'acquisition efficace

est dépendante de ces mêmes facteurs ainsi que du mode de transmission du virus. La période d'alimentation d'un insecte sur une plante infectée s'appelle "Acquisition Access Period" (AAP). La dernière étape de la transmission vectorielle des arbovirus de plante par un hémiptère vecteur est l'inoculation dans la plante hôte. Celle-ci se déroule lorsque l'hémiptère virulifère salive / (ou dans certains cas régurgite) pour goûter la plante, afin de juger de son appétence. Des particules virales sont alors excrétées dans la salive de l'insecte provoquant l'infection d'une (nouvelle) plante hôte. De même que pour l'acquisition, les tissus dans lesquels l'inoculation a lieu dépendent du comportement alimentaire de l'hémiptère, de l'espèce virale concernée et la durée de cette période varie en fonction du mode de transmission de l'insecte. La période d'alimentation d'un insecte virulifère sur une plante saine est appelée "Inoculation Access Period" (IAP). Dans le cas des virus circulants dont nous parlerons plus loin, l'inoculation du virus n'est possible qu'après un délai plus ou moins long après la phase d'acquisition, appelé phase de latence. Elle correspond au temps de transit du virus dans le corps de l'insecte entre l'ingestion du virus à partir d'une plante infectée et le moment où il peut être excrété à une nouvelle plante. Les sites de passage et de rétention (ou persistance) du virus dans son vecteur (stylet, œsophage, intestin, etc.) varient là aussi en fonction de l'espèce virale et du mode de transmission.

La classification des modes de transmission des virus de plante n'a cessé d'évoluer. La première était fondée sur des critères « quantitatifs » : les durées des périodes d'acquisition, de latence, d'inoculation et enfin de rétention (Watson et Roberts, 1939). Elle a permis de distinguer le mode « non persistant » et le mode « persistant ». D'autres travaux ont fait évoluer cette classification par la découverte d'un troisième mode intermédiaire dit « semi persistant » (Sylvester, 1954). Peu à peu, cette classification a adopté des critères « qualitatifs » décrivant les interactions entre le virus et son vecteur (Kennedy, 1962 ; Harris, 1977). A partir de cette classification, les modes de transmission sont divisés en 3 catégories : la transmission non-circulante (non-persistante et semi-persistante), la transmission circulante non-multipliant, la transmission circulante multipliant. Dans la suite de l'introduction, nous décrivons les spécificités propres aux différents modes de transmission.

b. La transmission non-circulante

Elle concerne une majorité de phytovirus (Hogenhout 2008). La transmission est dite non-circulante lorsque les virus sont retenus au niveau de la cuticule des pièces buccales des vecteurs (Ng et Falk, 2006); les virus sont donc perdus par mue entre les stades de développement (Brault, 2010). Ils peuvent être transmis sans délai après acquisition, il n'y a pas de phase de

latence. La transmission non-circulante était anciennement appelée non-persistante, car la rétention des virus était généralement de très courte durée. En effet, la majorité d'entre eux sont retenus au niveau des stylets (stylet-borne viruses) avec une rétention de quelques secondes à quelques minutes. Le temps minimal d'acquisition de ces virus est également très court. Quelques secondes à quelques minutes suffisent pour être acquis de manière efficace, à condition que le virus ne soit pas restreint au phloème. En effet, sa présence dans le mésophylle lui permet d'être acquis lors de piqûres d'épreuve de l'insecte. Deux stratégies d'interaction moléculaire entre le virus et le vecteur sont décrites pour le mode de transmission non-circulant (**Fig. 15**).

i. La stratégie capsid

Lors de la stratégie dite "capsid", les particules virales se lient directement à la cuticule du vecteur. Les virus qui suivent cette stratégie appartiennent au genre *Cucumovirus* (famille *Bromoviridae*), dont le représentant est le *Cucumber mosaic virus* (CMV), ainsi qu'au genre *Alfavirus* (famille *Bromoviridae*), au genre *Carlavirus* (famille *Betaflexiviridae*), ou encore au genre *Crinivirus* (famille *Closteroviridae*) (Uzest et Blanc, 2016). Cette stratégie a pu être mise en évidence par des expériences montrant que les particules virales de CMV mais pas son ARN viral isolé sont transmissibles par le puceron *Myzus persicae* (Pirone, 1966). Cette stratégie repose sur la reconnaissance de la CP et de ses domaines exposés pour qu'il puisse y avoir reconnaissance et fixation du virus au vecteur.

ii. La stratégie helper

La stratégie dite "facteur assistant" ou "stratégie helper", implique qu'une protéine virale non-structurale, appelée « facteur assistant de la transmission », fasse le lien entre le virion et le vecteur (Pirone et Blanc, 1996). Les genres concernés sont les *Caulimovirus* (famille *Caulimoviridae*) dont son représentant est le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) et les *Potyvirus* (famille *Potyviridae*). Le rôle de ces protéines virales intermédiaires a été mis en évidence grâce à l'acquisition par un insecte vecteur de virus purifié acquis sur membrane qui contrairement à la stratégie "capsid" n'a pas permis la transmission de ce virus par l'insecte vecteur. Cependant, dans le cas d'une ingestion par l'insecte vecteur d'un broyat de plantes virosées sans particules virales et de virus purifié, la transmission a bien lieu, attestant de la nécessité d'un facteur complémentaire pour accomplir la transmission du virus par l'insecte vecteur. Chez les potyvirus tel que le potato virus Y (PVY), le facteur assistant de la transmission est la protéine HC-pro (helper component protease) qui est essentielle pour faire le lien entre la CP

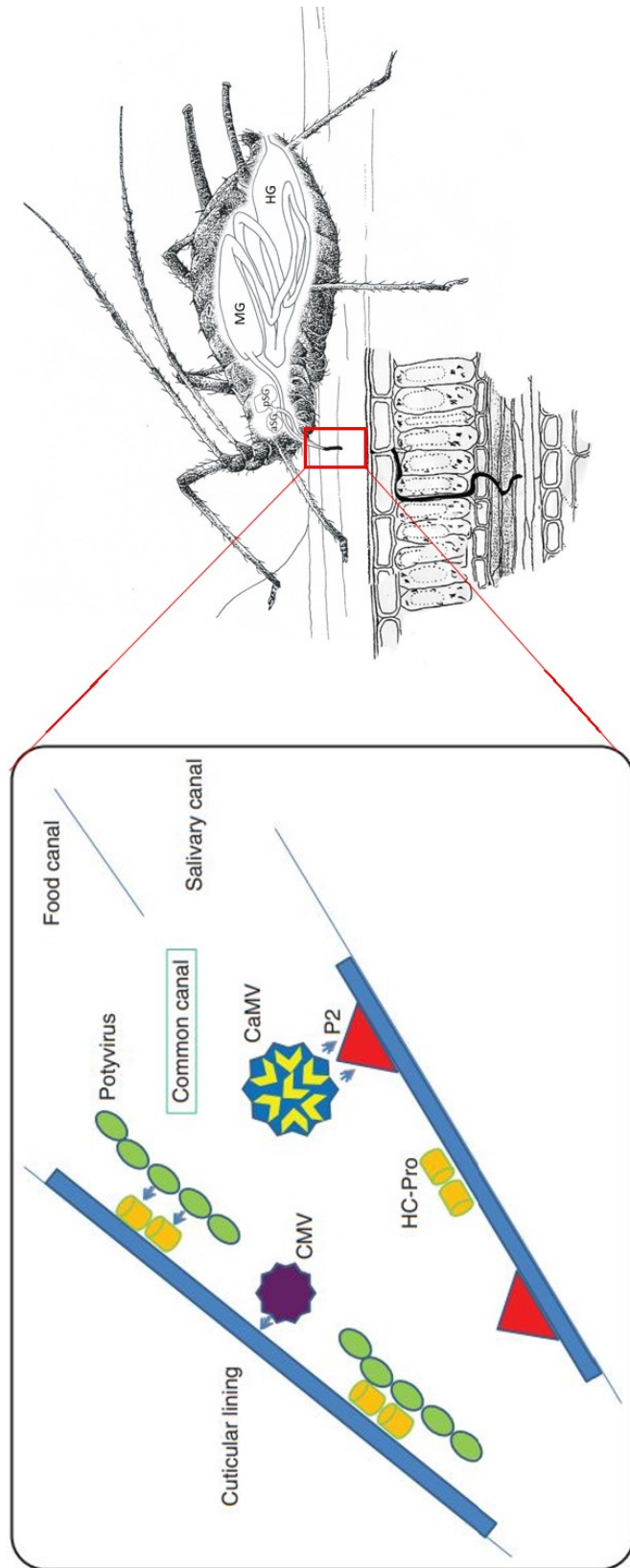


Figure 15 : Illustration du mode de transmission non-circulant des hémiptères (d’après Fereres et Raccach, 2015). Exemple de la stratégie dite “capside” du CMV et de la stratégie “facteur assistant” du CaMV (Illustration à droite de N. Sauvion).

du potyvirus et les protéines du stylet du puceron (Govier, 1977 ; Blanc, 1998 ; Dombrovsky , 2007 ; Seo , 2010).

Chez les caulimovirus, le CaMV requiert plusieurs protéines virales en plus du virion puisque la protéine P2 de ce virus a été montré comme interagissant avec la protéine P3 ancrée à la CP et les stylets du puceron (Plisson, 2005 ; Hoh, 2010 ; Blanc, 2014). Pour ce faire, dans les cellules de la plante infectées par le CaMV, le matériel viral est isolé dans des corps d'inclusions, aussi appelés usines virales (virus factories ou VF) qui contiennent nombre de complexes P3-virions (de Castro, 2013). Un autre type de corps d'inclusion est produit en présence du CaMV et est appelé corps à transmission (TB) (Woolston 1983 ; Espinoza, 1991). Les protéines P2, P3 et certains virions sont contenus dans les TB. Lors de l'insertion des stylets d'un puceron dans une cellule de plante infectée par le CaMV, un processus de réorganisation des protéines virales dans la cellule a lieu et est appelé "activation de la transmission". Une réaction de défense de la plante, sûrement due à la perception des effecteurs présents dans la salive du puceron, enclenche en quelques secondes une transformation des TB et des VF. Sous l'action de la pénétration de tubuline dans les TB, ils se dissocient et libèrent ainsi entre autre la P2. Les complexes P3-virions sont eux aussi libérés des VF sous l'effet probable d'un stress chimique peut-être associé à une réaction de défense des cellules de puceron (Bak, 2013). Les complexes P3-virions ainsi que les protéines P2 sont déplacées au niveau des microtubules corticaux de la cellule afin de faciliter leur acquisition par l'insecte vecteur lors des piqûres d'essai (Martinière, 2013).

Des images de haute résolution en microscopie on permit de démontrer qu'après l'acquisition du CaMV celui-ci se localise probablement à l'extrémité des stylets maxillaires du puceron car la P2 du CaMV marquée en fusion avec la green fluorescent protein (GFP) est marquée dans une région située entre les canaux alimentaires et salivaires (Uzest, 2007) (Fig. 16). Le site de rétention du CaMV a été identifié au niveau d'une structure précédemment inconnue, à laquelle le nom "acrostyle" a été donné. Elle est formée d'un épaissement de la cuticule sur la partie distale du conduit commun du stylet. L'acrostyle est présent chez tous les pucerons, qu'ils soient vecteurs ou non du CaMV et pourrait jouer un rôle dans la fixation des virus non-circulants en général (Uzest, 2010).

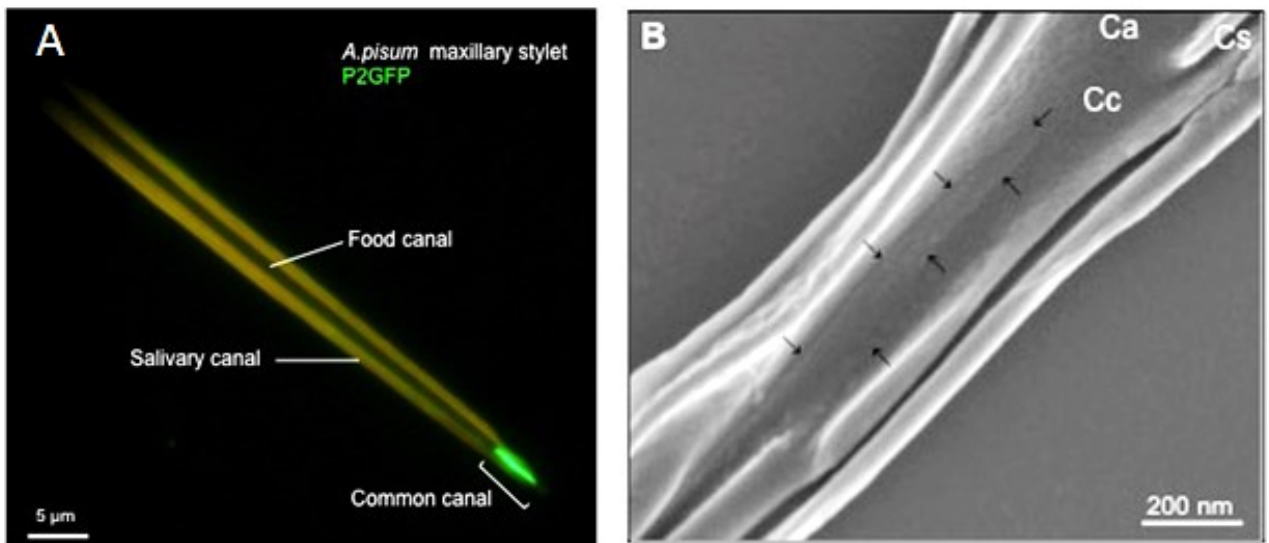


Figure 16 : Extrémité des stylets maxillaires du puceron, l'acrostyle, récepteur des virus non-circulants (Uzest, 2010). (A) Fixation de la protéine P2 du CaMV fusionnée à un Tag GFP à l'extrémité des stylets maxillaires du puceron *A. pisum*. (B) Zone à la pointe des stylets maxillaire nommée acrostyle.

iii. Virus semi-persistants

Certains virus transmis de manière non-circulante sont retenus au niveau de l'oesophage (foregut-borne viruses), sans toutefois pénétrer ces tissus et on parle alors de transmission semi-persistante (Blanc, 2014 ; Whitfield 2015). En effet, l'insecte reste virulifère durant quelques heures à quelques jours (Bragard, 2013). Le temps minimal d'acquisition de ces virus est plus long que pour les non-persistants, de l'ordre de quelques minutes à quelques heures (Harris, 1977).

C'est par exemple le cas du crinivirus lettuce infectious yellows virus (LIYV) transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci*. Les déterminants associés à la fixation des virus semi-persistants n'ont pas encore été formellement mis en évidence. Néanmoins, plusieurs études ont montré que l'acquisition d'un anticorps préparé contre la protéine mineure de la capsid (Cpm) du LIYV interfère avec la fixation de la particule virale sur la cuticule de l'intestin de l'aleurode. Comme cet anticorps inhibe efficacement la transmission du virus, il semblerait que la Cpm puisse participer à la rétention du LIYV au niveau du tube digestif.

L'étape d'inoculation pourrait se faire différemment de celle des autres arbovirus de plante transmis biologiquement. En effet, contrairement aux pucerons, le foregut des aleurodes est physiquement séparé des stylets maxillaires et du conduit salivaire. Une étude propose que la transmission des particules virales du LIYV à partir du foregut de l'aleurode se produise lors de la régurgitation plutôt que pendant la salivation, comme cela a été vu dans le cadre de la transmission par puceron du CaMV (Chen, 2011).

c. Transmission circulante multipliante

i. Généralités

Les virus transmis selon le mode circulant multipliant sont des phytovirus qui se répliquent dans l'organisme vecteur et envahissent les tissus de l'insecte de manière systémique avant d'arriver aux glandes salivaires (Ammar, 2009 ; Bragard, 2013) (Fig. 17). Ils appartiennent aux genres *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus* (famille *Reoviridae*), *Rhabdovirus* (famille *Rhabdoviridae*), *Tospovirus* (famille *Bunyaviridae*), *Tenuivirus* (famille *Phenuyviridae*), et *Marafivirus* (famille *Tymoviridae*) (Hogenhout, 2008 ; Blanc, 2014). Les insectes vecteurs de ces virus regroupent les cicadelles, les pucerons, les thrips et les fulgères. Les temps d'acquisition et d'inoculation sont plus longs que pour les non-circulants, de l'ordre de plusieurs jours. Le temps de latence peut même atteindre des semaines (Dietzgen, 2016). Néanmoins, une fois acquis ils sont transmissibles à vie par l'insecte vecteur (Ammar, 2009 ; Chen, 2011).

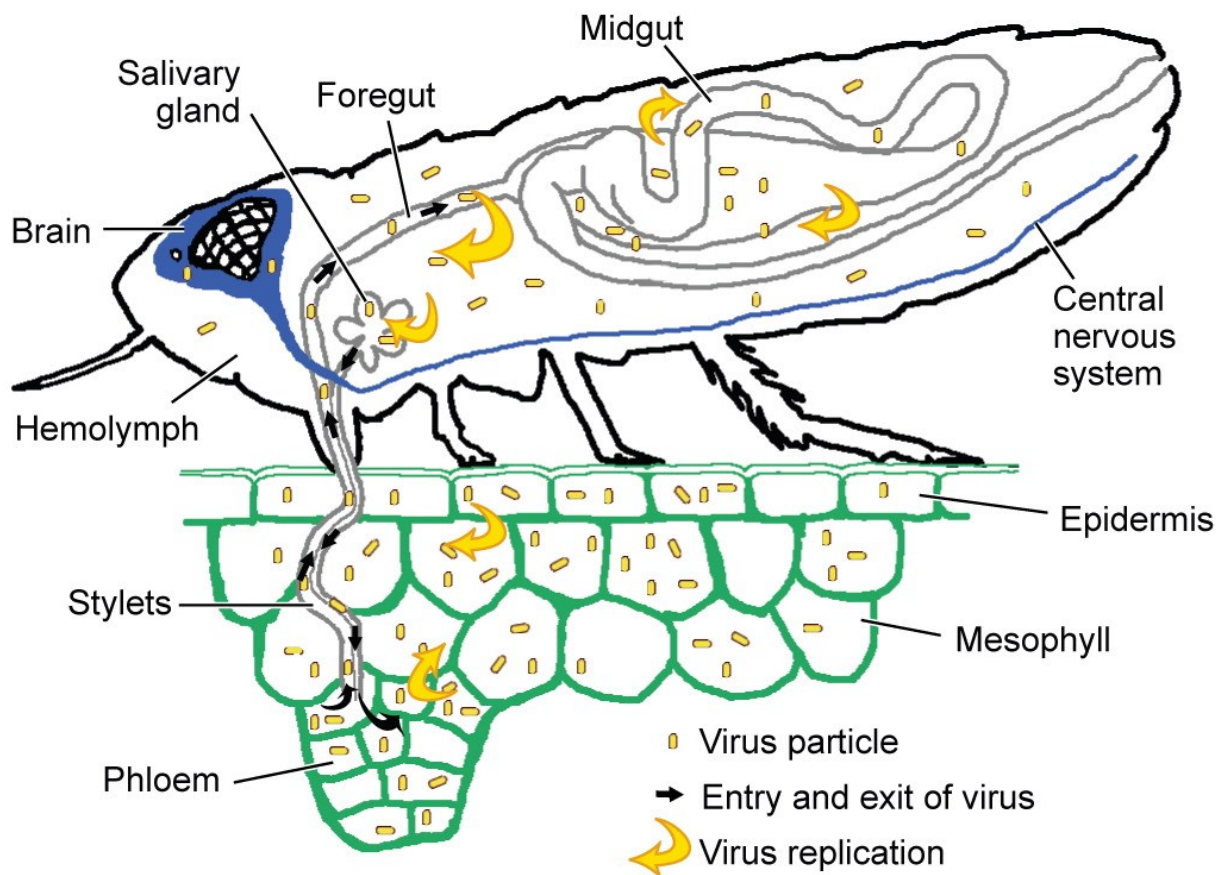


Figure 17 : Représentation schématique du mode de transmission circulant propagatif chez les cicadelles (Hogenhout, 2008).

ii. La transmission chez les *Reoviridae*

Le rice dwarf virus (RDV) est le phytovirus pour lequel la transmission circulante propagative a été la mieux caractérisée. Il est transmis par des cicadelles dont *Nephotettix cincticeps* de manière horizontale et verticale. Le RDV appartient au genre des *Phytoreovirus*, possède un génome à ARN double brin (dsRNA) segmenté et est encapsidé dans une particule virale icosaédrique de 70 nm de diamètre (Lu, 1998). Le feuillet extérieur de la capsid est composé des protéines P8 et P2, mais c'est P2 qui est impliquée dans l'entrée du virion au niveau de l'intestin du vecteur. Cette action est réalisée par endocytose clathrine-dépendante (Omura, 1999 ; Chen, 2011). Les virions contenus dans les endosomes sont ensuite libérés par cette même protéine P2 afin d'initier la réplication virale et l'assemblage des composants viraux. Le mouvement de cellule à cellule des particules virales dans l'insecte est assuré par la protéine non-structurale Pns10 qui a la capacité de former des tubules le long desquels les particules virales se déplacent. Ces structures interagissent par l'intermédiaire de la myosine avec l'actine présente le long des microvilli des cellules intestinales et des tissus musculaires de l'intestin (Chen, 2012). A noter que l'actine ne joue pas seulement un rôle dans la propagation intercellulaire mais pourrait aussi intervenir dans la spécificité virus-vecteur car Pns10 a montré ne pas interagir avec l'actine cytoplasmique d'une cicadelle non-vectrice du RDV (Chen, 2015).

Un autre phytovirus, le rice gall dwarf virus (RGDV) utiliserait lui aussi des structures tubulaires (ou filamenteuse) afin de franchir la barrière des glandes salivaires (Mao, 2017). La protéine Pns11, orthologue de Pns10 du RDV, forme ces structures qui s'attachent à la membrane plasmique apicale recouverte d'actine. L'interaction directe entre l'actine et Pns11 déclenche l'endocytose des virions à travers la membrane plasmique des cellules des glandes salivaires.

La formation et l'utilisation de structures tubulaires semble courante au sein des phytovirus et plus généralement dans la famille *Reoviridae*. La protéine non-structurale P7-1 du fijivirus southern rice black-streaked dwarf virus (SRBSDV) forme des tubules lui permettant aussi d'interagir avec l'actine. Le SRBSDV les utilise non pas pour passer d'une cellule à l'autre mais dans le franchissement de la lame basale de l'intestin pour rejoindre l'hémolymphe de sa cicadelle vectrice (Liu, 2011; Jia, 2014). Ce mécanisme qui diffère de celui des phytovirus explique pourquoi au sein d'une même famille virale, la période de latence à l'intérieur de leur cicadelle vectrice est plus courte pour le SRBSDV (6 à 9 jours) que pour le RDV (14 à 21 jours) (Pu, 2012 ; Honda, 2007).

iii. La transmission chez les *Rhabdoviridae*

Les virus de la famille *Rhabdoviridae* sont enveloppés, à ARN simple brin (ssRNA) de polarité négative et peuvent infecter aussi bien des animaux (incluant l'Homme) que des végétaux (Fu, 2005 ; Jackson, 2008). Concernant ces derniers, les genre *Cytorhabdovirus* et *Nucleorhabdovirus* comptent pour vecteurs des pucerons, cicadelles et fulgores (Jackson, 2005 ; Mann, 2014). Les virus appartenant à cette famille ne forment pas de tubules pour franchir les différentes barrières à l'intérieur de leur insecte vecteur, mais ont développé des routes alternatives. Pour exemple, le maize mosaic virus (MMV) utilisent les ganglions composés des réseaux neuronaux de son insecte vecteur (delphacide) pour arriver dans les glandes salivaires. Les cellules épithéliales de l'intestin moyen où se réplique le virus sont recouvertes par des tissus musculaires qui lui permettent de se contracter et de contracter le foregut si besoin grâce à un réseau de ganglions composés relié aux tissus nerveux de l'insecte (Chapman, 1985). Le virus utilise ce réseau de ganglions pour rejoindre les diverticules antérieurs, l'œsophage, puis les glandes salivaires (Ammar, 2008).

iv. La transmission chez les *Bunyaviridae*

Le genre *Tospovirus* est le seul genre parmi les *Bunyaviridae* dont les membres infectent des plantes. Les espèces virales appartenant aux autres genres infectent principalement les mammifères (dont l'Homme) et les insectes (Ullman, 1997). Les tospovirus sont des virus enveloppés uniquement transmis par des thrips et dont la particule virale contient un génome segmenté à ARN simple brin (ssRNA) de polarité négative (Whitfield, 2005). Le virus modèle est le tomato spotted wilt virus (TSWV) transmis par *Frankliniella occidentalis* (Elliot, 1996). La fenêtre d'acquisition efficace du virus est très brève puisque seuls les individus ayant acquis le virus lors du premier ou second stade de développement larvaire sont capables de transmettre le virus. Les larves perdent ensuite graduellement leur aptitude à acquérir le virus et les adultes peuvent acquérir le virus mais ne le transmettent pas (Assis Filho, 2004). Ceci suggère le développement d'une barrière au cours du développement du thrips empêchant la transmission du virus (Van de Wetering, 1996 ; Van de Wetering, 1999). Lors du premier stade larvaire de développement, les glandes salivaires se retrouvent au contact du tube digestif et de manière étonnante le virus n'est jamais détecté dans l'hémolymphe (Kritzman, 2002 ; Moritz 2004). Deux arguments qui poussent à croire que le TSWV pourrait passer directement du tube digestif aux glandes salivaires lors des premiers stades larvaires. Les spécialistes en ont conclu que l'accumulation du virus dans les muscles viscéraux de l'intestin moyen et de l'intestin antérieur

pourrait provoquer le passage du virus aux glandes salivaires grâce à des ligaments qui relient les deux organes (Nagata, 1999 ; Moritz, 2004).

v. La transmission chez les *Phenuyviridae*

Le genre *Tenuivirus* contient des virus non-enveloppés dont le génome est à ARN simple brin (ssRNA) de polarité négative ou ambisens. Leurs insectes vecteurs sont des delphacides (Fulgoromorpha) à l'exception d'une espèce virale divergente le maïze stripe virus transmis par une cicadelle (Cicadomorpha) et dont la classification dans un nouveau genre "cicatenuivirus" et dans une nouvelle famille "Tenuiviridae" a été proposée (Ammar et Peterschmitt, 2004). Le rice stripe virus (RSV), l'un des tenuivirus pour lequel le trajet dans son vecteur *Laodelphax striatellus* a été le mieux décrit, commence son voyage en infectant les cellules épithéliales de l'intestin de son insecte vecteur. A partir de celles-ci, il progresse vers les muscles viscéraux de l'intestin moyen et de l'intestin postérieur pour rejoindre l'hémolymphe puis les organes sexuels et les glandes salivaires principales (Wu, 2014). Le tropisme cellulaire à l'intérieur de ces insectes vecteurs varie entre les tenuivirus, comprenant parfois les conduits respiratoires, les tubes de Malpighi, le cerveau, la masse grasseuse (Hibino, 1996 ; Nault et Gordon, 1988). Ainsi, la dissémination du rice grassy stunt virus (RGSV) dans le corps de *Nilaparvata lugens* se fait aussi via les muscles viscéraux mais n'implique pas que l'invasion des glandes salivaires principales. Elle implique aussi l'invasion des glandes salivaires accessoires. Néanmoins le RGSV ne se réplique pas dans les organes sexuels de son insecte vecteur (Zheng, 2014).

vi. Analogie de la transmission circulante multipliante avec les arbovirus de vertébrés

Le mode de transmission biologique des arbovirus de vertébrés se rapproche le plus de celui des arbovirus de plante transmis selon le mode de transmission circulant multipliant, puisqu'ils se répliquent et peuvent envahir d'autres tissus que ceux de l'intestin moyen et des glandes salivaires (ex : les ovaires) (Lequime, 2014).

Certaines familles virales ne sont retrouvées que chez les arbovirus de vertébrés tel que les *Flaviviridae* avec le genre *Flavivirus* (ex: DENV, YFV, WNV, ZIKV), les *Togaviridae* avec le genre *Alphavirus* (ex : CHKV, virus o'nyong-nyong (ONNV), virus Sindbis (SINV)), les *Orthomyxoviridae* avec le genre *Thogotovirus* (ex: virus Dhoré (DHOV)). D'autres sont communes aux deux règnes : la famille *Bunyaviridae* avec le genre *Nairovirus* (ex: virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV)), et *Phlebovirus* (ex: virus de la Fièvre de la vallée du Rift (RVFV)), la famille *Rhabdoviridae* avec le genre *Vesiculovirus* (ex: vesicular stomatitis virus (VSV)), la famille *Reoviridae* avec le genre *Orbivirus* (ex: virus Orungo

(ORUV)) et *Coltivirus* (ex: fièvre à tiques du Colorado (CTF) (Weaver et Reisen, 2010). Parmi les plus étudiés le DENV possède 4 sérotypes qui sont transmis par les moustiques du genre *Aedes*. Le DENV-2 est internalisé par endocytose clathrine-dépendante dans les cellules de mammifères ou d'insectes. En outre, d'autres voies d'internalisation seraient empruntées en fonction de l'hôte et du sérotype testé tel qu'une voie d'endocytose dynamine-dépendante (Acosta, 2009).

d. Transmission circulante non-multipliante

i. Généralités

La transmission est dite circulante non-multipliante lorsque les virus effectuent un passage par l'intérieur du corps de l'insecte sans s'y multiplier avant l'inoculation par leur vecteur. Le trajet classique consiste à ce que le virus traverse tout d'abord l'intestin à des points d'entrée qui varient en fonction de la famille virale ou de l'espèce virale (chambre filtrante, intestin moyen, intestin postérieur) par des mécanismes et sous une forme (encapsidé, complexe nucléoprotéique) qui restent encore inconnus pour certains. Le virus arrive dans l'hémocèle où les organes dont les glandes salivaires baignent dans l'hémolymphe. Pour pouvoir être excrété dans la salive et infecter un nouvel hôte, le virus va nécessairement passer la membrane des cellules des glandes salivaires soit principales soit accessoires par des mécanismes là encore qui diffèrent entre les virus transmis selon ce mode de transmission (Bragard, 2013). Ce mode de transmission regroupe les familles des *Luteoviridae*, *Nanoviridae* et *Geminiviridae* dont leurs membres infectent seulement des végétaux et sont seulement transmis par des hémiptères (Hogenhout, 2008 ; Ammar, 2009 ; Blanc, 2014). Des périodes d'acquisition et d'inoculation relativement longues sont généralement requises pour ces virus car ils sont souvent restreints au phloème, tissus qui ne sont atteints que lors des phases d'alimentation prolongées de l'insecte vecteur. Une fois le virus acquis, les insectes vecteurs restent virulifères même après les mues et peuvent transmettre le virus pendant toute leur vie (Brault, 2007). A noter que les insectes qui transmettent des virus selon ce mode de transmission ne sont pas considérés comme des hôtes du virus car ceux-ci ne multiplient pas dans leur hôte

ii. Analogie de la transmission circulante non-multipliante des arbovirus de vertébrés

Ce mode de transmission n'a jamais été clairement mis en évidence pour des arbovirus de vertébrés. Néanmoins, l'exemple du Thogoto virus (THOV) de la famille *Orthomyxoviridae* transmis aux ruminants par la tique tropicale bont (*Amblyomma variegatum*), pourrait relancer le débat sur l'existence de modes de transmission alternatifs chez les arbovirus de vertébrés.

Des chercheurs ont mis en évidence que l'injection de ce virus directement dans l'hémocèle de la tique en complément d'une molécule stimulant la salivation, conduit au passage du virus directement de l'hémolymphe aux glandes salivaires de la tique (Kaufman et Nuttall, 1996). Les auteurs sont allés plus loin en montrant que le THOV était sécrété dans la salive de la tique sans qu'aucune répllication virale ne puisse être détectée dans le corps de l'arthropode. Cet exemple ne serait pas un cas isolé car plusieurs études récentes indiquent que le lumpy skin disease virus (LSDV) de la famille *Poxviridae* transmis par la tique *Rhipicephalus* spp. envahit plusieurs organes et persiste tout au long de la vie de la tique sans qu'aucune répllication ne soit détectée (Lubinga, 2014 ; Lubinga 2015 ; Tuppurainen, 2013 ; Tuppurainen, 2015).

VII. Luteoviridae

1. Généralités

La famille *Luteoviridae* regroupe les genres *Luteovirus*, *Polerovirus*, et *Enamovirus*. Ces virus se présentent sous la forme d'une particule virale non-enveloppée icosaédrique, d'une taille variant entre 25 et 30 nm de diamètre. Elle est composée de la protéine de capsid (CP) et de quelques copies de la protéine de read-through clivée (RT* pour read-through). La RT* est produite par la translecture traductionnelle du codon stop de l'ORF (open reading frame ou cadre de lecture) de la CP puis clivée à son extrémité C-terminale (Miller, 1995). Les particules virales renferment un génome monopartite à ARN simple brin (ssRNA) linéaire de polarité positive de 5.6 à 6 kb.

2. Gamme d'hôte

Plusieurs lutéovirus ont une gamme d'hôte restreinte à une famille de plante. C'est par exemple le cas du barley yellow dwarf virus (BYDV) et du cereal yellow dwarf virus (CYDV) dont les hôtes appartiennent à la famille *Poaceae* (céréales), ou du bean leafroll virus (BLRV) et du soybean dwarf virus (SbDV) dont les hôtes appartiennent à la famille des *Fabaceae* (légumineuses). Cela dit, d'autres lutéovirus sont capables d'infecter des plantes de diverses familles. Le beet western yellows virus (BWYV), par exemple, se montre capable d'infecter des plantes appartenant à 20 familles différentes.

3. Tropisme tissulaire dans la plante

Les lutéovirus sont restreints au phloème. Dans de rares cas le tropisme du virus pour sa plante hôte peut-être élargit en condition de co-infection. Ainsi, une relation mutualiste s'est installée entre l'énamovirus PEMV-1 et l'umbravirus (famille *Tombusviridae*) PEMV-2. L'umbravirus confère à l'énamovirus la capacité d'envahir le mésophylle de sa plante hôte et réciproquement l'umbravirus utilise la protéine de capsid de l'énamovirus lui permettant d'être transmis par le puceron (De Zoeten et Skaf, 2001).

4. Gamme de vecteur

La gamme connue des vecteurs de lutéovirus était jusqu'à peu limitée aux pucerons. Récemment, il a été montré qu'un polérovirus d'origine recombinante, est transmis par l'aleurode *B. tabaci*. Ce polérovirus appelé pepper whitefly-borne vein yellows virus (PeWBVYV) a été découvert en Israël sur des poivrons portant des symptômes très sévères. La transmission par divers insectes vecteurs est commune au sein de familles de virus de plantes, *Geminiviridae*, *Rhabdoviridae*, *Caulimoviridae*, *Potyviridae*, mais elle concerne d'habitude des espèces virales qui par leur divergence génétique et leur organisation génomique ont été classées dans des genres distincts. Le PeWBVYV au contraire fait bien partie du genre des polérovirus de par son organisation génomique, et sa proximité génétique avec moins de 10% de divergence en acides aminés pour chacune des protéines synthétisées par le virus selon les critères taxonomiques de l'ICTV. De manière encore plus étonnante, ce nouveau polérovirus ne semble pas être transmis par pucerons (Gosh, 2019).

5. Cycle de transmission dans le vecteur

Le cycle de transmission des lutéovirus a été largement décrit (Papura, 2002 ; Yang, 2008 ; Whitfield, 2015). Après ingestion, les virions sont transportés le long du canal alimentaire et peuvent pénétrer l'épithélium intestinal grâce à un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant. Ce passage a été décrit au niveau de l'intestin postérieur dans le cas du BYDV-PAV (Fig. 18), au niveau de l'intestin moyen postérieur pour le potato leaf roll virus (PLRV), ou au niveau des deux dans le cas du cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV). Cette endocytose se produit sous l'action de clathrines qui forment des vésicules destinées à fusionner avec les endosomes de la cellule qu'ils pénètrent. Des images de microscopie par immunolocalisation in situ dans l'insecte vecteur ont montré que les particules virales ne

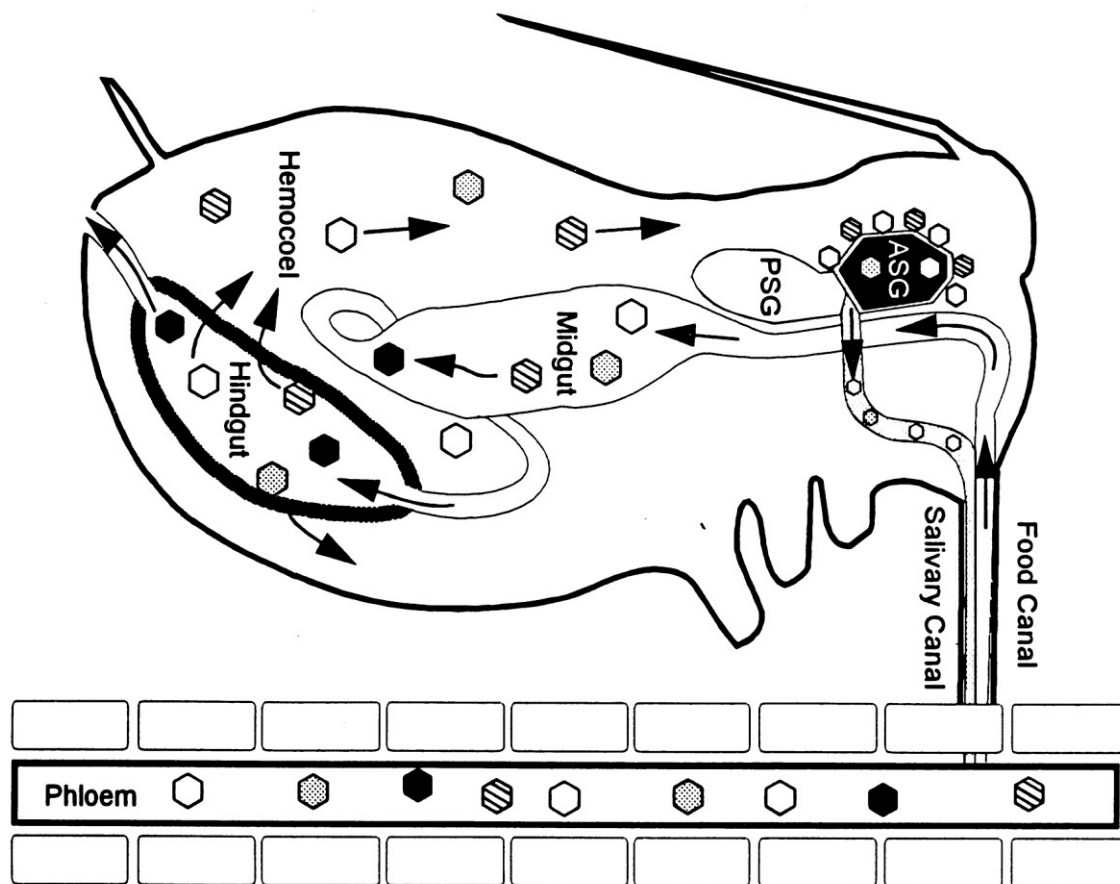


Figure 18 : Trajet du lutéovirus barley yellow dwarf virus (BYDV) dans le corps de son puceron vecteur (Power, 1995 ; Gray et Banerjee, 1999).

voyagent jamais seules dans le cytoplasme cellulaire. Il faut garder en tête que l'épithélium du tube digestif des pucerons est peu spécifique pour l'endocytose des lutéovirus car nombreux sont ceux qui parviennent à entrer dans ces cellules chez des pucerons pourtant non-vecteurs.

Les virions sont ensuite relargués dans l'hémocèle par exocytose. Ce processus d'endocytose et d'exocytose, est aussi appelé transcytose. Il a également été décrit au niveau de la membrane plasmique et de la lamelle basale des cellules des glandes salivaires accessoires. Enfin, après la traversée de la membrane apicale, les virus sont excrétés dans une nouvelle plante hôte par la salive via la canal salivaire (Gildow, 1993 ; Garret, 1996 ; Reinbold, 2001 ; Reinbold, 2003).

L'acquisition et la transmission des lutéovirus semble être contrôlée par la CP et la RT* (Brault, 2000 ; Peter 2008 ; Gray, 2014). La CP est suffisante pour induire la transcytose des particules virales à l'entrée et à la sortie des cellules du tube digestif mais la RT* améliore l'efficacité de ce passage. La RT* est aussi requise pour la pénétration des particules virales à travers la membrane des glandes salivaires (Bruyere, 1997).

6. Déterminants moléculaires de la transmission par vecteur

Quatres protéines de pucerons ont pour l'instant montré une implication certaine dans la transmission des lutéovirus :

La **symbionine** est produite par l'endosymbionte primaire *Buchnera spp. aphidicola*. C'est un homologue de la protéine GroEL d'*Escherichia coli*. Les endosymbiontes bactériens comme *Buchnera spp. aphidicola* sont contenus dans des cellules spécialisées appelées bactériocytes localisées dans l'hémocèle du puceron. La symbionine interagit *in vitro* avec les virions de plusieurs espèces de lutéovirus et plus spécifiquement avec la RT* (Filichkin, 1997 ; Van den Heuvel, 1997). La transmission du PLRV peut être réduite par un traitement antibiotique (Van den Heuvel, 1994). Cependant, comme la présence de la symbionine n'est pas corrélée à la capacité de transmission, elle ne peut être considérée comme un facteur de spécificité (Pinheiro, en 2015). Par conséquent, on estime que la spécificité de transmission serait plutôt une affaire de récepteurs présents au niveau des barrières de transmission que sont l'intestin et surtout les glandes salivaires accessoires.

En cohérence avec cette hypothèse, des résultats semblent indiquer que l'interaction du BYDV avec la protéine **SaM50** au niveau des glandes salivaires accessoires du puceron *Sitobion avenae* serait associée à sa transmission. En effet, l'acquisition simultanée du BYDV et d'anticorps dirigés contre SaM50 diminue la transmissibilité du virus (Li, 2001).

L'**alanyl aminopeptidase N** (APN) pourrait interagir avec la CP du PEMV au niveau de l'intestin du puceron *A. pisum*. Ce résultat a été obtenu de façon indirecte par la découverte du peptide GBP3.1, capable de se lier à l'intestin du puceron et ainsi de bloquer l'entrée du péanation mosaïque virus (PEMV) et de diminuer la quantité de virus dans l'hémolymphe (Liu, 2010). Or, le peptide GBP3.1 possède une structure proche de la capside du PEMV. Des études complémentaires ont démontré que ce même peptide interagissait *in vitro* avec la protéine APN (Chougule, 2013), et que l'expression d'APN dans des cellules d'insectes permet l'internalisation du virus (Linz, 2015).

Enfin, la protéine du **récepteur de l'Ephrine** (membrane-bound Ephrin receptor ou ephR) a été identifiée récemment comme interagissant impliqué dans la transmission des lutéovirus (Mulot, 2018). Cette protéine a été découverte grâce au criblage double-hybride d'une banque de glandes salivaires de puceron de l'espèce *M. persicae* face aux protéines structurales du CABYV et du turnip yellows virus (TUYV). L'ARN interférence des transcrits de l'ephR a mis en évidence que trois lutéovirus s'accumulent moins dans le corps du puceron, suggérant un rôle de cette protéine dans l'accumulation de certains lutéovirus.

Outre les protéines du puceron ou des endosymbiontes, des résultats suggèrent que des protéines du phloème induites par le polérovirus CYDV, s'associeraient avec le virus et seraient requises pour son acquisition et sa transmission (Cilia, 2012). Selon la même logique, des protéines présentes dans la sève des cucurbitacés augmenteraient la transmission du polérovirus cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) (Bencharki, 2010).

VIII. Nanoviridae

1. Généralités

Cette famille virale comprend deux genres : *Nanovirus* et *Babuvirus*. Leur génome est dit multipartite car il est composé de plusieurs molécules d'ADN circulaires (8 pour les nanovirus et 6 pour les babuvirus) encapsidés individuellement. L'ADN est de type simple brin (ssDNA), et les molécules ont une taille d'environ 1 kb. Les virions sont non-enveloppés, de symétrie icosaédrique et d'une taille comprise entre 17 et 20 nm de diamètre.

2. Organisation génomique

Parmi les segments d'ADN génomique, l'ADN-R, l'ADN-S, l'ADN-C, l'ADN-M et l'ADN-N sont présents chez les nanovirus et les babuvirus. Trois autres segments génomiques qui codent pour des protéines de fonction inconnues sont nommés ADN-U1, ADN-U2 et ADN-U4 chez les nanovirus et ADN-U3 chez les babuvirus. A l'exception de l'ADN-R du banana bunchy top virus (BBTV) qui est bicistronique, tous les segments d'ADN sont monocistroniques ce qui signifie qu'ils contiennent une seule phase de lecture pour l'expression d'une seule protéine (Sharman, 2008 ; Sicard, 2013). Les protéines codées universellement par les virus de la famille *Nanoviridae* sont la protéine de réplication M-Rep (ADN-R), la protéine de capsid CP (ADN-S), la protéine régulatrice de cycle cellulaire Clink (ADN-C), la protéine de mouvement MP (ADN-M) et enfin, la protéine navette Nuclear shuttle protein (NSP) associée au mouvement entre le cytoplasme et le noyau de la cellule (ADN-N) (Fig. 19). Sur la base d'homologies avec les virus de la famille *Geminiviridae*, la réplication virale est supposée se faire via des formes intermédiaires de réplication ADN double brin par un mécanisme de cercle roulant. Des expériences ont montrés que la M-Rep du faba bean necrotic yellows virus (FBNYV) et du BBTV initient la réplication de tous les ADN génomiques des virus de cette famille, d'où son nom de M-Rep, master Rep. L'origine de réplication (*ori*) est située dans une séquence nonanucléotidique flanquée de séquences inversement répétées qui forment une tige boucle. Le nonanucléotide est parfaitement conservée au sein de chaque genre avec comme séquence TATTATTAC chez les babuvirus et TAGTATTAC chez les nanovirus.

3. Gamme d'hôte

En général, les nanovirus infectent des plantes de la famille des *Fabaceae*. Un nanovirus a été récemment découvert sur persil (Vetten, 2019). La gamme d'hôte des babuvirus se limite à des monocotylédones des familles *Musaceae* et *Zingiberaceae* (Stainton, 2015). Les plantes infectées par des virus de la famille *Nanoviridae* manifestent un retard de croissance et peuvent aussi montrer de l'enroulement des feuilles, de la chlorose et une mort prématurée. Les nanovirus et babuvirus sont restreints au phloème (Shirasawa-Seo, 2005). Curieusement, les segments du faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) s'accumulent selon des fréquences spécifiques à leur hôte, appelé "formule génomique" (Sicard, 2013). De plus, les cellules infectées ne contiennent pas nécessairement tous les segments ce qui suggère un fonctionnement cellulaire en réseau dans lequel des protéines indispensables à la multiplication

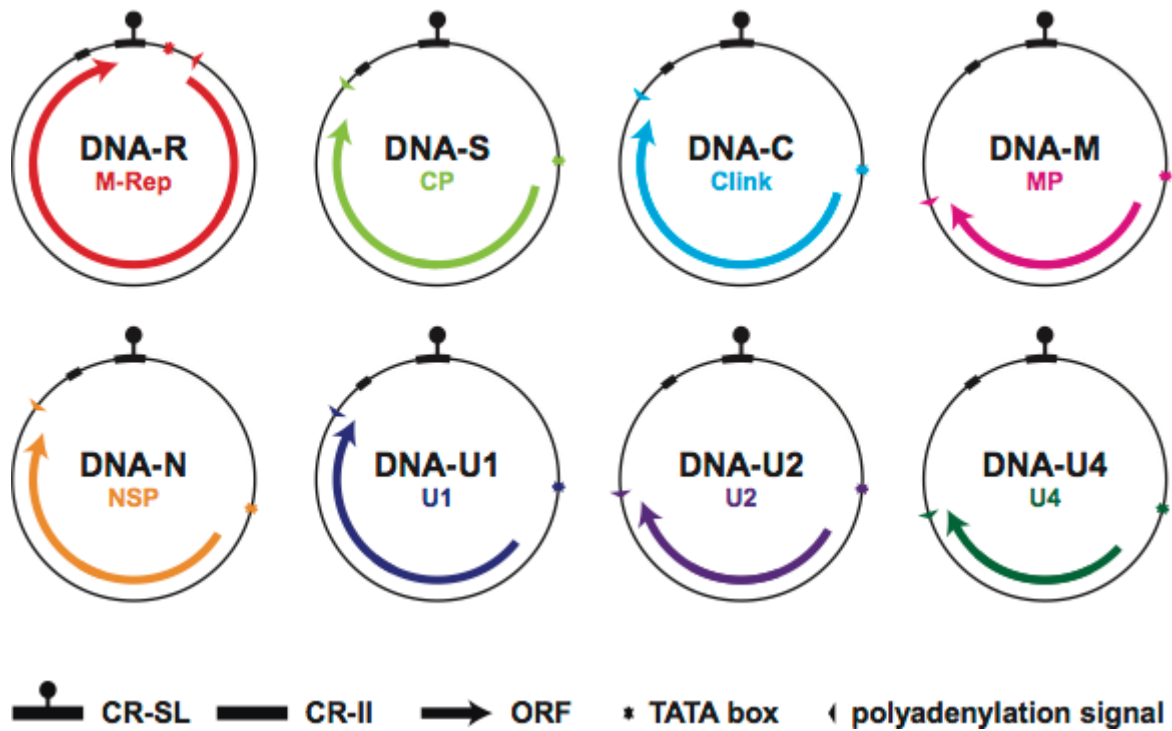


Figure 19 : Schéma de l'organisation génomique des virus de la famille *Nanoviridae*. Chaque cercle représente un segment d'ADN viral (ADN-R, ADN-S, ADN-C, ADN-M, ADN-N, ADN-U1, ADN-U2, ADN-U4). Le nom de la protéine codée par chaque segment est indiqué en couleur et la flèche colorée correspondante représente le cadre de lecture de ces protéines (9^{ème} rapport ICTV).

du virus telles que la protéine de réplication (Rep) puisse être accessible même à des cellules qui ne contiennent pas l'ADN-R (Sicard, 2019).

4. Transmission

Ni transmission mécanique ni transmission verticale à la graine n'ont pour l'instant été décrites dans cette famille. La seule transmission naturelle décrite se produit par des hémiptères. Les virus appartenant à la famille *Nanoviridae* ont comme seuls vecteurs des pucerons. Les pucerons décrits comme vecteurs chez les nanovirus appartiennent aux espèces *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis fabae*, *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Megoura viciae* mais il est considéré que *Aphis craccivora* serait le vecteur naturel majeur car très fréquemment observé sur légumineuses (Sicard, 2015). Les babuvirus n'ont pu être transmis qu'avec le puceron du bananier, *Pentalonia nigronervosa*, sauf le cardamom bushy dwarf virus (CBDV) transmis aussi par le puceron *Micromyzus kalimpongensis* (Blackman et Eastop, 2008). Une formule génomique propre aux pucerons et indépendante de l'espèce (*A. pisum*, *A. craccivora* et *M. persicae*) a été montrée pour le FBNSV avec des proportions relatives très différentes entre plante et puceron pour les ADN-U1, U2 et N (Sicard, 2015).

Cependant, le *Coconut foliar decay virus* (CFDV) pour l'instant espèce non-assignée de la famille *Nanoviridae*, serait transmis par le cixiide (Fulgoromorpha) *Myndus taffini* (Wefels, 2015). La CP du CFDV possède la plus forte similarité de séquence (19 à 24 %) avec celles d'un bégomovirus trouvé sur *Fabaceae* (vecteur aleurode) et d'un grablovirus (vecteur membracide) qui appartiennent tout deux à la famille *Geminiviridae*. Cette divergence de séquence de la CP, qui constitue chez les gémivirus un facteur de spécificité de la transmission par l'insecte vecteur, reflète probablement la transmission par un autre hémiptère que le puceron, en l'occurrence un cixiide. Les auteurs de cette étude ont donc proposé qu'une nouvelle famille virale à ADN simple brin appelée *Naminiviridae* soit créée afin d'accommoder le CFDV qui possède à la fois des caractéristiques génomiques des virus appartenant à la famille *Nanoviridae* et *Geminiviridae* (Gronenborn, 2018).

a. Déterminants de la transmission

En 2018, Grigoras et al. ont démontré que le nanovirus FBNSV avait besoin d'un facteur assistant de la transmission (« helper component » ou HC) pour assurer la transmission du virus et que ce facteur n'est autre que la protéine virale NSP. C'est à ce jour, le seul virus circulant non-propagatif pour lequel est décrit une stratégie dite « helper ».

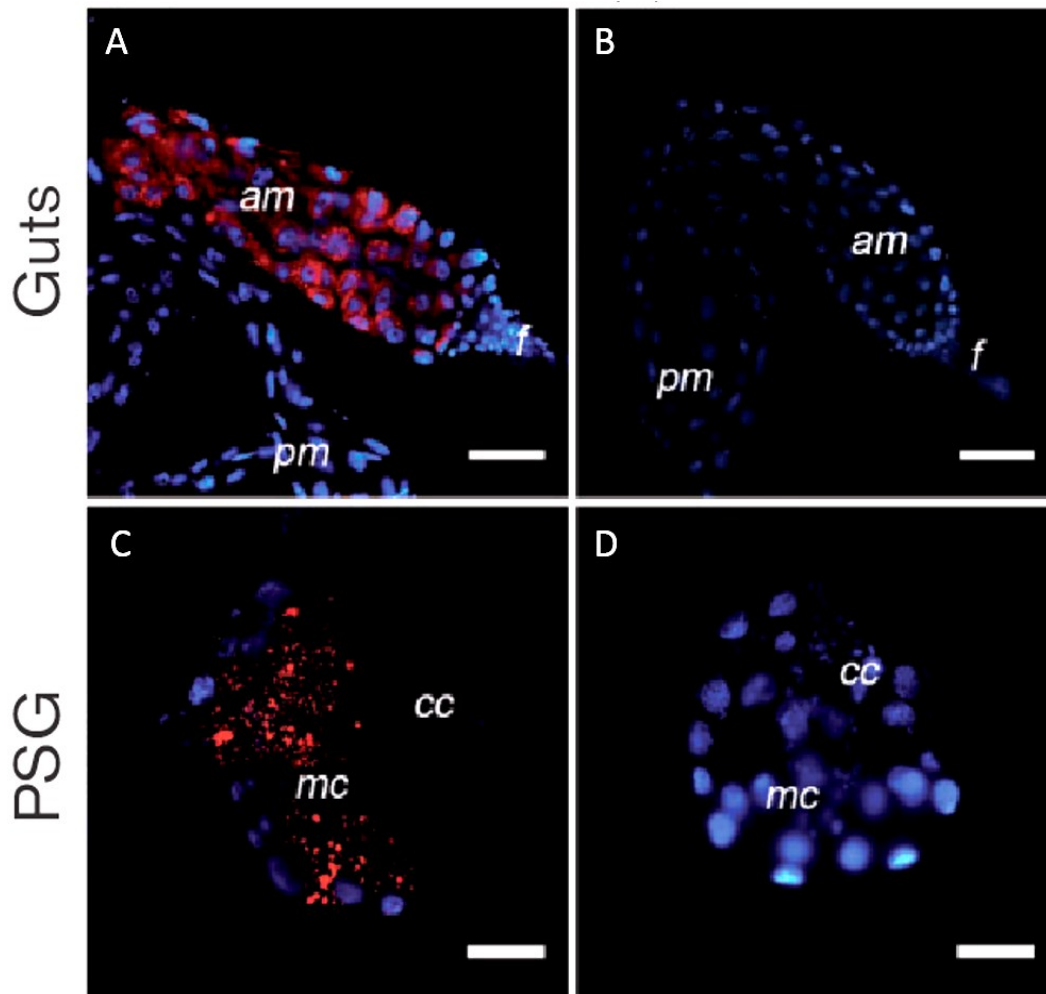


Figure 20 : Localisation par immunofluorescence du banana bunchy top virus dans les intestins et glandes salivaires du puceron *Pentalonia nigronervosa*. Les protéines du BBTV ont été révélées à l'aide des anticorps secondaires marqué à l'Alexa Fluor 555 (rouge). Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI (bleu). (A) Intestin moyen et intestin postérieur de puceron virulifères au BBTV. (B) Intestin moyen et intestin postérieur de puceron provenant d'une plante saine. (C) Glande salivaire principale du puceron virulifère au BBTV. (D) Glande salivaire principale du puceron provenant d'une plante saine. Les barres d'échelle correspondent à 100 nm. am : intestin moyen ; pm : intestin postérieur ; cc : cellules couvrantes ; f : intestin antérieur ; mc : cellules principales ; psg : glandes salivaire principale (Watanabe, 2013).

Les nanovirus doivent donc franchir la barrière intestinale de leur insecte vecteur. La suite du trajet des nanovirus se déroule par la libération du virus dans l'hémolymphe, puis sa migration jusqu'aux glandes salivaires principales (Franz, 1999 ; Bressan et Watanabe, 2011). Comme le BBTV, le FBNSV est localisé dans l'intestin moyen antérieur et dans les glandes salivaires principales de son vecteur *A. pisum* (Di mattia, 2020 - en cours de révision). Le trajet emprunté par le virus est encore sujet à débat car même s'il est trouvé dans l'hémolymphe, l'hypothèse d'une translocation directe de l'intestin aux glandes salivaires ne peut pas être exclue, quand des repliements du tractus intestinal mettent ces organes en contact (Watanabe et Bressan, 2013). Quant aux mécanismes de passages dans les organes, les auteurs d'une étude sur le BBTV ont exclu plusieurs processus d'internalisation cellulaire, tels que ceux impliquant des endosomes précoces, notamment l'endocytose clathrine-dépendante ou cavéoline-dépendante (Watanabe, 2016). En outre, dans mon équipe, l'immunomarquage des segments du FBNSV deux à deux a permis de montrer des résultats contrastés entre plante et puceron. Alors que dans le puceron tous les segments semblent co-localiser dans des vésicules dont la nature reste à déterminer au niveau de l'intestin et des glandes salivaires, dans la plante, les segments ne co-localisent pas nécessairement. La protéine de capsid et l'ADN viral co-localisent également au niveau des vésicules chez le puceron, ce qui indique que l'ADN viral ne circule pas sous forme libre.

IX. Geminiviridae

1. Généralités

Les géminivirus sont d'importants pathogènes de plantes principalement dans les régions tropicales/subtropicales et méditerranéennes. Ils causent des dégâts économiques importants sur des cultures à la base de la consommation humaine (tomate, manioc, maïs). Ils infectent à la fois des plantes monocotylédones et dicotylédones. La famille des Geminiviridae est à l'heure actuelle divisée en neuf genres : *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*, *Turncurtovirus*, *Topocuvirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Capulavirus*. Ce sont des virus non-enveloppés caractérisés par leur forme icosaédrique jumelée qui a donné son nom à cette famille virale (du latin *Geminus*, jumeau). La taille de ces doublets est estimée à 18-20 nm de diamètre et 30 nm de long (Zhang, 2001 ; Jeske, 2009).

Le génome des géminivirus est composé d'ADN circulaire simple brin de 2,6 à 3 kb selon le genre.

Alors que le génome des bégomovirus bipartites est composé de deux molécules d'ADN circulaire, A et B, celui des autres bégomovirus et des membres des autres genres est composé d'un seul ADN, A-like. Certains géminivirus ont été trouvés en co-infection avec des ADNs satellites. Ces ADNs satellites ont été classés en trois catégories selon leur séquence, et la nature de leur dépendance au géminivirus: alphasatellites, béta-satellite, et deltasatellite. Les alphasatellites sont capables de se répliquer de manière autonome dans les cellules végétales mais dépendent du géminivirus assistant (helper) pour leur mouvement dans la plante, leur transmission par l'insecte vecteur (Mansoor, 1999 ; Saunders & Stanley, 1999). Les béta-satellites contiennent des régions conservées et codent pour une seule protéine nommée B(béta)C1. BétaC1 amplifie les symptômes et participe à la suppression de la défense des plantes par silencing (Briddon, 2001; Cui, 2005; Zhou, 2013). Les deltasatellites ont été récemment découverts. Ils ne codent pour aucune protéine (Fiallo-Olivé, 2012; Zhou, 2013; Lozano, 2016).

2. Organisation génomique et fonction des différentes protéines

Le génome des géminivirus est ambisens, c'est à dire que les deux brins d'ADN, le viral et le complémentaire, codent pour des protéines (Fig. 21). Ainsi, les ORFs V1 et V2 sont codées par le brin viral alors que les ORFs C1, C2, C3 et C4 sont codées par le brin complémentaire (synthétisé lors de la réplication). La phase de lecture V1 code pour la protéine de capsid (CP), la protéine structurale. Cette protéine intervient dans la dispersion systémique du virus dans la plante (Briddon, 1989 ; Lazarowitz, 1989 ; Noris, 1998 ; Rojas, 2001; Wartig, 1997). De plus, étant exposée à la surface du virion, la CP joue un rôle clef dans la reconnaissance et la transmission du géminivirus par son insecte vecteur (Briddon, 1990 ; Caciagli, 2009). La phase de lecture V2 code pour la protéine de mouvement (MP) qui contrôle la dispersion du virus de cellule à cellule dans la plante (Rojas, 2001 ; Wartig, 1997). Sur l'autre brin, la phase de lecture C1 code pour la protéine impliquée dans la réplication (Rep). Elle permet l'accumulation de l'ADN viral dans les cellules végétales en association avec la protéine stimulatrice de la réplication (replication enhancer, REn) codée par la phase de lecture C3 (Hanley-Bowdoin, 2000). Ces deux protéines ont des rôles cellulaires multiples puisqu'elles sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire mais aussi la différenciation cellulaire et l'expression des gènes (Arguello-astorga, 2004 ; Castillo, 2004 ; Gutierrez, 2002 ; Settlage, 2001).

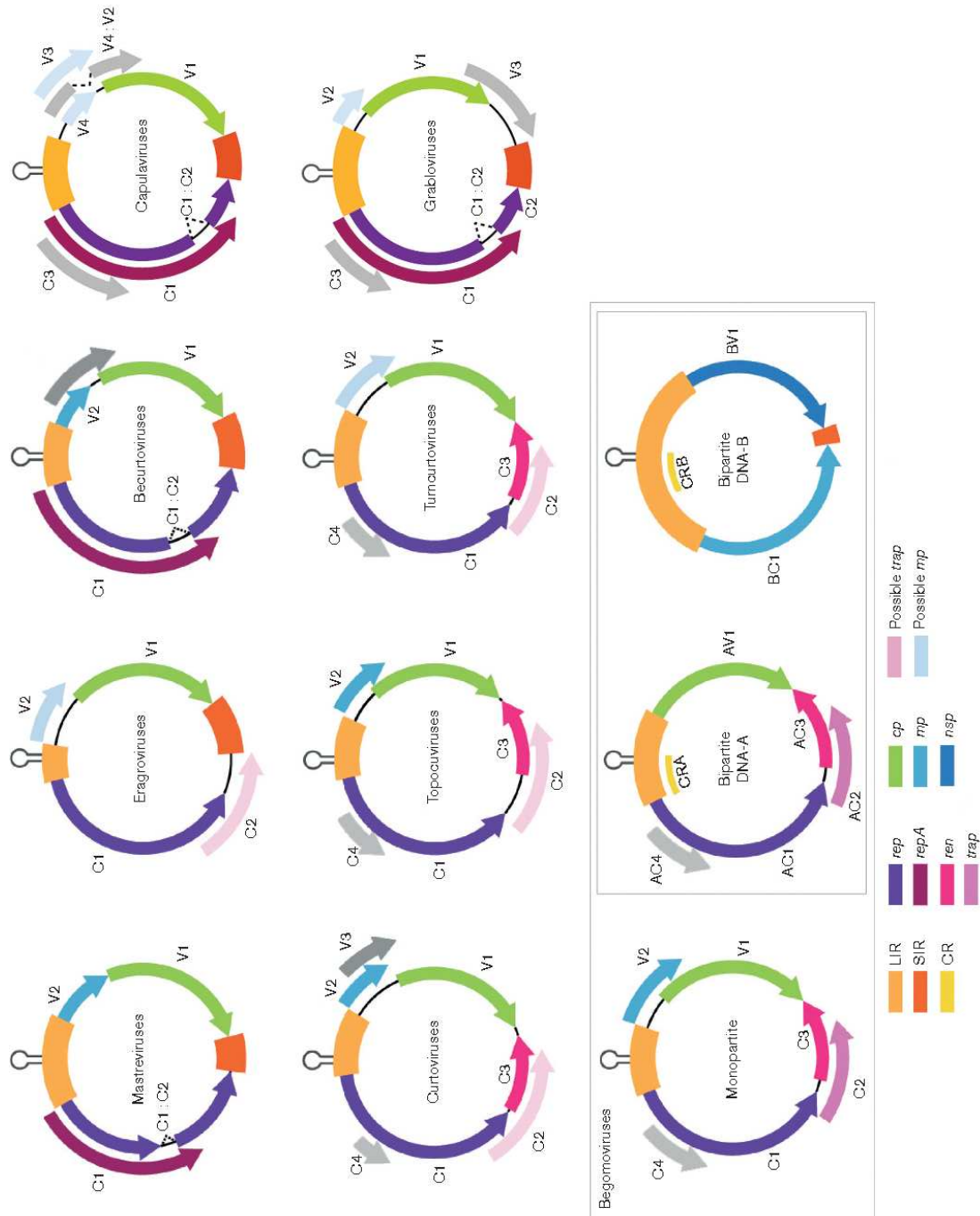


Figure 21 : Organisation génomique des différents genres de la famille *Geminiviridae*. Les cadres de lecture sont colorés en fonction des protéines produites. rep : protéine associée à la réplication ; ren : protéine stimulatrice de la réplication ; trap : protéine activatrice de la transcription ; cp : protéine de capsid ; mp : protéine de mouvement ; nsp : protéine de navette vers le noyau ; LIR : longue région intergénique ; SIR : courte région intergénique ; CR : région commune. La tige boucle qui contient l'origine de réplication est indiquée dans la LIR (Zerbini, 2017).

La phase de lecture C2 code pour la protéine activatrice de la transcription (TrAP) de la CP et de BV1 codé par le composant B des bégomovirus bipartite (van Wezel, 2001). TrAP a aussi pour fonction la suppression du gene silencing (Bisaro, 2006 ; Rojas, 2005 ; Sharma et Ikegami, 2010). Enfin, la protéine C4 codée par le cadre de lecture du même nom intervient dans la sévérité des symptômes de la maladie, dans la gamme d'hôte et dans le mouvement de cellule à cellule (Dogra, 2009 ; Latham, 2002 ; Rigden, 1994 ; Jupin, 1994 ; Teng, 2010). De plus, un rôle de suppresseur de silencing lui a aussi été attribué (Dogra, 2009).

L'ADN-B des bégomovirus possèdent deux phases de lecture. Porté par le brin complémentaire, le gène BC1 code pour la protéine MP qui contribue au mouvement de cellule à cellule de l'ADN viral. Porté par le brin viral, le gène BV1 code pour la NSP qui est impliquée comme chez les nanovirus dans le transport de l'ADN viral du noyau vers le cytoplasme (Sanderfoot, 1996 ; Gafni et Epel, 2002).

3. Réplication virale

Les géminivirus se répliquent par un mécanisme de cercle roulant à l'intérieur du noyau de la cellule infectée de la plante (Stenger, 1991 ; Preiss et Jeske, 2003). Après la décapsidation, l'ADN circulaire simple-brin est tout d'abord converti en un intermédiaire double brin par l'ADN polymérase cellulaire (Saunders, 1992). Chez les mastrevirus, la synthèse du brin complémentaire s'effectue grâce à des petits fragments d'ADN encapsidés dans la particule virale et hybridés avec l'ADN génomique dans la petite région intergénique (small intergenic region, SIR). Chez les bégomovirus, la synthèse d'une amorce ARN complémentaire se produit à la région intergénique (IR). L'ADN double-brin circulaire s'associe avec les histones de la cellule hôte et forme ainsi des mini-chromosomes viraux.

Sous cette forme, l'ADN double brin est capable d'être répliqué par le mécanisme du cercle roulant comme le font les phages à ADN circulaire simple brin (ex: M13) (Novick, 1998). Outre la tige boucle portant l'origine de réplication, d'autres séquences de la région intergénique sont également nécessaire pour initier la réplication. Ce sont des séquences répétées qui ont été identifiées comme site de fixation de la Rep chez le bégomovirus tomato golden mosaic virus (TGMV) (Fontes, 1994).

La Rep initie le cycle de réplication par une coupure (*) du brin d'ADN viral au niveau de la tige boucle dans la séquence conservée, nonanucléotidique TAATATT*AC puis reste liée à l'extrémité 5' de l'ADN (Hanley-Bowdoin, 1999). Les facteurs de la cellule-hôte, dont une

ADN polymérase, forment un complexe de réplication autour de Rep. L'extrémité 3'-OH libre formée sert d'amorce pour la réplication d'un nouveau brin viral par le mécanisme de cercle roulant. Le brin complémentaire sert de matrice. L'ancien brin viral est déplacé au fur et à mesure que la réplication progresse. Après un tour de réplication, la structure tige-boucle se forme sur le brin néosynthétisé. Rep clive de nouveau dans la séquence nonanucléotidique et transfère l'extrémité 3'-OH libéré de l'ancien brin à l'extrémité 5' liée à Rep. L'ADN circulaire ainsi formé pourra être encapsidé (Sunter et Bisaro, 1991).

4. Transmission des géminivirus

Les vecteurs de géminivirus sont des hémiptères appartenant à différentes familles : *Aleurodidae*, *Cicadellidae*, *Membracidae*, *Aphididae*. Dans la famille *Geminiviridae*, les membres d'un même genre sont transmis spécifiquement par des représentants d'une de ces familles. Ainsi, les virus du genre *Begomovirus* sont transmis par des aleurodes, ceux des genre *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus* et *Turncurtovirus* sont transmis par des cicadelles, ceux des genres *Topocuvirus* et *Grablovirus* sont transmis par membracides, et enfin, ceux du genre *Capulavirus* par pucerons (Fig. 22). Chez les bégomovirus, l'aleurode *B. tabaci* est la seule espèce vectrice. *Bemisia tabaci* est un complexe d'espèces qui regroupe une trentaine d'espèces cryptiques. Sur la base de spécificité biologique, certaines espèces cryptiques sont appelées « biotype ». Les deux biotypes les plus étudiés et vraisemblablement les plus répandus géographiquement sont le biotype B (espèce Middle East-Asia Minor 1 ; MEAM1) et Q (espèce Méditerranéen ; MED) (De Barro, 2011 ; Lee, 2013). Chez les mastrevirus, les cicadelles vectrices appartiennent à de nombreux genres et espèces différentes, en fonction de leur origine géographique (Kvarnheden, 2016).

a. Trajet du virus dans son vecteur (exemple des bégomovirus chez *Bemisia tabaci*)

La majorité des géminivirus sont limités aux tissus phloémiens de leur plante hôte bien que certains envahissent aussi le mésophylle, tel le bégomovirus bipartite bean dwarf mosaic virus (BDMV) (Levy, 2003) ou le mastrevirus maize streak virus (MSV) (Lucy, 1996). Quand il y a restriction au phloème, l'acquisition n'est possible qu'au moment où le vecteur atteint les tissus du phloème. Cependant, comme le repas d'un hémiptère piqueur-suceur consiste principalement en des périodes d'alimentation prolongée dans les tubes criblés du phloème, l'acquisition virale est alors potentiellement très efficace.





				
	Aphididae	Cicadellidae	Aleyrodidae	Membracidae
<i>Begomovirus</i>	-	-	+ 200	-
<i>Mastrevirus</i>	-	10	-	-
<i>Curtovirus</i>	-	3	-	-
<i>Becurtovirus</i>	-	1	-	-
<i>Topocuvirus</i>	-	-	-	1
<i>Turncurtovirus</i>	-	1	-	-
<i>Capulavirus</i>	2	-	-	-
<i>Grablovirus</i>	-	-	-	1

Figure 22 : Hémiptères vecteurs des virus appartenant aux différents genres de la famille des *Geminiviridae*. Aucun vecteur associé au genre *Eragrovirus* n'a été décrit à ce jour.

Chez les bégomovirus, les interactions virus-vecteur les plus étudiées l'ont été avec le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) en raison de son importance économique (Brown, 2015 ; Czosnek, 2007 ; Navas-Castillo, 2011) (Fig. 23). L'ingestion du TYLCV est plutôt rapide comme le montre sa détection dans la tête de l'aleurode 5 minutes après le début de l'AAP (Atzmon, 1998). Cette durée a pu être corrélée avec le temps moyen que mettent les stylets de l'aleurode pour rejoindre les tissus du phloème et commencer l'ingestion de sève élaborée (Jiang, 2000). Les particules virales vont ensuite passer le long du canal alimentaire pour rejoindre l'oesophage, la chambre filtrante et l'intestin moyen de l'insecte au bout de 40 min d'AAP. Les virions pénètrent la membrane plasmique des cellules épithéliales de la chambre filtrante et de l'intestin moyen probablement par un mécanisme d'endocytose (Mercer, 2010). Cette hypothèse forte est soutenue par des expériences où l'assemblage des clathrines et des dynamines à la surface des cellules a été chimiquement inhibé et a mené à une réduction de la quantité de virus dans l'hémolymphe (Pan, 2017). Les virions transportés à travers le cytoplasme des cellules épithéliales de la chambre filtrante sont observés dans des vésicules, également présentes chez l'aleurode non-vectrice *Trialeurodes vaporarium* ne renfermant pas de virus (Uchibori, 2013). Ces vésicules seraient des endosomes car l'ingestion d'anticorps Rab5 et d'ARN double-brin Rab7 qui ciblent respectivement les endosomes précoces et tardifs a mené à une accumulation plus importante du TYLCV dans l'intestin moyen de *B. tabaci* (Pan, 2017). Néanmoins, une autre étude fait état du transport dans le cytoplasme du TYLCV uniquement dans des endosomes précoces qui vont fusionner avec la membrane plasmique basale des cellules épithéliales de l'intestin moyen (Xia, 2018). La fusion des vésicules avec la membrane plasmique basale entraîne la libération des particules virales dans l'hémolymphe de l'insecte, à partir de 90 minutes après le début du repas. Les particules virales pénètrent les glandes salivaires principales entre 4 et 7 heures après le début de l'acquisition, par un mécanisme encore inconnu. La reconnaissance des géminivirus par les glandes salivaires de l'aleurode semble spécifique car les cellules entourant la région sécrétrice des glandes salivaires principales discriminent les bégomovirus. Ainsi, sur la base d'immunomarquage de la CP, le *Tomato yellow leaf curl China* (TYLCCNV), non transmis par le biotype Q, resterait cantonné à l'extérieur des glandes salivaires principales chez des aleurodes de ce biotype.

En revanche, le TYLCV, transmis efficacement par le biotype Q, entre et se dissémine dans les glandes salivaires principales. Le TYLCV s'accumule ensuite dans la région centrale où se trouvent les cellules sécrétrices des glandes salivaires principales au bout de 12 à 24h. Puis, entre 36 et 72h la CP du TYLCV est observée le long du canal salivaire (Ghanim, 1998).

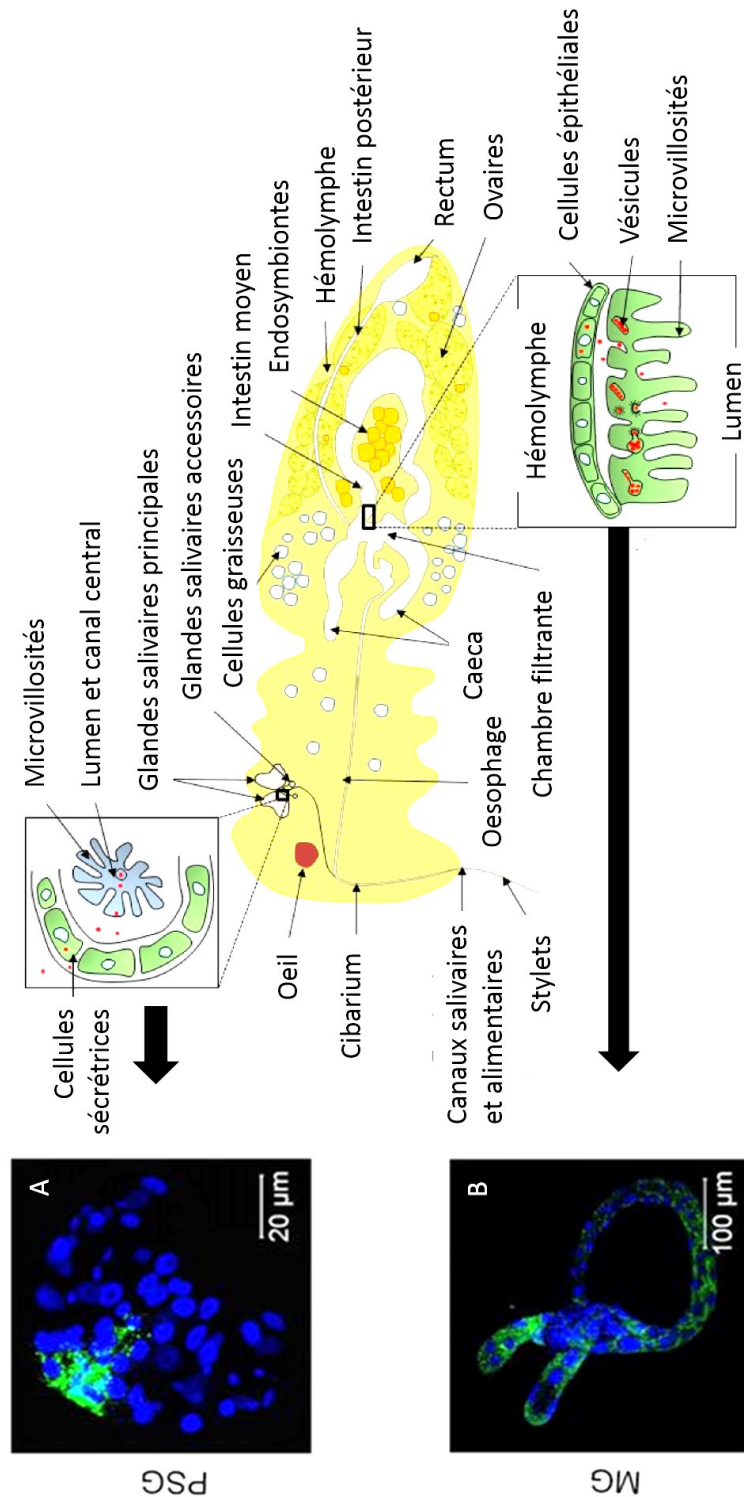


Figure 23 : Circulation du TYLCV dans son insecte vecteur, l'aleurode *Bemisia tabaci*. (A) Photo d'une glande salivaire de *B. tabaci* virulifère pour le TYLCV. (B) Photo d'un tube digestif de *B. tabaci* virulifère pour le TYLCV. (C) Schéma des organes de *B. tabaci* qui peuvent être impliqués dans la transmission des bégomovirus (Adapté de Czosnek, 2017 et Wei, 2017).

Enfin, les particules virales sont excrétées dans la salive du vecteur, et la transmission du virus se produit lorsque cette salive est excrétée dans le phloème de la plante hôte. Certains bégomovirus lorsqu'ils sont présents dans l'hémolymphe, sont aussi capables d'envahir le tissu adipeux et les ovaires de l'aleurode (Luan, 2011). Des cas de transmissions verticale aux oeufs, aux nymphes et mêmes aux adultes ont d'ailleurs été décrits pour le TYLCV, le tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) et le TYLCCNV (Ghanim, 1998 ; Bosco, 2004 ; Wang, 2010). Dans une étude, les expérimentateurs ont constaté l'infectiosité d'insectes transmetteurs deux générations après l'acquisition virale de l'aleurode, en l'absence de plante infectée (Wei, 2017).

b. Circulant propagatif ?

La réplication des géminivirus reste un sujet en débat car même si dans la majorité des cas la transmission est décrite comme non-propagative, certaines expériences ont apporté des preuves de la réplication et de la transcription des géminivirus dans l'insecte vecteur. Pakkianathan et al., (2015) ont montré qu'après 8 heures d'AAP sur une plante source, les aleurodes déplacés sur une plante non-hôte du virus présentaient dans les trois premiers jours, une augmentation multiple des quantités de transcrits viraux et d'ADN viral avant que celles-ci ne décroissent jusqu'à un niveau basal. Les auteurs rapportent de manière concomitante la détection par FISH de brins d'ADN complémentaire dans les noyaux des cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'aleurode, ce qui suggérerait la présence de formes répliquatives de l'ADN. Dans un autre article, Wang et al. (2016), confirment chez l'aleurode une augmentation des transcrits, de l'ADN génomique et observent aussi une augmentation de l'accumulation de la CP entre 12 et 48 heures après une AAP de 6 heures.

Une première explication à cette augmentation est que lors de l'ingestion de la sève, des particules virales mais aussi des brins viraux complémentaires et des facteurs de répliquations de la plante sont ingérés, permettant alors une réplication dans les premiers jours sur une plante non-hôte (Becker, 2015). Néanmoins, cette hypothèse a été réfutée dans une étude de Sanchez-Campos en 2016, où des virions ont été traités à la DNase-I et ingérés artificiellement sur membrane. Malgré ces précautions, des ADN simple-brin et des ADN double-brin viraux ont été trouvés associés aux particules virales du TYLCV dans *B. tabaci*.

Curieusement, les variations des transcrits du TYLCV dans les aleurodes ont été corrélées avec l'induction de la voie de l'autophagie (Wang, 2016). Une deuxième explication qui a été proposée est que la réplication virale du TYLCV pourrait activer un mécanisme de défense chez

l'insecte dépendant de la voie de l'autophagie qui à son tour supprimerait la réplication virale afin de contenir la quantité de virus dans le corps de l'insecte. Cette hypothèse est cohérente avec l'observation d'une augmentation prolongée de l'ADN viral dans des aleurodes dont la physiologie a été perturbée par l'administration de pesticides.

c. Intéactants et récepteurs

La CP est la seule protéine structurale des géminivirus et aucune protéine assistante de la transmission n'a été décrite. La CP est donc la seule protéine virale qui peut être en contact avec les organes du puceron lors de son séjour dans le corps de l'insecte. Cette protéine joue un rôle crucial dans la transmission des géminivirus en permettant la reconnaissance spécifique du virus par son insecte vecteur. Pour preuve, l'échange du gène codant pour la CP du bégomovirus africain cassava mosaic virus (ACMV) avec celui du curtovirus beet curly top virus (BCTV) engendre la transmission de l'ACMV par la cicadelle vectrice du BCTV (Briddon, 1990). Comme indiqué ci-dessus, la CP serait impliquée dans la pénétration spécifique du TYLCV dans les glandes salivaires principales, et dans la pénétration des cellules épithéliales de l'intestin (Czosnek, 2002 ; Ohnishi, 2009). Par ailleurs, il a été montré qu'un isolat non-transmissible du TYLCSV a pu redevenir infectieux par le changement de quelques résidus d'acides aminés de la CP, déterminés essentiels dans l'infection systémique, la formation des particules virales et la transmission des bégomovirus par leur insecte vecteur (Noris, 1998). Il a été démontré que la CP, protéine multifonctionnelle, interagit également avec la vitellogénine de l'oeuf et permet l'entrée du TYLCV dans les oeufs en cours de développement (Wei, 2017).

Du côté de l'insecte, l'intestin moyen des hémiptères présente une bordure en pinceau à la membrane apicale, une configuration idéale pour l'endocytose virale (Czosnek, 2002). La CP du TYLCV a d'ailleurs été immuno-localisée entre les microvilli du lumen de l'intestin. Le déclenchement de l'internalisation du virion doit dépendre de la présence et de la reconnaissance de récepteurs par la protéine de capsid.

Plusieurs protéines d'insectes ont été décrites pour leur interaction avec la CP et leur colocalisation avec le virus dans l'intestin du vecteur. Celles qui ont aussi démontré leur implication dans la transmission de ces virus sont décrites ci-dessous.

La **Hsp70** (heat shock protein) co-localise avec la CP du TYLCV dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'aleurode *B. tabaci*. Ces deux protéines interagissent *in vitro* et l'ingestion orale d'anticorps anti-hsp70 en même temps que le TYLCV entraîne une augmentation de la transmission du virus. Les heat shock protéines sont produites en condition

de stress cellulaire. Il a donc été suggéré que l'interaction de cette protéine avec la CP du TYLCV pourrait conduire à une réaction de stress et provoquer la dégradation des virions (Götz, 2012).

La protéine intestinale (MGP pour **midgut protein**) co-localise avec les particules virales du tomato leaf curl New Delhi virus (ToLCNDV) et du cotton leaf curl Rajasthan virus (CLCuRV) dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen de l'aleurode *B. tabaci*. Elle a été identifiée par un criblage double-hybride contre les protéines de capsid de ces deux bégomovirus, et son interaction avec la CP du ToLCNDV a pu être confirmée en pull-down. Enfin, l'ingestion d'anticorps anti-MGP diminue le taux de transmission du ToLCNDV, ce qui suggère que cette protéine pourrait être nécessaire à la transmission du virus (Rana, 2015).

La **cyclophiline B** (CypB) co-localise avec la CP du TYLCV dans la chambre filtrante, dans les caeca, dans l'intestin moyen, dans les glandes salivaires principales et même dans les oocytes. Cette protéine est surexprimée chez les aleurodes virulifères et l'ingestion d'anticorps anti-CypB diminue la transmission du TYLCV. Les cyclophilines sont connues pour leur activité peptidyl prolyl isomérase, qui sont des enzymes qui transforment certaines protéines de forme *trans* en forme *cis*, et modulent ainsi leur activité (Kanakala, 2016).

La protéine de reconnaissance des peptidoglycane (**PGRP**) chez *B. tabaci* (BtPRPG) interagit avec la CP du TYLCV dans les intestins des aleurodes virulifères, comme cela a été montré par immunocapture PCR et immunofluorescence. L'expression des transcrits qui codent pour PGRP est sur-réglée lors de l'accumulation des bégomovirus TYLCV et TYLCCNV dans le corps de l'insecte vecteur. Les PGRPs sont des composants importants de la voie de signalisation de l'immunité innée, ils reconnaissent des motifs associés aux pathogènes (MAMP - Microbe-associated molecular pattern). De ce fait, PGRP pourrait être impliqué dans l'immunité de l'aleurode lors du transit des bégomovirus (Wang, 2016).

Une fois l'intestin franchit, les virions sont exposés à de potentiels réactions de défenses au sein de l'hémolymphe pouvant impliquer des protéases et nucléases (Nation, 2016). Plusieurs résultats montrent que la CP du TYLCV interagit avec la chaperone **GroEL** produite par la bactérie endosymbiotique *Hamiltonella spp.*, et suggèrent que le virus pourrait ainsi se protéger de l'environnement hostile de l'hémocèle (Morin, 2000). Le rôle de cette protéine serait donc identique à celui de la GroEL produite chez les pucerons par *Buchnera aphidicola* dans le cadre de la transmission des lutéovirus (Van den Heuvel, 1994). Les GroELs produites par *Wolbachia* et *Arsenophonus* des biotypes B et Q interagissent faiblement avec la CP du TYLCV, ce qui

semble valider la spécificité pour l'interaction avec la GroEL d'*Hamiltonella spp.* Enfin, il a été montré que la GroEL d'*Arsenophonus* interagit avec la CP du cotton leaf curl virus (CLCuV) et les résultats suggèrent son implication dans la transmission du virus (Rana, 2012).

X. Capulavirus

1. Généralités

Une précédente doctorante du laboratoire, Pauline Bernardo, a réalisé des études de métagénomique virale qui ont généré des séquences de gémivirus très divergents. Les plantes sur lesquelles ces séquences ont été détectées appartiennent à l'espèce *Euphorbia caput-medusae*, une euphorbe sauvage du fynbos en Afrique du Sud et à des échantillons de luzernes (*Medicago sativa*) collectés en Camargue. Après la thèse, d'autres études métagénomique réalisées en collaboration avec l'université d'Helsinki ont révélé d'autres séquences divergentes de gémivirus sur plantain lancéolé (*Plantago lanceolata*) échantillonné sur l'archipel d'Åland en Finlande. De façon inattendue, les séquences issues de ces échantillons très éloignés géographiquement et issus de plantes botaniquement très différentes, sont non seulement divergentes des centaines de gémivirus déjà connus, mais présentent des homologies de séquences et des similarités d'organisation génomique. Pour couronner cette découverte, un contact en Inde a permis à l'équipe de rattacher à ce nouveau groupe de gémivirus, un représentant indien isolé sur une plante de haricot vert (*Phaseolus vulgaris*) qui présentait des symptômes sévères d'enroulement dans l'état d'Uttar Pradesh. La caractérisation de ces nouvelles séquences virales a donné lieu à la création de quatre nouvelles espèces virales : *Euphorbia caput-medusae latent virus* (EcmLV), *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV), *French bean severe leaf curl virus* (FbSLCV) et *Plantago lanceolata latent virus* (PILV). Selon des critères de démarcation du genre dans la famille *Geminiviridae*, ces espèces virales ont été regroupées au sein d'un nouveau genre, nommé *Capulavirus* selon leur membre type l'*Euphorbia caput-medusae latent virus*. Outre l'homologie de séquences, l'appartenance à la famille *Geminiviridae* a été validée par la purification et l'observation en microscopie électronique de particules icosaédriques jumelées pour l'EcmLV (Roumagnac, 2015) (Fig. 24).

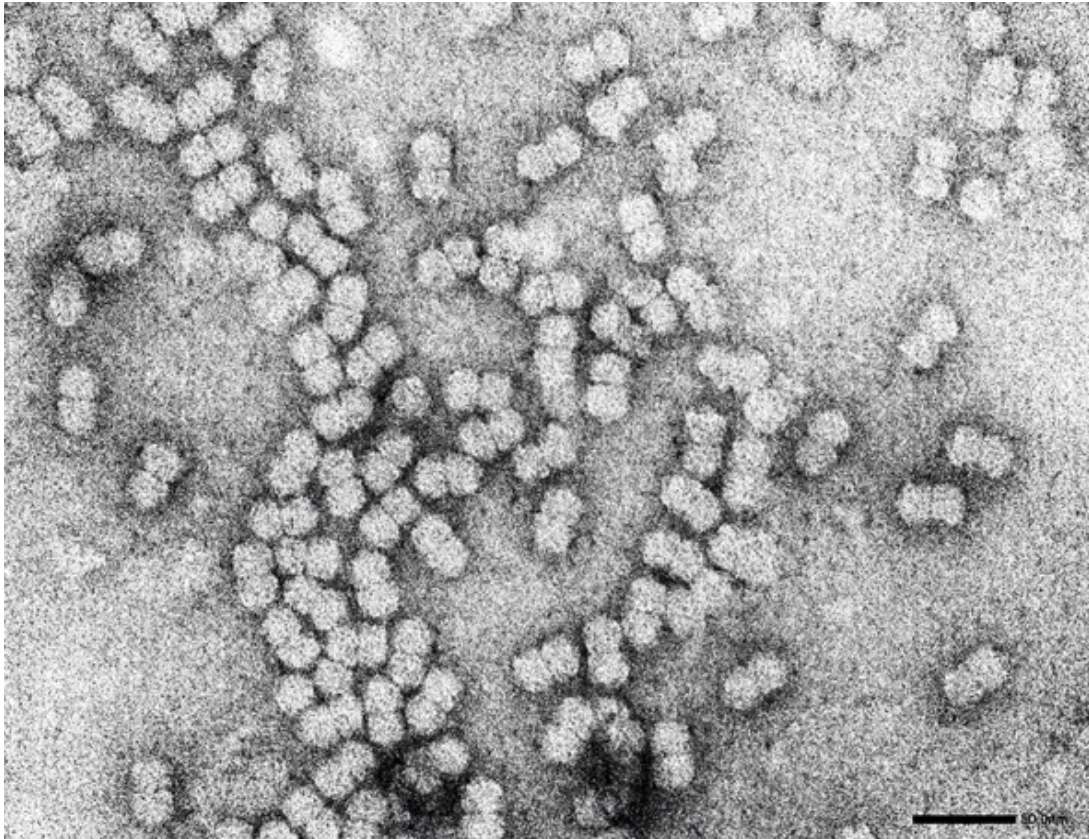


Figure 24 : Photo en microscopie électronique à transmission d'une purification des virions de l'euphorbia caput-medusae latent virus à partir d'un plant de *Nicotiana benthamiana* infecté par agro-inoculation. La barre d'échelle représente 50 nm (Roumagnac, 2015).

2. Organisation génomique

Du point de vue de l'organisation génomique, les capulavirus présentent des caractéristiques communes aux autres géminivirus et des caractéristiques qui leur sont propres. Leurs génomes présentent tout comme les mastrevirus et les becurtovirus, deux régions intergéniques (SIR et LIR) et une Rep qui est théoriquement traduite après épissage d'un transcrit englobant les cadres de lecture C1 et C2 (**Fig. 21**). Les capulavirus ont en commun avec les bégomovirus et les curtovirus, d'avoir un grand cadre de lecture C3, qui chevauche le cadre de lecture de la rep et dont la fonction reste à découvrir. En revanche, les capulavirus sont les seuls à présenter plusieurs cadres de lecture superposés (v2, v3 et v4) en amont du gène V1 codant pour la CP. Toutefois, ces cadres de lecture n'ont été décrits que sur la base des séquences virales et leur fonctionnalité reste à prouver. Par comparaison avec la position des gènes chez d'autres géminivirus tels que les mastrevirus et les bégomovirus, un des cadres de lecture en amont de V1 pourraient coder pour une protéine impliquée dans le mouvement du virus.

3. Homologies de séquence

L'ensemble des génomes de capulavirus forme un groupe monophylétique bien distinct des autres genres de géminivirus (**Fig. 25**). Les analyses de recombinaison ne soutiennent aucun scénario qui aurait conduit à ce nouveau genre par recombinaison avec des genres existants. Toutefois, les capulavirus ont comme les autres géminivirus, une propension élevée à la recombinaison intraspécifique et interspécifique. Ainsi, l'analyse et la comparaison des séquences ont dévoilées des événements de recombinaison entre différents isolats de l'ALCV mais aussi entre l'ALCV et l'EcmLV et entre l'EcmLV et le FbSLCV (**Davoodi, 2018**). Dans cette même étude, l'homologie de séquence entre tous les isolats de l'ALCV était supérieure à 80.2%. A partir des homologies de séquence et des événements de recombinaison, les isolats de l'ALCV ont été classés selon quatre génotypes majoritaires qui circulent actuellement dans le monde : ALCV-A, ALCV-B, ALCV-C et ALCV-D.

Chez les capulavirus, le seuil de démarcation de l'espèce a été fixé arbitrairement à 78% en prenant en compte les homologies de séquence connues, les caractéristiques biologiques des isolats et le seuil de démarcation chez les mastrevirus, genre qui partage la plus forte homologie de séquence avec le génome entier des capulavirus (**Varsani, 2017**). A ce jour, selon ce seuil, le genre *Capulavirus* compte quatre espèces qui correspondent à celles décrites ci-dessus.

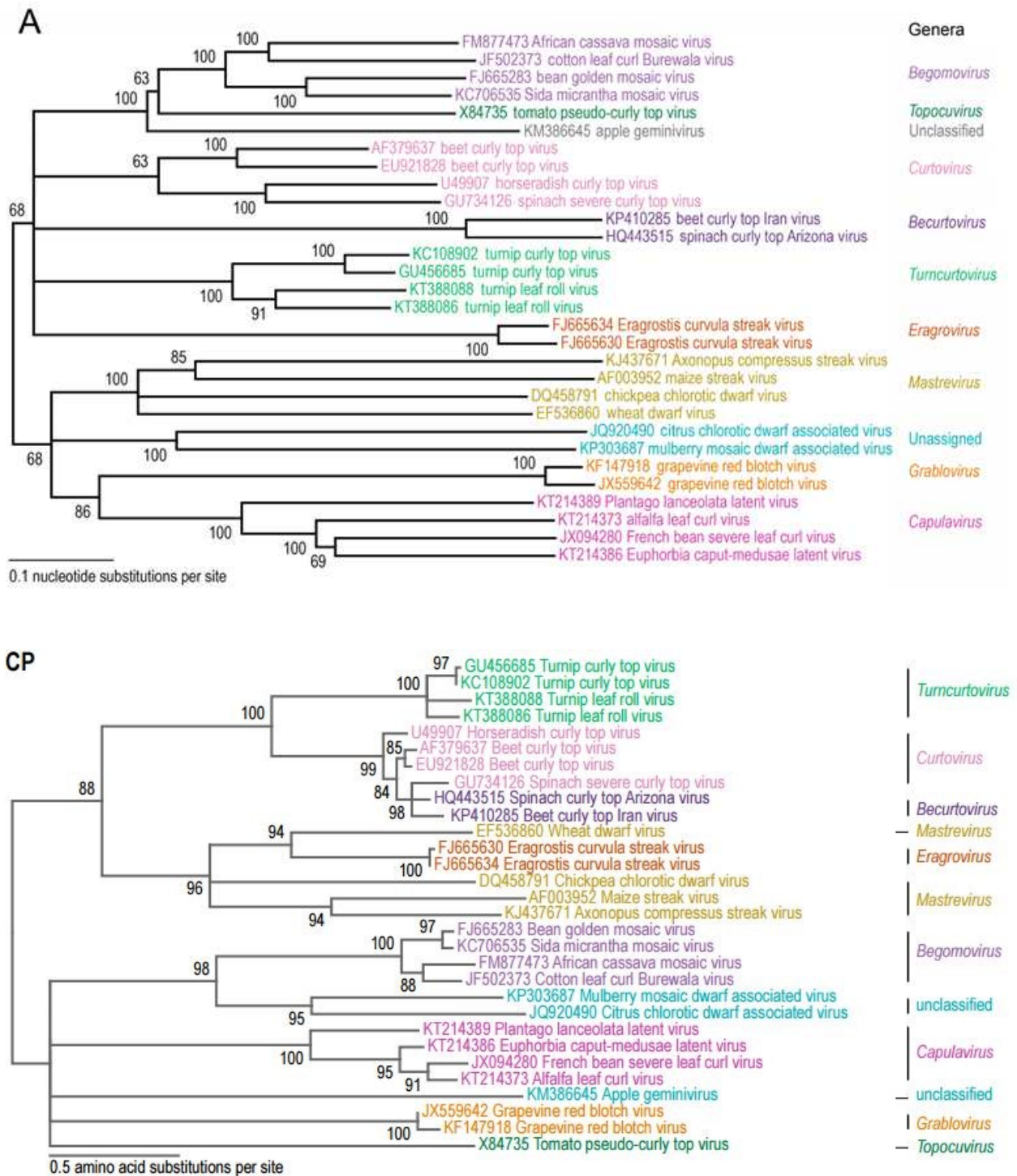


Figure 25 : Arbres phylogénétiques des séquences du génome complet (A), et des protéines de capsides d'isolats représentatifs dans les genres de la famille *Geminiviridae* (CP). Les embranchements correspondant aux capulavirus sont colorés en rose foncé (Varsani, 2017).

Un point important à noter est que la CP des capulavirus présente la plus forte homologie avec la CP des bégomovirus. Sachant que la CP est le déterminant majeur de la transmission par vecteur, nous posons l'hypothèse que cette proximité pourrait avoir un sens évolutif. En effet, les pucerons vecteurs de capulavirus sont phylogénétiquement apparentés aux aleurodes, vecteur de bégomovirus (ces deux taxons appartiennent au sous-ordre des Sternorrhyncha), alors que les cicadelles et les membracides vecteurs des autres géminivirus font partie des Auchenorrhyncha.

4. Considérations épidémiologiques

i. *Alfalfa leaf curl virus*

Du fait que l'ALCV ait été détecté dans le sud de la France, c'est le capulavirus qui a été le plus étudié par notre équipe. Sa prévalence a été recherchée non seulement en France mais aussi dans le Bassin Méditerranéen et au Moyen-Orient. Il a été trouvé en Espagne, Jordanie, Syrie, Liban, Tunisie, et Grèce. Grâce à des correspondants, l'ALCV a également été identifié en Iran et en Argentine. De plus il a été décrit en Chine (Kumari, 2018). Des échantillonnages réalisés en Afrique du Sud, Namibie, et Australie n'ont pas permis de détecter d'ALCV. En France, la prévalence de ce virus calculée selon un échantillonnage sans *a priori* (c-à-d., sur plantes asymptomatiques et symptomatiques), est assez variable selon les sites échantillonnés (3% à 46%), et en moyenne elle est de 14% (31/223) des cas (Bernardo, 2016). Une autre étude basée sur des collectes sans *a priori* dans tous les pays du bassin méditerranéen où l'ALCV a été détecté, ainsi qu'en Argentine, a montré la présence de l'ALCV dans 33% (51/170) des luzernes (Davoodi, 2018). En Iran, un échantillonnage des luzernes sur la base de symptômes a montré une prévalence de l'ALCV qui n'était pas plus élevée avec 16% de plantes infectées. Le génotype qui semble le plus répandu et avec la plus forte prévalence (n=56) est l'ALCV-A détecté dans presque tous les pays échantillonnés France, Grèce, Iran, Italie, Jordanie, Liban, Espagne, Syrie et Tunisie. L'ALCV-B (n=19) semblerait circuler en France et en Espagne. Enfin, l'ALCV-C (n=10) et l'ALCV-D (n=35) ont été trouvés en Iran et en Argentine, respectivement. Le virus a été détecté uniquement sur luzerne sauf en Iran où il a aussi été détecté sur d'autres plantes dont la fève, l'euphorbe, le robinier faux-acacia et le plantain (Bernardo ; communication personnelle Z. Davoodi). Il peut aussi infecter expérimentalement *N. benthamiana* de manière latente et la fève sur laquelle il provoque des symptômes d'énation des nervures et de boursoufflement sur les tiges (Roumagnac, 2015). Les symptômes observés au champ sur les luzernes infectées dans la région de Montpellier sont de type enroulement des

feuilles. L'enroulement des luzernes et l'énation des nervures sur les fèves, ressemblent à ceux décrits sur luzerne autour du bassin méditerranéen (France, Bulgarie, Roumanie, Espagne, Arabie saoudite) à partir des années 1950 (Alliot, 1972 ; Blattný, 1959 ; Cook et Wilton, 1984 ; Leclant, 1973 ; Rodriguez Sardiña et Novales Lafarga, 1973) (Fig. 26). Ces symptômes ont été associés à la présence d'un rhabdovirus mis en évidence par microscopie électronique sur des coupes ultrafines de tissus prélevés sur des plantes symptomatiques. De plus, ces symptômes ont pu être propagés d'une luzerne à une autre par le puceron *A. craccivora*. Sur la base de ces résultats, les chercheurs ont considéré que les symptômes d'énation étaient causés par un rhabdovirus qu'ils ont nommé luzerne enation virus (LEV) et que ce rhabdovirus était transmis par le puceron *A. craccivora* (Alliot, 1972). Il est tout à fait envisageable que les luzernes analysées ne contenaient pas seulement le rhabdovirus mais aussi l'ALCV. Un point faible de l'étude est que les plantes tests infectées par *A. craccivora* n'ont apparemment pas été examinées pour la présence de rhabdovirus. Les symptômes observés au champs sur les luzernes infectées dans la région de Montpellier sont de type enroulement des feuilles. L'enroulement des luzernes et l'énation des nervures sur les fèves, ressemble à ceux décrits sur luzerne autour du bassin méditerranéen (France, Bulgarie, Roumanie, Espagne, Arabie saoudite) à partir des années 1950 (Alliot, 1972 ; Blattný, 1959 ; Cook et Wilton, 1984 ; Leclant, 1973 ; Rodriguez Sardiña et Novales Lafarga, 1973) (Fig. 26).

A l'heure actuelle, l'hypothèse d'une étiologie complexe du symptôme de rabougrissement et d'enroulement est privilégiée par des chercheurs argentins. Récemment, ils ont signalé la présence alarmante d'une maladie sur la luzerne appelée "Alfalfa dwarf disease" (ADD) qui se caractérise par des déformations des folioles, et des énation des veines sur la face inférieure des feuilles, similaires aux observations de l'ALCV sur les luzernes au champs ainsi qu'aux observations de Alliot en 1972. Cette maladie est en fait corrélée avec la présence d'un complexe de cinq virus (alfalfa mosaic virus (AMV), alfalfa dwarf cytorhabdovirus (ADV), bean leafroll virus (BLRV), alfalfa enamovirus-1 (AEV-1) dont fait partie l'ALCV. Ce complexe viral a été nommé "Argentina Alfalfa Viruses" (AAV). L'ADD entraînerait une diminution de 38% de la production en graine et selon les cultivateurs, la nécessité de re-semer plus souvent les luzernes. Il est difficile de statuer quant à l'influence de l'ALCV sur la présence de ces symptômes puisque l'ALCV a été détecté dans 73% des plantes asymptomatiques et dans 96% des plantes symptomatiques. Cependant, les auteurs ont observé une forte corrélation entre la co-infection de l'AMV/ALCV et les symptômes de l'ADD.

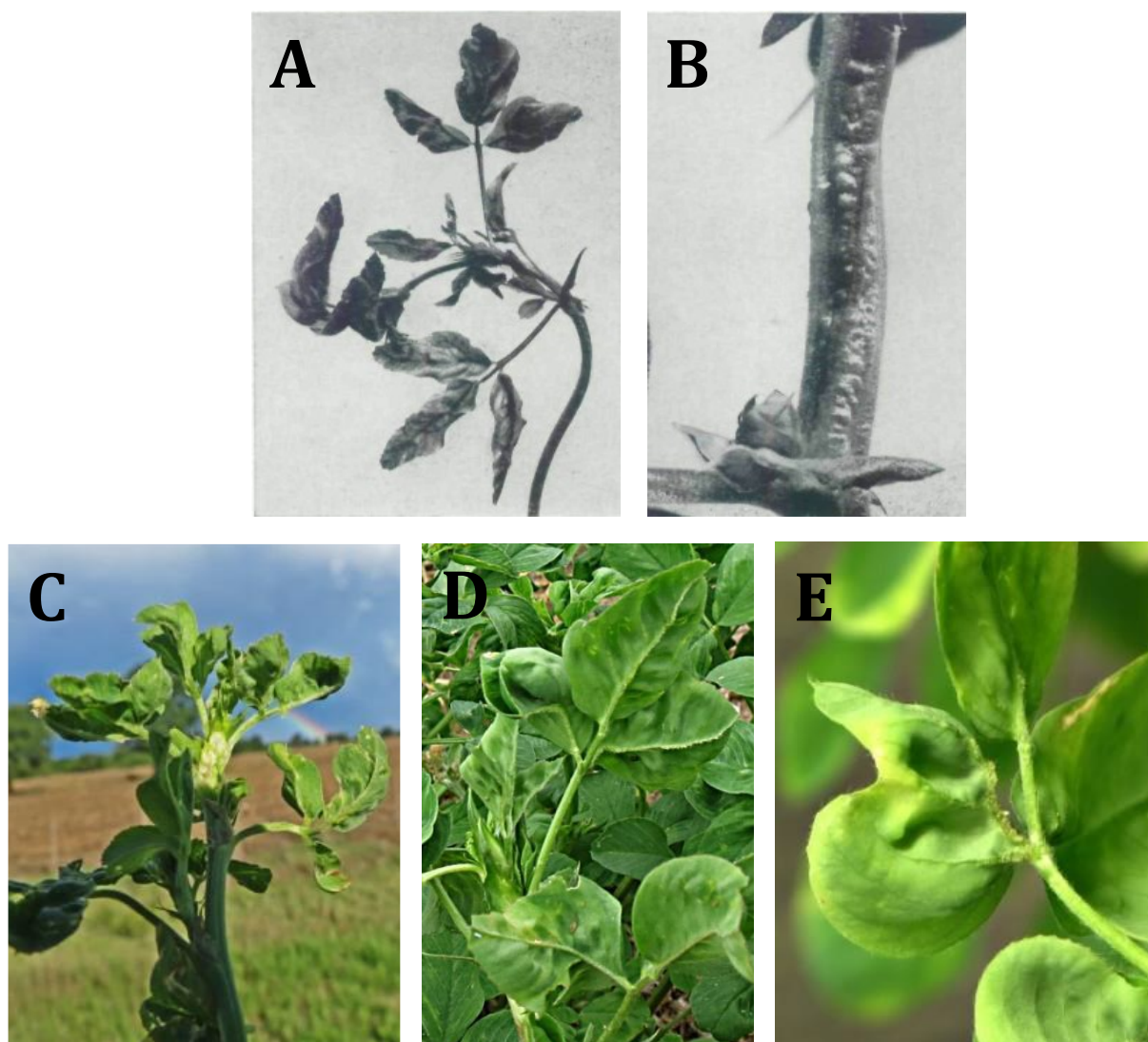


Figure 26 : Symptômes sur luzerne et fève probablement associés à une co-infection avec l'ALCV. (A) Symptôme de la maladie à énation sur un rameau de luzerne infecté naturellement. (B) Symptômes de la maladie à énation sur fève après greffage (Alliot et Signoret, 2008) (C) Maladie de la luzerne Argentina Alfalfa Disease (ADD) sur une luzerne au champs en Argentine (D) Symptômes d'enroulement et d'énaitions des nervures d'une luzerne au champs atteinte par l'ADD en Argentine (E) Co-infection expérimentale de l'ALCV et du AMV sur luzerne, montrant les symptômes de l'ADD (Trucco - 2nd Worldwide Congress on Alfalfa).

Ceci suggère que les symptômes observés sur les luzernes infectées par l'ALCV pourraient être dû à un synergisme entre l'AMV et l'ALCV. A cet égard, il est intéressant de noter qu'en Chine la co-infection AMV-ALCV est systématique.

ii. *Euphorbia caput-medusae latent virus*

En milieu naturel l'EcmLV, n'a été détecté que sur l'euphorbe *Caput-medusae*, sur laquelle il est latent. Des infections expérimentales ont néanmoins montrés son infectivité sur tomate et *N. benthamiana*, où il provoque de symptômes sévères d'enroulement (Bernardo, 2013) (Fig. 27). Les prévalences de ce virus sur le terrain en Afrique du Sud suite à un échantillonnage à l'aveugle vont de 6 à 35% en fonction des sites, avec une moyenne de 15% (44/301 plantes).

iii. *French bean severe leaf curl virus*

L'Inde est le seul pays dans lequel le FbSLCV a été décrit. Il provoque des symptômes sévères d'enroulements, de gaufrages et de rabougrissement sur le haricot vert. Si ce virus est très virulent, en revanche sa prévalence ne dépasse pas 2% (Communication personnelle Akram).

iv. *Plantago lanceolata latent virus*

Le PILV a uniquement été détecté sur plantain dans plusieurs pays d'Europe et du Moyen Orient, incluant la Finlande, la France, l'Italie, l'Espagne et l'Iran. Le PILV a été trouvé dans 1.2% des plantains trouvés symptomatiques (48/4000) analysés en Finlande où il était dans de rares cas en co-infection avec le plantago betapartitivirus (famille des *Partitiviridae*). Alors qu'aucun symptôme particulier n'avait été déclaré en 2017 lors de la première description du virus d'où le nom de "latent", la présence de symptômes de jaunissement a été significativement corrélée avec l'infection par le PILV dans une étude récente (Susi, 2017 ; Susi, 2019).

5. Vecteurs et mode de transmission

a. Transmission par vecteur

Historiquement, l'hypothèse de la transmission des capulavirus par puceron a été envisagée pour plusieurs raisons : 1) Les géminivirus étaient connus pour être transmis par plusieurs groupes d'hémiptères ; 2) Les nanovirus transmis par pucerons ont, comme les géminivirus, une transmission circulante non multipliant et un génome constitué d'ADN simple brin circulaire ; 3) La CP des capulavirus, facteur de spécificité de transmission, est relativement divergente de celle des autres géminivirus.

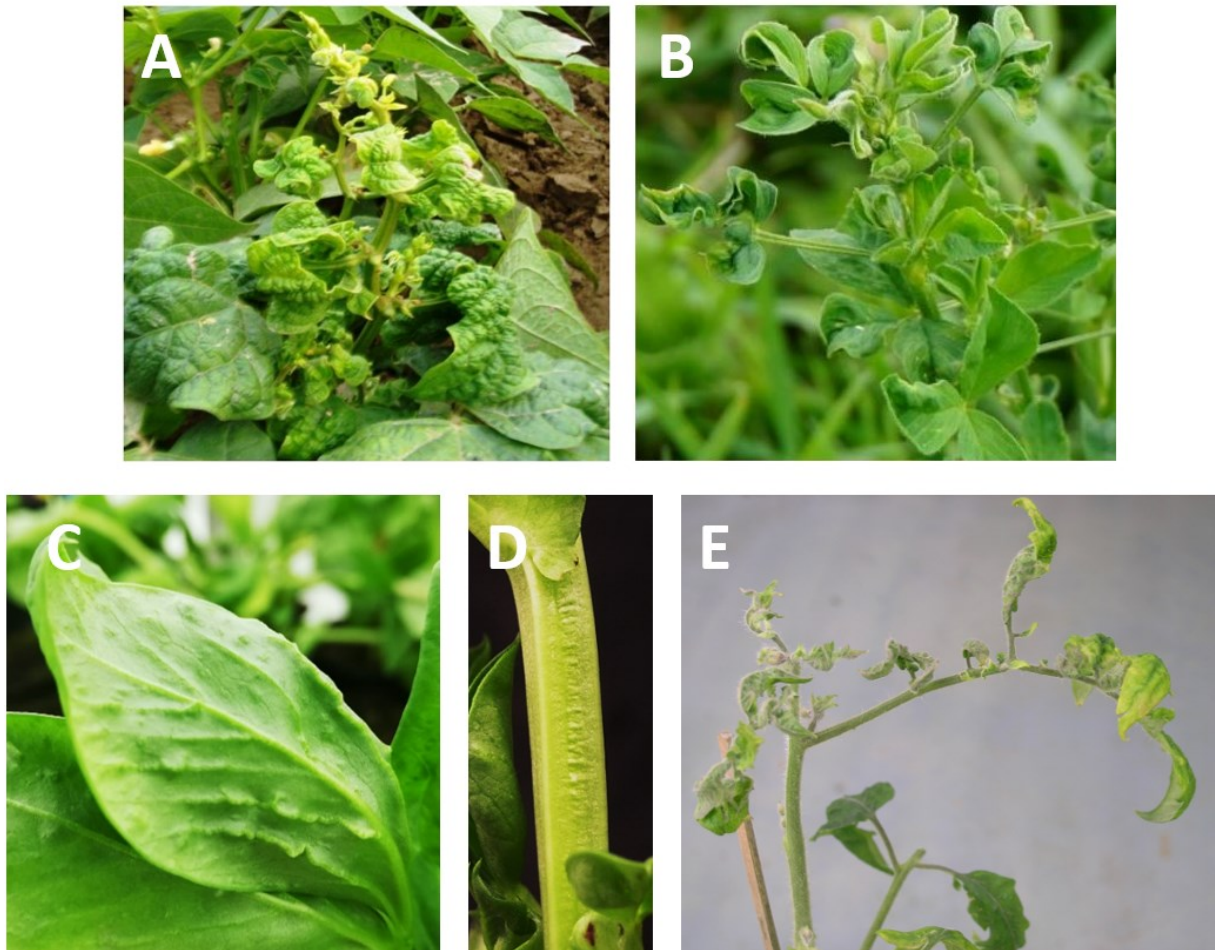


Figure 27 : Planche de symptômes observés sur des plantes infectées par un capulavirus. (A) Plant de haricot vert *P. vulgaris* infecté naturellement par le FbSLCV qui présente des symptômes d'enroulement des feuilles (crédit Akram). (B) Plant de luzerne *M. sativa* infecté naturellement par l'ALCV qui présente des symptômes de pincement et d'enroulement des feuilles. (C) Feuille et (D) tige de fève *V. faba* infecté expérimentalement par agro-inoculation avec le clone 44-1E de l'ALCV qui présente des symptômes d'énations des nervures et de boursouflures. (E) Plant de tomate *S. lycopersicum* infecté expérimentalement par agro-inoculation de l'EcmLV qui montre des symptômes d'enroulement (Roumagnac, 2015).

i. *Alfalfa leaf curl virus*

Le premier géminivirus démontré comme transmis par puceron est l'ALCV. La transmission de ce virus avait été testée à partir de divers hémiptères trouvés dans des champs de luzerne infectés en Camargue et autour du Montpellier. Aucun aleurode n'a été observé dans ces champs, ce qui explique pourquoi leur transmission n'a pas été testée avec ce type d'insecte. Les hémiptères collectés comprenaient des cicadelles de l'espèce *Anaceratagallia laevis* ainsi que des pucerons de l'espèce *Acyrtosiphon pisum* et *Aphis craccivora*. Finalement, seuls les pucerons de l'espèce *A. craccivora* sont parvenus à transmettre l'ALCV de fève à fève à partir d'un clone agro-infectieux (Roumagnac, 2015) (Fig. 28).

ii. *Euphorbia caput-medusae latent virus*

La transmission de l'EcmLV a aussi été testée à cette époque mais avec des hémiptères vecteurs d'autres géminivirus que sont *B. tabaci* MEAM et MED ainsi que la cicadelle *Cicadulina mbila* originaire d'Afrique du Sud, le pays où a été trouvé l'EcmLV. Aucun de ces hémiptères n'a transmis l'EcmLV lors de tests de transmission réalisés à partir de tomates et d'euphorbes agro-inoculées avec ce virus (Bernardo, 2016).

iii. *French bean severe leaf curl virus*

Concernant le FbSLCV, aucun puceron vecteur n'a pour l'instant été officiellement mis en évidence pour ce virus détecté en Inde. Néanmoins, les cultivateurs font état d'infestations récurrentes de leurs champs de haricot vert par le puceron *A. craccivora* et déclarent que l'apparition des symptômes se produit dans les semaines suivantes.

iv. *Plantago lanceolata latent virus*

Récemment l'équipe finlandaise ayant participé à la découverte du PILV, a démontré sa transmission à partir de plantains naturellement infectés par des pucerons cendrés du pommier, *Dysaphis plantaginea* (Fig. 29). Le taux de transmission obtenu lors du test était de 20 % (2 plantes sur 10 infestées). Le vecteur du PILV est un puceron spécialiste qui a pour hôte primaire le pommier et comme hôte secondaire la plupart du temps le plantain, parfois le rumex et le cerfeuil. La transmission du PILV par *D. plantaginea* constitue le deuxième cas de transmission d'un géminivirus par puceron. De plus, ce résultat démontre qu'une autre espèce que *A. craccivora* est capable de transmettre un capulavirus.



Figure 28 : Espèces de pucerons décrites comme vectrices de capulavirus. (A) *Aphis craccivora* transmet l'ALCV. (B) *Dysaphis plantaginea* transmet le PILV.



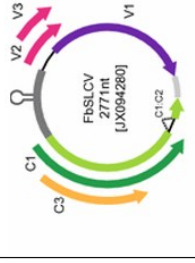
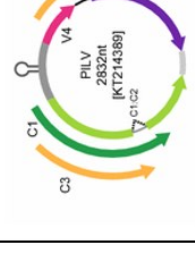






Espèce virale	<i>Euphorbia caput medusae latent virus</i>	<i>Alfalfa leaf curl virus</i>	<i>French bean severe leaf curl virus</i>	<i>Plantago lanceolata latent virus</i>
Abréviation de l'espèce	EcmLV	ALCV	FbSLCV	PILV
Organisation génomique				
Découvert par métagénomique	oui	oui	non (symptômes)	oui
Distribution géographique	Afrique du Sud	Bassin méditerranéen, Chine, Argentine	Inde	Finlande, France, Italie, Espagne, Iran
Famille de la plante hôte	 Euphorbiaceae (sauvage)	 Fabaceae (cultivé)	 Fabaceae (cultivé)	 Plantaginaceae (sauvage)
Espèce vectrice	?	 <i>Aphis craccivora</i>	?	 <i>Dysaphis plantaginea</i>

Figure 29 : Schéma récapitulatif des connaissances sur les quatre espèces de Capulavirus (EcmLV, ALCV, PILV, et FbSLCV).

b. Transmission par les semences

La transmission aux semences a été décrite pour certains géminivirus (ex: TYLCV-IL), mais plusieurs tentatives de détections de l'ALCV à partir d'un total de plus de 10 000 plants issus de graines de luzernes infectées ont échoué dans notre laboratoire (Kil, 2017 ; Qiao, 2019). Ce résultat a pu être confirmé par un groupe de chercheurs argentins qui ont testé plus de 600 plantes issues de graines de luzerne infectés (Communication orale Tucco, 2019). La transmission par les semences des autres capulavirus n'a pas encore été testée.

c. Transmission mécanique

L'équipe finlandaise nous a affirmé avoir réussi une transmission mécanique du PILV sur plantain (6/20 plantes positives) à partir d'un plantain naturellement infecté (Susi, 2019). Toutefois, les essais de transmission mécanique de l'EcmLV réalisés dans mon laboratoire n'ont pas donné lieu à des infections. L'inoculation a été réalisée sur 16 plants de tabac et de tomate à partir de plantes agro-inoculées (Bernardo, 2013).

6. Caractérisation du pathosystème de l'ALCV

a. Luzerne

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) est une dicotylédone de la famille des Fabaceae qui comprend notamment la fève, le haricot, le soja, la vesce, le pois, l'arachide, le trèfle et le robinier faux-acacia. C'est le fourrage le plus cultivé au monde. Très riche en protéine, elle est surtout utilisée pour l'alimentation du bétail et plus particulièrement des vaches laitières dont les besoins protéiques sont élevés pour produire un lait de qualité. Elle est distribuée au bétail à l'état frais en pâturage, ou sèche sous forme de foin ou encore transformée en granules par déshydratation. La luzerne présente d'autres bénéfices à savoir sa capacité à enrichir les sols en azote assimilable grâce à sa symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote atmosphérique, à réduire l'érosion du sol, à préserver la qualité de l'eau, et à héberger une biodiversité animale dont les insectes mellifères. C'est une plante vivace qui peut être maintenue en production pendant sept ans. Grâce à son système racinaire étendue à plusieurs mètres de profondeur, elle présente une bonne résistance aux hivers rigoureux ainsi qu'à la sécheresse (Fig. 30). Elle est souvent semée dans des champs en rotation de cultures, et assez fréquente sous forme spontanée dans divers habitats tels que les accotements, les fossés ou encore les bordures de champs. Chez la luzerne, la présence de symptômes peut être dû à des carences, des ravageurs ou des maladies.



Figure 30 : Illustration de la résistance à la sécheresse de la luzerne. (A) Luzernes de la variété ZongCao n°3 dans un sol argileux sec en Chine (B) Réseau de racines d'un luzerne *M. sativa* âgée de quatre ans (Crop Trust).

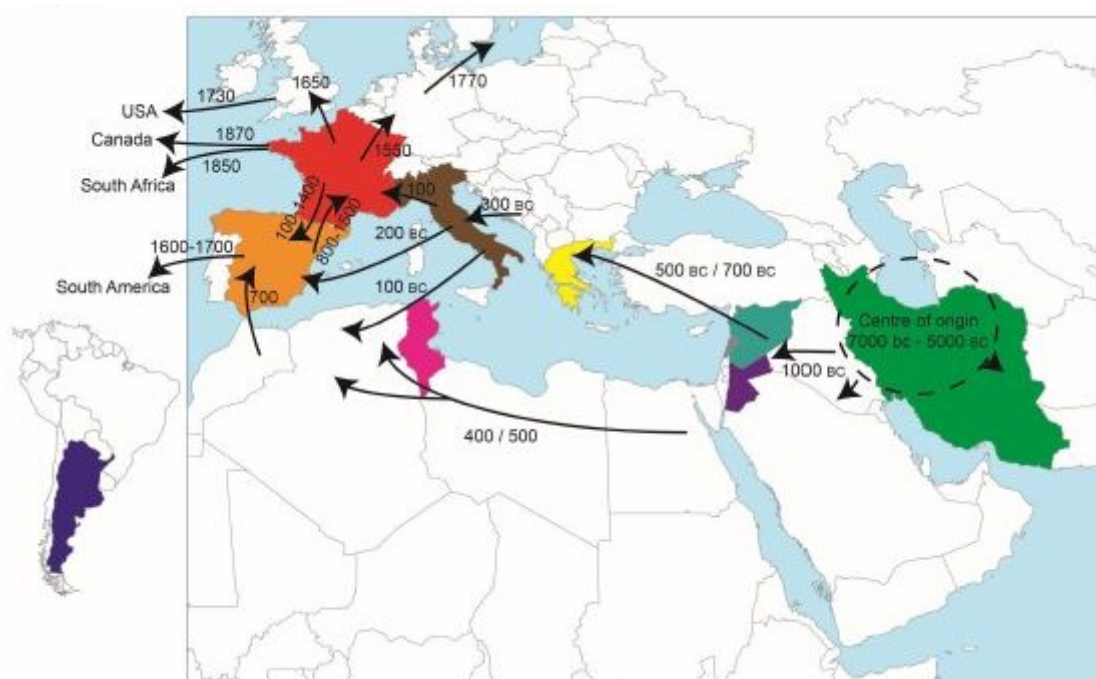


Figure 31 : Carte de l'Europe, du Moyen-Orient, et de l'Amérique du Sud indiquant les différentes routes et les dates approximatives de dispersion de la luzerne cultivée à partir de son centre d'origine présumé (Prosperi, 2014 ; Davoodi, 2018).

La luzerne est par exemple très sensible aux concentrations du sol en minéraux et une plante carencée développe facilement des symptômes de jaunissement inter-vénal ou encore de taches brunes (Mauries, 2003). Les premières traces de la culture de luzerne proviennent de l'Iran ou de l'Asie centrale et remontent à 7000 ans avant J.C. (Prosperi, 2014) (Fig. 31). La plante a probablement été domestiquée deux millénaires plus tard en Asie centrale (Muller, 2006), avant de se répandre au Moyen-Orient autour de 1000 avant J.C. A partir de là, les Mèdes selon le nom de leur région d'origine "la Médie", transportèrent entre 500 et 700 avant J.C, la luzerne jusqu'en Grèce antique pour nourrir les chevaux lors des conquêtes arabes. Le nom latin *Medicago* a alors été attribué à cette plante signifiant "herbe de Médie". Puis, le voyage de la luzerne s'est poursuivi en Italie vers 300 avant J.C et dans le reste de l'Empire Romain en 100 après J.C. La culture de la luzerne déclina durant le moyen-âge avant que cette place soit réintroduite via l'Espagne par les Arabes vers 700 après J.C. L'introduction de la luzerne par les espagnols en Amérique du Sud a eu lieu au XVIe siècle.

Or, une étude récente sur l'histoire évolutive des différents génotypes de l'ALCV rapporte que ce virus aurait probablement émergé en Iran, qu'il se serait diversifié au Moyen-Orient et ensuite dispersé à l'ouest du bassin méditerranéen et en Argentine. Ce scénario ressemble beaucoup à celui de la domestication de la luzerne et pourrait suggérer l'introduction de l'ALCV de manière concomitante (Davoodi, 2018).

b. *Aphis craccivora* Koch

Aussi appelé puceron noir de la luzerne, cette espèce est très cosmopolite comme en témoigne sa colonisation de tous les continents, à l'exception de l'Antarctique (Pettersson, 1998 ; Obopile et Ositile, 2010 ; Kamphuis, 2012). *Aphis craccivora* est considéré comme un ravageur préoccupant à différents égards. Des données écologiques montrent tout d'abord que ce puceron présente un très bon potentiel de migration en favorisant la production de formes ailées comparativement à d'autres espèces tel que *A. pisum* (Tokunaga et Suzuki, 2008). Une étude qui portait sur le nanovirus subterannean clover stunt virus (SCSV), transmis par *A. craccivora*, a révélé que des individus étaient capables de migrer sur plusieurs centaines de kilomètres et de provoquer une ré-infestation des pâturages dans les régions désertiques du sud de l'Australie (Gutierrez, 1971).

Cette espèce s'adapte facilement à des milieux assez variés. Elle a par exemple été trouvée à 4000 mètres d'altitude sur les plateaux tibétains de la chaîne de l'Himalaya (Huang, 2006). A l'inverse, ce puceron tolère aussi des températures élevées pouvant atteindre 35°C sans impact

sur sa fitness (Srinivasa Rao, 2017). Un autre avantage incontestable de cette espèce de puceron est son cycle anholocyclique (reproduction parthénogénétique toute l'année) dans les régions où les températures sont clémentes (régions tempérées et tropicales) (Radke, 1974) (Fig. 32). Ce type de reproduction permet aux femelles de pondre près de 120 larves au cours de leur vie. Additionné à un temps de développement court (environ 5,6 jours entre la naissance et la période de reproduction), les pucerons de cette espèce ont le pouvoir de coloniser très rapidement les plantes sur lesquelles ils s'installent (Berberet, 2009). Enfin, cette espèce est considérée comme polyphage (Blackman et Eastop, 2007). En effet, ces pucerons se nourrissent majoritairement sur des Fabaceae mais ils peuvent aussi coloniser des plantes appartenant à 19 autres familles (ex: *Malvaceae*, *Brassicaceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Chenopodiaceae*...). En fait, il existe des races d'hôtes au sein de l'espèce *A. craccivora* avec des populations spécialisées dans l'alimentation sur certaines espèces de plantes (Mehrparvar, 2012). Une structuration des populations d'endosymbiontes secondaires caractérisés chez ce puceron a été rapportée en fonction de leur plante hôte (Brady, 2014).

Par exemple des populations d'*A. craccivora* trouvées sur luzerne arborent la bactérie symbiotique *Hamiltonella defensa* alors que celles trouvées sur robinier vivent en symbiose avec la bactérie *Arsenophonus spp.* La présence de ces endosymbiontes facultatifs semble bénéfique aux pucerons, si l'on cite l'exemple de *H. defensa* qui protège *A. craccivora* des guêpes parasites (Dykstra, 2014). Ainsi puisque ces pucerons font principalement de la parthénogénèse et sont généralement spécialisés dans l'alimentation sur une seule plante hôte, on observe une plus faible prévalence et diversité d'endosymbiontes secondaires que chez d'autres espèces (ex: *A. fabae*, *A. pisum*).

L'alimentation de *A. craccivora* de la sève élaborée des plantes qu'il infeste a pour effet d'affaiblir ces plantes et *in fine* de provoquer des pertes de rendement agricoles. L'alimentation est suivie de la déjection du miellat qui est un liquide visqueux ne contenant presque que du sucre et quelques acides aminés. Cette substance favorise le développement de champignons ascomycètes, la fumagine sur les feuilles de la plante infestée. La présence de ce champignon limite la photosynthèse et impacte dès lors la production agricole (El-Defrawi, 2009). Toutes les caractéristiques de cette espèce font d'*A. craccivora* un ravageur redoutable des plantes, mais c'est aussi en tant que vecteur qu'il est problématique. En effet, les pucerons de cette espèce sont vecteurs de plus de 30 espèces virales, qui comprennent des virus transmis à la fois selon le mode persistant (nanovirus, luteovirus, capulavirus) et non-persistant (cucumovirus,

potyvirus, umbravirus, alfamovirus) (Murant, 1990 ; Franz, 1998 ; Sreenivasulu, 1988 ; Yuan, 1996 ; Roumagnac, 2015).



Figure 32 : Stades de développement de femelles parthénogénétiques de l'espèce *Aphis craccivora* appartenant à une population trouvée sur *Robinia pseudoacacia*. De gauche à droite : larves de stade L1, L2, L3 et L4 de couleur gris-brun mate, femelle adulte aptère caractérisée par sa couleur noire brillante et femelle ailée (Photo réalisée avec l'aide de Philippe Ryckwaert, CIRAD Montpellier).

XI. Objectifs de la thèse

La découverte d'une association jusque-là inconnue entre un géminivirus et un puceron soulevait de nombreuses interrogations non seulement sur le plan fondamental mais aussi sur le plan agronomique.

Le volet **agronomique** de mon projet de thèse était inclus dans le consortium E-space financé par Agropolis fondation. Ce consortium visait à améliorer l'épidémiosurveillance des maladies tropicales et méditerranéennes y compris celle associée à l'*Alfalfa leaf curl virus* (ALCV). L'ALCV étant un virus découvert récemment dans un tout nouveau genre (*Capulavirus*), au début de ma thèse, on ne connaissait quasiment rien de la biologie de ce virus et de son impact sur les cultures. Comme la transmission des géminivirus par puceron n'était pas connue avant la découverte des capulavirus, leur capacité de dissémination était à explorer. On ne pouvait exclure un risque phytosanitaire en considérant que de nombreux virus de la famille *Geminiviridae* font partie des virus les plus dommageables des cultures. De plus, comme les pucerons, sont de redoutables ravageurs et les plus sérieux vecteurs de virus de plante, il n'était pas exclu que les géminivirus soient efficacement disséminés par puceron. Concrètement, cette prédiction a été testée en explorant différents paramètres épidémiologiques impliqués dans la transmission.

1. Premier chapitre

Dans un premier temps, j'ai cherché à évaluer le degré de spécificité de transmission au sein des capulavirus. Chez les géminivirus, tous les membres d'un genre sont transmis par une seule famille de vecteurs. Par exemple, les bégomovirus sont uniquement transmis par des aleurodes. En supposant qu'il en était de même pour les capulavirus, dont certains membres avaient pu être transmis par puceron (ALCV, PILV), nous avons limité dans un premier temps notre champ d'investigation aux pucerons. Pour l'ALCV et le PILV qui avait déjà été transmis par puceron, j'ai testé le degré de spécificité de la transmission sur la base de diverses populations au sein des espèces précédemment identifiées comme vectrices, et de populations de puceron de différentes espèces. J'ai pu établir que pour certaines paires capulavirus/vecteur, la spécificité de transmission était très étroite et qu'elle pouvait être conditionnée par différentes barrières histologiques chez l'insecte. Les tests de transmissions et l'étude de la circulation du virus dans

l'insecte, nous ont aussi permis de valider le mode de transmission circulant des capulavirus par puceron.

2. Deuxième chapitre

Dans un second temps j'ai exploré le cycle de transmission de l'ALCV en tant que virus modèle des capulavirus, afin de déterminer si sa vection par puceron pouvait moduler certaines caractéristiques de son cycle. Les paramètres de la transmission sont des éléments importants à considérer dans la gestion d'une épidémie virale. En outre, leur caractérisation constitue dans notre cas une avancée scientifique dans la caractérisation de la transmission d'un nouveau genre viral. J'ai utilisé comme modèle le couple ALCV / *A. craccivora*. J'ai exploré son cheminement entre son acquisition dans les tissus d'une plante virosée jusqu'à son inoculation dans une nouvelle plante hôte. Les résultats ont été obtenus de manière originale grâce à la complémentarité de différentes approches que sont les tests de transmission, la réaction en chaîne par polymérase (PCR) quantitative, l'hybridation in situ en fluorescence (FISH), et l'électropénétrographie (EPG), une technique donnant accès au comportement alimentaire du puceron. Puisque la transmission verticale a été documentée chez certains géminivirus, j'ai testé si ce mode de transmission s'appliquait à l'ALCV et si les interactions entre l'ALCV et les pucerons *A. craccivora* pouvaient affecter la fécondité de ceux-ci. En outre, toutes ces expériences m'ont permis de statuer sur l'efficacité relative de la transmission de l'ALCV par le puceron *A. craccivora* dans nos conditions de laboratoire, et de poser des hypothèses quant à l'efficacité de la transmission des capulavirus dans leur milieu naturel.

D'un point de vue **fondamentale**, la découverte de géminivirus transmis par puceron représente une opportunité pour tenter de faire avancer nos connaissances sur la transmission des géminivirus car les ressources littéraires, génétiques et techniques sur puceron sont bien plus abondantes que sur les autres familles de vecteur de géminivirus. Les deux derniers chapitres de ma thèse décrivent comment nous avons tenté de tirer bénéfices de ce modèle.

3. Troisième chapitre

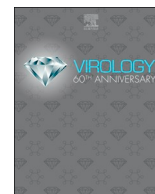
Ainsi, dans un troisième temps, je me suis intéressée à comparer la transmission circulante d'un capulavirus avec celle d'un nanovirus au sein des mêmes individus vecteurs du puceron *A. craccivora*. Comparer ainsi un géminivirus avec un membre d'une autre famille virale n'était pas possible avant la découverte des capulavirus car la transmission circulante non-multipliant en dehors des géminivirus, est uniquement décrite sur puceron. Cette comparaison permettait de tester si des virus ayant un génome de même nature (ADN simple brin circulaire) et transmis selon le même mode de transmission (circulant non-multipliant) ont adopté les mêmes voies de circulation. En outre, la comparaison de l'efficacité de transmission de ces deux virus transmis par un même puceron confirme les hypothèses que nous avons pu émettre au chapitre précédent.

4. Quatrième chapitre

Enfin, un autre objectif de mon travail a visé à rechercher de potentiels déterminants moléculaire de la transmission des géminivirus en prenant appui sur ce modèle géminivirus/puceron. J'ai procédé par un criblage en levure double-hybride d'une banque d'ADNc de puceron face à la CP de l'ALCV, la seule protéine structurale chez les géminivirus et décrite comme déterminant de la spécificité de transmission. Des candidats identifiés lors du criblage ont pu être validés en levure et certains sont communs avec ceux obtenus parallèlement avec la CP du FBNSV. La pertinence de ces candidats est discutée par rapport aux données de la littérature sur les interactions moléculaires entre virus et vecteur.

Chapitre 1 :

Spécificité de la transmission vectorielle des Capulavirus



Alfalfa leaf curl virus is transmitted by *Aphis craccivora* in a highly specific circulative manner

F. Ryckebusch^{a,b}, N. Sauvion^{a,b}, M. Granier^{a,b}, P. Roumagnac^{a,b}, M. Peterschmitt^{a,b,*}

^a CIRAD, UMR BGPI, Montpellier, France

^b BGPI, Univ Montpellier, INRAE, CIRAD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Geminivirus
Taxonomy
South Africa
Luteovirus
Luteoviridae
Hemiptera
Aphididae
Species complex

ABSTRACT

Two members of the genus *Capulavirus* (*Geminiviridae*) are transmitted by aphids including Alfalfa leaf curl virus (ALCV) transmitted by *Aphis craccivora*. The capulavirus *Euphorbia caput-medusae* latent virus was shown here to be transmitted also by *A. craccivora*, using the population *EuphorbiaSA*. ALCV was transmissible by several *A. craccivora* populations including *Robinia*, but not the *EuphorbiaSA* population, reflecting a high transmission specificity. Typical of the circulative-persistent mode of transmission, ALCV persists through insect molts. ALCV accumulation and localization were analyzed in whole insects, midguts, hemolymphs, and heads of aphids from vector and non-vector populations of *A. craccivora* and from the non-vector species *Acyrtosiphon pisum*. Vector and non-vector populations could be distinguished by contrasted virus accumulations and midgut intracellular localization consistent with a gut barrier to the transmission of ALCV in *A. pisum* and a primary salivary gland barrier in *A. craccivora*.

1. Introduction

Nearly 55% of reported plant pathogenic viruses are transmitted by piercing-sucking insects of the Hemiptera order (Hogenhout et al., 2008). In the viral family *Geminiviridae*, a large range of hemipterans were identified as vectors. Geminiviruses of the genus *Begomovirus* are transmitted by whiteflies (i.e., Aleyrodidae), viruses of the genera *Becurtovirus*, *Curtovirus*, *Mastrevirus*, *Turncurtovirus* are transmitted by leafhoppers (i.e., Cicadellidae) (Heydarnejad et al., 2013; Razavinejad et al., 2013) and those belonging to the genera *Grablovirus* and *Topocuvirus* are transmitted by treehoppers (i.e., Membracidae) (Bahder et al., 2016). Interestingly, although Aphididae is the insect group with the highest number of species reported as vector of plant viruses, aphid transmission was discovered only in 2015 when aphids of the species *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Aphididae) were shown to transmit Alfalfa leaf curl virus (ALCV), a geminivirus belonging to the newly defined genus *Capulavirus* (Roumagnac et al., 2015; Varsani et al., 2017). Since then, *Plantago lanceolata* latent virus (PLLV) another capulavirus was shown to be transmitted by the aphid *Dysaphis plantaginea* (Passerini, 1860) (Susi et al., 2019) suggesting that aphid transmission is a taxonomic criterion of the new genus which comprises two additional members, *Euphorbia caput-medusae* latent virus (EcmLV) and French bean severe leaf curl virus (FbSLCV).

Contrasted transmission specificities were observed between genera within the family *Geminiviridae*. While begomoviruses, irrespective of their geographic origin, are transmitted by whiteflies of the species complex *Bemisia tabaci* Gennadius, 1889 (Bedford et al., 1994; De Barro et al., 2011), mastreviruses are transmitted by leafhoppers of various genera depending on their geographic origin. Therefore, considering the scarcity of transmission data about capulaviruses, their transmission specificity is quite unpredictable. While it is clear that unlike the *Begomovirus* genus, there are more than one vector species associated with the *Capulavirus* genus, species and population-level specificities of capulavirus vectors have not been adequately studied.

The first objective of this study was to further support that aphids are vectors of capulaviruses and thus confirm that it may be a taxonomic criterion of the new geminivirus genus. The second objective was to assess the specificity of the aphid transmission. The identification of an aphid vector of a third capulavirus (EcmLV) confirmed that aphid transmission can be considered as a taxonomic criterion of this new genus. Moreover, the transmission tests of ALCV performed with various aphid species and populations showed that only *A. craccivora* transmitted this virus, but not all tested *A. craccivora* subpopulations. According to viral DNA persistence and distribution monitored with qPCR and FISH in vector and non-vector aphids, we detected two barriers to transmission, salivary glands and gut.

* Corresponding author. CIRAD, UMR BGPI, Montpellier, France.

E-mail address: michel.peterschmitt@cirad.fr (M. Peterschmitt).

2. Material and methods

2.1. Virus inoculation and detection in plants

2.1.1. Preparation of agroinfectious clones and agroinoculation

The agroinfectious clones of EcmLV and ALCV were reported previously (Bernardo et al., 2013; Roumagnac et al., 2015). The ALCV clone belongs to genotype A, which is the most widespread genotype and whose capsid protein is the most common among ALCV populations (Davoodi et al., 2018). An agroinfectious clone of the reported PILV clone (Genbank accession number KT214390) (Susi et al., 2017) was prepared as follows. Its genome was released from its Pjet1.2 vector by *Pst*I restriction and ligated as a tandem repeat into the corresponding restriction site of the binary vector pCambia 2300. *Agrobacterium tumefaciens* strain C58-MP90 was transformed with the recombinant plasmid by electroporation. *Agrobacteria* were grown overnight at 28 °C in LB medium containing gentamicin and kanamycin until an optical density (OD600) of 2–3. Bacterial suspensions were then centrifuged at 1000 g for 25 min. The pellets were resuspended in ultrapure water (Milli-Q) containing MgCl₂ (10 mM) and acetosyringone (150 mM). Agroinoculations were performed with a syringe by repeated needle injections at the base of the stem on ten-day-old broad bean plants (*Vicia faba*, cv. ‘Sevilla’), 14-day old tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.), one-month-old buckhorn plantain (*Plantago lanceolata* L.) or 6-year old euphorbia Medusa’s head plants (*Euphorbia caput-medusae* L.).

2.1.2. DNA extraction

The infection of ALCV, EcmLV, and PILV inoculated plants was monitored 4–6 weeks after inoculation by symptom observation (ALCV) and/or by PCR-mediated detection of viral DNA (ALCV, EcmLV, and PILV) in total plant DNA extracts. From each plant, four leaf disks of 4 mm diameter were collected from young leaves, one disc per leaf, and stored at –20 °C; due to the small size of the leaves of *E. caput medusa* plants, 4 whole leaves were collected per plant. Total DNA was extracted by grinding the leaf material in 400 µL of modified Edwards buffer containing 200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% SDS, 1% PVP40 and 0.2% ascorbic acid. The extract was incubated at 65 °C for 10 min and centrifuged at 15700 g for 10 min. One volume of isopropanol was added to the supernatant before a 20 min centrifugation at 15700g. After resuspension of the pellet in 500 µL of 70% ethanol, nucleic acids were recovered by centrifugation (15700 g, 15 min) and resuspended in 50 µL sterile distilled water. The DNA extracts were stored at –20 °C before use.

2.1.3. PCR detection of viral DNA

PCR primers designed to detect ALCV and EcmLV prime the amplification of a 174 bp fragment from the Rep gene: ALCV2cEcmLV-F, 5′- GAG GAA TTC GGA CTT GGA TG -3′ and ALCV2cEcmLV-R, 5′- TTC TTC GAC ATC AAG GAC CC -3′. PCR primers designed to detect PILV prime the amplification of a 293 bp fragment from the CP gene: PILV_729-F, 5′- AAG GGA AAG GCT GGT TAT GG -3′ and PILV_1013-R, 5′- GAA TCT CTT CTC TGA ATC GTG GTC -3′. The cycling protocol for all primers was as follow: 2 min denaturation at 95 °C, 1 min primer annealing at 60 °C and 50 sec DNA extension at 72 °C followed by 30 cycles each consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 60 °C, and 50 s at 72 °C. The PCR program was terminated by a 5 min incubation at 72 °C. The PCR products were resolved by electrophoresis in a 1% agarose gel and ethidium bromide staining.

2.2. Species and populations of aphids

2.2.1. Origin of aphids

The aphids used for transmission tests were from rearings initiated with aphids collected in France, South Africa, or Switzerland. Aphids of the following species were from France: *A. craccivora*; *D. plantaginea*;

Acyrtosiphon pisum (Harris, 1776); *Aphis fabae* Scopoli, 1763; *Aphis gossypii* Glover, 1877; *Myzus persicae* (Sulzer, 1776); *Therioaphis trifolii* (Monell, 1982). Full description of aphids is provided in Supplemental Table S1. *Aphis craccivora* aphids were from three populations collected on Fabaceae species near Montpellier (France), namely *Robinia pseudoacacia* L. (false acacia), *Vicia sativa* (L.) Bernh. (common vetch), and *Medicago sativa* L. (alfalfa). These populations were respectively named population Robinia, Vicia, and Medicago. The vector candidate for a potential aphid transmission of EcmLV was a black-backed aphid observed on euphorbia Medusa’s head plants, a natural host of EcmLV. A rearing of this aphid was established in a P3 containment chamber with individuals collected in 2015 in the Buffelsfontein Game and Nature Reserve (Darling region of the Western Cape, South Africa) where EcmLV was detected for the first time (Bernardo et al., 2013). It was identified here with molecular and morphological criteria. Taxonomy and nomenclature were as described by Remaudière and Remaudière (1997), Blackman and Eastop (2000), and Favret (2014).

2.2.2. Molecular identification of aphids

The total DNA was purified from individual aphids using the CTAB method as described in Peccoud et al. (2013). DNA was recovered in 50 µL of ultra-pure H₂O. A 658-bp fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) was amplified with a mix of degenerate primers adapted from the LCO1490/HCO2198 universal primers (Folmer et al., 1994) to Sternorrhyncha (Isabelle Meusnier, com. pers.), the suborder of the Hemiptera that include Aphididae. They consist of two forward primers namely LCO1490stern1_t1 (5′-TGTAACGACGCGCCAGTTTASAACTAACCCAAARMTATTGG-3′), LCO1490stern2_t1 (5′-TGTAACGACGCGCCAGTTTCACTAATCAT-AARGATATTGG-3′), and two reverse primers namely HCO2198Stern1_t1 (5′-CAGGAAACAGCTATGACTAWACTTCWGGATGTCCAAA-AAAYCA-3′), and HCO2198Stern2_t1 (5′-CAGGAAACAGCTATGACT-AMACCTCAGGATGHCCAAAAAATCA-3′). The PCR was performed in a final volume of 30 µL containing: 3 µL of QIAGEN Coraload buffer (containing 45 pmol MgCl₂), 0.1 mM of each dNTP, 0.5 mM of MgCl₂ (Qiagen), 0.2 µM of each primer, 0.625 U of Taq DNA Polymerase (Qiagen) and 2 µL of DNA extract. The PCR cycles were as follows: initial denaturation at 94 °C for 2 min; followed by 5 cycles at 94 °C for 30 s, 45 °C for 40 s and 72 °C for 1 min, and then 35 cycles at 94 °C for 30 s, 51 °C for 40 s and 72 °C for 1 min, with a final 10-min extension period at 72 °C. PCR products were purified and Sanger-sequenced in both directions by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK) with M13 primers complementary to the 5′ ends of the PCR primers. Chromatograms were aligned by the Muscle algorithm, cleaned and visually checked under Geneious Pro 10.2.6 (<http://www.geneious.com>). All sequences were deposited in GenBank. Sequences were aligned with Genbank or BOLD (<http://www.barcodinglife.org>) COI sequences from aphids of the *A. craccivora* group from different geographical origins, and of other species, in particular species previously described as closely related to the *A. craccivora* group (e.g. *Aphis coronillae* Ferrari, 1872; *Aphis intybi* Koch, 1855; *Aphis lhasaensis* Zhang, 1981). Aphids from which COI sequences were downloaded from Genbank or BOLD are described in Supplemental Table S2. A neighbor joining tree (Saitou and Nei, 1987) was constructed from Jukes and Cantor’s distance matrix using the PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2001) plugin in Geneious. Node support was calculated from 10,000 bootstrap replicates.

2.3. Transmission tests

Broad bean, buckhorn plantain, and alfalfa plants were kept in P2 containment chambers under 16 h light at 26 ± 2 °C, and 8 h dark at 24 ± 2 °C. Tomato and euphorbia Medusa’s head plants were maintained in a P3 containment chamber with the same temperatures but with 14 h light. The duration of the acquisition access period (AAP) was adapted to each test (Table 1) and carried out with 50 aphids per source plant. The duration of the inoculation access period (IAP) and the

number of insects transferred to each test plant for the IAP were also adapted to each test. The IAP was stopped by spraying the test plants with the insecticide Pirimor G (1 g.L⁻¹ in water).

2.3.1. ALCV transmission

Aphids of *A. fabae*, *A. gossypii*, *M. persicae*, *A. pisum*, *T. trifolii* and four populations of *A. craccivora* (Robinia, Medicago, Vicia, and EuphorbiaSA), were tested for their ability to transmit ALCV. The virus acquisition feeding was performed on broad bean plants 4–6 weeks after their agroinfection with ALCV. Virus inoculation was performed on 8-day-old broad bean or one-month-old alfalfa plants. The transmission success was assessed by symptom observation and detection of ALCV DNA by PCR as described above. In all the transmission tests, *A. craccivora* Robinia was used as a positive control of ALCV transmission.

2.3.2. EcMLV transmission

Aphid transmission of EcMLV was tested with *A. gossypii*, *M. persicae*, *D. plantaginea* and *A. craccivora* EuphorbiaSA (Table 1). The virus acquisition feeding was performed on tomato, buckhorn plantains, and euphorbia Medusa's head plants agroinfected with EcMLV. Plants used for virus inoculation by aphids were 2-week old tomato plants, one-month-old buckhorn plantain plants, or 6-year old euphorbia Medusa's head plants. The transmission success was assessed by PCR-mediated detection of EcMLV DNA. All the transmission tests of EcMLV were carried out in a P3 containment chamber.

2.3.3. PILV transmission

Aphid transmission of PILV was tested with *D. plantaginea* and *A. gossypii*. Aphids were given access to PILV by rearing them on buckhorn plantain plants one month after their agroinoculation with PILV. Aphids thus exposed to PILV, were shifted onto 1-month-old buckhorn plantain plants. The transmission success was assessed by PCR-mediated detection of PILV DNA as described above.

2.4. Virus persistence and localization in aphids

2.4.1. Testing virus persistence

Adults of *A. pisum*, *A. craccivora* Robinia and *A. craccivora* EuphorbiaSA were given a 3-day period on healthy broad bean plants for larvae delivery. Groups of 50 L1-L2 larvae were given a 3-day AAP on broad bean plants one month after their agroinoculation with ALCV. L3-L4 larvae were then moved on about 15 eight-day-old healthy plants - 10 individuals per plant-, and allowed for an IAP period of 2 days. The same individuals were shifted two more times to healthy plants for two additional 2-day IAPs. During the first and possibly second IAP the L3-L4 larvae from the AAP became adults by molting. Individuals were sampled before AAP, after AAP and at the end of the third IAP, i.e. 6 days after the end of the AAP. It is noteworthy that each individual underwent at least one molting between the end of the AAP and before the third IAP. The growth conditions were 14h light at 26 ± 2 °C, and 10h dark at 24 ± 2 °C.

2.4.2. Sampling of insect material

After collection, aphids were stored at -20 °C until use. Some aphids were dissected by pulling the insect's head with forceps under a binocular microscope. Gut and heads were separated in a water bath to prevent contaminations and subsequently grouped by 10 in 100 µL Edwards buffer. One drop of hemolymph was collected from each aphid with a glass capillary after pulling a leg. The DNA extraction was performed by grinding 10 individuals or organs in 1.5 mL microtubes with 30 rotations of small pestles. The crude extracts were centrifuged at 4000 g for 5 min. Supernatants were transferred on the filter of 200 µL filtered-tips with a PCR plate below and then centrifuged 10 min at 1500 g. One volume of isopropanol was added to the filtered extract. After several tubes inversions, the mix was centrifuged 25 min at 5000 g. Pellets were resuspended with 70% EtOH, and after

centrifugation at 15700g for 10 min, pellets were dried at 60 °C and resuspended in 50 µL H₂O. DNA extracts were stored at -20 °C before use.

2.4.3. qPCR conditions

Amplification was performed with the LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit (Roche) and the LightCycler 480 thermocycler (Roche). Primers were those described above for ALCV detection by PCR (ALCV2cEcmLV-F & ALCV2cEcmLV-R). They were used at a final concentration of 0.6 µM. Viral DNA detection was done by the addition of a 2 µL volume of extracted DNA to each well containing the Master-mix. The cycling protocol was as follows: an initial cycle consisting of 10 min at 95 °C, 30 s at 60 °C and 20 s at 72 °C; 40 cycles consisting of 15 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 20 s at 72 °C; and finally a melting curve. DNA accumulations were reported with fluorescence values adjusted for amplification efficiencies with the LinRegPCR program (Ruijter et al., 2013). They were also presented as copy numbers of viral DNA with standard curves derived from 10 fold serial dilutions of recombinant plasmids containing the viral genome.

2.4.4. Fluorescent in situ hybridization (FISH)

A fluorescent probe complementary to the CP gene of ALCV was prepared by random priming with the BioPrime DNA labeling system (Invitrogen) and Alexa Fluor 488-labeled dUTP. The template DNA was PCR amplified from the recombinant plasmid containing the ALCV genome, with the following primer pair: ALCV_FISH_620-F, 5'- GAA GAG GGC GAG AAC GAC AG-3' and ALCV_FISH_1025-R, 5'- GTG GTC TAT TTC AGC AGT TGC C -3'. Just before use, 10 µL probe was diluted with 290 µL hybridization buffer (see below), denatured 10 min at 100 °C and rapidly cooled on ice for 15 min. Individuals of *A. pisum*, *A. craccivora* Robinia and *A. craccivora* EuphorbiaSA were each divided into two groups raised for 2 weeks either on broad bean plants agroinfected with ALCV or on non-infected plants. Three days before use, aphids were shifted to healthy plants. Individuals were dissected in 1x phosphate-buffered saline (PBS) under a stereomicroscope. Pairs of salivary glands and digestive tracts were detached from the whole body by pulling the head with forceps. The dissected organs were fixed for 20 min at room temperature (RT) in embryo dishes containing 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in PBS. Fixation was stopped by a 15-min incubation in PBS containing 0,1 M glycine. To improve the permeability of the tissues, they were incubated in H₂O₂ for 15 min. The dissected organs were then soaked 3 times 5 min in 20 mM Tris-HCl hybridization buffer (pH8) containing 0.9 M NaCl, 0.01% SDS and 30% formamide. Organs were then incubated overnight at 37 °C in the diluted and heat-denatured probe solutions (see above) in embryo dishes sealed with parafilm membranes. After three washing steps of 5 min with hybridization buffer and two with PBS, organs were mounted on microscope slides in Vectashield antifade mounting medium containing 1.5 µg.mL⁻¹ DAPI for staining nuclei. Observations were performed using a Zeiss Confocal microscope and acquired in a stack mode. A minimum of thirty midguts and pairs of primary salivary glands were observed for ALCV exposed aphids of the three populations. Non-exposed aphids were observed as negative controls. The size of ALCV aggregates observed in midguts and salivary glands was estimated with the ImageJ software. To do this, the areas of 250 virtual confocal sections of aggregates were measured in midguts and salivary glands of 3 viruliferous individuals of *A. craccivora* Robinia and in the midgut of 3 viruliferous individuals of *A. craccivora* EuphorbiaSA.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were conducted with the R software v3.6.1 (R Core Team, 2017). Data were compared using the Kruskal-Wallis rank sum test (function *kruskal.test* of the package *stats*). When the null hypothesis of mean equality was rejected, the means of each pair of modalities were compared using the multiple comparison method based

on the Benjamini and Yekutieli (2001) procedure (function *pairwise.t.test()* with p-value adjustment method: BY).

3. Results

3.1. Aphid transmission is a common feature of capulaviruses

Aphid transmission of PILV, previously shown with a non-cloned virus (Susi et al., 2017) and a Finnish *D. plantaginea* population (Susi et al., 2019), was tested here with an agroinfectious clone and a French population of *D. plantaginea*. Fifty percent of the Buckhorn plantain plants agroinoculated with PILV were PCR positive, and as expected from the latent status of this virus (Susi et al., 2017; 2019), none of them exhibited any particular symptom. Some of the agroinfectious plants were used as source plants for a transmission test (Suppl. Table S1). The transmission was successful for nine of the ten test plants (Table 1) confirming that *D. plantaginea* is a vector of PILV, and together with Susi et al. results, showing that transmission was possible irrespective of the geographic origin of the aphids, Finland or France.

The aphid candidate for the potential transmission of EcmLV was a black-backed aphid from South Africa collected on plants of the species *E. caput-medusae*, a natural host of EcmLV. These aphids were able to transmit EcmLV from an agroinoculated source plant to two *E. caput-medusae* plants obtained from seeds in controlled conditions (Table 1).

3.2. The aphid vectors of EcmLV belongs to the *A. craccivora* group

According to COI gene sequences, individuals of the rearing population derived from black-backed aphids collected on *E. caput-medusae* in South-Africa clustered with representatives of the *A. craccivora* group, including *Aphis tirucallis* Hille Ris Lambers, 1954, a species known in Africa on *Euphorbia* spp. plants (Fig. 1). There are numerous morphologically similar *Aphis* spp. on *Euphorbia* that look like *A. craccivora* and which are recognized to be very difficult to distinguish from each other (Blackman and Eastop, 2000). As shown by morphological measures of specimens mounted on slides (Supplemental Fig. S1), the black-backed aphid specimens collected on *Euphorbia* Medusa's head plants are distinguishable from individuals of the *A. craccivora* group, *sensu stricto*, particularly by siphunculi length and a contrasting length ratio between the processus terminalis and the base of the last antennal segment (Supplemental Fig. S1), two previously reported discriminating features between specimens of the *A. craccivora* group,

sensu stricto, and specimens of other *Aphis* living on *Euphorbia*, in particular, *Aphis euphorbiae* Kaltenbach, 1843 (Blackman and Eastop, 2000). Morphometric data suggest that our specimens probably belong to *A. tirucallis* or *A. euphorbiae* species but with low certainty because it cannot be excluded that the morphological differences are adaptive. Thus, as suggested by Coeur d'Acier et al. (2014) in this case, we adopted a pragmatic and conservative point of view and considered that it is safe to identify the black-backed aphids from South Africa as members of the *A. craccivora* group according to CO1 sequences. Hence, the name *EuphorbiaSA* was given to this South African population that refers both to its host plant and its geographical origin. Its adaptation to spurge was confirmed with branches cut from *Euphorbia nicaeensis* All. and *Euphorbia serrata* L. plants of the area of Montpellier, on which *EuphorbiaSA* individuals developed readily.

3.3. Transmission of capulaviruses by aphids is highly specific

Aphids of five non-*A. craccivora* species were tested for their ability to transmit ALCV (Table 1). They were selected according to at least one of the following criteria: regularly found on Fabaceae, phylogenetically close to the known vectors of capulaviruses, and reported to transmit other viruses. No transmission was detected with any of these non-*A. craccivora* species.

The transmission tests for EcmLV and PILV were conducted with aphid species available in the laboratory that develop on the few reported hosts of these viruses. EcmLV was not transmissible by *A. gossypii* and *M. persicae* and PILV was not transmissible by *A. gossypii* (Table 1). These failures support the concept of a high transmission specificity, with only one vector species per capulavirus species.

Transmission specificity was explored further by testing if an aphid vector of one capulavirus can transmit another one. Due to a limited number of compatible plant/aphid/capulavirus trios (Table 2), only one combination could be tested, i.e. *A. craccivora* *EuphorbiaSA* and ALCV which are both hosted by broad bean. According to symptom observations and PCR test, all the broad bean plants exposed to *EuphorbiaSA* aphids that were given access to ALCV infected plants, were negative for the presence of ALCV (Table 1: 0/12, 0/45, 0/15). The transmission was also unsuccessful in test plants exposed to 30–150 viruliferous aphids (0/6). Aphids of the *A. craccivora* Robinia population tested in parallel as positive controls did successfully transmit ALCV (Table 1: 8/15, 9/30).

To explore other combinations of capulaviruses and known

Table 1

Transmission tests of three capulaviruses with aphids of various species. The rate of infected plants is in bold for successful transmissions. PILV, *Plantago lanceolata* latent virus; EcmLV, *Euphorbia caput medusae* latent virus; ALCV, alfalfa leaf curl virus; AAP, acquisition access period; IAP, inoculation access period.

Virus species	Aphid population c	Rate of infected plants	Host plant	AAP (days)	IAP (days)	Number aphids/IAP plant
PILV	<i>Dysaphis plantaginea</i> Nov08	9/10	<i>Plantago lanceolata</i>	27	5	10
	<i>Aphis gossypii</i> NM1	0/20	<i>Plantago lanceolata</i>	13	5	10
		0/20		21	5	10
EcmLV	<i>Aphis craccivora</i> <i>EuphorbiaSA</i>	2/2	<i>Euphorbia caput-medusae</i>	weeks	35	50
	<i>Aphis gossypii</i> NM1	0/9	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	5	10
	<i>Myzus persicae</i> Lav85	0/24	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	5	10
	<i>Dysaphis plantaginea</i> Nov08	0/12	<i>Plantago lanceolata</i>	3	3	10
		8/15	<i>Vicia faba</i>	2	5	10
ALCV	<i>Aphis craccivora</i> Robinia	9/30		2	5	10
	<i>Aphis fabae</i> A06-405	0/19	<i>Vicia faba</i>	2	5	5
	<i>Aphis fabae</i> AFCOL	0/3	<i>Vicia faba</i>	2	5	5
		0/5		2	5	5
		0/10		2	5	10
	<i>Aphis gossypii</i> NM1	0/20	<i>Vicia faba</i>	2	5	5
	<i>Myzus persicae</i> Lav85	0/6	<i>Medicago sativa</i>	2	5	20
	<i>Acyrtosiphon pisum</i> LL01	0/20	<i>Vicia faba</i>	2	5	10
	<i>Therioaphis trifolii</i> Mon18	0/1	<i>Medicago sativa</i>	15	5	10
	<i>Aphis craccivora</i> <i>EuphorbiaSA</i>	0/45	<i>Vicia faba</i>	2	5	10
		0/15		2	5	10
		0/6		3	5	30–150
		0/12		7	weeks	10

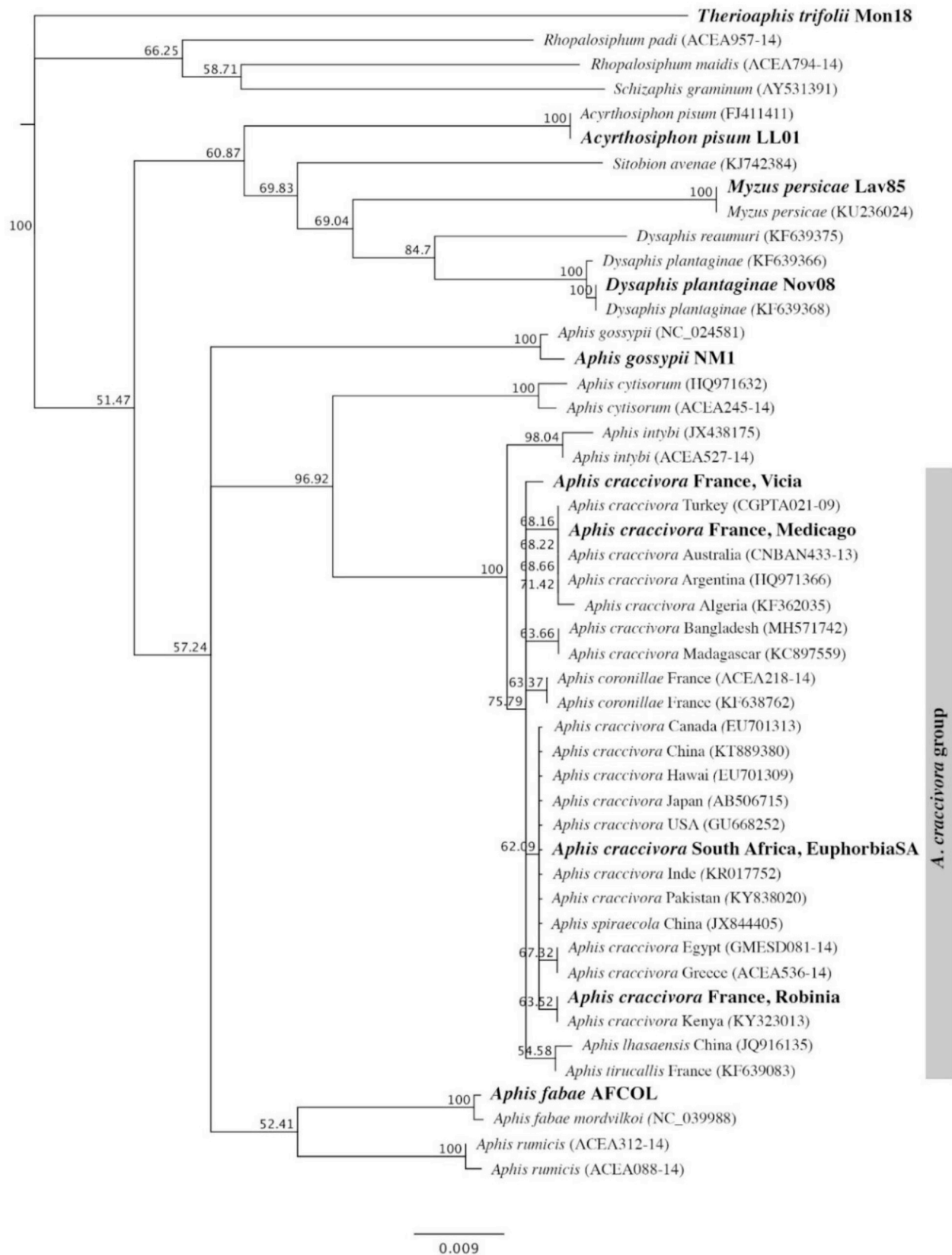


Fig. 1. Neighbor joining tree showing the genetic distances among members of the *Aphis craccivora* group and members of related species, based on the cytochrome oxidase 1 gene. Sequences are identified by a species name and an accession number for those uploaded from Genbank or BOLD. Members of the *A. craccivora* group are identified further with the country of origin. The description of sequences generated in this study is in bold. A detailed description of the sequenced specimens is provided in [Supplemental Tables S1 and S2](#). Numbers associated with nodes represent the percentage of 10,000 bootstrap iterations supporting the nodes; only percentages > 50% are indicated. *Therioaphis trifolii* was used as an outgroup.

Table 2

Detection of compatible plant/aphid/capulavirus trios to assess the transmission specificity of capulaviruses by aphids. (A) reported host plants of capulaviruses that may be hosts of capulavirus vectors. + aphids were able to stay for at least several days on the plant; - aphids were not able to survive on the plant. (B) Detection of reported host plants of capulaviruses that may host other capulaviruses. Capulaviruses were agroinoculated to host plants. nd = not done; * = transitory virus infection.

A			
Host plant	Aphid species		
	<i>Aphis craccivora</i> Robinia	<i>Aphis craccivora</i> EuphorbiaSA	<i>Dysaphis</i> <i>plantaginea</i>
<i>Vicia faba</i>	+	+	-
<i>Euphorbia caput-medusae</i>	-	+	-
<i>Plantago lanceolata</i>	-	-	+
B			
Host plant	Virus species		
	ALCV	EcmLV	PILV
<i>Vicia faba</i>	10/10	0/22	0/26
<i>Euphorbia caput-medusae</i>	nd	3/10	nd
<i>Plantago lanceolata</i>	1/20*	1/19	5/6

capulavirus vectors suitable for transmission tests, we tested if capulaviruses available in the laboratory have shared host plants (Table 2B). The only virus/vector combination was EcmLV with *D. plantaginea* but no transmission occurred (Table 1), suggesting that EcmLV is not transmitted by *D. plantaginea*; nonetheless, we cannot exclude that the failure results from a poor adaptation of EcmLV on this host.

3.4. High transmission specificity of ALCV within the *A. craccivora* group

The results presented above show that while aphids of the Robinia population of *A. craccivora* were able to transmit ALCV, those of the EuphorbiaSA population, were not (Table 1). This indicates that the transmission of ALCV by aphids is highly specific. Hence, the specificity within the *A. craccivora* group was investigated further by testing two more aphid populations, Medicago and Vicia (Supplemental Table S1). Aphids of Robinia, Vicia and Medicago populations transmitted ALCV from broad bean agroinfected plants to 7 of 13 (53.8%), 7 of 20 (35%) and 1 of 20 (5%) test plants, respectively (Table 3A). The relatively low transmission success with the Medicago population may be explained by its low affinity for broad bean plants because some individuals ran away during IAP. This hypothesis was confirmed with a distinct test in which individuals of the Medicago population exposed to ALCV infected broad bean plants were shifted to alfalfa plants; in this case, the transmission rate was 62%, similar to that obtained with the Robinia population on broad bean plants (Table 3A).

3.5. ALCV persist in vector and non-vector populations of the *A. craccivora* group

Since geminiviruses are transmitted in a circulative persistent manner (Nault, 1997; Whitfield et al., 2015), we wanted to verify if this is also the case for capulaviruses. To do this, we determined ALCV persistence in the vector population *A. craccivora* Robinia and compared it to that in non-vector populations of *A. craccivora* (EuphorbiaSA) and *A. pisum*. The transmission procedure consisted of a 3-day AAP on broad bean plants agroinfected with ALCV, followed by three sequential 2-day IAPs on three batches of broad bean plants. While 70% of the plants exposed to individuals of the Robinia

population were symptomatic in the three batches, none of the plants exposed to *A. pisum* and EuphorbiaSA populations exhibited symptoms, confirming their non-vector status (Table 3B). The transmission of ALCV to the three sequential batches by Robinia aphids indicates the persistence of transmissibility for at least 4 days after the end of AAP. To determine to what extent ALCV persists in the non-vector *A. pisum* and *A. craccivora* EuphorbiaSA, viral DNA content was assessed by qPCR. At the end of the 3-day AAP, ALCV DNA was detected in vector and non-vector aphids indicating that all had access to the virus (Fig. 2A). The number of viral DNA copies per insect in *A. craccivora* Robinia (1.5×10^6) was significantly higher than that of *A. pisum* (1.6×10^5 ; *pairwise.t.test()* p-value = 6.9×10^{-4}) and *A. craccivora* EuphorbiaSA (5.6×10^4 ; p-value = 4.6×10^{-5}) (Fig. 2A). Six days after the end of the AAP, the viral amount only slightly decreased in *A. craccivora* Robinia (7.5×10^5 viral DNA copies per insect), remained constant in *A. craccivora* EuphorbiaSA (6.4×10^4), and was undetectable in *A. pisum* (Fig. 2B).

The persistence of ALCV in the non-vector *A. craccivora* EuphorbiaSA was further investigated, analyzing the localization of the viral DNA in the insect body. To do this, a second transmission test was carried out, this time quantifying ALCV on dissected insect organs, i.e. the digestive tract, the head with the salivary glands, and hemolymph. Like in the first test, symptoms occurred only after exposure to viruliferous Robinia aphids (Table 3B). At the end of the AAP, viral DNA was detected in the digestive tract in all the treatments (Fig. 3A) which shows that aphids of the three populations had access to the virus. Although the body of *A. pisum* aphids is much larger than that of EuphorbiaSA aphids (Supplemental Fig. S1), the average ALCV DNA content was similar (1.75×10^4 and 1.4×10^4 , respectively). The guts of Robinia aphids contained 2.0×10^6 viral DNA copies per insect on average, which is 145 times higher than the content estimated for *A. pisum* and EuphorbiaSA. At the end of the three sequential 2-day IAPs, the digestive tract of *A. pisum* aphids was qPCR negative for ALCV (Fig. 3B). On the contrary, the samples of Robinia aphids were qPCR positive (6.7×10^4 viral DNA copies per individual) as well as 4 of the 6 samples of EuphorbiaSA aphids (5.7×10^2 viral DNA copies per individual). The detection pattern of ALCV in head samples was similar to that observed in gut samples. Indeed, while the head samples of *A. pisum* were all qPCR negative, those of Robinia aphids were positive (5.8×10^3 viral DNA copies per individual) as well as 5 of 7 samples of EuphorbiaSA aphids (1.9×10^2). Hemolymph samples were qPCR-positive only for Robinia aphids, with 5.1×10^2 viral DNA copies per individual on average.

3.6. Intracellular ALCV aggregates were localized in vector and non-vector *A. craccivora*

To evaluate if the persistence of ALCV detected with the non-vector population of *A. craccivora* (EuphorbiaSA) might be associated with internalization and persistence in midgut cells, we used fluorescent in-situ hybridization (FISH) using *A. craccivora* Robinia and *A. pisum* as positive and negative controls, respectively. Aphids of the three populations were allowed 15-day AAPs followed by 48-h IAPs before dissection and FISH analysis. In Robinia aphids, fluorescent aggregates were observed all around the nuclei of epithelial cells of the anterior midgut (Fig. 4) and of the beginning of the posterior midgut (data not shown). Their area estimated from confocal virtual sections was $0.52 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ on average (Fig. 5). These aggregates were detected neither in aphids of the *A. pisum* population nor in aphids that fed on healthy plants only. In EuphorbiaSA aphids, virus-specific aggregates were also detected but were distinguishable from those observed with Robinia aphids based on their distribution and size. Indeed, unlike those of Robinia aphids, they did not circle the nuclei but seemed to be concentrated towards the apical and basal side of epithelial cells. Their area was $28.10 \pm 1.01 \mu\text{m}^2$ on average, significantly larger than the Robinia aggregates (Fig. 5, Benjamini and Yekutieli's method: p-

Table 3

Transmission tests of ALCV with *A. craccivora* populations. (A) Comparison of populations from *Robinia pseudoacacia* L. (*Robinia*), *Vicia sativa* (L.) Bernh. (*Vicia*), and *Medicago sativa* L. (*Medicago*) (B) Test of the persistency of the infectivity in *A. craccivora* *Robinia*. Aphids of the non-vector *EuphorbiaSA* population of *A. craccivora* and of *A. pisum* were used as controls. The persistency was assessed with individuals that were given a 3-day AAP on broad bean plants agroinfected with ALCV and subsequently shifted sequentially to three batches of plants each exposed to 2-day IAPs. The rate of transmission successes is mentioned in the chronological order of the three passages. Aphids of this test were used also to determine the persistence of ALCV DNA in the whole body (Experiment 1, Fig. 2) and in dissected fractions (Experiment 2, Fig. 3). For both A and B tests, inoculations were performed with 10 aphids per plant.

A							
Virus species	Aphid population	Rate of infected plants	Source plant	Test plant	AAP (days)	IAP (days)	
ALCV	<i>Aphis craccivora</i> <i>Robinia</i>	7/13	<i>Vicia faba</i>	<i>Vicia faba</i>	3	5	
	<i>Aphis craccivora</i> <i>Vicia</i>	7/20	<i>Vicia faba</i>	<i>Vicia faba</i>	3	5	
	<i>Aphis craccivora</i> <i>Medicago</i>		1/20	<i>Vicia faba</i>	<i>Vicia faba</i>	3	5
			5/8	<i>Vicia faba</i>	<i>Medicago sativa</i>	4	7
B							
Virus species	Experiment	Aphid species	Rate of infected plants	Host plant	AAP (days)	IAP (days)	
ALCV	1.	<i>Aphis craccivora</i> <i>Robinia</i>	10/14; 9/13; 9/12	<i>Vicia faba</i>	3	2	
		<i>Aphis craccivora</i> <i>EuphorbiaSA</i>	0/15; 0/15; 0/15	<i>Vicia faba</i>	3	2	
		<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0/15; 0/15; 0/15	<i>Vicia faba</i>	3	2	
		<i>Aphis craccivora</i> <i>Robinia</i>	3/15; 4/19; 1/15	<i>Vicia faba</i>	3	2	
ALCV	2.	<i>Aphis craccivora</i> <i>EuphorbiaSA</i>	0/15; 0/18; 0/20	<i>Vicia faba</i>	3	2	
		<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0/15; 0/15; 0/15	<i>Vicia faba</i>	3	2	
		<i>Aphis craccivora</i> <i>Robinia</i>	3/15; 4/19; 1/15	<i>Vicia faba</i>	3	2	
		<i>Aphis craccivora</i> <i>EuphorbiaSA</i>	0/15; 0/18; 0/20	<i>Vicia faba</i>	3	2	

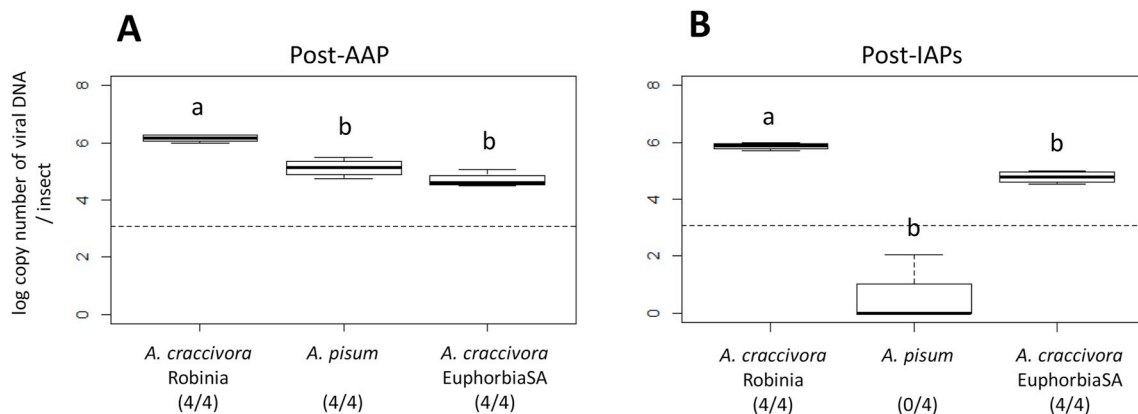


Fig. 2. Box-plots showing the amount of ALCV DNA in vector aphids (*A. craccivora* *Robinia*) and non-vector aphids (*A. craccivora* *EuphorbiaSA* and *A. pisum*) following a 3-day AAP on broad bean plants agroinfected with ALCV (A), and after three sequential 2-day IAPs on non-infected plants (B). In each treatment, the content of ALCV DNA was determined by qPCR in 4 pools of 10 individuals. Accumulations are reported as logarithm 10 of the number of viral DNA copies. The dotted lines represent the highest values obtained with non-viruliferous pools of 10 aphids sampled before the 3-day AAP; the post-AAP and -IAPs pools for which the number of estimated DNA copies is above this threshold are considered positive for the presence of ALCV DNA. The ratio of positive pools is indicated below aphid names. Letters above box-plots indicate significant differences (p-value < 0.01) between the modalities according to the multiple comparison method based on Benjamini and Yekutieli's procedure.

value < 0.01). Noteworthy, the size range of the aggregates is larger for *EuphorbiaSA* aphids than for *Robinia* aphids. Additionally, while virus aggregates were observed in a majority of *Robinia* individuals (68%), they were observed in only 33% of *EuphorbiaSA* individuals (Table 4).

Virus-specific aggregates were detected in primary salivary glands of *A. craccivora* *Robinia* aphids (Fig. 6) and only in 13% of individuals (Table 4); no virus-specific aggregates were detected in accessory salivary glands (results not shown). Interestingly, their size was larger than the *Robinia* midgut aggregates, with a mean area of $9.50 \pm 0.62 \mu\text{m}^2$ (Fig. 5). No virus-specific aggregates were detected in salivary glands of *A. craccivora* *EuphorbiaSA* and *A. pisum* aphids.

4. Discussion

4.1. Aphid transmission is a taxonomic criterion of the genus *Capulavirus*

ALCV and PILV were previously reported to be transmitted by aphids. By demonstrating that a third capulavirus (*EcmLV*) is

transmitted by aphids, aphid transmission is validated as a taxonomic criterion of the new genus. Additionally, the successful transmission of a cloned PILV by the aphid *D. plantaginea* not only confirmed previous transmission results with a non-cloned PILV isolate (Susi et al., 2019), but showed, together with the transmission of ALCV (Roumagnac et al., 2015) and *EcmLV* (this study) clones, that their monopartite genome determines by itself aphid transmissibility without any helper DNA or virus. It is assumed that CP is a major player in aphid transmission of capulaviruses as demonstrated previously for the CP of non-aphid transmitted geminiviruses (Azzam et al., 1994; Briddon et al., 1990). Consistent with these reports, CPs of ALCV and *EcmLV*, the two capulaviruses transmitted by aphids of the *A. craccivora* group, are more similar to each other (75% amino acid identity) than to the CP of PILV (47% and 53% aa identity respectively) which is transmitted with a non-*craccivora* aphid, i.e. *D. plantaginea*. Hence, as the CP of *FbSLCV* is highly similar to ALCV and *EcmLV* CPs (78% and 72%, respectively) (Varsani et al., 2017), it may be predicted that it will also be transmitted by *A. craccivora* aphids.

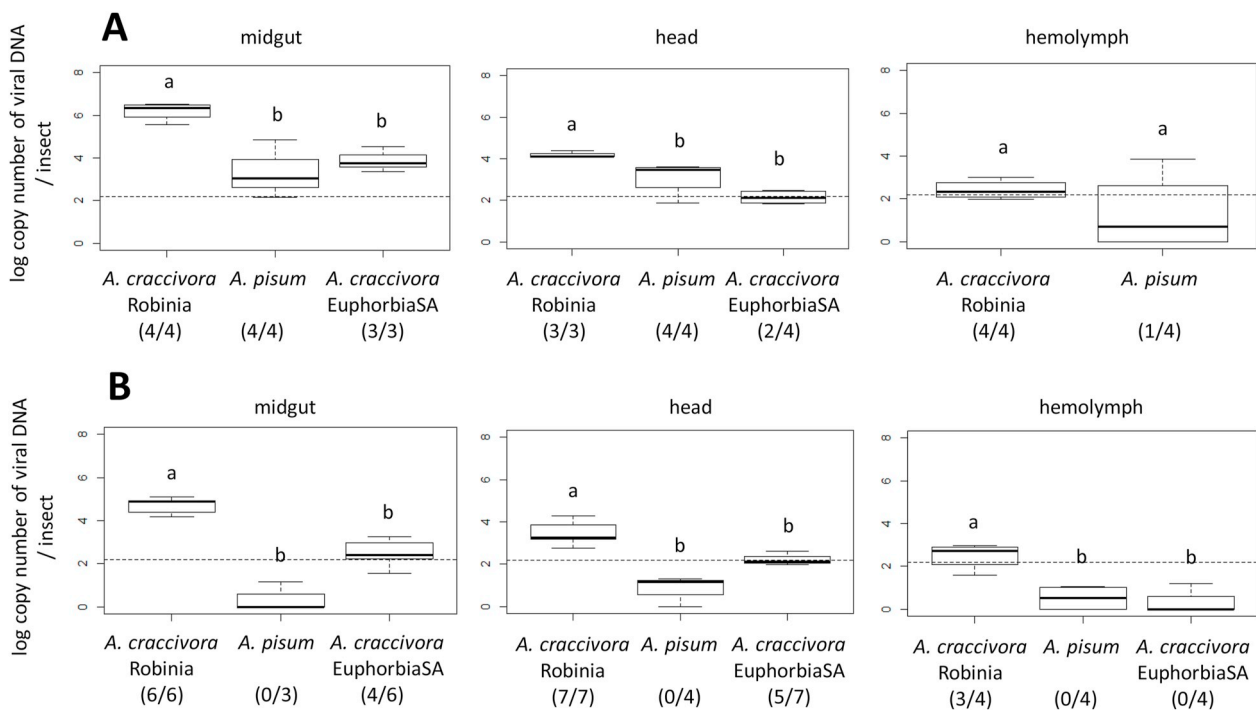


Fig. 3. Box-plots showing amount of ALCV DNA in the midgut, head, and hemolymph in vector aphids (*A. craccivora* Robinia) and non-vector aphids (*A. craccivora* EuphorbiaSA and *A. pisum*), following 3-day AAP on broad bean plants agroinfected with ALCV (A) and after three sequential 2-day passages on non-infected plants (B). The content of ALCV DNA was determined by qPCR in 3–7 pools of 10 dissected fractions. Accumulations are reported as logarithm 10 of the number of viral DNA copies. The dotted lines represent the highest value obtained with non-viruliferous pools of 10 aphids sampled before the 3-day AAP; the post-AAP and -IAPs pools for which the number of estimated DNA copies is above this threshold are considered positive for the presence of ALCV DNA. The ratio of positive pools is indicated below the aphid names. Statistical analysis as in Fig. 2.

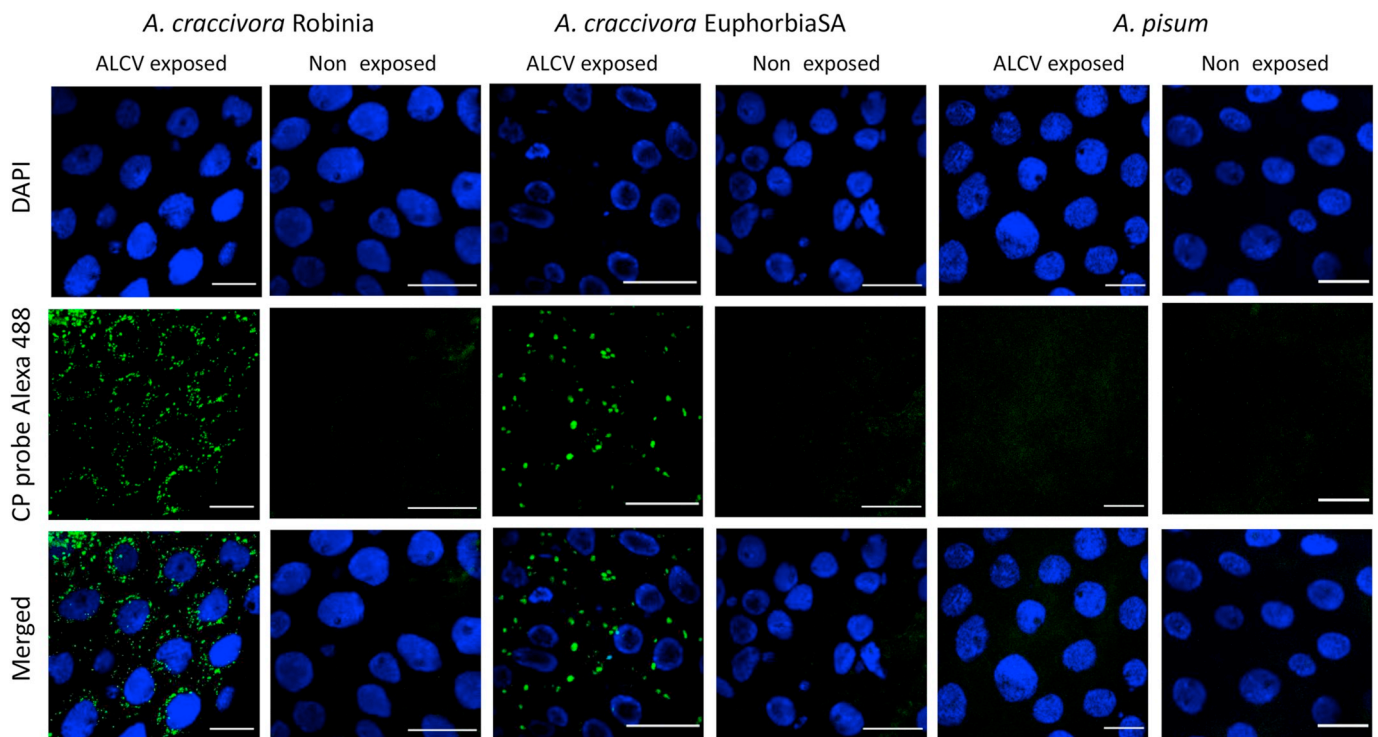


Fig. 4. Localization of ALCV DNA by FISH in dissected anterior midguts of vector and non-vector aphids of ALCV. Aphids were exposed during 15 days to broad bean plants agroinfected with ALCV and then shifted to non-infected plants for three days before FISH analysis. Non exposed aphids underwent the same procedure except that broad bean plants of the 15 day period were non-infected. *A. craccivora* Robinia is a vector aphid of ALCV whereas *A. craccivora* EuphorbiaSA and *A. pisum* are non-vector aphids. The DNA probe is complementary to the CP gene of ALCV and labeled with a green Alexa 488 fluorochrome. Nuclei are DAPI-blue stained. Preparations were examined with confocal microscopy. Horizontal bars = 30 µm.

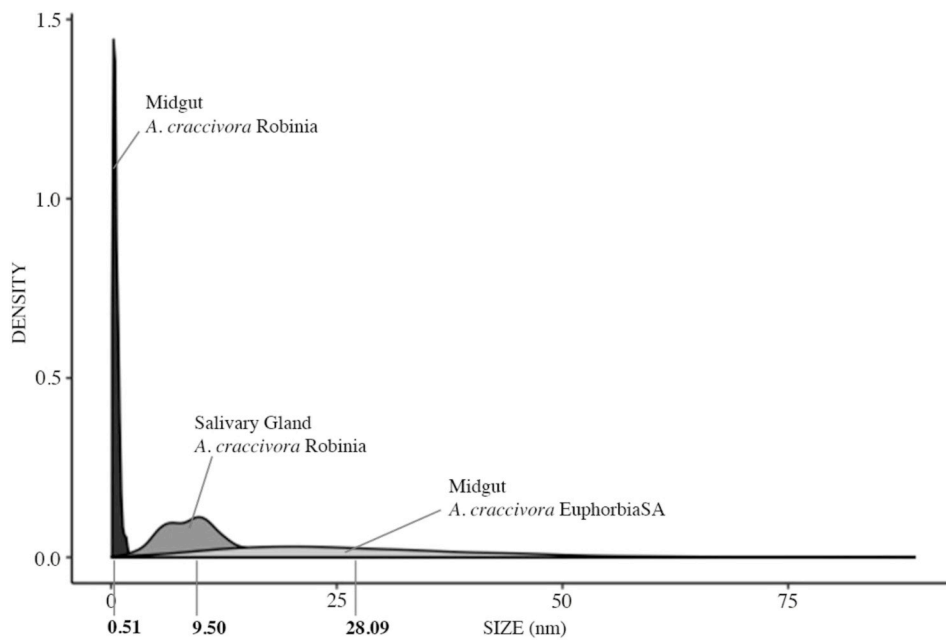


Fig. 5. Density plots showing the frequency distribution of section areas of fluorescent ALCV-specific aggregates observed in dissected midguts and salivary glands of vector and non-vector *A. craccivora* aphids. FISH was performed on aphids that were given a 15-day AAP on broad bean plants agroinfected with ALCV, followed by a 3-day period on healthy plants. Areas of aggregate sections were measured in midguts and primary salivary glands of three vector aphids (*A. craccivora* Robinia) and in midguts of three non-vector aphids (*A. craccivora* Euphorbia SA). Areas of 250 sections of aggregates were measured per modality. A graph was obtained with the libraries *ggplot2* and function *ggplot* in R. Average areas are indicated below the figure for each treatment.

Table 4

Frequency of midgut and salivary glands in which ALCV-specific aggregates were detected by FISH in vector and non-vector aphids (Figs. 2 and 3). Vector aphids were from the Robinia population of *A. craccivora* and the non-vector aphids were from the EuphorbiaSA population of *A. craccivora* and from *A. pisum*. Aphids were analyzed after a 15-day AAP on broad bean plants agroinfected with ALCV followed by a 3-day IAP on non-infected plants.

Aphid population	Aphid organs	
	Anterior midgut	Primary salivary gland
<i>Aphis craccivora</i> Robinia	62/91 (68,13%)	12/97 (12,37%)
<i>Aphis craccivora</i> EuphorbiaSA	13/39 (33,33%)	0/32
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0/30	0/34

4.2. Transmission results and taxonomy of *A. craccivora* populations

The transmission tests showed that vectors of EcmLV and ALCV are all belonging to the *A. craccivora* group. While the EuphorbiaSA population was distinguished from other *A. craccivora* populations by its adaptation to spurge and by morphological differences, it could not be distinguished according to COI gene comparisons (Fig. 1); this later result is consistent with previous results showing that sub-species or populations are not easily distinguished within the very cosmopolitan *A. craccivora* group (Blackman and Eastop, 2000; Wang et al., 2011; Song et al., 2016; Coeur d’Acier et al., 2014). According to aphid literature, morphological variations are not necessarily heritable (Mehrparvar, 2012). Therefore, as recommended by these authors, the taxonomy has to be confirmed with genetic and biological data. Unexpectedly, the transmission results may further support the distinction

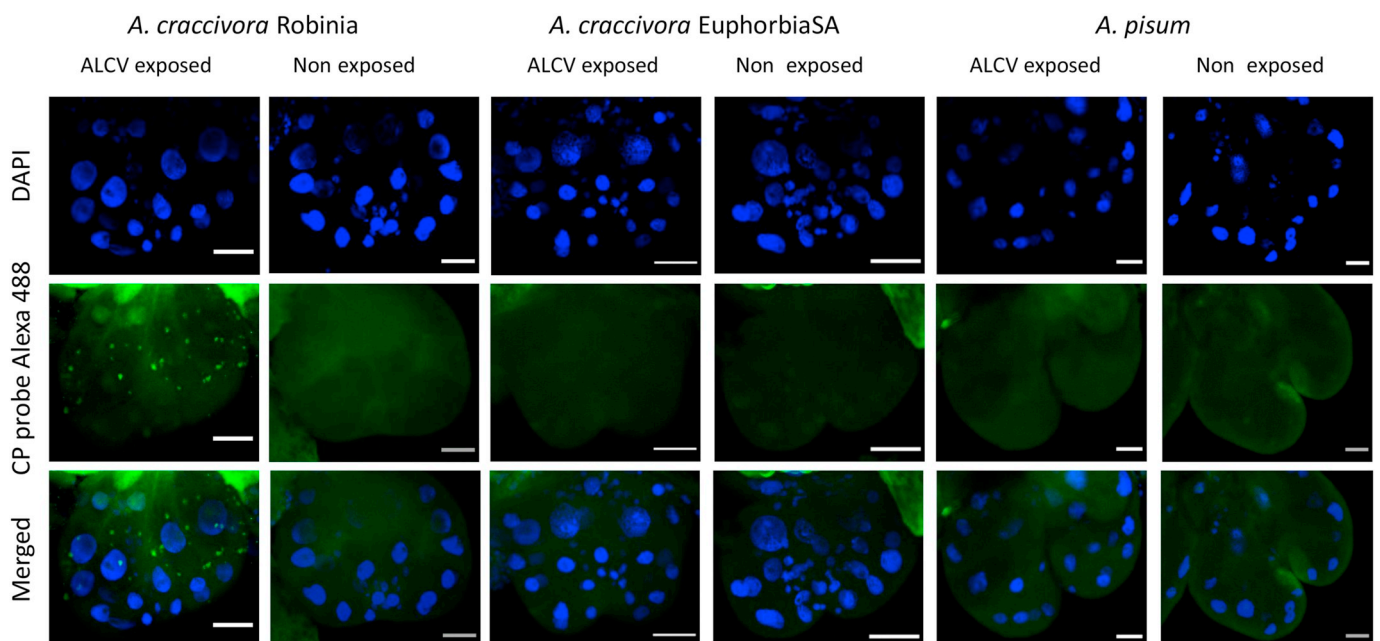


Fig. 6. Localization of ALCV DNA by FISH in dissected primary salivary glands of vector and non-vector aphids of ALCV. Aphid species, figure layout, probe and DAPI staining as in Fig. 4. Horizontal bars = 30 µm.

between the EuphorbiaSA population and the other three *A. craccivora* populations used in this study. Indeed, the intra-species transmission specificity previously detected with various populations of *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852), an aphid vector of luteoviruses (Gray et al., 2002), was shown to be a heritable trait regulated by multiple genes acting in an additive fashion (Burrows et al., 2007).

4.3. Contrasted capulavirus vectors

EcmLV was identified in South Africa and ALCV in Europe, Argentina, the Middle East and China (Davoodi et al., 2018, Guo et al. 2020) which suggests that *A. craccivora* is a global vector of capulaviruses. This prediction is consistent with the global distribution of *A. craccivora* and with the fact that FbSLCV was isolated from French bean in India, a highly conducive host of *A. craccivora*. Thus, except for PILV, the transmission of capulaviruses may be comparable to the transmission of begomoviruses, both having a unique vector species.

While *A. craccivora* is polyphagous, *D. plantaginea* is specialized on buckhorn plantain and apple tree. This difference is consistent with the large range of viruses transmitted by *A. craccivora*, including representatives of families *Tombusviridae*, *Potyviridae*, *Bromoviridae*, and *Nanoviridae*, whereas PILV is the first virus reported to be transmitted by *D. plantaginea*.

4.4. ALCV is transmitted by *A. craccivora* in a highly specific and persistent circulative manner

The persistence of ALCV in *A. craccivora* individuals was not interrupted by molts, which is typical of the persistent circulative mode of transmission. Consistently with this result, ALCV DNA was detected in hemolymph, epithelial cells of the anterior midgut and primary salivary glands. As ALCV DNA was not detected in accessory salivary glands, the results suggest a tropism for primary salivary glands like that observed with whitefly transmitted geminiviruses (Cicero and Brown, 2011).

ALCV was not transmissible by the EuphorbiaSA population of *A. craccivora*, even with a high number of individuals per test plants (30–150). Thus, the transmission failure of ALCV by EuphorbiaSA individuals is expected to be due to incompatible virus-aphid interactions rather than to a potentially lower amount of inoculated virus due to their smaller size compared to Robinia individuals (Supplemental Fig. S1). The extremely high transmission specificity of ALCV by certain populations of *A. craccivora* is similar to that reported with barley yellow dwarf virus - MAV (BYDV-MAV) and BYDV-PAV differentially transmitted by *S. graminum* aphid populations (Gray et al., 2002). Although *B. tabaci* cryptic species are generally thought to be vector of all begomoviruses, it was reported that the begomovirus Tomato yellow leaf curl China virus was transmissible by the cryptic species Middle East Asia Minor 1 and not by the Mediterranean one (Wei, 2014). The molecular interactions that drive ALCV recognition for transmission are expected to be highly specific. Hence, it seems highly unlikely that non-aphid vectors would transmit capulaviruses, which further supports that aphid transmission is a taxonomic criterion of the genus *Capulavirus*.

The inability of *A. craccivora* EuphorbiaSA to transmit ALCV may be related to its specialization in the transmission of EcmLV. It would be interesting to validate this hypothesis with a symmetric transmission of EcmLV by *A. craccivora* populations that are vectors of ALCV. Unfortunately, besides EuphorbiaSA, *A. craccivora* populations available in our laboratory did not develop on reported hosts of EcmLV (Bernardo et al., 2013). However, such test may be carried out in the future with African *A. craccivora* populations reported from spurges (Remaudière, 1985).

4.5. Transmission barriers to ALCV in aphids

ALCV DNA was detected in some hemolymph samples of the non-

vector *A. pisum* at the end of the AAP. However, their low percentage combined with the lack of ALCV signals by FISH in the midgut are consistent with a hemolymph contamination. These results indicate a transmission barrier located at the gut level similar to the barriers detected with non-vector leafhoppers of mastreviruses (Lett et al., 2002) and non-vector whiteflies of begomoviruses (Rosell et al., 1999; Czosnek et al., 2001; Ohnishi et al., 2009). The viral persistence in *A. craccivora* EuphorbiaSA but not in *A. pisum* may be explained by selective accessibility to gut cells.

The results on ALCV persistence and localization in *A. craccivora* EuphorbiaSA individuals suggest that the transmission barrier is in the salivary glands. Indeed, viral DNA was detected by FISH in midgut epithelial cells, and at 6 days post-AAP, some head samples were detected virus-positive. Interestingly, salivary glands were previously reported to be the major barrier for the aphid-transmitted barley yellow dwarf disease associated viruses (family *Luteoviridae*) (Gildow and Gray, 1993). Indeed, these authors showed that the basal lamina (BL) surrounding the accessory salivary glands acts as a viral barrier. While BL acts as an absolute barrier to the transmission of BYDV-MAV in the non-vector aphid *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856), it is slightly permeable in the non-efficient vector *Rhopalosiphum padi* Linnaeus, 1758 and attractive as well as permeable in the efficient vector *Sitobion avenae* (Fabricius, 1775).

ALCV DNA was readily localized by FISH in the midgut of vector aphids of *A. craccivora*. Its rare observation in the salivary glands may be explained by difficult access to salivary glands due to the BL barrier as reported for BYDV-MAV in *R. maidis* (Gildow and Gray, 1993). Indeed, as these authors estimated the size exclusion of BL in cereal aphids to 20–30 nm (Peiffer et al., 1997), a potentially similar size exclusion in *A. craccivora* may reduce the capulavirus transit through the BL due to their size, 20 × 36 nm in the case of EcmLV (Roumagnac et al., 2015).

We speculate that the standard size of the virus aggregates detected by FISH in midgut cells of *A. craccivora* Robinia and their defined perinuclear distribution reflect a well-established mechanism associated with virus transit. On the contrary, the large range of sizes of the aggregates observed in midgut cells of *A. craccivora* EuphorbiaSA and their apparently undefined distribution seems to reflect non-established virus-aphid interactions that nevertheless allow some virus persistence. Further tests will be necessary to characterize the specific and non-specific interactions and confirm the transmission barriers of capulaviruses.

Author contributions

Faustine Ryckebusch (FR), Nicolas Sauvion (NS) and Michel Peterschmitt (MP) conceived and designed the experiments.

Philippe Roumagnac (PR) collected the aphids from South Africa.

FR, NS, Martine Granier and MP performed the experiments.

FR, NS, and MP analyzed the data.

FR, NS, PR and MP wrote the paper.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

We are very thankful to Armelle Coeur d'Acier for her valuable expertise in aphid identification. We thank Myriam Siegwart (Inra-Avignon) for providing *D. plantaginea* aphids, Sylvaine Boissinot (Inra-Colmar) and Christoph Vorburger (ETHZürich) for providing *A. fabae* aphids and Josep Vicens Fandos (Lab. de Botànica, Fac. de Farmàcia, Univ. de Barcelona) for confirming the species identification of the spurges collected near Montpellier. The design of the CO1 primers was

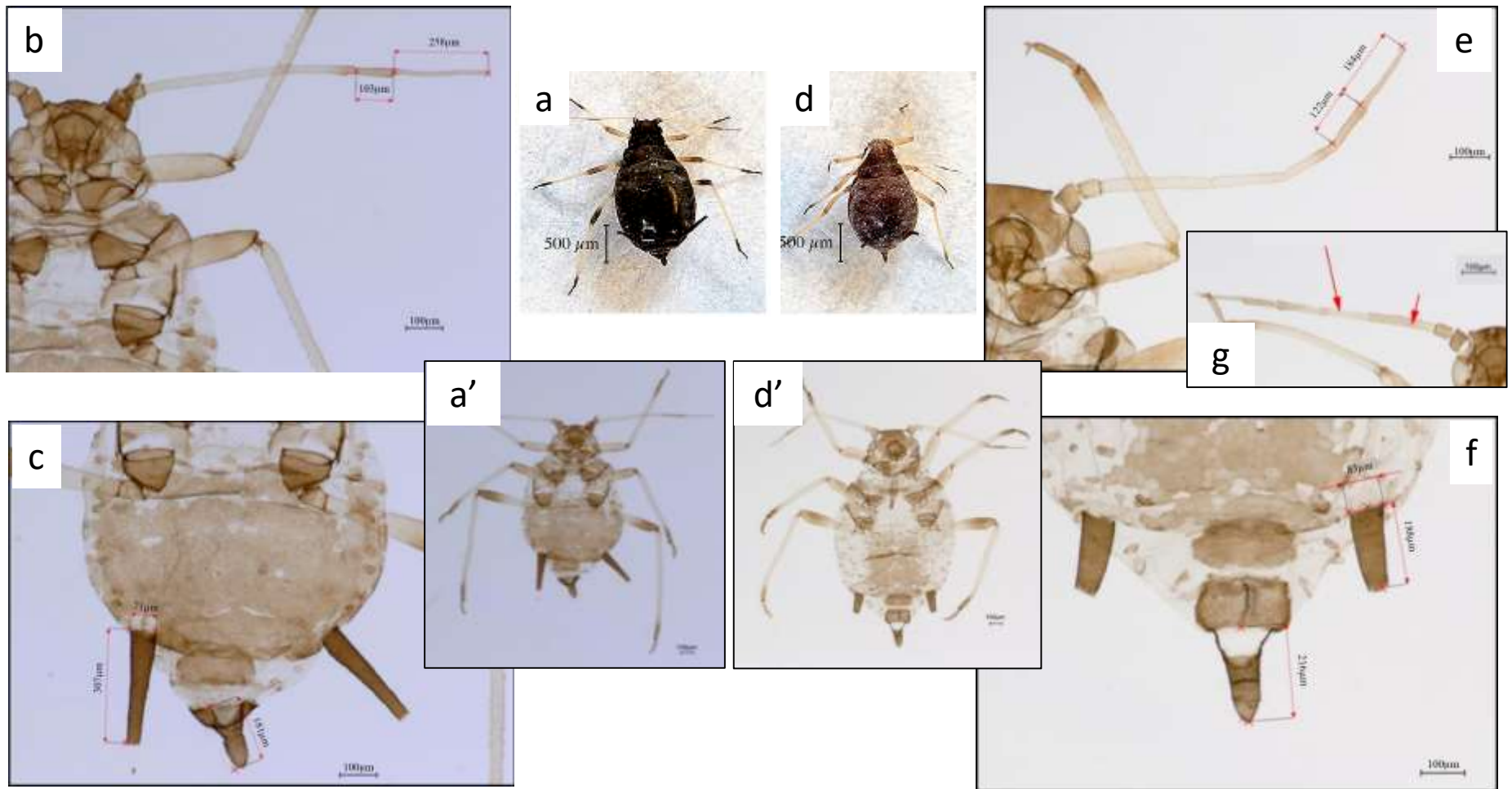
from Isabelle Meunier (Inra-Montpellier). The study was carried out during the Ph.D. project of Faustine Ryckebusch that was funded by the Agropolis Fondation (E-Space flagship program) grant number 1504-004.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.04.004>.

References

- Azzam, O., Frazer, J., de la Rosa, D., Beaver, J.S., Ahlquist, P., Maxwell, D.P., 1994. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* 204, 289–296. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1533>.
- Bahder, B.W., Zalom, F.G., Jayanth, M., Sudarshana, M.R., 2016. Phylogeny of geminivirus coat protein sequences and digital PCR aid in identifying *Spissistilus festinus* as a vector of Grapevine red blotch-associated virus. *Phytopathology* 106, 1223–1230. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-16-0125-FI>.
- Bedford, I.D., Briddon, R.W., Brown, J.K., Rosell, R.C., Markham, P.G., 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Ann. Appl. Biol.* 125, 311–325. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1994.tb04972.x>.
- Benjamini, Y., Yekutieli, D., 2001. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Ann. Stat.* 29, 1165–1188. <https://doi.org/10.1214/aos/1013699998>.
- Bernardo, P., Golden, M., Akram, M., Naimuddin, Nadarajan, N., Fernandez, E., Granier, M., Rebelo, A.G., Peterschmitt, M., Martin, D.P., Roumagnac, P., 2013. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: evolutionary and taxonomic implications. *Virus Res.* 177, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.006>.
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2000. *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide* (No. second ed. John Wiley & Sons Ltd).
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., Markham, P.G., 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177, 85–94. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90462-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90462-z).
- Burrows, M.E., Caillaud, M.C., Smith, D.M., Gray, S.M., 2007. Biometrical genetic analysis of luteovirus transmission in the aphid *Schizaphis graminum*. *Heredity* 98, 106–113. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800909>.
- Cicero M, J., Brown K, J., 2011. Functional Anatomy of Whitefly Organs Associated With Squash Leaf Curl Virus (Geminiviridae: Begomovirus) Transmission by the B Biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 104, 261–279. <https://doi.org/10.1603/an10075>.
- Coeur d'acier, A., Cruaud, A., Artige, E., Genson, G., Clamens, A.-L., Pierre, E., Hudaverdian, S., Simon, J.-C., Jousset, E., Rasplus, J.-Y., 2014. DNA barcoding and the associated PhylAphidB@se website for the identification of European aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *PLoS One* 9, e97620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097620>.
- Czosnek, H., Ghanim, Miriam, Ghanim, Murad, 2001. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* — insights from studies with Tomato yellow leaf curl virus. *Ann. Appl. Biol.* 140, 215–231 2002.
- Davoodi, Z., Bejerman, N., Richet, C., Filloux, D., Kumari, S., Chatzivasiliou, E., Galzi, S., Julian, C., Samarfarid, S., Trucco, V., Giolitti, F., Fiallo-Olivé, E., Navas-Castillo, J., Asaad, N., Moukahel, A., Hijazi, J., Mghandef, S., Heydarnejad, J., Massumi, H., Varsani, A., Dietzgen, R., Harkins, G., Martin, D., Roumagnac, P., 2018. The westward journey of alfalfa leaf curl virus. *Viruses* 10, 542. <https://doi.org/10.3390/v10100542>.
- De Barro, P.J., Liu, S.-S., Boykin, L.M., Dinsdale, A.B., 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085504>.
- Favret, C., 2014. Cybertaxonomy to accomplish big things in aphid systematics: cyber-taxonomy in aphid systematics. *Insect Sci.* 21, 392–399. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12088>.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
- 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.
- Gray, S.M., Smith, D.M., Barbiéri, L., Burd, J., 2002. Virus transmission phenotype is correlated with host adaptation among genetically diverse populations of the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytopathology* 92, 970–975. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.970>.
- Guo, Z.P., Zhang, J.X., Wang, M.L., Guan, Y.Z., Qu, G., Liu, J.Y., Guo, Y.X., Yan, X.B., 2020. First Report of alfalfa leaf curl virus infecting alfalfa (*Medicago sativa*) in China. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0318-PDN>.
- Heydarnejad, J., Keyvani, N., Razavinejad, S., Massumi, H., Varsani, A., 2013. Fulfilling Koch's postulates for beet curly top Iran virus and proposal for consideration of new genus in the family Geminiviridae. *Arch. Virol.* 158, 435–443. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1485-6>.
- Hogenhout, S.A., Ammar, E.-D., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>.
- Lett, J.-M., Granier, M., Hippolyte, I., Grondin, M., Royer, M., Blanc, S., Reynaud, B., Peterschmitt, M., 2002. Spatial and temporal distribution of geminiviruses in leafhoppers of the genus *Cicadulina* monitored by conventional and quantitative Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 92, 65–74. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.65>.
- Mehrparvar, M., 2012. Morphometric discrimination of Black Legume Aphid, *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae) populations associated with different host plants. *N. West. J. Zool.* 8 (1), 172–180.
- Nault, L.R., 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 521–541. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.5.521>.
- Ohnishi, J., Kitamura, T., Terami, F., Honda, K., 2009. A selective barrier in the midgut epithelial cell membrane of the nonvector whitefly *Trialleurodes vaporariorum* to Tomato yellow leaf curl virus uptake. *J. Gen. Plant Pathol.* 75, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0147-3>.
- Peccoud, J., Labonne, G., Sauvion, N., 2013. Molecular test to assign individuals within the *Cacopsylla pruni* complex. *PLoS One* 8, e72454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072454>.
- Peiffer, M.L., Gildow, F.E., Gray, S.M., 1997. Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 3), 495–503. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-3-495>.
- R Core Team, 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.r-project.org>.
- Razavinejad, S., Heydarnejad, J., Kamali, M., Massumi, H., Kraberger, S., Varsani, A., 2013. Genetic diversity and host range studies of turnip curly top virus. *Virus Gene.* 46, 345–353. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0858-y>.
- Remaudière, G., Remaudière, M., 1997. *Catalogue of the World's Aphididae: Homoptera Aphidoidea*. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA).
- Remaudière, G., 1985. *Contribution à l'écologie des aphides africains, vol. 64 Food & Agriculture Organisation, Rome*.
- 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. *Phytopathology* 89, 239–246. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.3.239>.
- Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., Fernandez, E., Julian, C., Abt, I., Filloux, D., Mesléard, F., Varsani, A., Blanc, S., Martin, D.P., Peterschmitt, M., 2015. Alfalfa leaf curl virus: an aphid-transmitted geminivirus. *J. Virol.* 89, 9683–9688. <https://doi.org/10.1128/JVI.00453-15>.
- Ruijter, J.M., Pfaffl, M.W., Zhao, S., Spiess, A.N., Boggy, G., Blom, J., Rutledge, R.G., Sisti, D., Lievens, A., De Preter, K., Derveaux, S., Hellemans, J., Vandesompele, J., 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods* 59, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2012.08.011>.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>.
- Song, N., Zhang, H., Li, H., Cai, W., 2016. All 37 mitochondrial genes of aphid *Aphis craccivora* obtained from transcriptome sequencing: implications for the evolution of aphids. *PLoS One* 11, e0157857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157857>.
- Susi, H., Filloux, D., Frilander, M.J., Roumagnac, P., Laine, A.-L., 2019. Diverse and variable virus communities in wild plant populations revealed by metagenomic tools. *PeerJ* 7, e6140. <https://doi.org/10.7717/peerj.6140>.
- Susi, H., Laine, A.-L., Filloux, D., Kraberger, S., Farkas, K., Bernardo, P., Frilander, M.J., Martin, D.P., Varsani, A., Roumagnac, P., 2017. Genome sequences of a capulavirus infecting *Plantago lanceolata* in the Åland archipelago of Finland. *Arch. Virol.* 162, 2041–2045. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3298-0>.
- Swofford, D.L., 2001. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (And Other Methods) 4.0.B5.
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., Briddon, R.W., Rivera-Bustamante, R., Murilo Zerbini, F., Martin, D.P., 2017. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Arch. Virol.* 162, 1819–1831. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3268-6>.
- Wang, J., Jiang, L.-Y., Qiao, G.-X., 2011. Use of a mitochondrial COI sequence to identify species of the subtribe Aphidina (Hemiptera, Aphididae). *ZooKeys* 122, 1–17. <https://doi.org/10.3897/zookeys.122.1256>.
- Wei, J., et al., 2014. Specific Cells in the Primary Salivary Glands of the Whitefly *Bemisia tabaci* Control Retention and Transmission of Begomoviruses. *Journal of Virology* 88, 13460–13468. <https://doi.org/10.1128/JVI.02179-14>.
- Whitfield, A.E., Falk, B.W., Rotenberg, D., 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 60th Anniversary Issue 479–480, 278–289. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>.



Supplemental Fig. 1. Morphological comparisons between specimens of a population of *A. craccivora sensu stricto* (a, a') and specimens of a euphorbia population of black-backed South African aphids (EuphorbiaSA) (d, d') collected on *Euphorbia caput-medusae*, the natural host species of EcmLV. The lengths of the processus terminalis, the base of the last antennal segment, the siphunculi and the cauda were measured in *A. craccivora* specimens (b, c) and in EuphorbiaSA specimens (e, f). (g) shows the absence of rhinaria on the IVth antennal segment of an alate EuphorbiaSA aphid. Based on these discriminating morphological features, EuphorbiaSA was identified as a member of the formerly described *Aphis tirucallis* ([Blackman and Eastop, 2000](#)).

Supplemental Table 1. Description of aphid species and populations used in this study and associated references.

Species	Clone or population	Sampling						Genbank accession	BOLD Number
		Country	Locality	Date	Host plant	Sampler	Reference		
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris, 1776)	LL01	France	Lusignan	1988	<i>Medicago sativa</i> L. Alfalfa	R. Bournoville (Inra-Lusignan)	Grenier et al. 1994		
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	EuphorbiaSA	South Africa	Buffelsfontein Game and Nature Reserve	2015	<i>Euphorbia caput-medusae</i> L.	P. Roumagnac (Cirad-Montpellier)	Roumagnac et al. 2015		
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	Medicago	France	Montferrier-sur-Lez	2018	<i>Medicago sativa</i> L. Alfalfa	N. Sauvion & F. Ryckebusch (Inra-Montpellier)	this study		
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	Robinia	France	Prades-le-Lez	2015	<i>Robinia pseudoacacia</i> L. False Acacia	G. Labonne (Inra-Montpellier)	this study		
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	Vicia	France	Montferrier-sur-Lez	2018	<i>Vicia sativa</i> L. Common Vetch	N. Sauvion & F. Ryckebusch (Inra-Montpellier)	this study		
<i>Aphis fabae</i> Scopoli, 1763	A06-405	Switzerland	St. Margrethen	2006	<i>Chenopodium album</i> L. Baconweed	C. Vorburger	Vorburger et al. 2017		
<i>Aphis fabae</i> Scopoli, 1763	AFCOL	France	Colmar	1972	<i>Vicia faba</i> L. cv. Séville Broad bean	Y. Bouchery (Inra-Colmar)	Kozłowska-Makulska et al. 2009		
<i>Aphis gossypii</i> Glover, 1877	NM1	France	Navacelles	1988	<i>Curcubita maxima</i> Duschene Squash	G. Labonne (Inra-Montpellier)	Lupoli et al. 1992 Carletto et al. 2009		
<i>Dysaphis</i> (<i>Pomaphis</i>) <i>plantaginea</i> (Passerini, 1860)	Nov08	France	Noves	2008	<i>Malus communis</i> L. cv. Golden Delicious	M. Siegwaert (Inra-Avignon)	this study		
<i>Myzus</i> (<i>Nectarosiphon</i>) <i>persicae</i> (Sulzer, 1776)	Lav85	France	Lavérune	1985	<i>Convolvulus arvensis</i> L. Bearwind	G. Labonne (Inra-Montpellier)	Labonne et al. 1994		
<i>Therioaphis trifolii</i> (Monell, 1882)	Mon18	France	Montferrier-sur-Lez	2018	<i>Medicago sativa</i> L. Alfalfa	M. Pertersmitt, M. Garnier, F. Ryckebusch (Inra-Montpellier)	this study		

Supplemental Table 1 (continuation)

Species	Group	Clone or population	Experiments			Rearing conditions			
			Transmission tests	Persistence specificity	Molecular analysis	Host plant	Containment	Temperature	Photoperiod
<i>Acyrtosiphon pisum</i> (Harris, 1776)		LL01	ALCV	X	X	<i>Vicia faba</i> L. cv. Aquadulce Broad bean	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	A. <i>craccivora</i>	EuphorbiaSA	ALCV, EcmLV	X	X	<i>Vicia faba</i> L. cv. Robinhood Broad bean	P3	24± 2°C	L14:D10h
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	A. <i>craccivora</i>	Medicago	ALCV		X	<i>Vicia faba</i> L. cv. Séville Broad bean	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	A. <i>craccivora</i>	Robinia	ALCV	X	X	<i>Vicia faba</i> L. cv. Séville Broad bean	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Aphis craccivora</i> Koch, 1854	A. <i>craccivora</i>	Vicia	ALCV		X	<i>Vicia faba</i> L. cv. Séville Broad bean	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Aphis fabae</i> Scopoli, 1763		A06-405	ALCV			<i>Vicia faba</i> L. cv. Séville Broad bean	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Aphis fabae</i> Scopoli, 1763		AFCOL	ALCV		X	<i>Vicia faba</i> L. cv. Séville Broad bean	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Aphis gossypii</i> Glover, 1877		NM1	ALCV, PILV, EcmLV		X	<i>Cucurbita pepo</i> L. cv. Diamant Pumpkin	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Dysaphis</i> (Pomaphis) <i>plantaginea</i> (Passerini, 1860)		Nov08	EcmLV, PILV		X	<i>Plantago lanceolata</i> L. Buckhorn Plantain	P2	23± 4°C	L14:D10h
<i>Myzus</i> (Nectarosiphon) <i>persicae</i> (Sulzer, 1776)		Lav85	ALCV, EcmLV		X	<i>Solanum melongena</i> L. Aubergine	P2	L24:D21°C	L16:D8h
<i>Therioaphis trifolii</i> (Monell, 1882)		Mon18	ALCV		X	<i>Medicago sativa</i> L. Alfalfa	P2	L26:D24°C	L16:D8h

References of Supplemental Table 1

- Carletto, J., Lombaert, E., Chavigny, P., Brévault, T., Lapchin, L., & Vanlerberghe-Masutti, F., 2009. Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants. *Molecular Ecology*, 18, 2198-2212.
- Grenier, A. M., Nardon, C., & Rahbé, Y., 1994. Observations on the micro-organisms occurring in the gut of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 70, 91-96.
- Kozłowska-Makulska, A., Beuve, M., Syller, J., Szyndel, M. S., Lemaire, O., Bouzoubaa, S., & Herrbach, E., 2009. Aphid transmissibility of different European beet polerovirus isolates. *European journal of plant pathology*, 125(2), 337-341.
- Labonne, G., Yvon, M., Quiot, J. B., Avinent, L., & Llacer, G., 1994. Aphids as potential vectors of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological consequences. In XVI International Symposium on Fruit Tree Virus diseases 386 (pp. 207-218).
- Lupoli, R., Labonne, G., & Yvon, M., 1992. Variability in the transmission efficiency of potyviruses by different clones of *Aphis gossypii*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 65, 291-300.
- Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., ... & Mesléard, F., 2015. Alfalfa leaf curl virus: An aphid-transmitted geminivirus. *Journal of Virology*, 89, 9683-9688.
- Vorburger, C., Herzog, J., & Rouchet, R., 2017. Aphid specialization on different summer hosts is associated with strong genetic differentiation and unequal symbiont communities despite a common mating habitat. *Journal of evolutionary biology*, 30, 762-772.

Supplemental Table 2. Description of aphid species and populations mentioned in this study and associated references.

Species	Group	Genbank accession	BOLD Number	Sampling						Reference
				Date	Country	Region	Locality	Host plant	Sampler	
<i>Acyrtosiphon (Acyrtosiphon) pisum</i> (Harris, 1776)		FJ411411		1999	USA	Wisconsin	Madison	<i>Medicago lupulina</i> L. [Fabaceae]		Brady et al. 2013
<i>Aphis (Aphis) coronillae</i> Ferrari, 1872	<i>A. craccivora</i>		ACEA218-14	1999	France	Alsace	Kaysersberg		A. Coeur d'Acier	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Aphis (Aphis) coronillae</i> Ferrari, 1872	<i>A. craccivora</i>	KF638762	ACOE1245	2001	France	Auvergne	Chouvigny	<i>Trifolium sp.</i> L. [Fabaceae]	A. Coeur d'Acier	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	KF362035			Algeria	Ghardaia		<i>Medicago sativa</i> L. [Fabaceae]		NCBI
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>		CNBAN433-13	2011	Australia	Australian Capital Territory		unknown (Malaise traps)	P. Hebert	NCBI
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	MH571742		2018	Bangladesh					Foottit et al. 2008
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	EU701313		1995	Canada	New Brunswick				Song et al. 2016
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	KT889380		2015	China	Henan	Zhengzhou	Locust trees [Fabaceae]		NCBI
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>		GMESD081-14	2013	Egypt	Alexandria	Smouha		O.El-Ansary	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>		ACEA536-14	2002	Greece	Korinthia (el)	Peloponnese			Foottit at al. 2008
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	EU701309	RDBA768-06	2006	Hawaii	Maui	Kihei		R.G. Foottit, R. Miller, K.S. Pike	NCBI
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	KR017752			India					Komazaki et al. 2010

Species	Group	Genbank accession	BOLD Number	Sampling						Reference
				Date	Country	Region	Locality	Host plant	Sampler	
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	KY323013			Kenya					Lagos et al. 2014
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	KC897559	GBMHH16383-19	2009	Madagascar			<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp. [Fabaceae]	M. Randrianan drasana	Ashfaq et al. 2018
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	KY838020		2012	Pakistan	Islamabad	Shakarparian forest	unknown (Malaise traps)	M. Rafique	NCBI
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>		CGPTA021-09	1989	Turkey	Erzurum	Horasan		S. Guclu	Foottit et al. 2008
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	GU668252		1999	USA	Colorado				NCBI
<i>Aphis (Aphis) craccivora</i> Koch, 1854	<i>A. craccivora</i>	HQ971366		2009	Argentina	Neuquen	Cutral-Co	<i>Medicago sativa</i> L. [Fabaceae]	Perez Hildago, N.	Pilar et al. 2012
<i>Aphis (Aphis) cytisorum</i> Hartig, 1841		HQ971362		2009	Argentina	Río Negro	Santuario Virgen Misionera	<i>Cytisus scoparius</i> L. [Fabaceae]	Perez Hildago, N.	Pilar et al. 2012
<i>Aphis (Aphis) cytisorum</i> Hartig, 1841			ACEA245-14	2000	France	Occitanie	Anduze			BOLD
<i>Aphis (Aphis) fabae</i> mordvilkoï Börner & Janisch, 1922		NC_039988		2017	Belarus		Minsk	<i>Philadelphus</i> sp. [Hydrangeaceae]		NCBI
<i>Aphis (Aphis) gossypii</i> Glover, 1877		NC_024581			China			<i>Gossypium</i> sp., [Malvaceae]		NCBI
<i>Aphis (Aphis) intybi</i> Koch, 1855			ACEA527-14	2002	France	Occitanie	Montferrier-sur-Lez		A. Cœur d'Acier	BOLD
<i>Aphis (Aphis) intybi</i> Koch, 1855		JX438175	RFQC247-11	2010	Canada	Québec	Montreal		Pilon, Claude	Pilar et al. 2012

Species	Group	Genbank accession	BOLD Number	Sampling						Reference
				Date	Country	Region	Locality	Host plant	Sampler	
<i>Aphis</i> (<i>Aphis</i>) <i>rumicis</i> Linnaeus, 1758			ACEA088-14	1997	France	Seine-Maritime	Criquetot-sur-Ouville	<i>Rumex sp.</i> L. [Polygonaceae]	Cœur d'Acier	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Aphis</i> (<i>Aphis</i>) <i>rumicis</i> Linnaeus, 1758			ACEA312-14	2000	France	Brittany	Fouesnant	<i>Rumex sp.</i> L. [Polygonaceae]	Cœur d'Acier	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Aphis</i> (<i>Aphis</i>) <i>spiraecola</i> Patch, 1914	<i>A. craccivora</i>	JX844405			China					
<i>Aphis</i> (<i>Aphis</i>) <i>tirucallis</i> Hille Ris Lambers, 1954	<i>A. craccivora</i>	KF639083	ACEA181-14	1999	France	Dordogne	St-Vincent-de-Cosse	<i>Euphorbia sp.</i> L. [Euphorbiaceae]	A. Cœur d'Acier	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Dysaphis</i> (<i>Pomaphis</i>) <i>plantaginea</i> (Passerini, 1860)		KF639366		2005	France	Languedoc-Roussillon	La Bastide-Puylaurent	<i>Plantago lanceolata</i> L. [Fabaceae]	A. Cœur d'Acier & E. Jousselein	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Dysaphis</i> (<i>Pomaphis</i>) <i>plantaginea</i> (Passerini, 1860)		KF639368		2008	France	Languedoc-Roussillon	Gaujac	<i>Malus domestica</i> Borckh. [Rosaceae]	A. Cœur d'Acier	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Dysaphis</i> (<i>Pomaphis</i>) <i>reaumuri</i> (Mordvilko, 1928)		KF639375		2002	Greece	Lakonia (el)	Lagada	<i>Rosaceae sp.</i> L.	A. Cœur d'Acier	Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Myzus</i> (<i>Nectarosiphon</i>) <i>persicae</i> (Sulzer, 1776)		KU236024			China					NCBI
<i>Rhopalosiphum maidis</i> (Fitch, 1856)			ACEA794-14	2006	Italia	Sicily	Catania			Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Rhopalosiphum padi</i> (Linnaeus, 1758)			ACEA957-14	2008	France	PACA	Antibes			Cœur d'Acier et al. 2014
<i>Schizaphis</i> (<i>Schizaphis</i>) <i>graminum</i> (Rondani, 1852)		AY531391								Thao et al. 2004
<i>Sitobion</i> (<i>Sitobion</i>) <i>avenae</i> (Fabricius, 1775)		KJ742384			China					Zhang et al. 2016

References of Supplemental Table 2

- Ashfaq, M., Sabir, J. S., El-Ansary, H. O., Perez, K., Levesque-Beaudin, V., Khan, A. M., ... & Hebert, P. D., 2018. Insect diversity in the Saharo-Arabian region: Revealing a little-studied fauna by DNA barcoding. *PloS one*, 13(7), e0199965.
BOLD: <http://boldsystems.org>
- Brady, C. M., & White, J. A., 2013. Cowpea aphid (*Aphis craccivora*) associated with different host plants has different facultative endosymbionts. *Ecological Entomology*, 38(4), 433-437.
- Coeur d'acier, A., Cruaud, A., Artige, E., Genson, G., Clamens, A. L., Pierre, E., ... & Rasplus, J. Y., 2014. DNA barcoding and the associated PhylAphidB@ se website for the identification of European aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae). *PLoS One*, 9(6), e97620.
- Footitt, R. G., Maw, H. E. L., Von Dohlen, C. D., & Hebert, P. D. N., 2008. Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8(6), 1189-1201.
- Komazaki, S., Shigehara, T., & Toda, S., 2010. Diversity of Japanese *Aphis gossypii* and comparison with other *Aphis* species based on the mitochondrial cytochrome oxidase I sequence. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(6), 916-924.
- Lagos, D. M., Voegtlin, D. J., Coeur d'acier, A., & Giordano, R., 2014. *Aphis* (Hemiptera: Aphididae) species groups found in the Midwestern United States and their contribution to the phylogenetic knowledge of the genus. *Insect science*, 21(3), 374-391.
NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Durante, M. P. M., Footitt, R., Von Dohlen, C. D., & Ortego, J., 2012. First American records of *Aphis intybi* (Hemiptera: Aphididae) with notes on two other related adventive species in Argentina. *Florida Entomologist*, 1154-1162.
- Song, N., Zhang, H., Li, H., & Cai, W., 2016. All 37 mitochondrial genes of aphid *Aphis craccivora* obtained from transcriptome sequencing: implications for the evolution of aphids. *PloS one*, 11(6), e0157857.
- Thao, M. L., Baumann, L., & Baumann, P., 2004. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids, and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evolutionary Biology*, 4(1), 25.
- Wang, J. F., Jiang, L. Y., & Qiao, G. X., 2011. Use of a mitochondrial COI sequence to identify species of the subtribe Aphidina (Hemiptera, Aphididae). *ZooKeys*, (122), 1.
- Zhang, B., Zheng, J., Liang, L., Fuller, S., & Ma, C. S., 2016. The complete mitochondrial genome of *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(2), 945-946.

Chapitre 2 :

**Caractéristiques du cycle de transmission
de l'ALCV par le puceron *Aphis craccivora***

1 **Alfalfa leaf curl virus is efficiently acquired by its aphid vector *Aphis***
2 ***craccivora* but inefficiently transmitted**

3

4 Faustine Ryckebusch^{1,2}, Michel Peterschmitt^{1,2,§}, Martine Granier^{1,2}, Nicolas Sauvion^{2,§}

5 ¹ CIRAD, UMR BGPI, Montpellier, France

6 ² BGPI, Univ Montpellier, INRAE, CIRAD, Montpellier SupAgro, Montpellier, France

7 § Corresponding authors: nicolas.sauvion@inrae.fr, michel.peterschmitt@cirad.fr

8

9 **ABSTRACT**

10 *Alfalfa leaf curl virus* (ALCV) is the first geminivirus for which an aphid transmission was
11 reported. Transmission by *Aphis craccivora* was determined previously to be highly specific
12 and circulative. Using various complementary techniques, the transmission journey of ALCV
13 was monitored from its uptake in infected plant tissues up to the head of its vector. ALCV was
14 shown to be restricted to phloem tissues using fluorescent in situ hybridization (FISH) and
15 electropenetrography (EPG) monitoring of virus acquisition. Furthermore, the virus is
16 heterogeneously distributed in phloem tissues, as revealed by FISH and qPCR quantification
17 of viral DNA acquired by EPG-monitored aphids. Despite the efficient ingestion of viral DNA,
18 about 10⁶ viral DNA copies per insect in a 15-hour feeding on ALCV infected plants, the
19 individual transmission rate was at a maximum of 12%. Transmission success was related to a
20 critical viral accumulation, around 1.6x10⁷ viral DNA copies per insect, a threshold that
21 generally needs more than 48 hours to be reached. Moreover, whereas the amount of acquired
22 virus does not decrease over time in the whole aphid body, it declined in the hemolymph and
23 heads. ALCV was not detected in progenies of viruliferous aphids and did not affect aphid
24 fitness. Compared to geminiviruses transmitted by whiteflies or leafhoppers, or to luteoviruses
25 transmitted by aphids, the transmission efficiency of ALCV by *A. craccivora* is low. This result
26 is discussed in relation to the aphid vector of this geminivirus and the agroecological features
27 of alfalfa, a hardy perennial host plant.

28 **Keywords:** Capulavirus, Hemiptera, Aphididae, epidemiology, luteovirus, nanovirus

29 INTRODUCTION

30 Viruses that belong to the family *Geminiviridae* are transmitted by various hemipteran vectors
31 (1-3). Whiteflies (Aleyrodidae) transmit geminiviruses of the genus *Begomovirus* (4),
32 leafhoppers (Cicadellidae), those of the genera *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Becurtovirus*,
33 *Turncurtovirus*, and probably *Eragrovirus* (5-7), and treehoppers (Membracidae) those of the
34 genera *Topocuvirus* and *Grablovirus* (8). Finally, aphids were found to be vectors of
35 genetically distinct geminiviruses recently detected by metagenomic analyses and for which a
36 new genus was defined, named *Capulavirus* (9-11). Although taxonomically very distinct,
37 these hemipteran transmit geminiviruses with a similar circulative non-propagative (CNP)
38 mechanism (1, 10) also reported with the aphid-transmitted viruses of the family *Luteoviridae*
39 (2) and *Nanoviridae* (3). As described below, CNP viruses require circulation through insect
40 bodies before transmission (12).

41 Viruses can be acquired from infected plants when insects probe and feed on virus-infected
42 cells using their piercing-sucking mouthparts. The success of virus acquisition depends both
43 on virus localization within the plant tissue and on the feeding behavior of the insect. Phloem
44 sieve tubes are the most conducive cells to virus acquisition because viruses inevitably use
45 them for long-distance movement, and hemipterans spend most of their feeding time in this
46 cell compartment to draw their nutrient resource. Sieve tubes consist of a network of sieve
47 elements surrounded by companion and phloem parenchyma cells which form phloem tissue
48 (13). By coupling microscopic observations and feeding behavior analysis with
49 electropenetrography (EPG) method, Prado and Tjallingii (14) confirmed with the luteovirid
50 barley yellow dwarf virus (BYDV) that virus acquisition is mainly associated with ingestion
51 of phloem sap from sieve elements (EPG E2 waveform). Interestingly, they detected some virus
52 acquisition with insects for which the E2 waveform was not detected, indicating that the virus
53 can be acquired from other cells. While most CNP viruses are phloem restricted (15, 16), some
54 of them are also detected in mesophyll tissues, including mastreviruses, some begomoviruses,
55 and the luteovirid pea enation mosaic virus 1 (PEMV1) (17-21). Therefore, it cannot be
56 excluded that these viruses, like BYDV, may be acquired from non-sieve-element cells,
57 including mesophyll cells. The most compelling validation for virus acquisition from non-
58 phloem tissues was obtained with *Cicadulina mbila* Naudé, 1924, a leafhopper vector of maize
59 streak virus (MSV), the type member of the *Mastrevirus* genus. It can be acquired in 15 sec
60 (22), which is far too short a time to reach sieve elements, as shown by EPG recording (23).
61 This result was fully consistent with electron microscopy observations showing that, unlike

62 aphids, *C. mbila* individuals vigorously ingest mesophyll cell content. To summarize, tissue
63 tropism of the virus in the plant, together with the feeding behavior of its vector are both keys
64 to virus acquisition.

65 CNP transmission is characterized by a latent period, the time between virus acquisition by the
66 insect vector, and the ability to transmit it. It corresponds to the travel time needed by the
67 ingested virus to travel from the gut lumen to the salivary duct of the insect vector. The best
68 description of this circulation route was obtained with luteovirids for which - transcytosis
69 through the gut epithelium, hemocoel crossing and transcytosis through the salivary glands
70 epithelium - was shown with compelling electron micrographs (2, 24). For most CNP viruses,
71 the minimum duration of the latent period is of several hours. For example, it is of 54 hours for
72 the luteovirid potato leafroll virus (PLRV) in *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) aphids (25), 6-12
73 hours for MSV in *C. mbila* leafhoppers (26) and 8 hours for the begomovirus tomato yellow
74 leaf curl virus (TYLCV) in *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) biotype B (formally Middle East
75 Asia Minor 1 cryptic species or MEAM1) (27). The minimum latent period duration of only
76 10 min detected with the mastrevirus wheat dwarf virus (WDV) in *Psammotettix alienus*
77 (Dahlbom, 1850) leafhoppers was explained by an early shortcut from the filter chamber
78 reducing the circulation route (28). Potential receptors involved in transcytosis mechanisms
79 have been identified with luteovirids in aphids (29) and with begomoviruses in *B. tabaci*
80 whiteflies (30).

81 Typically, CNP viruses are retained by their insect vectors mostly for life, reflecting their
82 ability to cope with insect defense mechanisms (4, 31, 32). As the infectivity of CNP viruses
83 persists for life too, it is thought that the gut is a major virus source from which viruses can be
84 released into salivary glands via the hemolymph. Among CNP viruses, TYLCV exhibits some
85 unexpected features. Indeed, the DNA amount of an Israeli isolate of TYLCV was found to
86 increase 2 to 3 fold in *B. tabaci* (MEAM1) whiteflies during the first few days after an 8-h
87 acquisition access period (AAP) (33). Consistently with this result, this particular isolate has a
88 negative impact on the fitness of its vector (34), and infectivity can be transovarially inherited
89 (35). However, using other TYLCV and begomovirus isolates, and other *B. tabaci* populations,
90 DNA replication was not detected (36, 37), and neither vertical transmission (38, 39).

91 While aphid-transmitted CNP viruses have long been limited to the families *Nanoviridae* and
92 *Luteoviridae*, such vector type was recently identified in the family *Geminiviridae* with alfalfa
93 leaf curl virus (ALCV). ALCV was shown to be transmissible by aphids of the species *Aphis*
94 *craccivora* Koch, 1854 (9). A CNP transmission mechanism was identified based on the

95 retention of viral DNA in gut hemolymph and salivary gland compartments, and persistence of
96 infectivity over time through insect molts (10). The transmission of ALCV is highly specific.
97 Indeed, ALCV could not be transmitted with an Euphorbia population of *A. craccivora*,
98 although this population was a vector of EcmLV, the type member of the genus *Capulavirus*.
99 Two transmission barriers were detected, a gut barrier to the transmission of ALCV in non-
100 vector aphids of the species *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776), and a barrier at the primary
101 salivary gland level in *A. craccivora* aphids of the Euphorbia population. The objective of our
102 study was to complete the description of the transmission cycle of ALCV through aphids and
103 particularly its acquisition from infected source plants, its accumulation dynamics in relation
104 to infectivity, and its retention dynamics in different insect compartments. ALCV was also
105 tested for a possible impact on the fitness of the aphid vector and for vertical transmission.
106 Special attention was given to transmission efficiency because previous results showed that it
107 was relatively low compared to other CNP viruses (10, 40).

108

109 **METHODS**

110 **Plant and insect material**

111 All transmission tests were conducted using broad bean plants (*Vicia faba* L. cv. 'Séville').
112 Fluorescent in situ hybridization (FISH) analysis was performed on both broad bean and
113 *Nicotiana benthamiana* plants. Plants were grown in a P2 containment chamber under 16h light
114 at 26°C, and 8h dark at 24°C.

115 Individuals of *A. craccivora* were collected in 2015 by G. Labonne (INRAE, France) on
116 *Robinia pseudoacacia* L. (False acacia) near Montpellier (France). A rearing was initiated and
117 maintained on broad bean plants (*Vicia faba* L. cv. 'Séville') under 16h light at 24°C and 8h
118 dark at 21°C.

119 **Preparation of agroinfectious clones and agroinoculation**

120 The agroinfectious clone of ALCV was reported (9). Agrobacteria were cultured and inoculated
121 to broad bean plants as described (10).

122 **Plant DNA extraction and detection of ALCV DNA by PCR**

123 ALCV infection of broad bean plants was monitored 4 to 6 weeks after inoculation by symptom
124 observation and/or by PCR-mediated detection of viral DNA in total plant DNA extracts as
125 described (10).

126 **Mechanical inoculation of ALCV**

127 One gram of leaf material was collected from broad bean plants 4 weeks after their
128 agroinoculation with ALCV. According to a first extraction method, the plant material was
129 ground in an ice-cold mortar with 4 ml of a cold 0.03 M sodium phosphate buffer (Na₂HPO₄)
130 containing 0.2 % sodium diethyldithiocarbamate (DIECA). After the addition of 0.2 g activated
131 charcoal and 0.4 g carborundum, the plant extracts were rubbed onto the upper side of the
132 youngest leaves of twenty-two 10 day-old broad bean plants. Plants were abundantly rinsed
133 with water 5 min after their inoculation.

134 A second trial was performed as described by Susi *et al.* (11): two grams of leaf material were
135 collected from broad bean plants 33 days after their agroinoculation with ALCV. Plant material
136 was ground in a cold mortar with 8 ml of sodium phosphate buffer (0.02 M – pH 7.4). After
137 the addition of 0.8 g of carborundum, the inoculum sap was rubbed onto the youngest leaves
138 of thirty-day old broad bean plants. The inoculated leaves were rinsed with water 15 min after
139 their inoculation.

140 **ALCV transmission by aphids**

141 Virus acquisition feedings were performed on broad bean plants 4 to 6 weeks after their
142 agroinfection with ALCV, in a P2 containment chamber under 16h light at 24°C, and 8h dark
143 at 22°C. The duration of the acquisition access period (AAP) was specific to each test (see
144 below the detailed description of experiments) and carried out with 50 individuals per source
145 plants with 1-3 day-old apterous adults. Virus inoculation feedings were performed on 8-day-
146 old broad bean plants under 16h light at 26°C, and 8h dark at 24°C. The duration of the
147 inoculation access period (IAP) and the number of insects transferred to each test plant were
148 specific to each test (see detailed descriptions below). The IAP was stopped by spraying the
149 test plants with Pirimor G insecticide (1 g.l⁻¹ in water). The transmission success was assessed
150 by symptom observation and detection of ALCV DNA by PCR, as described above.

151 **Aphid dissection, DNA extraction, and qPCR**

152 After collection, aphids were stored at -20°C until use. Some aphids were dissected to assess
153 the viral content in guts heads and hemolymphs. Dissection and DNA extraction was performed
154 as described (10).

155 The qPCR amplification was performed with the LightCycler FastStart DNA Master Plus
156 SYBR Green I kit (Roche) and the LightCycler 480 thermocycler (Roche). Primers
157 ALCV2cEcmLV-F and ALCV2cEcmLV-R (see above) were used at a concentration of 0.6

158 μM each in a total reaction volume of 10 μl containing 8 μl Master-mix and 2 μl of DNA
159 extract. The cycling protocol and DNA accumulation reports were as described (10).

160 **Plant material used for fluorescent in situ hybridization (FISH)**

161 Broad bean and *N. benthamiana* plants were inoculated with agrobacteria containing either an
162 ALCV genome or an empty plasmid as a negative control. ALCV-infected plants were
163 identified four to six weeks after agroinoculation by symptoms and an ALCV-specific PCR
164 test (see above). FISH was performed on petioles or leaves at six weeks after agroinoculation.
165 One centimeter cross-sections of petioles were cut with a razor blade from upper leaves of
166 ALCV agroinfected broad bean plants. Sections were fixed overnight at 4°C under stirring in
167 embryo dishes containing 4% paraformaldehyde (PFA) diluted in phosphate-buffered saline
168 (PBS). Fixation was stopped by a 15-min incubation in PBS containing 0.1 M glycine. Petiole
169 sections were embedded vertically in 8% low melting agarose in a 24-well tissue culture plate
170 and stored overnight at 4°C. The agarose blocks were extracted from the plates and cross-
171 sections of 100 μm were produced with a Vibratome HM650V (Microm) and processed as
172 described (41). Leaf discs of *N. benthamiana* plants were cut with drinking straws and leaf
173 cuticles were removed with forceps. Discs were fixed as described above with petioles. After
174 rinsing in 70% EtOH discs were incubated for 2 hours in a Carnoy solution consisting of six
175 volumes of chloroform, three volumes of ethanol, and one volume of acetic acid. Discs were
176 then bleached for 10 minutes in a 6% H_2O_2 solution and finally incubated for one hour in PBS
177 before FISH. Vein networks of broad bean leaves were pulled using sticky tapes (42), and
178 subsequently processed like leaf discs.

179 **Preparation of fluorescent probes and labeling procedure**

180 A fluorescent probe complementary to the CP gene of ALCV was prepared by random priming
181 with the BioPrime DNA labeling system (Invitrogen) and Alexa Fluor 568-labeled dUTP. The
182 template DNA was PCR amplified from the recombinant plasmid containing the ALCV
183 genome, using the following primer pair: CP_ALCV_620-F, 5'- GAA GAG GGC GAG AAC
184 GAC AG-3' and CP_ALCV_1025-R, 5'- GTG GTC TAT TTC AGC AGT TGC C -3'.

185 Ten μl of the probe was diluted in 290 μl of 20 mM Tris-HCl hybridization buffer (pH 8)
186 containing 0.9 M NaCl, 0.01% SDS and 30% formamide. The diluted probe was denatured
187 10 min at 100°C and rapidly cooled on ice for 15 min. In parallel, plant samples (petiole, leaf-
188 discs or veins) were soaked 3 times 5 min in a hybridization buffer. Plant samples were then
189 incubated overnight at 37°C in embryo dishes containing probe solutions and sealed with

190 parafilm membranes. After three washing steps of 5 min with hybridization buffer and two
191 with PBS, samples were mounted on microscope slides in Vectashield antifade mounting
192 medium containing 1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DAPI for staining nuclei. Observations were performed using
193 a Zeiss confocal microscope and acquired in a stack mode.

194 **EPG system**

195 We used the electropenetrography (EPG) technique (43, 44) to investigate which specific stylet
196 penetration activities of *A. craccivora* individuals were associated with the acquisition of the
197 virus. Different EPG waveforms can be recorded by connecting an insect and its host plant to
198 an electrical circuit, reflecting particular biopotentials and electrical resistances associated with
199 typical feeding activities (45, 46). During intercellular stylet pathways, aphids perform
200 numerous very brief punctures into non-vascular cells that result in EPG-detectable potential
201 drops [waveform pd, (44)]. Two types of “anomalous” pd (i.e., different from standard pd)
202 were recorded just before aphids start eventually a sustained phloem sieve ingestion, the so-
203 called repetitive pd [R-pd, (47) and phloem-pd (48)]. R-pd’s may reflect repeated punctures of
204 phloem sieve elements, but their biological significance is unknown. Ultra-structural analyses
205 with the biological model *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) on sugar beet, clearly demonstrated
206 that phloem-pds were associated with stylet penetrations in sieve elements or companion cells
207 whereas other cells (mesophyll, bundle sheath cells and possibly phloem parenchyma) are
208 penetrated during standard-pds (49). The phloem-pds were shown to play an important role in
209 inoculation of the semi persistent phloem-limited beet yellows virus (BYV) by *M. persicae* and
210 the persistently transmitted, phloem-limited barley yellow dwarf virus (BYDV) by
211 *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) (48, 50). Long stylet penetration (i.e., several tens of
212 seconds to several hours) in sieve elements that eventually attain phloem sap ingestion always
213 begin by the stereotypical E1 waveform. It is related to salivation and described as the essential
214 phase for inoculation of persistently or semi-persistently transmitted plant viruses by aphids
215 (14, 50), whiteflies (51), or leafhoppers (52). E1 waveform is generally - but not necessarily -
216 followed by a short transition period before the typical E2 waveform. This waveform recorded
217 with *R. padi* in wheat has been related to passive sap ingestion concurrent with the secretion of
218 watery saliva, and associated with ingestion of BYDV (14). It is commonly accepted that
219 phloem-restricted viruses transmitted by hemipterans are acquired mainly during waveform E2
220 (14).

221 A Giga-8 DC-EPG device (EPG-Systems, Wageningen, The Netherlands) was used to monitor
222 probing and ingestion activities of virus-free newly emerged *A. craccivora* adults on leaves of

223 virus-infected broad bean plants. The electrical circuits containing insects, plants, and
224 electrodes were placed in a Faraday cage to isolate them from electromagnetic interference.
225 The electrical signals between the electrodes were converted into digital signals via the Di710-
226 UL (DATAQ, Akron, OH, USA) analog-to-digital board. The digital signals were visualized
227 and recorded on a computer using Probe 3.5 software (EPG Systems, The Netherlands).
228 Recordings were made under constant temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$).

229 A gold wire ($\text{\O} 18.5 \mu\text{m}$, 2-3 cm long) was fixed to the thorax cuticle of the backside of the
230 insects using a drop of silver glue (EPG Systems, The Netherlands). During this procedure,
231 insects were held stationary at the tip of a plastic pipe in which a slight suction was applied.
232 The other end of the gold wire was pasted to a copper electrode with the silver glue. This
233 electrode (5 cm long, 2 mm in diameter) was rammed into the soil beside the plant whereas the
234 insect was placed onto a leaf. Before each beginning of recordings, individuals were given a
235 fasting period of 30 minutes. Eight individuals were recorded in parallel. The voltage source
236 was tuned as described by Tjallingii (53), so that the amplifier output signal was between +5
237 and -5 V, with positive values when stylet tips were outside cells and negative inside cells.
238 After each recording, plants were replaced by new ones.

239 Signals were analyzed using the software Stylet+a (EPG Systems, The Netherlands).
240 Individuals of many aphid species have been monitored by EPG over the past 50 years,
241 including *A. craccivora* (e.g., 54, 55), allowing an unambiguous interpretation of our
242 recordings, in particular the waveforms correlated with the stylet location in the phloem (E1
243 and E2).

244 **Detection by EPG of vector feeding behavior associated with ALCV acquisition** 245 **(experiments 1 & 2)**

246 Young apterous adult aphids (≈ 2 days old) were given access individually to upper leaves of
247 ALCV-infected broad bean plants and EPG-recording monitored their feeding behavior.

248 In experiment 1, the objective was to test if ALCV acquisition is essentially associated with
249 the ingestion of sieve tube content (waveforms E2). Thus, we dissociated two sets of aphids:
250 24 individuals were stopped at the end of their first phloem salivation phase (E1) (modality 1),
251 whereas 30 individuals were monitored up to 4 hours, a period that was expected to contain
252 almost one phloem-feeding phase (E2) (modality 2). Indeed, preliminary analysis revealed that
253 most aphids reached phloem in less than one hour. After their monitoring, aphids were stored
254 individually at -20°C . Total DNA was extracted from each aphid and viral DNA was quantified

255 by qPCR as described above. Negative controls consisted of three adult aphids of the same
256 batch that were given access to upper leaves of healthy broad bean plants.

257 In experiment 2, the objective was to test if the amount of ingested virus is correlated with the
258 duration of the ingestion of sieve tube content. As virus acquisition was only detected with
259 aphids of the E2 batch (experiment 1), we focused only on the duration of E2 for statistical
260 analysis. Twenty-six individuals were monitored for 4 hours. For each individual, we
261 calculated the variable WDi - Waveform Duration by Insect (i.e., the sum of durations of all its
262 events of one waveform type made by each individual insect that produced that waveform)
263 related to E2 pattern as defined by Backus *et al.* (56). The total DNA of each aphid was
264 extracted and viral DNA was quantified by qPCR. Finally, the viral amount of each individual
265 was plotted against WDi-E2.

266 **Individual transmission probability and transmission rates in relation to aphid numbers** 267 **(experiments 3 & 4)**

268 In experiment 3, the individual transmission success of ALCV by aphids was determined in
269 relation to their virus content. After a 3-day AAP on ALCV-infected broad bean plants, 43
270 individuals were each given individual access to one healthy broad bean plant for a 5-day IAP.
271 The viral DNA of each of the 34 individuals that were alive at the end of the IAP was quantified
272 by qPCR. The 34 plants associated with the surviving aphids were sampled 4 weeks after IAP
273 and PCR-tested for ALCV detection.

274 In experiment 4, the transmission rate of ALCV was determined with aphid batches of various
275 sizes in eight independent transmission tests (Suppl Table 1). The batch sizes were of 1, 5, 10,
276 20, 30, 40, or 100 individuals depending on the test. The average transmission rate determined
277 for each batch size was used to plot a curve showing the expected transmission rate as a function
278 of the number of individuals per test plant. The theoretical transmission rate TR is defined as
279 $TR = 1 - (1 - p_i)^n$ in which p_i is the probability that at least one aphid is infective in a population,
280 $1 - p_i$ the probability for an aphid not to be infective, and n the batch size.

281 **Kinetics of ALCV accumulation in aphids (experiment 5)**

282 Young apterous adult aphids were allowed to feed on ALCV infected broad bean plants for 2h,
283 6h, 15h 24h, 48h and 82h. Individuals were collected at each time point. Their total DNA was
284 extracted in pools of five individuals, and the amount of ALCV DNA was quantified by qPCR.
285 The same test was performed with AAPs of 2h, 4h, 6h, 19h, 24h, 48h, 72h and 96h except that

286 DNA was extracted from individual aphids. Some of the individuals that were not shifted to
287 infected plants for an AAP were collected and tested as negative controls (time point 0h).

288 **Transmission rates in relation to AAP duration (experiment 6)**

289 Eight independent transmission tests were carried out with 5 or 10 apterous adult aphids per
290 test plant. The transmission rate was determined with 19 or 20 test plants per AAP duration.
291 AAP duration ranged between 1 and 120h and IAP duration was 5 days.

292 **ALCV persistence in aphids (experiment 7)**

293 After a 3-day AAP on ALCV infected broad bean plants (D0), apterous adult individuals were
294 shifted to non-infected broad bean plants by groups of 10 individuals per plant. After 4 days,
295 individuals were similarly shifted for two more sequential 4-day feedings on healthy broad
296 bean plants. At D0 and at the end of each sequential 4-day post-AAP feeding (i.e, at D4, D8,
297 D12), 8 groups of 10 individuals were collected. Total viral DNA was extracted from 4 groups
298 per time point and viral DNA was quantified by qPCR. Individuals of the 4 other groups were
299 dissected (see above) and the viral DNA was quantified from each pool of 10 organs (guts and
300 heads) and 10 hemolymph samples. For each modality, we obtained four independent values
301 of the amount of viral DNA contained in 10 aphids, organs or hemolymph samples. These
302 values were then divided by ten to estimate the mean copy number of viral DNA per insect.
303 For the whole body, the amount of DNA was not measured at D12 because of a limited number
304 of individuals still alive. As a control, individuals from the same rearing as those used for
305 acquisition were analyzed.

306 **Minimum latent and inoculation periods (experiment 8)**

307 Determining the latent period with transmission tests is challenging because this period is
308 obviously overlapping with AAP and IAP. Therefore, its duration can only be estimated with
309 the minimum duration of [AAP + IAP] that results in a successful transmission. Due to
310 overlapping with AAP and IAP, the estimated latent period should be considered as a
311 maximum. In the first set of four transmission tests (tests 1-4), five to ten young apterous adult
312 aphids were given a 15-hours AAP on ALCV infected broad bean plants and then shifted to
313 test plants for various IAP durations between 3h and 48h. For the estimation of the inoculation
314 period, five to ten aphids were given AAPs of 48 or 72 hours and then shifted to test plants for
315 IAP of various durations between 1 and 120h (tests 5-7). The number of plants in each
316 treatment was between 9 and 20. The infectious success was determined with symptom
317 observation and PCR detection of viral DNA.

318 **Vertical transmission of ALCV (experiment 9)**

319 In a first test, aphids were reared on ALCV infected broad bean plants for 2 weeks. Apterous
320 adult individuals were shifted into a transparent box for 6 hours. Progenies produced in the box
321 were given access to nine healthy plants (5 nymphs per plant). As a positive control of ALCV
322 transmission, adults from the box were given access to three healthy plants (5 apterous adults
323 per plant). The test was repeated independently one month later with 8 healthy plants, each
324 exposed to 5 nymphs. To complete the test the vector competence of L1-L2 nymphs produced
325 on ALCV infected plants had to be tested. They were shifted to broad bean test plants, 5
326 individuals per plant. Eight day-old adults were similarly shifted to test plants as a control.

327 Vertical transmission was also evaluated by testing the presence of viral DNA in two pools of
328 30 nymphs produced by viruliferous adults. Pools were from broad bean plants of the third
329 sequential passage in the persistence test (experiment 7). Total DNA was extracted from each
330 of the two pools of nymphs and the presence of viral DNA was determined by qPCR.

331 **Effect of ALCV on aphid fitness (experiment 10)**

332 To determine whether ALCV could affect the fitness of its vector, we estimated the intrinsic
333 rate of increase (r_m), a parameter combining fecundity and developmental time (57). It was
334 defined as $r_m = 0.738 \cdot \text{Log}_e(Md)/d$, according to the simplified method of Wyatt & White (58)
335 where d is the mean number of days from aphid birth to reproduction (i.e., pre-reproductive
336 time), and Md the average number of progeny produced in a time equal to d . We also estimated:
337 (i) the mean generation time (T), i.e., the mean length of aphid generation, calculated after the
338 approximation of Wyatt & White (58) ($T=d/0.738$); and (ii) the doubling time (DT), i.e. the
339 time required by the aphid population to double its size, which can be derived from the standard
340 definition of r_m as $DT = \text{Log}_e(2)/r_m$ (e.g., (59)). The experiment has been conducted with two
341 cohorts of 44 individuals prepared as follows: on day 0 (D0), 2-3-day-old young apterous
342 females from a synchronized population were placed individually on healthy or infected broad
343 bean seedlings for a four-hour laying, and removed after that. At day 4 (D4), nymphs were
344 removed except one. From day 6 (D6), individuals were daily observed to detect the age at
345 which each individual lay its first nymphs (i.e., to determine d , the pre-reproductive time).
346 Then, the number of nymphs produced during a period of d days was counted for each
347 individual. When nymphs retained for laying turned out to be alate, they were excluded from
348 the test. Likewise, the countings that were performed with adults that were not found at the end
349 of the experiment, or that produced very few or no nymphs were excluded from the statistical

350 analysis to avoid interpretation bias. Due to this selection, 6 viruliferous and 9 non-viruliferous
351 individuals were excluded from the analysis. The r_m value was estimated for each individual
352 for comparison of mean differences, but the r_m values presented in the results are the group
353 values, and standard errors were calculated using the bootstrap technique (60).

354 **Statistical analysis**

355 All statistical analyses were conducted with the R software v3.6.1 (61).

356 To interpret the results from experiments 2, 5 and 6, we applied *loess* (an acronym for locally
357 weighted regression) smoothing to fit a curve through points in each scatterplot (62). With this
358 non-parametric regression technique, no assumptions have to be made about the underlying
359 distribution of the data (63). Smoothed curves were obtained using the *loess* method
360 implemented in the *ggplot2* package of R [function *geom_point()*], with the default values for
361 $\alpha=0.75$ (this parameter determines the degree of smoothing, i.e., the proportion of all data that
362 is to be used in each local fit), and for $\lambda=2$ (i.e., the local regression fitting based on quadratic
363 equations). In experiment 2, Kendall's tau coefficient was used to measure the ordinal
364 association between cumulative time in E2 and viral load. The test was performed with
365 *cor.test()* function, method *kendall*. To interpret the results from experiments 7, box-plots were
366 used (function *boxplot()* of the package *stats*), and the means were compared using the
367 Kruskal–Wallis rank-sum test (function *kruskal.test* of the package *stats*). When the null
368 hypothesis of mean equality was rejected at the 5% threshold, the means of each pair of
369 modalities were compared using the multiple comparison method based on the Benjamini and
370 Yekutieli (64) procedure (function *pairwise.t.test()* with p-value adjustment method: BY). The
371 means of the parameters estimated in experiment 10 were compared using the Wilcoxon rank-
372 sum test (function *wilcox.test()* of the package *stats*). Standard errors of these parameters were
373 calculated using a bootstrap procedure with the *boot()* function of the *boot* package.

374

375 **RESULTS**

376 **ALCV is phloem restricted and heterogeneously distributed in this tissue compartment**

377 A fluorescent probe complementary to the CP gene of ALCV was used to localize ALCV in
378 broad bean plants by FISH (Fig. 1). Fluorescent labeling was detected in petioles of plants
379 agroinfected with ALCV (Fig. 1a) but not in petioles of mock-inoculated plants. Specific
380 labeling co-localized with cell nuclei and was detected in relatively few cells, with a maximum
381 of 3 labeled cells per cross-section. Specific labeling was restricted to areas located between

382 xylem and sclerenchyma tissues, the location of phloem tissue (Fig. 1a,b). ALCV specific
383 labeling was also detected in the phloem of vascular tissues pulled from broad bean leaf lamina
384 (Fig. 1c). The labeling is restricted to some sections of the vascular network and only some
385 cells of these sections are labeled. The specifically labeled cells are nucleated and characterized
386 by an elongated shape. They may be identified as phloem parenchyma cells or companion cells.
387 Translaminar observations of ALCV-infected *N. benthamiana* leaves showed FISH labeling in
388 phloem but not outside the vascular network (Fig. 1f). Consistently with these results
389 suggesting that ALCV cannot move to or from non-phloem cells, none of the mechanically
390 inoculated plants (0/37) displayed ALCV symptoms or were detected PCR-positive for the
391 presence of ALCV.

392 ALCV distribution was also investigated by the characterization of plant tissues from which
393 aphids can acquire the virus (experiment 1). To do this, we monitored the feeding behavior of
394 54 aphid individuals on ALCV-infected plants by EPG. In most of the 24 individuals stopped
395 before E2 waveform, E1 was preceded with at least one pd (Fig. 2c) exhibiting the typical
396 phloem-pd features described for *M. persicae* and *R. padi* (49). Firstly, the magnitude of their
397 potential drop of phloem-pds was the same as that recorded in phase E1 and lower than that
398 observed on standard pds. Secondly, the frequency of intervals between their downward peaks
399 in subphase II-2 was at least two times lower than that of standard pd. (Fig. 2c). In spite of this
400 phloem-pds, ALCV was not qPCR detected in the 24 individuals stopped before E2. ALCV
401 was neither detected in the 10 individuals for which no E1 or E2 waveforms were observed.
402 Among the 20 individuals that reached E2, 14 were ALCV-positive by qPCR. Five ALCV-
403 negative insects remained less than 20 min in phase E2, a duration that may have been too short
404 to acquire a detectable amount of viral DNA. Nevertheless, one ingested sieve tube content for
405 more than 2h30 suggesting that ALCV is not equally distributed in the sieve tube network.
406 Although ALCV is present in companion cells and possibly in parenchyma cells (FISH),
407 ALCV was only acquired from sieve elements.

408 **Efficiency of acquisition is dependant on the puncture site and AAP duration**

409 Considering the heterogeneous phloem distribution of ALCV revealed by FISH and suggested
410 by EPG, the efficiency of virus acquisition by aphids may depend on the puncture site. This
411 hypothesis was validated with a set of adult aphids for which we accurately assessed both the
412 duration of phloem ingestion by EPG (E2 waveform) and the acquired viral DNA content by
413 qPCR (Fig. 2d). Indeed, there is no correlation between E2 cumulative time and the amount of

414 virus ingested by the aphid (Kendall's rank correlation $\tau = 0.0027$). For example, two
415 aphids for which the E2 waveform was recorded for about one hour, acquired each as many or
416 more viral DNA copies (0.5×10^6) than aphids for which E2 recording lasted more than 2h30.
417 Furthermore, one aphid for which E2 recording lasted almost two hours has acquired very little
418 viral DNA. Nevertheless, it is noteworthy that individuals that fed more than 107 min were all
419 detected qPCR positive with more than 10^5 copies of viral DNA, suggesting that despite of
420 heterogeneous distribution, the virus is accessible at any sites of the phloem network.

421 This result suggests that phloem-feeding durations and viral DNA accumulation may be
422 positively correlated with longer AAP durations. This prediction was validated by monitoring
423 viral DNA accumulation in individuals that were given access to ALCV infected plants for
424 durations ranging between 2 and 96 hours (Fig. 3). Aphids accumulate a large amount of virus
425 in the first 15-19 hours of acquisition. During this initial period, viral load per insect increased
426 sharply up to $4 - 7 \times 10^5$ viral DNA copies per insect. Thereafter, the viral increase was lower
427 with only 10 times increase to a plateau of about 2 to 7×10^6 viral DNA copies per insect that
428 was reached at 48 hours (Fig. 2d).

429 **A high accumulation of ALCV is necessary for efficient transmission but not always** 430 **sufficient**

431 The accumulation dynamics of ALCV in aphids revealed that viral DNA content reaches more
432 than 10^6 viral DNA copies per insect within two days of AAP (Fig. 3). However, it was not
433 known if this acquired virus can be easily transmitted and particularly if the transmission is
434 subjected to an accumulation threshold. To test the threshold hypothesis, 43 individuals,
435 following a 3-day AAP, were given access to test plants - one test plant per individual - to
436 determine their ability to transmit the acquired virus (Fig. 4a). The viral amounts assessed by
437 qPCR in the 34 individuals collected alive at the end of the 5-day IAP were consistent with the
438 threshold hypothesis. Indeed all individuals harboring viral amounts below 1.6×10^7 failed to
439 transmit ALCV. The transmission was possible only when viral content was above this
440 threshold. However, while 8 individuals had a viral content above the threshold, only 4
441 transmitted ALCV. Noteworthy, the average viral content of the 4 transmitters cannot be
442 distinguished from that of the 4 non-transmitters (see box-plots in Fig 4a). Thus, although a
443 minimum viral content is necessary, it is not a sufficient condition for transmission. Other
444 parameters, yet to be determined, may also influence the efficiency of viral inoculation.

445 The individual transmission rate ($\pi \approx 11.8\%$; 4/34) is relatively low considering the long
446 durations of AAP and IAP, 3 and 5 days respectively. Using $\pi \approx 11.8\%$, theoretical
447 transmission rates (TR) were estimated as a function of the number of individuals used per test
448 plant according to the formula $TR = 1 - (1 - \pi)^n$ (Fig 4b, red curve). Surprisingly, the transmission
449 rates derived from transmission tests performed with different numbers of individuals per test
450 plants (1, 5, 10, 20, 30, 40; Suppl Table 1), were all below the expected rates (Fig. 4b). Indeed,
451 the theoretical individual transmission rates derived from the observed transmission rates were
452 between 2.8 and 6.1%. To summarize, the individual transmission rate of ALCV by
453 *A. craccivora* is generally around 4-5% with a maximum of 12% when the transmission was
454 performed with one insect per test plant. Although the increase of transmission rate is positively
455 correlated with the increase of viruliferous individuals, the transmission success cannot be
456 easily predicted from individual transmission rates. However, given these results, transmission
457 rates of 18 to 45% can be expected with 5 or 10 individuals per test plant. These conditions
458 were used for the following tests because they should enable to assess negative and positive
459 effects of other transmission parameters using a minimum number of aphids and tested plants.

460 **Optimal transmission rate needs a minimum AAP duration of 48 hours**

461 To determine the minimum AAP duration needed to reach an optimal transmission rate, 5 or
462 10 individuals per tested plant were used as defined above. Figure 5 shows that up to 48h, the
463 transmission rate is a quasi-linear function of acquisition time, reaching a maximum of about
464 50 to 60%. Increasing acquisition time beyond 48h does not increase the transmission rate,
465 even up to 5 days. It is noteworthy that the maximum transmission rate is not reached following
466 a 24 hour AAP although the most intensive virus accumulation was achieved in less than 24h
467 (Fig. 3). These results are consistent with the threshold hypothesis. Indeed, the moderate virus
468 accumulation that occurs after the initial intensive virus accumulation (19h) is critical for an
469 optimal transmission rate. For unknown reasons, transmission rates were sometimes different
470 between tests carried out under the same experimental conditions.

471 **Contrasted ALCV persistence in aphid cellular compartments, and potential impact on** 472 **virus inoculation**

473 ALCV was previously reported to circulate and persist in *A. craccivora* based on the detection
474 of ALCV DNA in midguts, heads and hemolymphs 6 days after a 3 day AAP (10). This result
475 is confirmed and expanded here by monitoring the dynamics of viral DNA content in these
476 compartments up to 12 days after a 3 day AAP (Fig. 6). Viral DNA monitored from the whole

477 body exhibited an increase between 0 and 8 days post-AAP and the effect of time was
478 significant according to the Kruskal-Wallis test (p-value=0.048). However, the pairwise
479 multiple comparison test does not reject the null hypothesis of equality of means estimated for
480 every three post-AAP durations (p-values ≥ 0.14). This apparent contradiction between the
481 tests can be explained by the low number of repetitions (n=4) for each duration. We
482 conservatively conclude that the viral load in the whole body did not increase after AAP which
483 is consistent with the midgut results in which no significant differences were detected between
484 the samples collected over time (Kruskal-Wallis test, p-value=0.653). In hemolymph and
485 heads, the viral amount exhibited a decrease over time (Kruskal-Wallis test, respectively p-
486 value=0.047 and p-value=0.034). The pairwise multiple comparison test further supports this
487 decrease in hemolymphs. Indeed, a significant difference in viral content was detected between
488 0 and 12 days post-AAP (p-value=0.016). One of the four hemolymph samples collected at 12
489 days post-AAP was negative for viral DNA detection. The pairwise test did not show any
490 significant difference in viral content in the heads (p-value=0.098). Nevertheless, one of the 4
491 head samples was negative at 9 and 12 days post AAP.

492 The decrease of viral content in the hemolymph and the head compartment was thought to limit
493 the amount of virus that is potentially released from the insect through salivary glands, and
494 hence, the transmission rate. To test the effect of IAP duration on the transmission rate, we
495 used a 48- or 72-hour AAP which, according to previous tests produced viruliferous insects
496 that exhibit optimal infectivity (Fig. 5). With these experimental conditions, it was expected
497 that the virus accumulation would not be a limiting factor for virus inoculation. However, in
498 spite of AAP durations compatible with high virus accumulation, the inoculation was
499 successful only with an IAP duration of at least 24 hours (Table 1). Additional transmission
500 tests were performed to investigate the minimum latent period. To do this we had to use
501 individuals that were given an AAP that was long enough to produce infective aphids (Fig. 5)
502 and short enough to limit the risk of exceeding the potential minimum time of the latent period
503 during AAP. Using 15 hours AAPs (Table 1), no virus transmission was obtained with IAPs of
504 3 hours (0 out of 10 test plants), 5 hours (0/40), 6 hours (0/10) and 9 hours (0/40). It was only
505 with a 12-hour IAP that transmission was observed (1/20), which indicates that the minimum
506 latent period is at a maximum 27 hours. Additionally, with this latent period the minimum
507 duration of successful IAPs was reduced to 12 hours.

508 **No vertical transmission**

509 The relatively low efficiency of ALCV inoculation might be balanced by its vertical
510 transmission. To test this hypothesis, nymphs produced by viruliferous aphids were tested
511 either for virus presence or infectivity on broad bean plants. In the three independent tests,
512 nymphs were not detected PCR-positive for ALCV DNA and did not induce ALCV infection
513 in broad bean plants. The viruliferous parental aphids which were tested as positive controls
514 induced infection in two of the five test plants exposed. L1-L2 nymphs produced on ALCV
515 infected plants transmitted ALCV as efficiently as adults from the same plants, with
516 transmission rates of 53% (8/15) and 50% (5/10), respectively (5 individuals per test plant).

517 **No ALCV-associated fitness cost in aphids**

518 The fitness of viruliferous and non-viruliferous aphids was compared by estimating the
519 intrinsic rate of natural increase (r_m) (Table 2). The mean time of development of non-
520 viruliferous individuals was not significantly different from that of viruliferous individuals
521 ($d=7.88$ days versus 7.39 days, Wilcoxon test $p\text{-value}>0.1$). Likewise, the average number of
522 nymphs laid during a period equal to the time of development (d) was not significantly different
523 between viruliferous and non-viruliferous individuals with 55.17 and 49.79 nymphs,
524 respectively. Hence, the r_m , the combination of both parameters, was highly similar between
525 non-viruliferous and viruliferous individuals (0.418 versus 0.422 progenies per female per
526 day).

527

528 **DISCUSSION**

529 It was only in the last decade following the advent of metagenomics approaches that aphid-
530 transmitted geminiviruses were discovered. The CNP transmission mechanism was
531 demonstrated for ALCV, one of the members of the genus *Capulavirus* in which these new
532 geminiviruses were classified. Here, we further described the transmission cycle of ALV with
533 a particular focus on parameters that are potentially associated with transmission efficiency.

534 **ALCV is restricted and heterogeneously distributed in phloem tissues**

535 To monitor the tripartite interactions between plant, virus, and vector during the acquisition
536 process of ALCV by *A. craccivora*, we used an original approach comprising three
537 complementary techniques. While FISH localized ALCV in nucleated phloem cells including
538 companion cells, EPG and qPCR analysis showed that it is acquired only by aphids with access

539 to sieve elements (E2 aphid group), despite of the phloem-pds detected in the E1 aphid group.
540 We assume that phloem-pds are too short (a few seconds) and their frequency too low (rarely
541 more than three or four E1 phases preceded by phloem-pd(s) during the 4 hours of recording)
542 to enable ALCV acquisition at a qPCR detectable level in aphids of the E1 group. Noteworthy,
543 the phloem limited luteovirus BYDV was detected in individuals that were stopped before E1
544 or during E1 (50). This inconsistency may be explained by the fact that BYDV is a cytoplasmic
545 RNA virus and ALCV a nuclear DNA virus. Indeed, the short sucking during phloem-pds may
546 be strong enough to acquire a cytoplasmic virus but not a nuclear virus.

547 Like the phloem restriction of ALCV, its heterogeneous distribution was also analyzed with
548 combined approaches. Thus, during a 4 hour EPG monitoring of aphids, the non-correlation
549 between the duration of sieve tube probings (waveform E2) and the amount of acquired viral
550 DNA assessed by qPCR is consistent with the heterogeneous distribution observed by FISH.
551 Geminiviruses were frequently tested for their phloem restriction (e.g., 18), but heterogeneous
552 virus distribution within the phloem network was to our knowledge never mentioned although
553 it may be implicit from previous reports. Thus, FISH labelling of TYLCV in longitudinal
554 sections of infected plant tissues is not continuous along the vascular tissue suggesting
555 heterogeneous virus distribution (65). Moreover, the amount of TYLCV acquired by *B. tabaci*
556 whiteflies during a 4-hour AAP was uneven (66). In this later report however, it cannot be
557 excluded that different durations of sieve tube probings may have contributed to the uneven
558 amount of acquired virus, because, unlike in our study, whitefly probings were not EPG
559 monitored. Our results suggest that insects that accumulated the highest concentration of
560 ALCV DNA are those that punctured sieve elements nearby virus replicating phloem cells.

561 **Heterogeneous intra-phloem distribution of ALCV does not prevent efficient acquisition**

562 When the duration of probing in sieve elements (waveform E2) was beyond 100 minutes,
563 aphids were all ALCV- positive, irrespective of their puncture site, suggesting generalized
564 contamination of the sieve tube network. Hence, when AAPs were extended for 24 hours
565 ALCV accumulation increased steadily on average. Such a correlation between AAP durations
566 and virus amount was detected with other geminiviruses and is a common feature of non-
567 propagative transmission (67).

568 ALCV accumulation is in the same range as that of other geminiviruses, with 10^6 DNA copies
569 per individual from 15 hours AAP and in the range of 10^6 to 10^7 between 2 and 4 days AAP.
570 Indeed, these amounts are slightly higher than that of MSV in its leafhopper vector following

571 a 6-day AAP ($<10^6$ DNA copies)(68), and they were similar to those of TYLCV and
572 *Watermelon chlorotic stunt virus* in their whitefly vector following AAPs of 5 days (about
573 5×10^7 and 4×10^6 respectively)(69).

574 **Transmission success depends on a high viral amount threshold in aphids**

575 Previous transmission studies with geminiviruses showed that infectivity of viruliferous
576 vectors correlates with AAP duration (e.g., 70). These results suggest that insect infectivity
577 depends on its virus content, but to our knowledge, a threshold of virus concentration beyond
578 which an infection is possible was never defined. Here, we found that individual aphids with
579 less than 1.6×10^7 DNA copies were not infective. As this threshold was determined after 5-
580 days of IAP, the estimated copy numbers of viral DNA corresponds to persistent virus, most
581 likely internalized, and therefore, relevant for infectivity. Interestingly, infection rates obtained
582 with 5 or 10 individuals per test plant following increasing AAP durations are consistent with
583 a critical threshold of ALCV DNA content. Indeed, the maximum infection rate, around 50%,
584 was reached only from 48 hours AAP (Fig. 5), which according to the accumulation dynamics
585 of ALCV in *A. craccivora* (Fig. 3), is the time needed for a majority of individuals to reach
586 viral contents that are higher than 10^6 viral DNA copies. Thus, although the ALCV content of
587 24-hour AAP individuals was only slightly lower than that of 48-hour AAP individuals, the
588 differential transmission rate was about 2 on average.

589 The transmission performed with groups of increasing numbers of insects per test plant
590 revealed that the virus accumulation threshold determined for individual transmission success
591 could not be reached collectively by the mere addition of the viral amounts brought by
592 individuals within the group. The transmission rates obtained with groups of individuals were
593 lower than the expected (i.e. theoretical) one calculated from the individual transmission rate
594 (12%). This result shows that when an insect is alone on a plant, its probability to transmit
595 ALCV is higher than if it is in a group. This result may be explained by defence mechanisms
596 to aphid feeding or virus infection which may be more triggered with a group of aphids than
597 with a single one.

598 Although necessary for infectivity, reaching the predicted concentration threshold is not
599 sufficient because 50% of the individuals that reached the threshold were not infective during
600 the 5-day IAP. As aphids are genetically highly homogeneous due to their clonal multiplication,
601 the contrasted infectivities may be associated with stochastic phenomena, like the site of
602 inoculation, a particular feeding behavior, particular physiological conditions influencing the

603 virus distribution along the transmission route. Finally, endosymbionts that may influence
604 insect probing behavior and ALCV transmission cannot be excluded (71).

605 **The low infectivity of aphids is associated with the low persistence of ALCV in**
606 **hemolymph and head.**

607 The highest individual transmission rate of ALCV by its vector *A. craccivora* was 12%, much
608 lower than that of other circulative transmitted viruses. For example, within the family
609 *Geminiviridae*, MSV (32) and TYLCV (72) were respectively transmitted by their leafhopper
610 and whitefly vectors with an individual transmission rate of 90%. Likewise within the family
611 *Luteoviridae*, the polerovirus *Potato leafroll virus* (PLRV) was transmitted by the aphid
612 *M. persicae* with an individual transmission rate of 60% (73) and the luteovirus BYDV by *R.*
613 *padi* with a rate of 94% (14). As acquisition dynamics and maximum viral content of ALCV
614 in *A. craccivora* individuals are similar to those of non-aphid transmitted geminiviruses, the
615 low transmission rate of ALCV is obviously associated with further stages of its circulation
616 through the insect. The retention studies with dissected individuals show a high persistence in
617 the midgut but a low persistence in hemolymph and heads, indicating transmission barriers
618 beyond the midgut (post-gut barriers). Virus decrease in hemolymph and head may be due to
619 hindrance to virus flow from the gut to these compartments and/or degradation of viral DNA
620 due to insect-defense mechanisms such as autophagy, already described in the whitefly
621 *B. tabaci* for TYLCV (74, 75). An ultimate barrier was revealed at the exit of salivary glands
622 by comparing the circulative transmissions of ALCV to that of the nanovirus faba bean necrotic
623 stunt virus (FBNSV)(40). Using the same Robinia population of *A. craccivora* as here, these
624 authors showed that although the accumulation of the two viruses were similar in the head
625 compartment, the excretion of ALCV was far lower than that of FBNSV.

626 Post-gut barriers associated with low or no transmission were detected with other insects/virus
627 combinations. Firstly, barriers that prevent transmission of ALCV in a non-vector population
628 of *A. craccivora* are mostly beyond the gut in which ALCV was retained (10). Secondly, post-
629 gut barriers in *Rhopalosiphum maidis* (Fitch, 1856), and *R. padi* were associated respectively
630 to non-transmission or non-efficient transmission of BYDV (76). Thirdly, post-gut barriers
631 were suspected in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) aphid individuals that transmitted
632 the polerovirus PLRV much less efficiently than *M. persicae* individuals (77). As the low
633 transmission of PLRV by *M. euphorbiae* could not be ascribed to failure to acquire or retain
634 PLRV, or to degradation of virus particles in the aphid, authors proposed that only a few PLRV
635 particles pass from the hemolymph to saliva in this species. Fourthly, post-gut barriers were

636 detected in one of the rare begomovirus/*B. tabaci* combinations in which no transmission
637 occurred, i.e., tomato yellow leaf curl China virus (TYLCCNV) and the MED cryptic species
638 (78). Although the acquisition and retention of TYLCCNV in the midguts of MED whiteflies
639 were as efficient as that of MEAM1 whiteflies that are vectors of TYLCCNV, penetration into
640 the primary salivary glands (PSG) was much lower in MED than in MEAM1 whiteflies.
641 Consistently with this last result, TYLCCNV was not detected in the saliva of MED
642 individuals.

643 **Ecology and evolution of capulaviruses**

644 In a previous study, the authors showed that the false robinia population of *A. craccivora* used
645 in this study exhibited the highest transmission rate of the agroinfectious clone of ALCV (7/13),
646 in comparison to that of two other vector populations collected on common vetch (7/20) and
647 alfalfa (1/20) (10). They also showed that the host preference of aphid populations has an
648 impact on the transmission rate. Thus, whereas the transmission rate with the alfalfa population
649 was much lower than that of the robinia population on broad plants, when alfalfa was used as
650 recipient plants, its transmission rate was similar to that of the robinia population (5/8).
651 Moreover, using the alfalfa population, they showed with an ALCV isolate acquired from a
652 naturally infected alfalfa plant collected near Montpellier, that its transmission rate was not
653 higher than the rate obtained with the agroinfectious clone (2/4) (unpublished results). Taken
654 together these previous results indicate that the low transmission rate of ALCV by
655 *A. craccivora* may not be due to a particular virus or aphid population exhibiting an obvious
656 defect to transmission. Hence, we presume that the low transmission rate is intrinsic to the
657 couple ALCV-*A. craccivora*, although we do not know if it is only driven by ecological
658 adaptation to the environment or if mechanical barriers to more efficient geminivirus
659 circulation through aphid bodies are involved as well. Alfalfa, the major host of ALCV, is a
660 hardy perennial plant that exhibits a high tolerance to non-biotic stresses like drought and
661 extreme temperatures. Hence, the window of opportunity for ALCV to be carried to a new plant
662 is extremely wide and may extend over several years. Moreover, as alfalfa is hardier than other
663 plants, it may be an aphid shelter in dry and hot periods. Thus, the low transmission rate of
664 ALCV determined in controlled conditions is not incompatible with its survival and not even
665 with the 13.4% average prevalence of ALCV determined in the south of France from a random
666 collection of alfalfa plants (32/238) irrespective of the presence of potential symptoms (79).
667 Indeed, as alfalfa can live for more than ten years, disease prevalence can increase every year
668 from the pool of plants infected the previous years.

669 If the low transmission efficiency of ALCV is determined by intrinsic mechanical barriers of
670 aphids to geminivirus circulation through aphid bodies, other capulaviruses are also expected
671 to exhibit low transmission rates. Preliminary results support this hypothesis. The incidence of
672 french bean severe leaf curl virus (FbSLCV) in french bean is generally below 2% (Akram,
673 personal communication), and plantago latent virus (PILV) is the less prevalent virus in
674 Buckhorn Plantain (*Plantago lanceolata* L.) according to a large survey using viral
675 metagenomics (11). Moreover whereas EcmLV was transmissible with 50 aphids per recipient
676 plants (2/2) (10), preliminary results show that transmission was not possible with only 10
677 insects (0/2). Considering a co-divergence scenario in which geminiviruses coevolved with
678 plant-aphid complexes, only geminiviruses hosted in complexes that did not require high
679 transmission efficiency may have survived. Noteworthy, the hardy perennial feature also
680 applies to other capulaviruses such as *Euphorbia. caput-medusae* L., the host of EcmLV, and
681 probably also to Buckhorn Plantain the host of PILV (10). FbSLCV would seem to be an
682 exception as it is the only capulavirus isolated from an annual host. However, as the incidence
683 of FbSLCV in french bean is generally below 2% (Akram, personal communication), we
684 assume that it is maintained in a perennial host yet to be determined, and that French bean is
685 an occasional host. Consistent with a coevolution scenario, ALCV was not detected to affect
686 the fitness of its aphid vector. Further studies are needed to test if ALCV modulates the
687 behaviour of its aphid vector as reported with other whitefly-transmitted geminiviruses (80).

688 **Conclusion**

689 The outcome of this study, together with previous results (10, 40), shows that post-gut barriers
690 were associated not only to the non-transmission of ALCV by a non-vector population of *A*
691 *craccivora* but also to the low transmission of the vector population tested here. Interestingly,
692 such barriers were detected in other virus-insect combinations in association with transmission
693 failures (see above, BYDV, PLRV, and TYLCCNV). We hypothesize that the relatively low
694 transmission efficiency detected with ALCV is a typical feature of geminivirus transmission
695 by aphids due to a factor inherent to aphids. To further validate this hypothesis, transmission
696 parameters should be analyzed with other ALCV isolates and *A. craccivora* populations and
697 with other capulaviruses.

698

699 **Authors and contributors**

700 Nicolas Sauvion: <http://orcid.org/0000-0002-1641-5871>

701 Faustine Ryckebusch (FR), Nicolas Sauvion (NS) and Michel Peterschmitt (MP) conceived
702 and designed the experiments. FR, NS, Martine Granier and, MP performed the experiments.
703 FR, NS, and MP analyzed the data. FR, NS, and MP wrote the paper

704

705 **Conflicts of interest**

706 The authors declare that there are no conflicts of interest.

707

708 **Funding information**

709 The study was carried out during the Ph.D. project of Faustine Ryckebusch, funded by the
710 Agropolis Fondation (E-Space flagship program) grant number 1504-004. The authors received
711 no financial support for the authorship and/or publication of this article.

712

713 **Acknowledgments**

714 We are grateful to Marie-Stéphanie Vernerey and Elodie Piroles for their assistance in the
715 development of FISH and the use of the confocal microscope. We thank Michel Yvon, Sophie
716 Le Blaye, Jean-Luc Macia, Sylvaine Boissinot, Véronique Brault and Romain Ferdinand for
717 their technical assistance, Myriam Siegwaert (INRAE-Avignon) for providing part of EPG
718 material, Guillaume Sauvion for aphid drawing, and Bruno Serrate (INRAE-CBGP) for the
719 aphid picture.

720

721 **REFERENCES**

- 722 1. Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh MG. Insect vector interactions
723 with persistently transmitted viruses. *Ann Rev Phytopathol* 2008;46:327-59.
724 <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>
- 725 2. Gray SM, Gildow FE. Luteovirus-aphid interactions. *Annu Rev Phytopathol*
726 2003;41:539-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815>
- 727 3. Sicard A, Zeddani J-L, Yvon M, Michalakakis Y, Gutiérrez S, Blanc S. Circulative
728 nonpropagative aphid transmission of nanoviruses: an oversimplified view. *J Virol*
729 2015;89:9719-26. <https://doi.org/10.1128/JVI.00780-15>

- 730 4. Czosnek H, Ghanim M. Back to basics: are begomoviruses whitefly pathogens? *J Integr*
731 *Agric* 2012;11:225-34. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60007-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60007-0)
- 732 5. Kvarnheden A, Lett J-M, Peterschmitt M. Mastreviruses: Tropical and temperate
733 leafhopper-borne geminiviruses. Vector-mediated transmission of plant pathogens. St. Paul,
734 Minnesota, USA: The American Phytopathological Society; 2016. p. 231-41.
- 735 6. Varsani A, Martin DP, Navas-Castillo J, Moriones E, Hernández-Zepeda C, Idris AM,
736 et al. Revisiting the classification of curtoviruses based on genome-wide pairwise identity.
737 *Arch Virol* 2014;159:1873-82. <https://doi.org/10.007/s00705-014-1982-x>
- 738 7. Varsani A, Navas-Castillo J, Moriones E, Hernández-Zepeda C, Idris A, Brown JK, et
739 al. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: *Becurtovirus*, *Eragrovirus*
740 and *Turncurtovirus*. *Arch Virol* 2014;159:2193-203. <https://doi.org/10.1007/s00705-014->
741 2050-2
- 742 8. Bejerman N. Geminivirus–vector relationship. In: Kumar R, editor. Geminiviruses:
743 Springer; 2019. p. 137-45.
- 744 9. Roumagnac P, Granier M, Bernardo P, Deshoux M, Ferdinand R, Galzi S, et al. Alfalfa
745 Leaf Curl Virus: an aphid-transmitted geminivirus. *J Virol* 2015;89:9683-8.
746 <https://doi.org/10.1128/JVI.00453-15>
- 747 10. Ryckebusch F, Sauvion N, Granier M, Roumagnac P, Peterschmitt M. Alfalfa leaf curl
748 virus is transmitted by *Aphis craccivora* in a highly specific circulative manner. *Virology*
749 2020;546:98-108. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.04.004>
- 750 11. Susi H, Filloux D, Frilander MJ, Roumagnac P, Laine A-L. Diverse and variable virus
751 communities in wild plant populations revealed by metagenomic tools. *PeerJ* 2019;7:e6140.
- 752 12. Nault LR. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann Entomol Soc*
753 *Amer* 1997;90:521-41, <https://doi.org/10.1093/aesa/90.5.521>.
- 754 13. Oparka KJ, Turgeon R. Sieve elements and companion cells—traffic control centers of
755 the phloem. *Plant Cell* 1999;11:739-50. <https://doi.org/10.1105/tpc.11.4.739>
- 756 14. Prado E, Tjallingii WF. Aphid activities during sieve element punctures. *Entomol Exp*
757 *Appl* 1994;72:157-65. <https://doi.org/10.1111/j.570-7458.1994.tb01813.x>
- 758 15. Shirasawa-Seo N, Sano Y, Nakamura S, Murakami T, Gotoh Y, Naito Y, et al. The
759 promoter of Milk vetch dwarf virus component 8 confers effective gene expression in both

- 760 dicot and monocot plants. *Plant Cell Rep* 2005;24:155-63. [https://doi.org/10.1007/s00299-005-](https://doi.org/10.1007/s00299-005-0917-0)
761 0917-0
- 762 16. Peter KA, Gildow F, Palukaitis P, Gray SM. The C terminus of the polerovirus p5
763 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *J Virol* 2009;83:5419-29. DOI:
764 <https://doi.org/10.1128/JVI.02312-08>
- 765 17. Ryabov EV, Fraser G, Mayo MA, Barker H, Taliansky M. Umbravirus gene expression
766 helps Potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically
767 between plants. *Virology* 2001;286:363-72. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0982>
- 768 18. Morra MR, Petty ITD. Tissue specificity of geminivirus infection is genetically
769 determined. *Plant Cell* 2000;12:2259-70. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2259>
- 770 19. Wang HL, Gilbertson RL, Lucas WJ. Spatial and temporal distribution of bean dwarf
771 mosaic geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathology*
772 1996;86:1204-14.
- 773 20. Carr RJ, Kim KS. Evidence that bean golden mosaic virus invades non-phloem tissue
774 in double infections with tobacco mosaic virus. *J Gen Virol* 1983;64:2489-92.
775 <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-11-2489>
- 776 21. Lucy AP, Boulton MI, Davies JW, Maule AJ. Tissue specificity of *Zea mays* infection
777 by Maize Streak Virus. *MPMI* 1996;9:22-31. <https://doi.org/10.1094/MPMI-9-0022>
- 778 22. Storey HH. Investigations of the mechanism of the transmission of plant viruses by
779 insect vectors II. The part played by puncture in transmission. *Proc Roy Soc B* 1938;125:455-
780 77. <https://doi.org/10.1098/rspb.1938.0037>
- 781 23. Lett JM, Granier M, Grondin M, Turpin P, Molinaro F, Chiroleu F, et al. Electrical
782 penetration graphs from *Cicadulina mbila* on maize, the fine structure of its stylet pathways
783 and consequences for virus transmission efficiency. *Entomol Exp Appl* 2001;101:93-109.
784 <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00895.x>
- 785 24. Reinbold C, Herrbach E, Brault V. Posterior midgut and hindgut are both sites of
786 acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *J Gen*
787 *Virol* 2003;84:3473-84. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19415-0>
- 788 25. Smith KM. Studies on Potato Virus diseases. IX Some further experiments on the insect
789 transmission of Potato Leaf-Roll. *Ann Appl Biol* 1931;18:141-57. <https://doi.org/10.1111/j>
790 1744-7348.1931.tb02292.x

- 791 26. Storey HH. Transmission studies of Maize Streak Disease. *Ann Appl Biol* 1928;15:1-
792 25. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1928.tb07034.x>
- 793 27. Ghanim M, Morin S, Czosnek H. Rate of Tomato yellow leaf curl virus translocation
794 in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*.
795 *Phytopathology* 2001;91:188-96. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.188>
- 796 28. Wang Y, Mao Q, Liu W, Mar T-T, Wei T, Liu Y, et al. Localization and distribution of
797 Wheat dwarf virus in its vector leafhopper, *Psammotettix alienus*. *Phytopathology*
798 2014;104:897-904. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-13-0251-R>
- 799 29. Mulot M, Monsion B, Boissinot S, Rastegar M, Meyer S, Bochet N, et al. Transmission
800 of *Turnip yellows virus* by *Myzus persicae* is reduced by feeding aphids on double-stranded
801 RNA targeting the Ephrin receptor protein. *Front Microbiol* 2018;9:457.
802 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00457>
- 803 30. Rana VS, Popli S, Saurav GK, Raina HS, Jamwal R, Chaubey R, et al. Implication of
804 the whitefly, *Bemisia tabaci*, collagen protein in begomoviruses acquisition and transmission.
805 *Phytopathology* 2019;109:1481-93. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-18-0082-R>
- 806 31. Rosen R, Kanakala S, Kliot A, Pakkianathan BC, Farich BA, Santana-Magal N, et al.
807 Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *COVIRO* 2015;15:1-
808 8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.008>
- 809 32. Reynaud B, Peterschmitt M. A study of the mode of transmission of maize streak virus
810 by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Ann Appl Biol*
811 1992;121:85-94. <https://doi.org/10.1111/j.744-7348.1992.tb03989.x>
- 812 33. Pakkianathan BC, Kontsedalov S, Lebedev G, Mahadav A, Zeidan M, Czosnek H, et
813 al. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector, *Bemisia tabaci*. *J Virol*
814 2015;89:9791-803. <https://doi.org/10.1128/JVI.00779-15>
- 815 34. Rubinstein G, Czosnek H. Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with
816 its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and
817 fecundity. *J Gen Virol* 1997;78:2683-9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2683>
- 818 35. Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek H. Evidence for transovarial transmission of
819 tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology* 1998;240:295-
820 303. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8937>

- 821 36. Becker N, Rimbaud L, Chiroleu F, Reynaud B, Thébaud G, Lett J-M. Rapid
822 accumulation and low degradation: key parameters of *Tomato yellow leaf curl virus* persistence
823 in its insect vector *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* 2015;5:17696. <https://doi.org/10.1038/srep17696>
- 824 37. Sánchez-Campos S, Rodríguez-Negrete EA, Cruzado L, Grande-Pérez A, Bejarano ER,
825 Navas-Castillo J, et al. Tomato yellow leaf curl virus: No evidence for replication in the insect
826 vector *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* 2016;6:1-6. <https://doi.org/10.1038/srep30942>
- 827 38. Bosco D, Mason G, Accotto GP. TYLCSV DNA, but not infectivity, can be
828 transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius).
829 *Virology* 2004;323:276-83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.010>
- 830 39. Wang J, Zhao H, Liu J, Jiu M, Qian YJ, Liu SS. Low frequency of horizontal and
831 vertical transmission of two begomoviruses through whiteflies exhibits little relevance to the
832 vector infectivity. *Ann Appl Biol* 2010;157:125-33. <https://doi.org/10.1111/j.1744->
833 7348.2010.00403.x
- 834 40. Di Mattia J, Ryckebusch F, Vernerey M-S, Pirolles E, Sauvion N, Peterschmitt M, et
835 al. Co-Acquired Nanovirus and Geminivirus exhibit a contrasted localization within their
836 common aphid vector. *Viruses* 2020;12:299. <https://doi.org/10.3390/v12030299>
- 837 41. Sicard A, Pirolles E, Gallet R, Vernerey MS, Yvon M, Urbino C, et al. A multicellular
838 way of life for a multipartite virus. *Elife* 2019;8. e43599
- 839 42. Boissinot S, Pichon E, Sorin C, Piccini C, Scheidecker D, Ziegler-Graff V, et al.
840 Systemic propagation of a fluorescent infectious clone of a polerovirus following inoculation
841 by agrobacteria and aphids. *Viruses* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/v9070166>
- 842 43. McLean DL, Kinsey MG. A technique for electronically recording aphid feeding and
843 salivation. *Nature* 1964;202:1358-9.
- 844 44. Tjallingii WF. Electronic recording of penetration behavior by aphids. *Entomol Exp*
845 *Appl* 1978;24:721-30.
- 846 45. Tjallingii WF. Electrical recording of stylet penetration activities. In: Minks AK,
847 Harrewijn P, editors. *Aphids, their biology, natural enemies and control*. Amsterdam: Elsevier
848 Science Publications; 1988. p. 95-108.
- 849 46. Tjallingii WF. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids. In:
850 Eikenbary RCR, editor. *Aphid-plant genotype interactions*. Amsterdam: Elsevier Science
851 Publishers B.V.; 1990. p. 89-99.

- 852 47. Tjallingii WF, Gabryś B. Anomalous stylet punctures of phloem sieve elements by
853 aphids. *Entomol Exp Appl* 1999;91:97-103.
- 854 48. Jiménez J, Tjallingii WF, Moreno A, Fereres A. Newly distinguished cell punctures
855 associated with transmission of the semipersistent phloem-limited Beet yellows virus. *J Virol*
856 2018;92:e01076-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01076-18>
- 857 49. Jiménez J, Garzo E, Alba-Tercedor J, Moreno A, Fereres A, Walker GP. The phloem-
858 pd: a distinctive brief sieve element stylet puncture prior to sieve element phase of aphid
859 feeding behavior. *Arthropod-Plant Inte* 2020;14:67-78. [https://doi.org/10.1007/s11829-019-](https://doi.org/10.1007/s11829-019-09708-w)
860 09708-w
- 861 50. Jiménez J, Arias-Martín M, Moreno A, Garzo E, Fereres A. Barley yellow dwarf virus
862 can be inoculated during brief intracellular punctures in phloem cells before the sieve element
863 continuous salivation phase. *Phytopathology* 2020;110:85-93.
864 <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0260-FI>
- 865 51. Johnson DD, Walker GP, Creamer R. Stylet penetration behavior resulting in
866 inoculation of a semipersistently transmitted closterovirus by the whitefly *Bemisia argentifolii*.
867 *Entomol Exp Appl* 2002;102:115-23. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2002.00931.x>
- 868 52. Wayadande AC, Nault LR. Leafhopper probing behavior associated with maize
869 chlorotic dwarf virus transmission to maize. *Phytopathology* 1993;83:522-6.
870 <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-522>
- 871 53. Tjallingii WF. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound
872 responses. *J Exp Bot* 2006;57:739-45. <https://doi.org/10.1093/Jxb/Erj088>
- 873 54. Annan IB, Schaeffers GA, Tingey WM, Tjallingii WF. Stylet activity of cowpea aphid
874 (Homoptera: Aphididae) on leaf extracts of resistant and susceptible cowpea cultivars. *J Insect*
875 *Behav* 1997;10:603-18.
- 876 55. Philippi J, Schliephake E, Jürgens HU, Jansen GA, Ordon F. Feeding behavior of
877 aphids on narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*) genotypes varying in the content of
878 quinolizidine alkaloids. *Entomol Exp Appl* 2015;156:37-51. <https://doi.org/10.1111/eea.12313>
- 879 56. Backus EA, Cline AR, Ellerseick MR, Serrano MS. *Lugus hesperus* (Hemiptera :
880 Miridae) feeding on cotton: New methods and parameters for analysis of nonsequential
881 electrical penetration graph data. *Ann Entomol Soc Am* 2007;100:296-310.
882 [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2007\)100\[296:lhmf\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2007)100[296:lhmf]2.0.co;2)

- 883 57. Birch L. The intrinsic rate of natural increase of an insect population. *J Anim Ecol*
884 1948;17:15-26. http://campus.lakeforest.edu/menke/PDFs/Bio373/Birch_1948_JAE.pdf
- 885 58. Wyatt IJ, White PF. Simple estimation of intrinsic increase rates for aphids and
886 tetranychid mites. *J Appl Ecol* 1977;14:757-66. <https://doi.org/10.2307/2402807>
- 887 59. DeLoach CJ. Rate of increase of populations of cabbage, green peach, and turnip aphids
888 at constant temperatures. *Ann Entomol Soc Am* 1974;67:332-40.
889 <https://doi.org/10.1093/aesa/67.3.332>
- 890 60. Efron B. Bootstrap methods: another look at the Jackknife. In: Kotz S. JNL, editor.
891 Breakthroughs in Statistics Springer Series in Statistics (Perspectives in Statistics). New York,
892 NY: Springer; 1979. p. 1-26.
- 893 61. R Core Team. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical
894 Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, <https://www.r-project.org>; 2017.
- 895 62. Cleveland WS, Devlin SJ. Locally weighted regression: an approach to regression
896 analysis by local fitting. *J Am Stat Assoc* 1988;83:596-610.
897 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.1988.10478639>
- 898 63. Jacoby WG. Loess: a nonparametric, graphical tool for depicting relationships between
899 variables. *Elect Stud* 2000;19:577-613. [https://doi.org/10.1016/S0261-3794\(99\)00028-1](https://doi.org/10.1016/S0261-3794(99)00028-1)
- 900 64. Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing
901 under dependency. *Ann Stat* 2001;29:1165-88. <https://doi.org/10.1214/aos/1013699998>
- 902 65. Ghanim M, Brumin M, Popovski S. A simple, rapid and inexpensive method for
903 localization of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Potato leafroll virus* in plant and insect
904 vectors. *J Virol Meth* 2009;159:311-4, <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.017>.
- 905 66. Caciagli P, Bosco D. Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus
906 DNA in its whitefly vector. *Phytopathology* 1997;87:610-3.
907 <https://doi.org/10.1094/PHTO.1997.87.6.610>
- 908 67. Gray S, Cilia M, Ghanim M. Circulative, “nonpropagative” virus transmission: an
909 orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Adv Virus Res* 2014;89:141-99.
- 910 68. Lett J-M, Granier M, Hippolyte I, Grondin M, Royer M, Blanc S, et al. Spatial and
911 temporal distribution of geminiviruses in leafhoppers of the genus *Cicadulina* monitored by

- 912 conventional and quantitative polymerase chain reaction. *Phytopathology* 2002;92:65-74.
913 <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.1.65>
- 914 69. Czosnek H. Chapter 2 - Interactions of *Tomato yellow leaf curl virus* with its whitefly
915 vector. In: Czosnek H, editor. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease*: Springer; 2007. p. 157-
916 70.
- 917 70. Mehta P, Wyman JA, Nakhla MK, Maxwell DP. Transmission of tomato yellow leaf
918 curl Geminivirns by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *J Econ Entomol* 1994;87:1291-
919 7. <https://doi.org/10.1093/jee/87.5.1291>
- 920 71. Angelella G, Nalam V, Nachappa P, White J, Kaplan I. Endosymbionts differentially
921 alter exploratory probing behavior of a nonpersistent plant virus vector. *Microb Ecol*
922 2018;76:453-8. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1133-5>
- 923 72. Péréfarres F, Thébaud G, Lefeuvre P, Chiroleu F, Rimbaud L, Hoareau M, et al.
924 Frequency-dependent assistance as a way out of competitive exclusion between two strains of
925 an emerging virus. *Proc R Soc B-Biol Sci* 2014;281:20133374.
926 <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3374>
- 927 73. Kassanis B. Some factors affecting the transmission of leaf-roll virus by aphids. *Ann*
928 *Appl Biol* 1952;39:157-67. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1952.tb00894.x>
- 929 74. Czosnek H, Hariton-Shalev A, Sobol I, Gorovits R, Ghanim M. The incredible journey
930 of begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses* 2017;9:273.
931 <https://doi.org/10.3390/v9100273>
- 932 75. Wang L-L, Wang X-R, Wei X-M, Huang H, Wu J-X, Chen X-X, et al. The autophagy
933 pathway participates in resistance to Tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies.
934 *Autophagy* 2016;12:1560-74. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192749>
- 935 76. Gildow FE, Gray SM. The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier
936 associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteovirus. *Phytopathology*
937 1993;83:1293-302. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-1293>
- 938 77. Tamada T, Harrison BD. Quantitative studies on the uptake and retention of potato
939 leafroll virus by aphids in laboratory and field conditions. *Ann Appl Biol* 1981;98:261-76.
940 <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb00759.x>

- 941 78. Wei J, Zhao J-J, Zhang T, Li F-F, Ghanim M, Zhou X-P, et al. Specific cells in the
942 primary salivary glands of the whitefly *Bemisia tabaci* control retention and transmission of
943 begomoviruses. *J Virol* 2014;88:13460-8. <https://doi.org/10.1128/JVI.02179-14>
- 944 79. Bernardo P, Muhire B, François S, Deshoux M, Hartnady P, Farkas K, et al. Molecular
945 characterization and prevalence of two capulaviruses: *Alfalfa leaf curl virus* from France and
946 *Euphorbia caput-medusae* latent virus from South Africa. *Virology* 2016;493:142-53.
947 <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.016>
- 948 80. Liu B, Preisser EL, Chu D, Pan H, Xie W, Wang S, et al. Multiple forms of vector
949 manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and tomato yellow leaf curl virus. *J*
950 *Virol* 2013;87:4929-37. <https://doi.org/10.1128/JVI.03571-12>

951

952 **Figures and tables**

953 **Figure 1. Histological localization of ALCV DNA in plants tissues by FISH.** The ALCV
954 specific DNA probe is labeled with red Alexa (568) fluorochrome. Nuclei are DAPI-blue
955 stained. Color channels were merged in panels a, c, f and g, but not in panels d and e. (a) Cross
956 section of a petiole of an ALCV-infected broad bean plant, showing a vascular bundle (b).
957 Same as (a) but with artificial colors: xylem in green, cambium in yellow, phloem in pink,
958 sclerenchyma in blue, parenchyma in grey. (c, d, e) Elongated cells of vascular bundles pulled
959 from a leaf of an ALCV-infected faba bean plant. (d) Same as (c) but only with the red channel.
960 (e) same as (c) but only with the blue channel. (f) Translaminar view of a leaf sampled on an
961 ALCV-infected *Nicotiana benthamiana* plant. (g) Same as (f) except that the leaf was collected
962 on a healthy plant. Preparations were examined with confocal microscopy. Horizontal bars =
963 50 μ m.

964 **Figure 2. EPG design, and *Aphis craccivora* feeding behavior associated with ALCV**
965 **acquisition.** (a) Schematic illustration of an aphid in feeding position showing the intra-leaf
966 route of its stylets until a vascular bundle; (b) *A. craccivora* adult with a thin gold wire glued
967 to its dorsum with a small drop of silver print paint; (c) Overview of typical EPG waveforms
968 produced by an apterous adult feeding for 1h on a branch of broad bean plant, and expanded
969 views of the waveforms studied: pd (intracellular puncture in epidermis or mesophyll cell), E1
970 phase (salivation into sieve tube elements of the phloem), E2 phase (ingestion from sieve tube
971 elements), and tr phase (transition between E1/E2); (d) Cumulative duration in phase E2 of
972 young apterous adults measured during 4 h EPG recordings on ALCV infected branches of
973 broad bean plants, plotted against their post-EPG viral DNA content (experiment 2).
974 Smoothing method was used to add a regression line with 0.95 confidence interval shown in
975 grey.

976 **Figure 3. Kinetics of ALCV accumulation in *Aphis craccivora*.** Viral accumulation was
977 assessed by monitoring viral DNA contents with qPCR on individuals that were given AAPs
978 of 2 to 82 h (black dots) or 2 to 96 h (blue dots). Black dots correspond to individuals analysed
979 individually, each blue dot corresponds to the average viral content of 5 individuals analysed
980 by qPCR in a pool. For each set of dots, a smooth local regression was performed, in black for
981 the black dots and in blue for the blue dots. A 0.95 confidence interval was displayed around
982 smooth in grey and green colors respectively.

983 **Figure 4. Transmission rate of ALCV by *A. craccivora* individuals and relationship with**
984 **their viral amount (a) and the number of individuals per test plant (b).** (a) Viral DNA
985 amount assessed by qPCR in 34 individuals after a 3-day AAP on ALCV-infected broad bean
986 plants and a 5-day IAP on healthy plants with one individual per test plant. Solid circles
987 represent individuals that transmitted ALCV to their test plant, open circles represent non-
988 transmitters. Only individuals in which viral content was above 1.6×10^7 viral DNA copies
989 (red horizontal line) transmitted ALCV. The box-plots apply respectively to the 25 individuals
990 below this threshold, to the 4 individuals above the threshold that did not transmit while their
991 viral load was on average identical to that of the 4 transmitter aphids. (b) Transmission rates
992 were determined experimentally (black dots with standard deviations) in seven independent
993 transmission tests performed with 1, 5, 10, 20, 30, 40, 100 individuals (experiment 4). For each
994 aphid batch size, mean theoretical individual transmission rate (p_i) was deduced from formula,
995 $TR = 1-(1-p_i)^n$, knowing TR and n (values in % on the figure) (see also Suppl Table 1). The
996 grey curves are the theoretical curves of TR as a function of n for these p_i values. The red curve
997 was derived from the transmission test shown in (a) in which $p_i=4/34$.

998 **Figure 5. Relationship between AAP duration and transmission rate of ALCV by *Aphis***
999 ***craccivora*.** Each dot corresponds to a transmission rate determined with 5 days AAP carried
1000 out with 19 or 20 test plants and with 5 or 10 individuals per test plant. The figure summarizes
1001 the results generated with eight independent transmission tests (experiment 6). A smooth local
1002 regression was performed, and 0.95 confidence interval was displayed around smooth in grey.

1003 **Figure 6. ALCV persistence in *Aphis craccivora* cellular compartments.** The box-plots
1004 show the amount of ALCV DNA in whole body, midgut, hemolymph, and head of aphids
1005 following a 3-day AAP on ALCV infected broad bean plants (D0), and after three sequential
1006 4-day post-AAP feedings (i.e, D4, D8, D12). The content of ALCV DNA was determined by
1007 qPCR in 4 pools of 10 non-dissected individuals and 4 pools of 10 organs or hemolymph.
1008 Accumulations are reported as logarithm 10 of the number of viral DNA copies. The red lines
1009 represent the highest value obtained from individuals sampled before the 3-day AAP. The
1010 amount of DNA in non-dissected individuals was not measured at D12 because there were not
1011 enough aphids alive on that date. The means for each duration were compared by a Kruskal-
1012 Wallis test. When the null hypothesis of mean equality was rejected ($p<0.05$, p -values in black),
1013 the means of each pair of modalities were compared using the multiple comparison method
1014 based on Benjamini and Yekutieli's procedure. Different letters indicate significant differences
1015 at the level shown in grey.

1016 **Table 1. Description of the seven transmission tests designed to estimate the minimum**
 1017 **latency and inoculation periods (experiment 8).** Ratios between the number of infected
 1018 plants and the number of test plants are indicated for each test plants and transmission
 1019 conditions. The infection status of the test plants was determined with symptoms and/or the
 1020 detection of ALCV DNA by PCR. AAP, acquisition access period; IAP, inoculation access
 1021 period; n, number of aphid individuals per test plant.

1022

AAP (h)	IAP (h)	AAP+IAP (h)	Test 1 n=5	Test 2 n=5	Test 3 n=10	Test 4 n=10	Test 5 n=5	Test 6 n=10	Test 7 n=10
15	3	18				0/10			
15	5	20		0/20	0/20				
15	6	21				0/10			
15	9	24		0/20	0/20				
15	12	27	1/20	0/20	0/20	0/10			
15	24	39	1/20	0/20	0/20	0/10			
15	48	63	0/20			0/12			
48	1	49						0/10	
48	6	54						0/10	
48	12	60					0/11	0/10	
48	24	72					2/12	0/10	
48	48	96					4/10	1/10	
48	120	168						0/10	
72	3	5							0/10
72	6	78							0/10
72	12	84							0/10
72	24	96							0/9
72	48	120							0/10
72	120	192							2/10

1023

1024 **Table 2. Comparing the fitness of *A. craccivora* individuals that acquired ALCV to that**
 1025 **of non-infected individuals.** *d*: mean number of days from aphid birth to reproduction (i.e. pre-
 1026 reproductive time); *Md*: average number of progeny produced in a time equal to *d*; # nymphs:
 1027 mean number of nymphs produced per day during a time equal to *d*; *r_m*: intrinsic rate of
 1028 increase; *T*: mean length of aphid generation; *DT*: time required by the aphid population to
 1029 double its size; SE: bootstrap estimator of standard error.

Estimated parameters	non-viruliferous aphids	viruliferous aphids
	N=35	N=38
<i>d</i> [day (SE)]	7.00 (0.04)	6.74 (0.08)
<i>Md</i> [day (SE)]	55.17 (2.63)	49.79 (2.69)
# nymphs [per day (SE)]	7.88 (0.38)	7.41 (0.40)
<i>r_m</i> [progenies/fem/day (SE)]	0.418 (0.006)	0.422 (0.009)
<i>T</i> [day]	9.49	9.13
<i>DT</i> [day]	1.64	1.62

1030

1031

1032

1033 **Supplementary Information**

1034 **S1 Table.**

1035 Description of the eight transmission tests designed to estimate the transmission rate of ALCV
 1036 by *A. craccivora* as a function of the number of individuals per test plant (experiment 4). The
 1037 results are summarized in Fig. 4b. AAP, acquisition access period; IAP, inoculation access
 1038 period; Aphid batch size, number of aphid individuals per test plant. Theoretical individual
 1039 transmission rate (p_i) was deduced from formula , $TR = 1-(1-p_i)^n$, knowing *TR* and *n*.

1040

Figure 1.

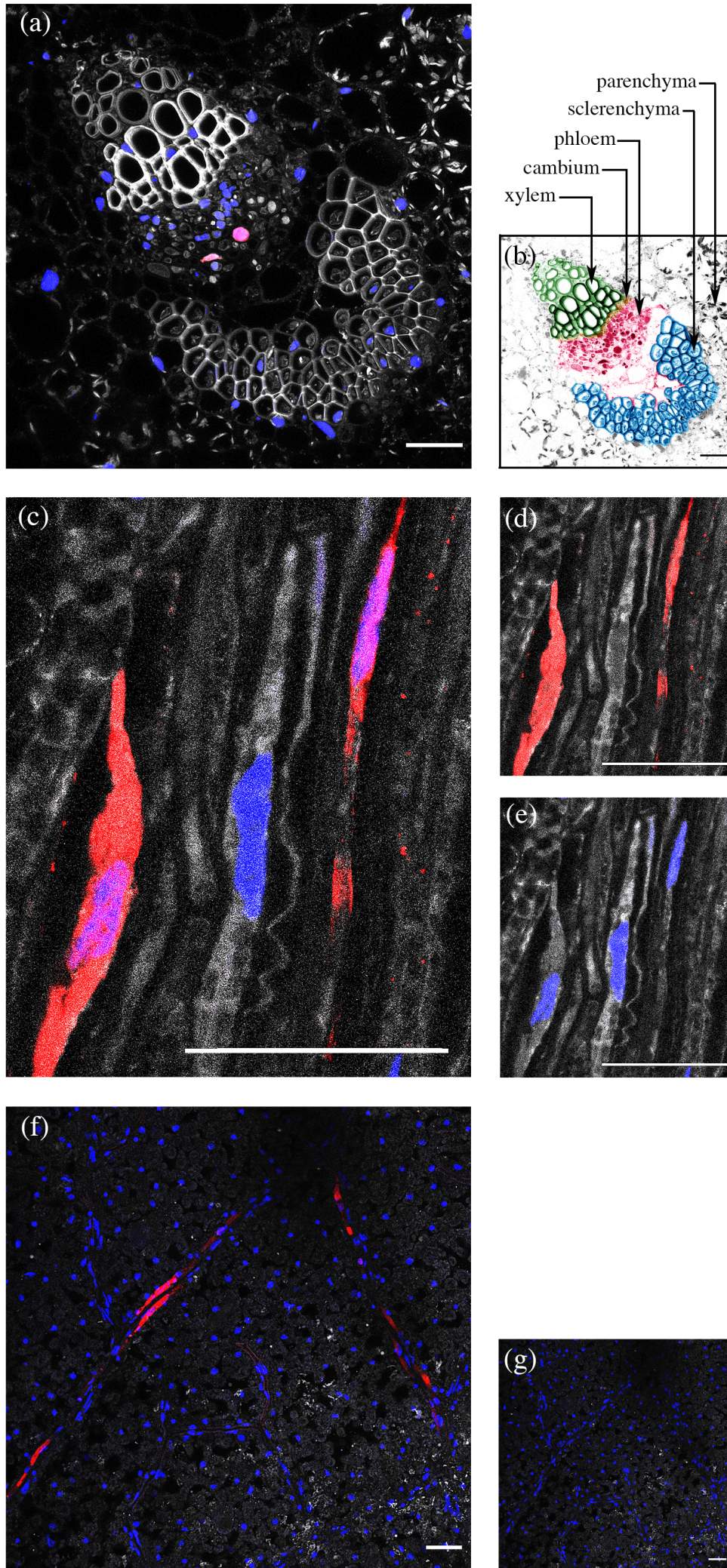


Figure 2

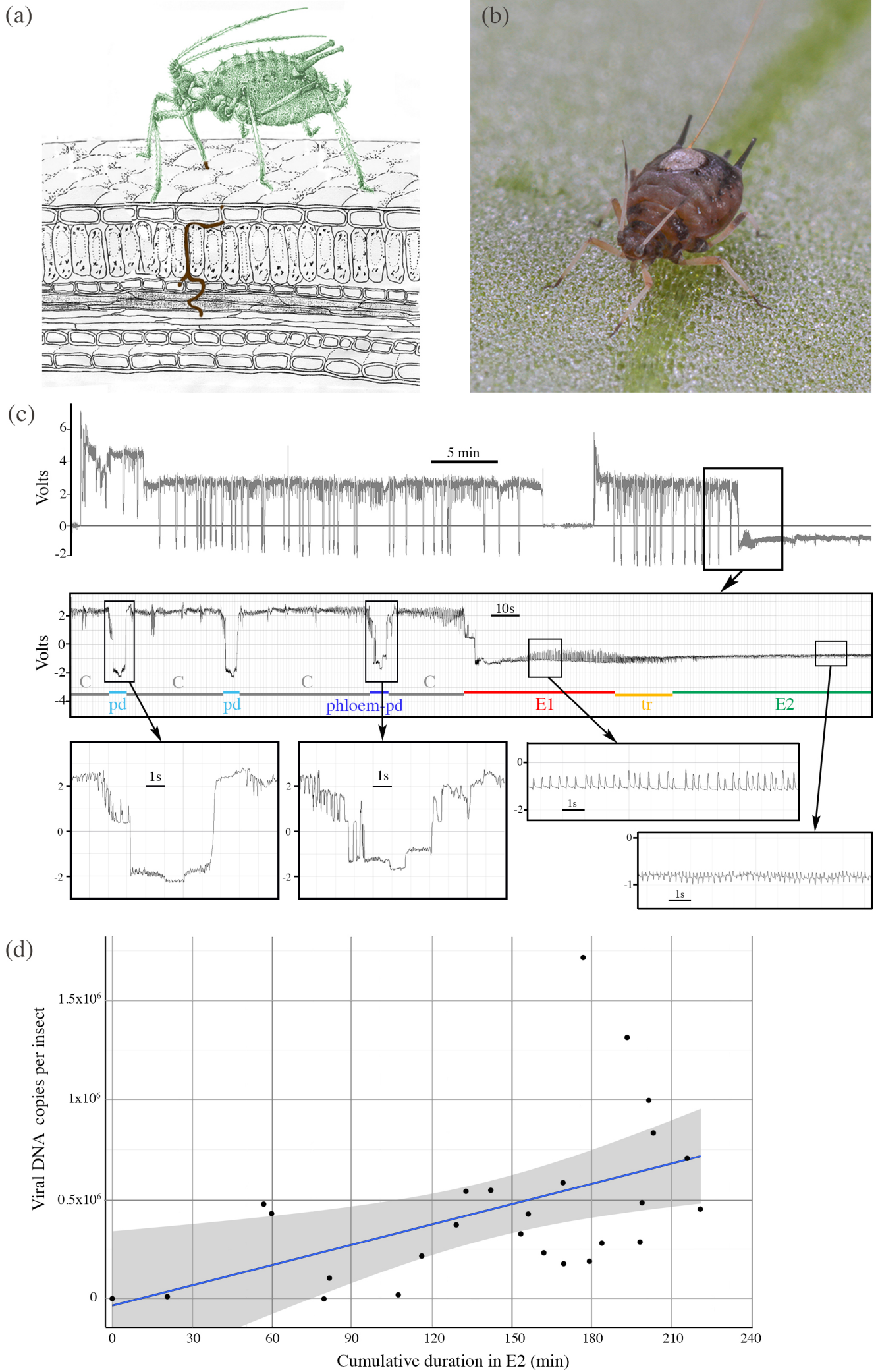


Figure 3

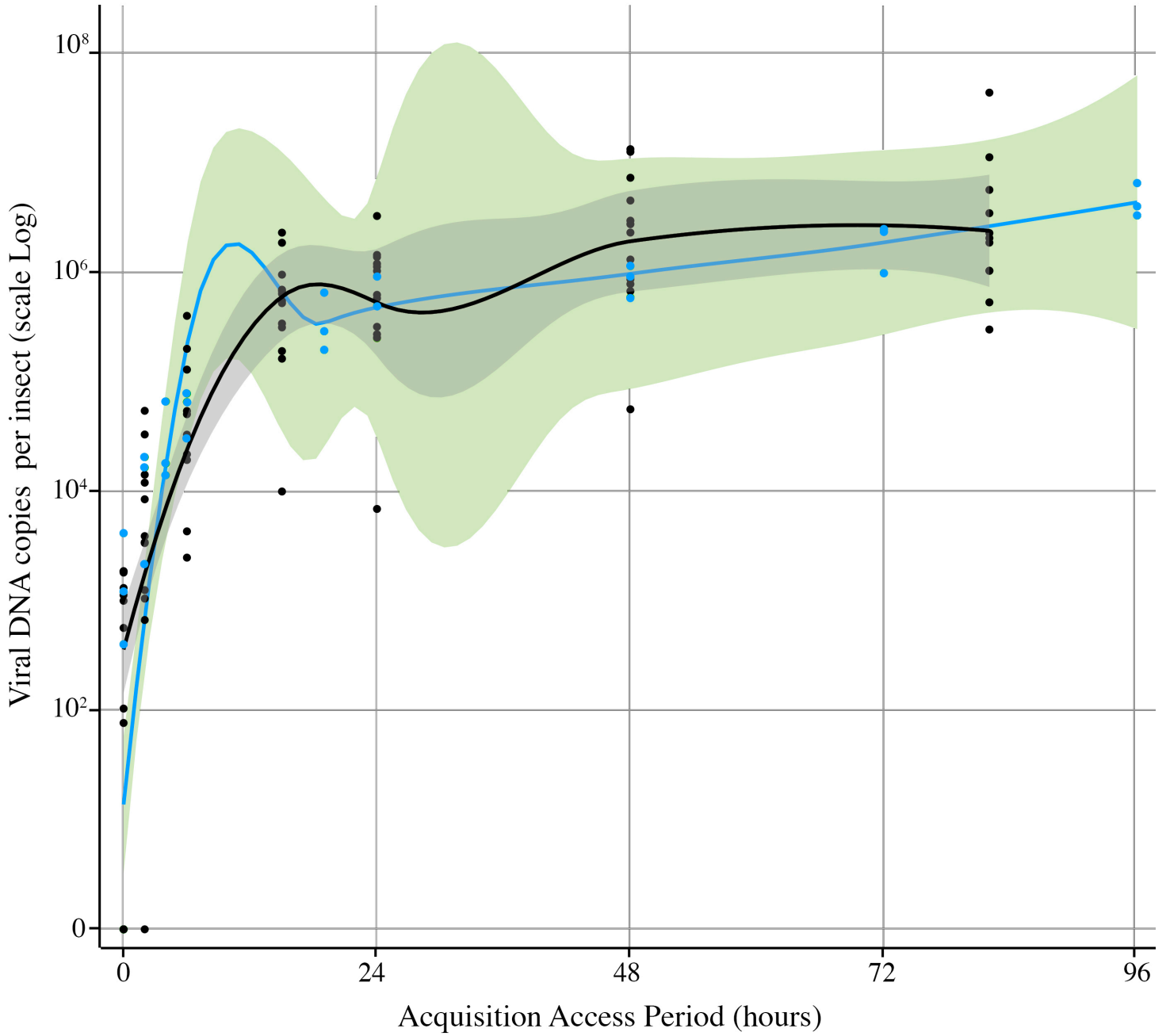


Figure 4

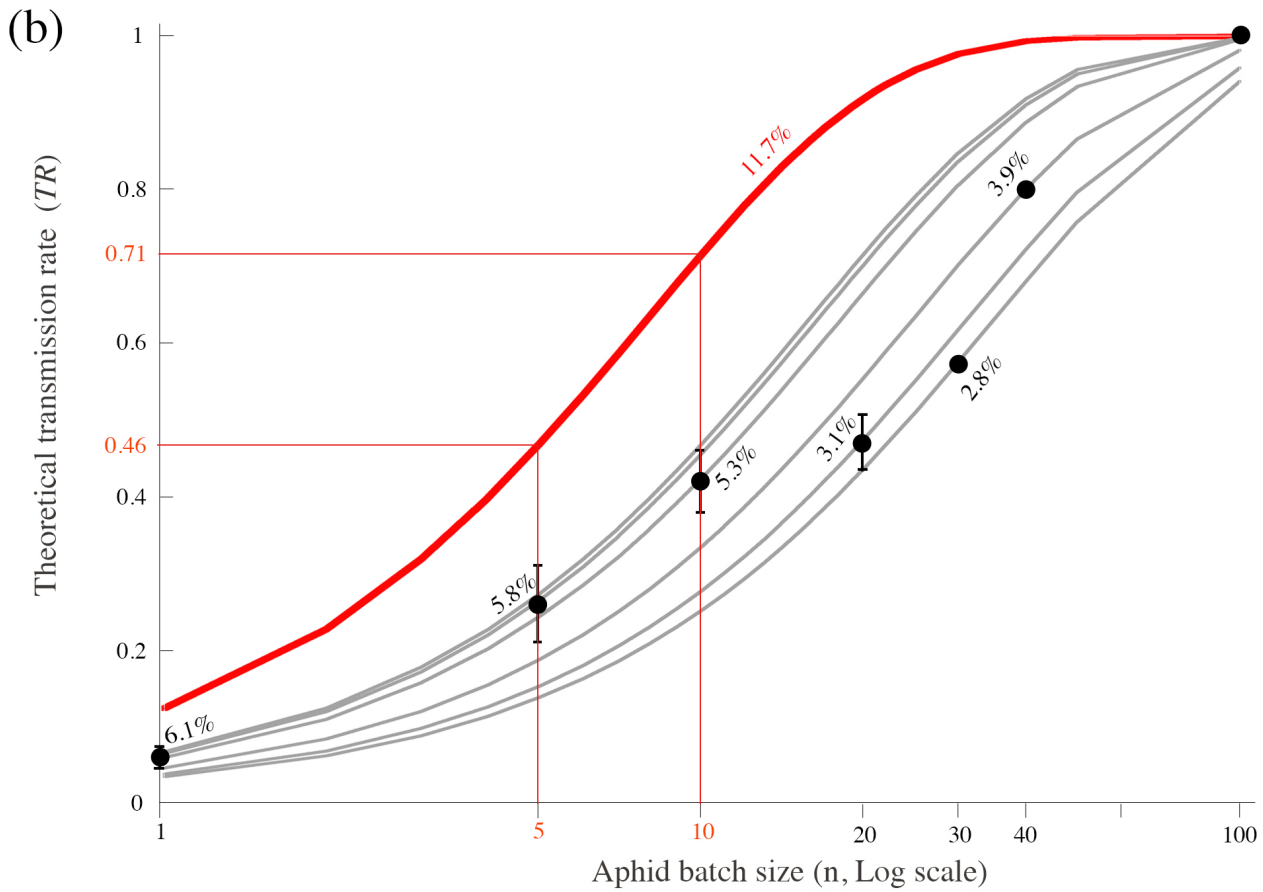
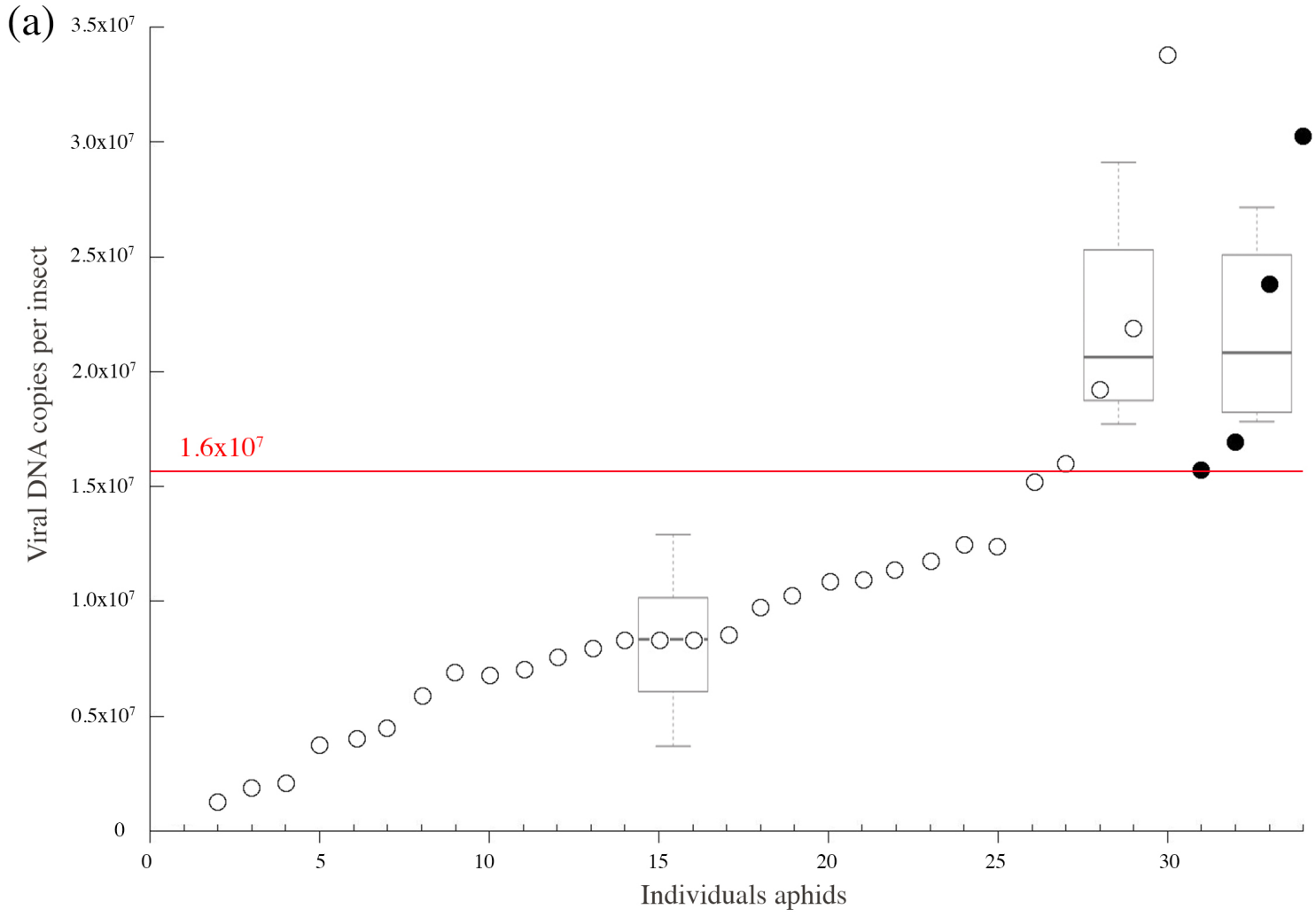


Figure 5

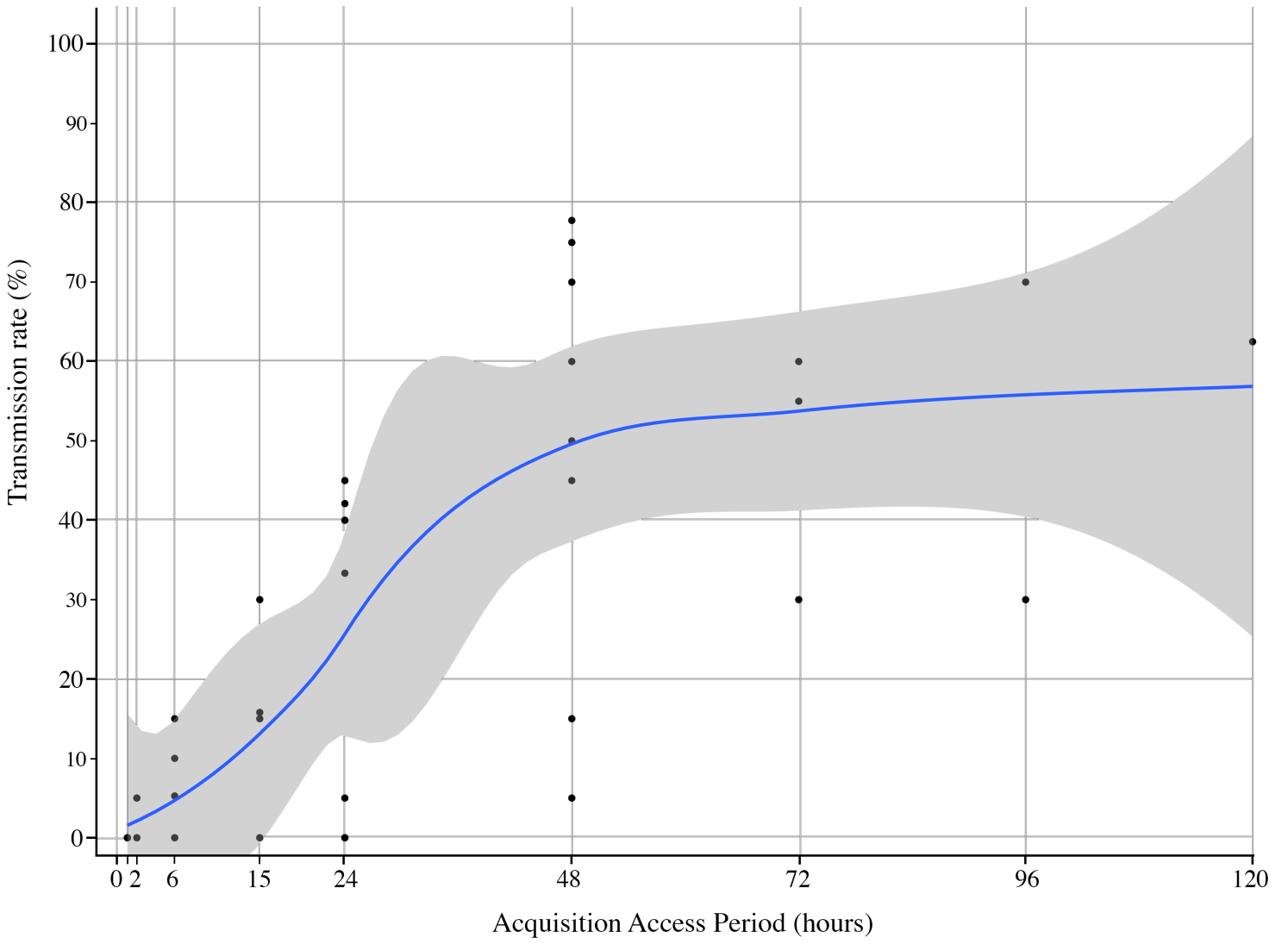
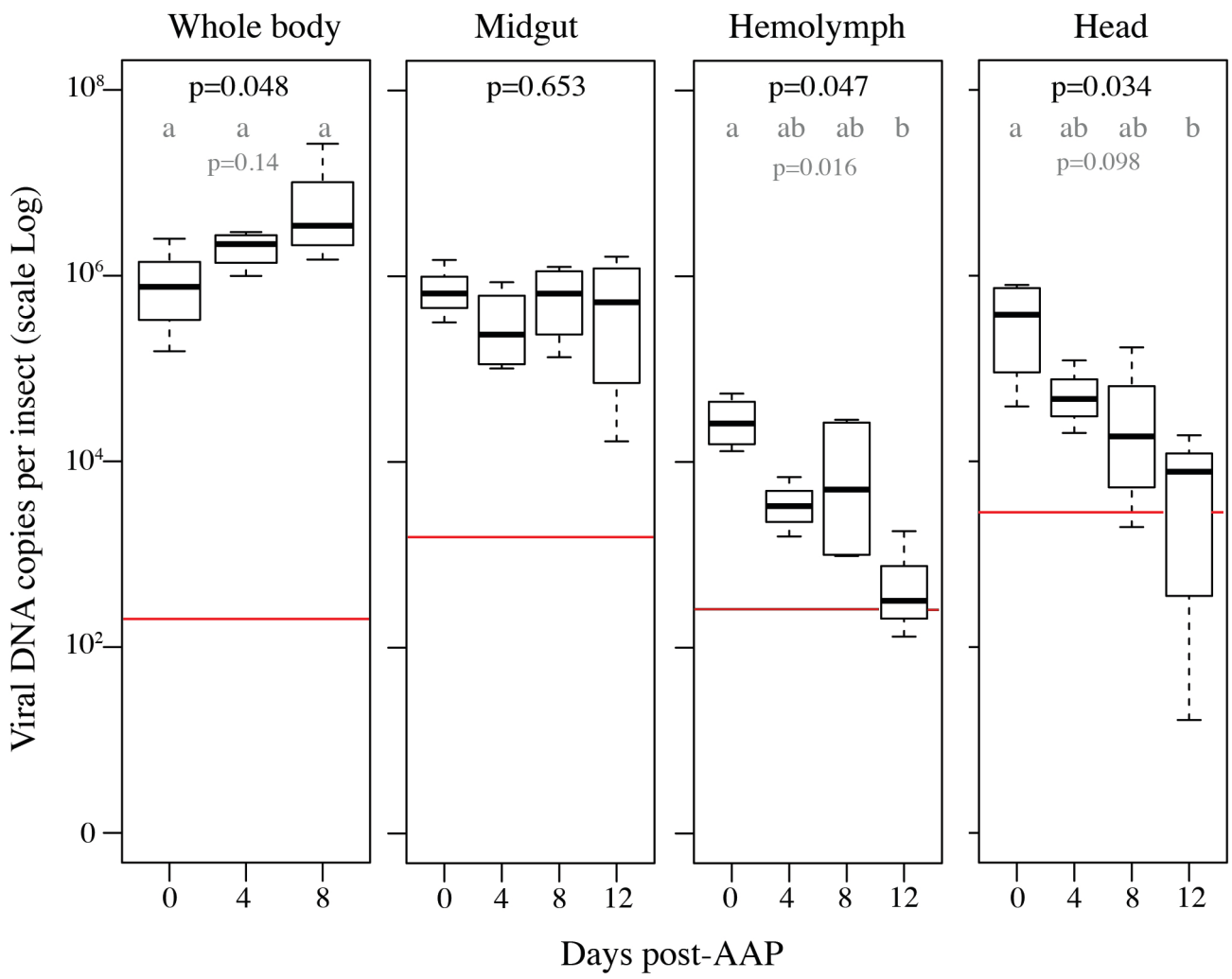


Figure 6



Supplementary Table 1

Description of the eight transmission tests designed to estimate the transmission rate of ALCV by *A. craccivora* as a function of the number of individuals per test plants (experiment 4). The results are summarized in Fig. 4b. AAP, acquisition access period; IAP, inoculation access period; Aphid batch size, number of aphid individuals per test plant. Theoretical individual transmission rate (π) was deduced from formula , $TR = 1-(1-\pi)^n$, knowing TR and n .

				Aphid batch size (n)						
Experiment		AAP	IAP	1	5	10	20	30	40	100
Number of infected plants / Number of tested plants	Test 1	3	5	4/43						
	Test 2	2	5	2/30	6/20					
	Test 3	3	5	1/10	3/10	5/10	3/7			
	Test 4	3	5	1/10	1/10	4/10	5/10	4/7		
	Test 5	3	4			4/11				6/6
	Test 6	4	5	1/35						
	Test 7	3	5	1/37						
	Test 8	3	2		3/10				8/10	
Total		2-4	2-5	10/165	13/50	13/31	8/17	4/7	8/10	6/6

% infected plants	Test 1	3	5	9.30						
	Test 2	2	5	6.66	30.00					
	Test 3	3	5	10.00	30.00	50.00	42.86			
	Test 4	3	5	10.00	10.00	40.00	50.00	57.14		
	Test 5	3	4			36.36				100.00
	Test 6	4	5	2.86						
	Test 7	3	5	2.70						
	Test 8	3	2		30.00				80.00	
N				6	4	3	2	1	1	1

Transmission rate (TR)	Min.			2.70	10.00	36.36	42.86			
	Max.			10.00	30.00	50.00	50.00			
	Mean	2-4	2-5	6.06	26.00	41.93	47.06	57.14	80.00	100.00
	SE			1.40	5.00	4.08	3.57			




Individual transmission rate (π)				6.1%	5.8%	5.3%	3.1%	2.8%	3.9%	-
--	--	--	--	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	----------

Chapitre 3 :

Etude de la co-acquisition et de la co-transmission d'un nanovirus et d'un géminivirus par le même puceron vecteur

Article

Co-Acquired Nanovirus and Geminivirus Exhibit a Contrasted Localization within Their Common Aphid Vector

Jérémy Di Mattia ^{1,†}, Faustine Ryckebusch ^{1,†}, Marie-Stéphanie Vernerey ¹, Elodie Pirolles ¹, Nicolas Sauvion ¹ , Michel Peterschmitt ¹, Jean-Louis Zeddam ^{1,2}  and Stéphane Blanc ^{1,*} 

¹ UMR BGPI, Univ. Montpellier, INRAE, CIRAD, Montpellier SupAgro, 34398 Montpellier, France; jeremydimattia@gmail.com (J.D.M.); faustine.ryckebusch@cirad.fr (F.R.); marie-stephanie.vernerey@inra.fr (M.-S.V.); elodie.pirolles@inra.fr (E.P.); nicolas.sauvion@inra.fr (N.S.); michel.peterschmitt@cirad.fr (M.P.); Jean-Louis.Zeddam@ird.fr (J.-L.Z.)

² UMR IPME, Univ. Montpellier, IRD, CIRAD, 34398 Montpellier, France

* Correspondence: stephane.blanc@inrae.fr

† These authors contributed equally to this work.

Received: 16 January 2020; Accepted: 22 February 2020; Published: 10 March 2020



Abstract: Single-stranded DNA (ssDNA) plant viruses belong to the families *Geminiviridae* and *Nanoviridae*. They are transmitted by Hemipteran insects in a circulative, mostly non-propagative, manner. While geminiviruses are transmitted by leafhoppers, treehoppers, whiteflies and aphids, nanoviruses are transmitted exclusively by aphids. Circulative transmission involves complex virus–vector interactions in which epithelial cells have to be crossed and defense mechanisms counteracted. Vector taxa are considered a relevant taxonomic criterion for virus classification, indicating that viruses can evolve specific interactions with their vectors. Thus, we predicted that, although nanoviruses and geminiviruses represent related viral families, they have evolved distinct interactions with their vector. This prediction is also supported by the non-structural Nuclear Shuttle Protein (NSP) that is involved in vector transmission in nanoviruses but has no similar function in geminiviruses. Thanks to the recent discovery of aphid-transmitted geminiviruses, this prediction could be tested for the geminivirus alfalfa leaf curl virus (ALCV) and the nanovirus faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) in their common vector, *Aphis craccivora*. Estimations of viral load in midgut and head of aphids, precise localization of viral DNA in cells of insect vectors and host plants, and virus transmission tests revealed that the pathway of the two viruses across the body of their common vector differs both quantitatively and qualitatively.

Keywords: fluorescent in situ hybridization; qPCR; leaf discs; Hemiptera; nanovirus; geminivirus; vector transmission

1. Introduction

All ssDNA plant viruses belong to the families *Geminiviridae* and *Nanoviridae* and are transmitted by hemipteran vectors in a circulative, mostly non-propagative, manner [1,2], meaning that they persist and cycle within the body of their vectors without replication [3,4]. While nanoviruses are transmitted exclusively by insects of the family *Aphididae* (aphids) [5], geminiviruses are transmitted by three other hemipteran families: *Cicadellidae* (leafhoppers), *Membracidae* (treehoppers) and *Aleyrodidae* (whiteflies) [6–8]. Circulative transmission involves sophisticated virus–vector interactions in which viruses can cross insect epithelial membranes and escape intracellular degradation pathways and other insect immune defense mechanisms [9]. The fact that vector specificity can be used as a discriminating criterion for taxonomic assignment, particularly in the family *Geminiviridae* [10], reveals that vectors can

structure virus populations via transmission specialization. While geminivirus-associated diseases have been studied for more than 100 years, a new genus had to be created recently in the family *Geminiviridae* (the genus *Capulavirus*) to accommodate the newly discovered aphid-transmitted species [11]. Alfalfa leaf curl virus was the first geminivirus for which aphid transmission was demonstrated, and its transmission by *Aphis craccivora* (Koch, 1854) was shown to be highly specific [12]. Unexpectedly, the transmission rate of ALCV per individual aphid was much lower than that of whitefly- and leafhopper-transmitted geminiviruses [13]. While ALCV was acquired and stably retained in midguts, the viral content in heads was relatively low and decreased over time, suggesting a low viral flow from the aphid body into the saliva [13]. Considering the late discovery of this genus, which may reflect a slow dissemination to, and within, cultivated hosts, these authors discussed the intriguing hypothesis that geminiviruses may not readily evolve virus–vector interactions that lead to high transmission efficiencies in aphids. From that, it is tempting to speculate that nanoviruses, which are all transmitted by aphids, have evolved virus–vector interactions that differ from those evolved by capulaviruses. In this case, different transmission routes, as well as different transmission rates, may be expected.

Nanoviruses and most geminiviruses are reported to be restricted to phloem tissues of their host plants [14], and species of both groups have been detected in the anterior midgut (AMG) and principal salivary glands (PSG) of their aphid vector [12,15–17]. Despite these similarities, striking differences also exist, and can be expected to have a significant impact on transmission. While the genome of capulaviruses consists of only one ssDNA circle, that of nanoviruses has a multipartite organization and consists of eight ssDNA circles, each encapsidated individually in a distinct virus particle. Moreover, while the CP is the only geminivirus protein reported to interact with insect vectors [18,19], the NSP of nanoviruses has been shown to act as a helper factor for transmission [20,21] and is mandatory for accumulation of virus particles within the cells of the aphid AMG [22]. Thus, the different genome architecture, and the use of a helper factor for the transmission of nanoviruses but not of geminiviruses, is consistent with potentially different adaptations to vectors in these two viral families.

Here, we explore this prediction by making use of the fact that the ALCV (capulavirus) and the FBNSV (nanovirus) both share a common host (broad bean) and a common aphid vector (*Aphis craccivora*). Our results show that the ALCV- and FBNSV-vector interactions are different based on several features. First, DNA accumulation of ALCV in the midgut is about 10 times higher than that of FBNSV. Second, in situations of co-infection, although ALCV has an apparent negative impact on FBNSV accumulation in aphids, the transmission rate of the latter remains 2–10 times higher than that of the former. Third, in spite of higher accumulation in aphids, ALCV is excreted in the saliva in much lower amounts than FBNSV. Finally, while both viruses accumulate in the same cells in the aphid AMG, they do not co-localize within these cells, suggesting that they use distinct pathways during transcytosis.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material and Agro-Inoculation

Broad bean plants (*Vicia faba*, L. cv. “Séville”, Vilmorin, Paris, France) were maintained in growth chambers with 70% hygrometry, 26/20 °C day/night temperature and 13/11 h day/night photoperiod. The soil of each potted plant was sprayed with a 0.04% aqueous solution of Trigard 75 WP (ref: 24923, Syngenta®, Syngenta Global, Basel, Switzerland) to prevent development of sciarid flies.

The FBNSV agroinfectious clone was constructed earlier from an Ethiopian isolate [23]. It consists of eight distinct clones, each containing one of the eight FBNSV genome segments (C, M, N, R, S, U1, U2, U4) inserted as a head-to-tail dimer into the binary plasmid pBin19. Each of these eight plasmids were propagated into the COR308 strain of *Agrobacterium tumefaciens* and inoculated into plants as a mixture exactly as earlier described [24]. The agroinfectious clone of ALCV has also been previously described [11]. It consists of a tandem repeat of the whole genome sequence, inserted in the binary plasmid pCambia2300 and transformed in the C58 strain of *A. tumefaciens*, which can be inoculated

into plants as a single agrobacterial culture [12]. FBNSV and ALCV clones were used to agroinoculate 10-day-old plantlets. The OD₆₀₀ of agrobacteria cultures was monitored in order to inoculate the same amount (OD₆₀₀ between 2 and 3 units) of cells for each clone in all experiments. This resulted in a number of bacterial cells being infiltrated into the plant, equal to 1× for mono-infection with ALCV, to 8× for mono-infection with FBNSV, to 9× for co-infection with both viruses. In one test (as indicated in the Results), FBNSV was inoculated by viruliferous aphids with an inoculation access period (IAP) of 2 days on 8-day-old plantlets, prior to agro-inoculation with ALCV.

Mono-infected or co-infected plants were all analyzed by qPCR (see below) to confirm the presence of ALCV and of each of the eight components of FBNSV.

2.2. Aphid Rearing

Individuals of *A. craccivora* came from a clonal colony established previously [13], and were reared on healthy broad bean plants maintained under a 24/18 °C day/night temperature and a 16/8 h day/night photoperiod. Viruliferous aphid cohorts were derived from this colony by placing apterous adult females on broad bean plants infected for approx. 30 days with FBNSV, ALCV or both. For transmission tests, these apterous females were transferred onto healthy plantlets after a 3-day acquisition access period (AAP). For in situ hybridization, the apterous females were removed following the 3-day AAP, and their larvae were left to develop on the infected plants for a further 10 days. This procedure yielded young viruliferous adults that had been in contact with the virus(es) for a longer period, (i) allowing abundant virus accumulation in the gut and salivary glands, and (ii) increasing the likelihood of observing the association of viruses with intracellular compartments in a form in which they are durably stored.

2.3. Plant and Insect Dissections

Veins from the upper leaves of infected plants were collected with an adhesive tape following a published protocol [25]. The veins were then fixed overnight at 4 °C under gentle stirring in embryo dishes containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 0.2% Triton X-100 diluted in phosphate-buffered saline 1X pH 7.4 (PBS). Fixation was stopped by a 15-min incubation in 0.1 M glycine diluted in PBS followed by a washing step in PBS. To reduce chlorophyll autofluorescence, plant samples were incubated five times for 30 min each in a Carnoy solution containing 6 volumes of ethanol (EtOH), 3 volumes of chloroform and 1 volume of glacial acetic acid. This process was completed with a 1-h wash in absolute ethanol. Finally, fixed leaf veins were stored at 4 °C in PBS until use.

Between 30 and 50 viruliferous aphids, maintained for 10 days on an infected plant as described above, were placed for 48 h on healthy plants in order to clear the lumen from virus containing alimentary bolus. The AMG and PSG were then dissected in PBS by pulling the head off the abdomen with forceps. Organs were fixed in 4% PFA for 20 min and rinsed in 0.1 M glycine diluted in PBS for 15 min. After fixation, AMG and PSG were stored in PBS at 4 °C until use.

2.4. Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)

Virus DNA-specific fluorescent probes were prepared by random priming with the BioPrime DNA labeling system kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif, USA) as described [26]. Probes complementary to the ALCV CP gene incorporated Alexa Fluor 488-labeled dUTP (green), whereas those complementary to FBNSV incorporated Alexa Fluor 584-labeled dUTP (red). Probes were diluted 30 times before incubation with the samples. For FBNSV-infected plants, a mix of probes targeting the eight viral segments was used because infected cells do not necessarily contain all segments [27]. In aphids, U2- (green) and U4- (red) specific probes were used to co-localize FBNSV segments. In experiments assessing the co-localization of FBNSV and ALCV in midgut cells, only the U4-specific probe was used for FBNSV because it has previously been reported that AMG cells of viruliferous pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, always contain this (and likely all) FBNSV segments [22].

Prior to labeling, dissected insect organs or plant veins were incubated for 5 min at room temperature (RT) in 20 mM Tris-HCl hybridization buffer (pH 8) containing 0.9 M NaCl, 0.01% SDS and 30% formamide [28]. Samples were then incubated overnight at 37 °C with the diluted probes in hybridization buffer, and then rinsed 3 × 5 min at room temperature in the hybridization buffer followed by two final rinses for 10 min each in PBS.

Samples were mounted on microscope slides in Vectashield® antifade mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) containing 1.5 µg·mL⁻¹ of DAPI [26]. Observations were performed with a LSM700 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and all images were taken at a resolution of 1024 × 1024 pixels with a ×63 objective.

2.5. Viral DNA Extraction

For plants, three leaf discs of 0.6 cm diameter were squashed onto Whatman paper from the upper leaf-level of infected broad bean plants. Each Whatman paper disc was then deposited individually onto the filter of 200 µL micropipette tips and 100 µL of modified Edwards buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% SDS, 1% PVP40, 0.2% ascorbic acid) were added. For insects, groups of five heads or abdomens were ground with a plastic pestle in a 1.5 mL Eppendorf tube containing 100 µL of modified Edwards buffer (without ascorbic acid). Samples were similarly deposited onto the filter of 200 µL tips, and the homogenate was centrifuged directly into a PCR plate placed underneath, at 5000 g for 15 s. Finally, the DNA was precipitated with isopropanol, washed once with 70% EtOH and resuspended in 50 µL of distilled water before further processing [12].

2.6. Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Detection

ALCV and FBNSV DNAs were qPCR-detected and quantified in a LightCycler 480 thermocycler (Roche, Indianapolis, Ind, USA) using 2 µL total DNA extracts diluted 10-fold in H₂O. The LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit (Roche) was used according to the manufacturer's instructions with 5 µL of the 2X qPCR Mastermix, 0.3–0.6 µM final primers (0.3 µM final for segments C, M and S of FBNSV, 0.5 µM final for the other segments of FBNSV and 0.6 µM final for ALCV), complemented with H₂O to obtain 8 µL of final mix for 2 µL of DNA sample as matrix (10 µL total). The specific primers of FBNSV and ALCV used for the qPCR were described in references [12,24], respectively. Forty qPCR cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s and 72 °C for 10 s were applied to the samples. All samples were analyzed with two technical replicates.

Post-PCR data analyses were carried out as described [29]. The accumulation of ALCV is expressed as the number of copies of monopartite viral genomes. Accumulation of FBNSV is expressed as the sum of the number of copies of the eight genome segments.

2.7. Transmission Experiments

Apterous adult aphids were given a 3-day AAP on infected broad bean plants followed by a 3-day IAP on 10-day-old healthy broad bean plants with 10 individual aphids per test plant. IAP was stopped with a spray of insecticide (Pirimor–Certis®, Marguerittes, France), 1 g·L⁻¹ in water. At 21 days after the beginning of the IAP, the presence of FBNSV was checked visually by inspection of symptoms, and that of ALCV by qPCR. All transmission tests were carried out in the containment room where aphid colonies are maintained, with the exception of the fifth test, which was carried out in a containment chamber with 16 h light at 26 °C, and 8 h dark at 24 °C.

2.8. Leaf-Disc Inoculation Assay and Nested-PCR

Leaf-disc inoculation assays were performed to estimate the amount of viral DNA inoculated by aphids into plants. Leaf-discs of 2.5 cm diameter were maintained in 6-well cell culture plates, one disc per well, on 1.5% agarose + 2% Na₂SO₃ in PBS to limit drying and oxidation. A first experiment was performed under environmental conditions of the fifth transmission test. A second experiment was performed under the standard conditions of the aphid growth chambers. Aphids were given

a 3-day AAP on infected plants and then transferred onto healthy plants for 3 days to clear the gut lumen of virus material and thus prevent surface leaf-disc contamination by viruliferous honeydew. These “purged” aphids were transferred onto a first series of leaf-discs (10 individuals per disc) for an IAP of 24 h, and then moved to a second series of leaf discs for an additional IAP of 48 h. After aphid removal, the leaf discs were double washed in a detergent solution (Magister[®], company, Epernay, France)—detergent manual plunge—1:20 dilution in H₂O) followed by two rinses in H₂O to remove residual viral contamination by feces/honeydew. Between each wash, leaf-discs were further cleaned with a smooth paintbrush. Finally, to prepare the DNA extraction step, leaf-discs were placed in 2 mL microtubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with two metal beads of 3 mm diameter and Fontainebleau sand. Micro-tubes containing the samples were immersed in liquid nitrogen for flash freezing and stored at −80 °C if required. A volume of 750 µL of modified Edwards buffer was added in each tube where the frozen leaf discs were ground by shaking four to six times each for 20 s to obtain a homogeneous solution (FastPrep[®]-24, MP Biomedicals[®] Instrument IIIkirch-Graffenstaden, France). Total DNA was extracted using the Purelink[™] plant total DNA purification kit (Invitrogen) and qPCR was carried out on 100-fold diluted samples.

For nested-PCR experiments, the extracted DNA was purified a second time with the same Purelink[®] Plant total DNA kit (Invitrogen), and each sample was tested in triplicate to control the presence of ALCV. The GoTaq[®] G2 DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) was used according to the manufacturer’s instructions, using 1 µL of the double-purified DNA, 0.25 µL polymerase, 10 µL of 5× green GoTaq[®] reaction buffer, 38.25 µL H₂O, 0.5 µL dNTP and 0.5 µL of both forward and reverse primers at 10 mM. The primer pair used for the first PCR was: CP_ALCV_185-F 5′TGGAATATTGTGCTGCTTGG^{3′} (position 185 on the virus genome; forward orientation) and: CP_ALCV_1025-R 5′GTGGTCTATTCAGCAGTTGC^{3′} (position 1025; reverse orientation). The pair of primers for the second PCR was CP_ALCV_620-F 5′GAAGAGGGCGAAAACGACAG^{3′} (position 620 on the genome; forward) and CP_ALCV_969-R 5′ATTTTGGGACTTGTGCTCCA^{3′} (position 969; reverse). Each PCR was performed with 40 cycles of amplification: 98 °C for 2 min, 98 °C for 20 s, 58 °C for 20 s, 72 °C for 1 min and 72 °C for 5 min.

2.9. Statistical Analysis

All statistical analyses were conducted with the package *stats* of the R software package, v3.5.0 [30]. As also indicated in the figure legends, boxplots display DNA quantification in source plants performed on $n = 9$, $n = 11$ and $n = 19$ plants infected, respectively, with FBNSV, ALCV and both viruses. Differences in the amounts of each virus DNA in abdomens and heads were tested with a Tukey HSD test on the transformed log₁₀ values. ANOVA were performed with the virus (ALCV or FBNSV), the “organ” (abdomen or head) and the type of infection (mono- or co-infection) as the tested variables.

3. Results

3.1. FBNSV and ALCV Can Co-Infect Plants and Cells within These Plants

Both FBNSV and ALCV can individually infect broad bean [11,31]. To investigate and compare the mechanisms of their transmission, we first evaluated whether they can co-infect the same individual host plants, from which they could be concomitantly/simultaneously acquired by the insect vector. When agro-inoculated alone, the mean infection rate was 41%^(+/-33%) for FBNSV and 93%^(+/-12%) for ALCV (percent calculated from five experiments with 96 plants per experiment for FBNSV and 24 plants per experiment for ALCV). When co-agroinoculated, 9%^(+/-2%) of the plants were co-infected, while FBNSV was found in 31%^(+/-20%) and ALCV in 66%^(+/-18%) (percent calculated from five experiments with 48–72 agro-inoculated plants per experiment). This slightly lower infection rate of both FBNSV and ALCV when co-agroinoculated could stem from the trivial fact that the total amount of bacteria agro-inoculated per plant differs greatly in mono- and co-inoculation (see Materials and Methods). We did not investigate this specific point further because our primary goal was to obtain co-infected

plants for further characterization. More important is the observation of identical symptoms in mono- and co-infected plants (Figure 1A) and the absence of interference between the two viruses for accumulation in plant tissues. Indeed, at 21 days post infection (dpi), both viruses accumulated similarly in mono- and co-infections (p -value = 0.15 and 0.40 for FBNSV and ALCV, respectively), with ALCV reaching a viral load about 100 times that of FBNSV in all cases (Figure 1B).

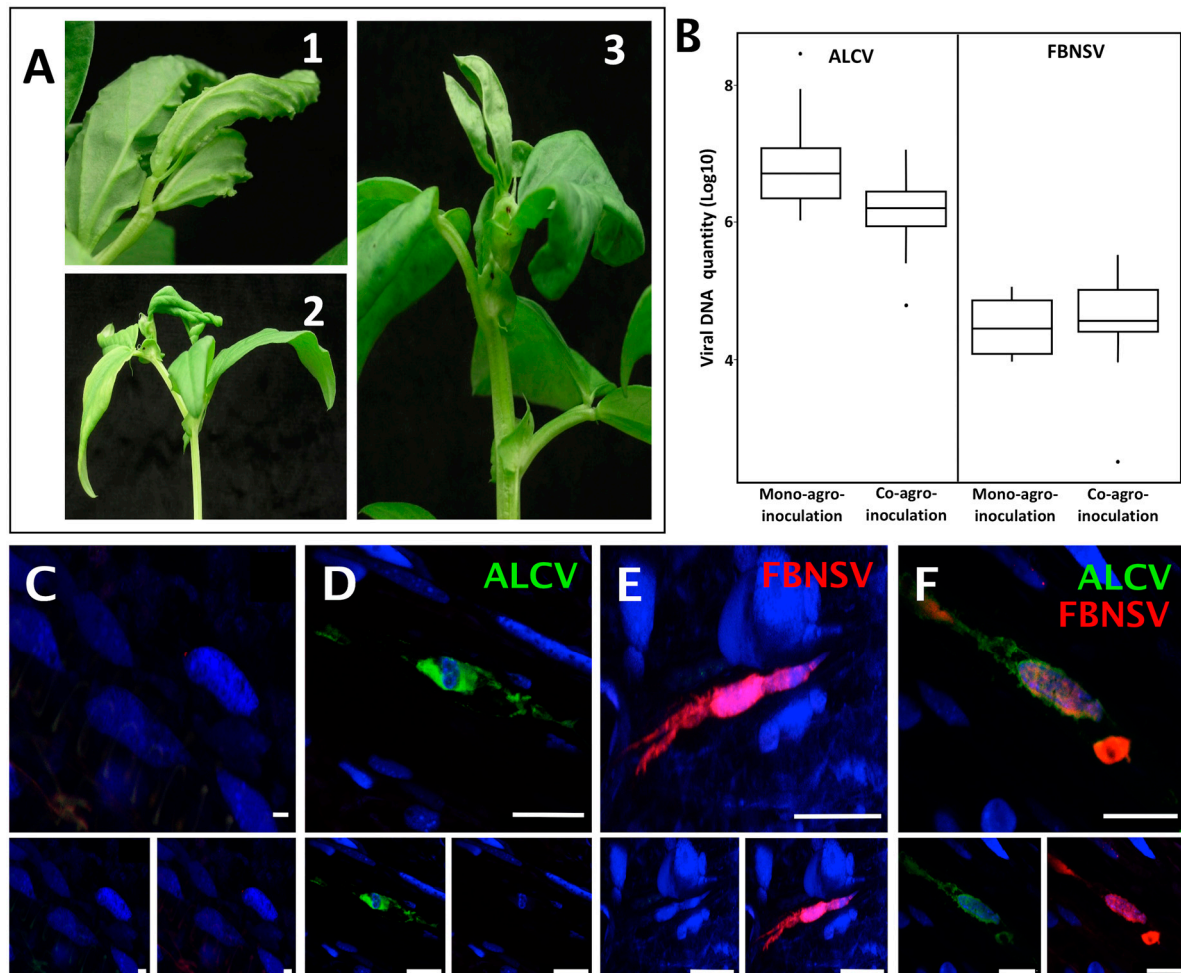


Figure 1. Localization of FBNSV and ALCV DNA in broad bean host plants. Visualization of ALCV symptoms (A1) and FBNSV symptoms (A2) on late stage of infection on broad bean plants, where symptoms are easier to see, and ALCV + FBNSV symptoms (A3) on early stage of infection, when over-curling of leaves due to FBNSV do not yet totally mask ALCV-associated vein swelling. (B) Box-plots of viral DNA amounts (log₁₀ of the copy number, see Materials and Methods) of each virus in mono- and co-agro-inoculated broad bean plants. The box-plot on the mono- and co-infected plants represent $n = 9$ for FBNSV, $n = 11$ for ALCV and $n = 15$ for co-infected plants, respectively. C to F: Localization of ALCV DNA (green probe) and FBNSV DNA (8 segments labeled, red probe) in phloem tissues of broad bean plants either mock infected (C), or co-infected with the two viruses (D–F). Most cells contain either ALCV (D) or FBNSV (E) alone, but they can also occasionally be co-infected (F). Top panel in C to D are images with merged color channels and the corresponding split channels are at the bottom left (green) and right (red). Each image corresponds to maximum intensity projections. The scale bar of each image represents 25 μ m. Cell nuclei are DAPI blue-stained.

The localization of ALCV and FBNSV was determined in co-infected plant tissues by in situ hybridization. ALCV and FBNSV DNAs were both detected in phloem vessels, most likely in companion cells, but only in some infected areas, with a large proportion of the observed cells being void of viruses. Because the two viruses appear to infect only a fraction of the susceptible cells—a

phenomenon already reported for FBNSV [27]—it follows that they are often found alone (Figure 1D–E) and only occasionally together (Figure 1F).

Overall, our results demonstrate not only that FBNSV and ALCV can co-exist in the same host plant, where they accumulate as if infecting alone, but also that these viruses can co-exist in the same individual cells of these plants, suggesting little or no interference during the colonization process. Plants in which both viruses co-circulate in the sieve elements can act as source plants for concomitant virus acquisition by the aphid vector.

3.2. FBNSV and ALCV Are Co-Acquired from Co-Infected Plants

The circulative, non-propagative transmission of ALCV and FBNSV in aphids was documented recently, in independent studies, and the route of the two viruses within the vector appears strikingly similar [12,22]. Here, to test for potential interference during virus intake, we measured the viral load in aphid vectors after a 3-day AAP on mono- or co-infected plants. When acquired from mono-infected plants, ALCV accumulated in the abdomen to higher levels than FBNSV (Figure 2), likely reflecting its higher accumulation within co-infected plants (Figure 1B). Interestingly, this discrepancy was no longer observed in the heads, suggesting a lower flow of ALCV than of FBNSV between the aphid gut and salivary glands.

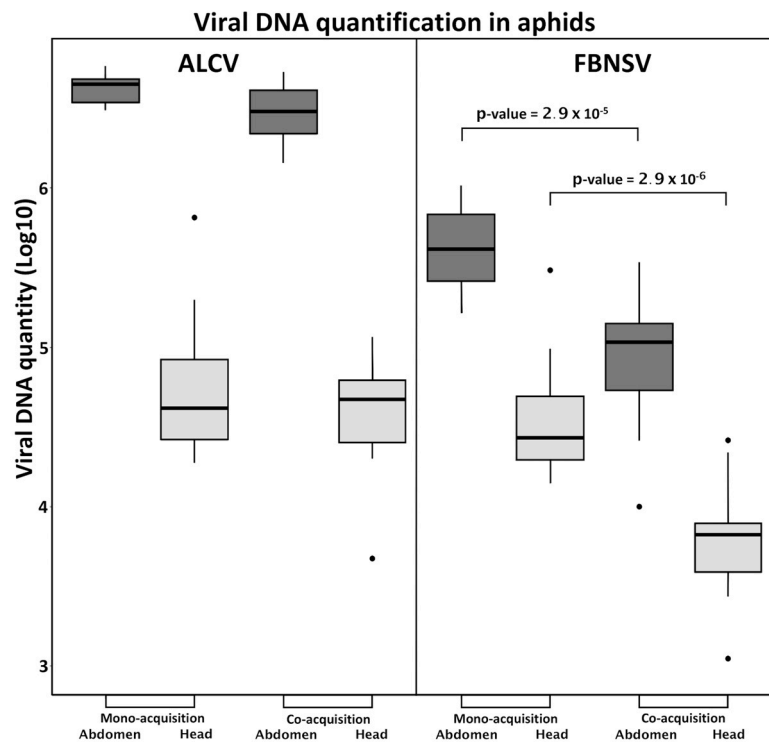


Figure 2. Accumulation of FBNSV and ALCV in aphid vectors. The box-plots represent the amounts of viral DNA (log₁₀ of copy number) of ALCV and FBNSV in the abdomens (dark grey) and heads (light grey) of *A. craccivora*. The box-plots are from pools of five abdomens or heads with $n = 11$ for mono-infection and $n = 15$ for coinfection. p -values given result from testing the differences in FBNSV DNA amounts in heads or abdomens of aphids that have acquired FBNSV from mono-infected versus co-infected plants.

When acquired from co-infected plants, FBNSV and ALCV were both detected in heads and abdomens, indicating that the acquisition and transit from gut to salivary glands of one virus does not preclude that of the other (Figure 2). When considering the amounts accumulated, however, ALCV was not affected by co-infection, whereas FBNSV decreased by about one order of magnitude, both in

the abdomen, and likely also in the head. This reduced accumulation of FBNSV in the presence of ALCV is discussed further below.

3.3. FBNSV and ALCV Accumulate in Distinct Cytoplasmic Aggregates in Aphid Gut Cells

The two viruses were localized precisely in cells of the AMG of individual aphids that fed on co-infected plants, as reported earlier for aphids fed on plants singly infected with either FBNSV [22] or ALCV [12]. Both viruses were detected in the majority of individual AMG cells, indicating that they are not mutually exclusive (Figure 3).

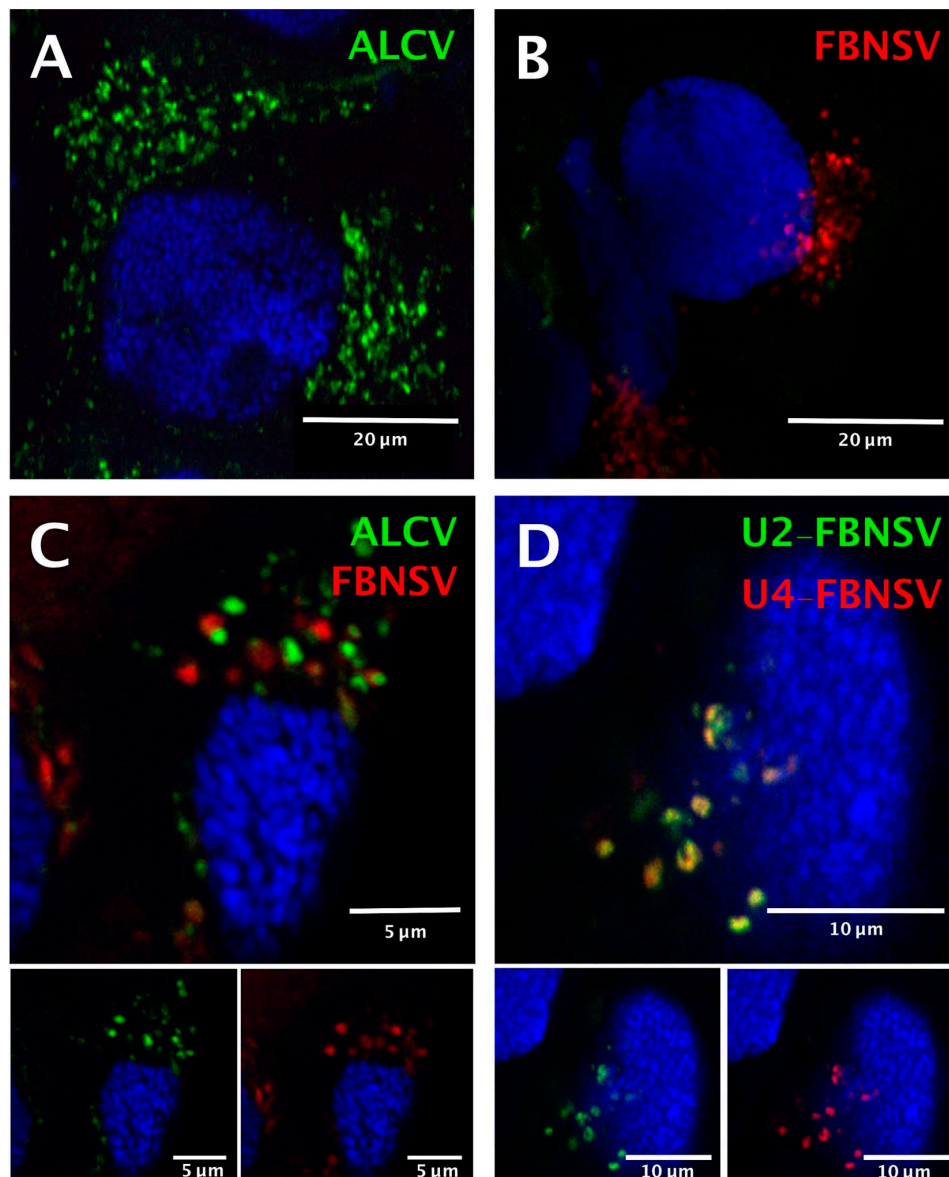


Figure 3. Localization of ALCV and FBNSV DNA in anterior midgut cells of *A. craccivora*. Co-labeling of ALCV (green) and FBNSV (8 segments probes, red) in aphids fed on plants infected with ALCV alone (A), FBNSV alone (B), or with both viruses (C). Co-labeling of the two FBNSV segments U2 (green) and U4 (red) in aphids fed on plants co-infected by FBNSV and ALCV (D). Top panels in C and D are images with merged color channels, and the corresponding split channels are at the bottom left (green) and right (red). Images A and B correspond to maximum intensity projections and images C and D to single optical sections. Cell nuclei are blue-stained with DAPI.

Because the insects were killed and processed for FISH analysis 2 days after the end of the AAP, after a “purging” period on healthy plants, detection of the two viruses confirms that neither entry nor persistence is hindered by co-infection. The intra-cellular FBNSV and ALCV aggregates (fluorescent foci) that were detected in the same individual gut cells were similar in size and shape, and were distributed predominantly around the nucleus (Figure 3C), just as in aphids fed on singly infected plants (Figure 3A,B). Remarkably, each aggregate was strictly specific to either ALCV or FBNSV, and the respective fluorescent labeling never overlapped (Figure 3C).

As a control for this observation, we made use of the fact that, in aphids fed on co-infected plants, the ingested sap contains ALCV particles as well as FBNSV particles representing encapsidation of individual distinct segments. While particles of the two viral species apparently segregate upon internalization in AMG cells, particles of FBNSV containing distinct segments do not, as recently demonstrated in the aphid *A. pisum* [22]. In the same *A. craccivora* cohort as that used to localize ALCV and FBNSV simultaneously (Figure 3C), we also specifically labeled two distinct segments of FBNSV, namely U2 and U4, and confirmed that they enter cells and accumulate together (Figure 3D). This result elegantly illustrates that when the aphid vector ingests a fluid containing a mixture of virions of the two species (the sap of co-infected plants), FBNSV particles all follow the same intracellular pathway, whatever segment they contain, and that this pathway is different from that followed by ALCV particles.

3.4. FBNSV and ALCV Are Both Released Together with the Aphid Saliva

The FBNSV content of *A. craccivora* individuals fed on co-infected plants was about 10 times lower than that of those fed on mono-infected plants (Figure 2), including the heads, and thus likely the salivary glands. To test the potential effect of this lower FBNSV content on transmission, we first carried out an inoculation assay on broad bean leaf discs, as described in Section 2. FBNSV DNA was readily detected by qPCR after a 24-h IAP in most leaf discs previously loaded with aphids fed on mono- or co-infected plants (Table 1).

Table 1. FBNSV and ALCV DNA detection in broad bean leaf discs after aphid inoculation.

	Detection	qPCR	Nested-PCR	qPCR	Nested-PCR
		24 h		48 h	
Mono-inoculation	ALCV ^a	0/25	0/25	2/38	9/38
	FBNSV ^b	6/6	nt	13/14	nt
Co-inoculation	ALCV ^c	0/26	0/26	0/41	5/41
	FBNSV ^d	24/26	nt	38/41	nt
	ALCV + FBNSV ^e	0/26		5/41	

^a Number of ALCV-positive leaf discs tested by qPCR or nested-PCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from mono-infected plants. ^b Number of FBNSV-positive leaf discs tested by qPCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from mono-infected plants. ^c Number of ALCV-positive leaf discs tested by qPCR or nested-PCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from co-infected plants. ^d Number of FBNSV-positive leaf discs tested by qPCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from co-infected plants. ^e Number of ALCV-(tested by nested-PCR) and FBNSV-positive (tested by qPCR) leaf discs after IAP of 24 or 48 h by aphids from co-infected plants.

In contrast, ALCV DNA could be detected by qPCR only after a longer IAP period of 48 h, in only 2 leaf-discs out of 38 tested in this condition, and only when aphids had previously acquired the virus from mono-infected plants. To confirm this unexpected low rate of ALCV inoculation with respect to its relatively high accumulation in aphid heads (Figure 2), the presence of ALCV DNA was further assessed by nested-PCR. With this more sensitive technique, all leaf-discs proved negative after a 24-h IAP, while a few gave a positive signal after the longer 48-h IAP, with aphids fed on either mono-infected (9/38) or co-infected (5/41) plants (Table 1).

In the case of co-infection, the five leaf-discs where ALCV DNA could be detected also contained FBNSV DNA (Table 1), showing that the two viruses can be secreted in the saliva of the same individual aphid. Interestingly, a Chi² test showed no statistical difference in the presence of ALCV or FBNSV DNA in leaf-discs whether aphids had previously been fed on mono- or co-infected plants (p -value = 0.24 and 1, respectively), revealing no interference between these viruses for inoculation success.

3.5. FBNSV Antagonizes ALCV at the Onset of Infection after Co-Transmission by Aphids

Finally, beyond release into leaf-discs, we tested whether ALCV can be transmitted effectively to plants when it is co-inoculated together with FBNSV by the aphid vector. Transmission tests from mono- and co-infected plants showed that FBNSV is always transmitted much more efficiently than ALCV (Table 2), consistent with their respective release into leaf discs (Table 1). Nevertheless, the ALCV transmission rate from mono-infected plants was significantly higher than that from co-infected plants (Table 2), which may be interpreted as a negative interference of FBNSV. Intriguingly, however, in the only two plants infected with ALCV in co-transmission experiments, FBNSV was not present. It is thus possible to imagine that FBNSV might only affect ALCV within the newly inoculated plant solely at the onset of infection, but not during the whole cycle within the vector.

Table 2. Co-transmission testing of FBNSV and ALCV.

Source Plants	Detection	Transmission Rate	
		Test 1-4	Test 5
Mono-inoculation	ALCV ^a	4/30	16/28
	FBNSV ^b	19/20	5/7
Co-inoculation	ALCV ^c	0/54	2/29
	FBNSV ^d	49/54	27/29
	ALCV + FBNSV ^e	0/54	0/29

^a Number of plants infected after transmission of ALCV from mono-infected plants. ^b Number of plants infected after transmission of FBNSV from mono-infected plants. ^c Number of plants infected by ALCV after transmission from co-infected plants. ^d Number of plants infected by FBNSV after transmission from co-infected plants. ^e Number of plants infected by ALCV and FBNSV after transmission from co-infected plants.

4. Discussion

Numerous studies and reviews have cited the common features of the two families *Geminiviridae* and *Nanoviridae* to assume similar mechanisms of transmission for all ssDNA plant viruses [1,2,32,33]. Because no gemini- and nanovirus members were known to share a common vector species, this assumption was difficult to confirm. The discovery of ALCV and its aphid vector opened, for the first time, the opportunity to compare the life cycle of a geminivirus (ALCV) and a nanovirus (FBNSV) within a common host plant and its common insect vector.

4.1. Co-Infection of Plants by a Nanovirus and a Geminivirus

Co-infections of plants are common, if not the rule, in nature [34]. Yet, to our knowledge, the co-acquisition and inoculation of ALCV and FBNSV by aphids is the first report of co-circulation within the same insect vector for circulative viruses that belong to different families. However, the frequent co-infection of whitefly-transmitted geminiviruses and nanovirus-like alphasatellites (formerly named DNA1) suggests that co-infection of geminiviruses and nanoviruses is a widespread phenomenon [35,36]. Alphasatellites have the highly conserved nanovirus-like sequence motif TAGTATTAC and a replication associated gene (Rep) homologous to that of nanoviruses, indicating that these satellites may have evolved from components of nanoviruses, perhaps from historical occurrences of co-infection [37]. The experimental co-infection of ALCV and FBNSV described in the present paper provides direct proof that gemini- and nano-viruses can co-infect plants. Moreover, the detection of co-infected cells within these plants is consistent with inter-family recombination,

as illustrated by the defective def19 DNA molecule found associated with a begomovirus [35]. In our experimental conditions, co-infection was possible only via co-agroinoculation. Co-infection by aphid vectors, although highly probable, remains to be confirmed.

4.2. Possible Interference between ALCV and FBNSV

The accumulation of FBNSV DNA in the abdomens and heads of aphid vectors was lower when FBNSV was co-acquired with ALCV. Several explanations can be proposed: (i) For unknown reasons, the accumulation of FBNSV could be lower in the sieve elements of plants co-infected with ALCV; a comparative quantification of FBNSV in total leaf tissues (as here) and phloem exudates could confirm or refute this hypothesis. (ii) The presence of ALCV could elicit insect defense mechanisms (e.g., autophagy) as shown for other geminiviruses [9], which might differentially affect FBNSV and ALCV. (iii) The two viruses could compete for entry and/or accumulation in aphid AMG cells [38], and ALCV could partially outcompete FBNSV. The latter seems improbable, however, since the two viruses seemingly use distinct entry and accumulation routes (see below).

The transmission results were quite unexpected. While the accumulation of ALCV DNA in the midgut is about 10 times higher than that of FBNSV, the latter is transmitted 2–10 times more efficiently than ALCV, irrespective of infection status. Unexpectedly, the negative impact of ALCV on FBNSV accumulation did not impair its excretion into leaf discs or its transmission. Also unexpected was the observation that, while the accumulation of ALCV is not affected by the presence of FBNSV, its transmission rate appears reduced. This cannot be explained by a deficiency in ALCV excretion, because no significant differences could be detected when comparing mono- and co-infection. Instead, we hypothesize that FBNSV might block an early step in ALCV infection in the host plant after co-inoculation by aphids. In support of this hypothesis, we observed that when FBNSV was inoculated earlier and in larger amounts in the leaf discs, test plants in co-transmission experiments became infected predominantly with FBNSV alone, with ALCV infecting only those rare plants where FBNSV infection failed.

4.3. Distinct Intracellular Pathways for Nanovirus and Capulavirus in the Insect Vector

Although ALCV and FBNSV infect the same cells of the AMG, they do not co-localize in the cytoplasm of these cells. This original observation is consistent with the prediction that geminiviruses and nanoviruses may follow distinct subcellular pathways across their insect vectors. Unfortunately, due to limited sensitivity and/or accessibility, viral DNAs were not detectable in PSG under our experimental conditions, as reported earlier [12,22].

The absence of intracellular colocalization of ALCV and FBNSV DNAs may reflect different transmembrane receptors that may, in turn, guide these viruses into distinct routes across the cells. The absence of homology between the proteins that are reported to bind putative insect receptors for geminiviruses (CP) [1,10,39] and nanoviruses (NSP) [20–22] is consistent with this interpretation. Other compelling evidence in support of this interpretation is that ALCV is specifically transmitted only by certain populations of *A. craccivora* [12], whereas FBNSV is more widely transmitted by *A. pisum*, *Myzus persicae* and *A. craccivora* [40]. Although several studies have analyzed insect–virus interactions in the two viral families [41–43], no receptor(s) have been identified so far. Thus, further effort is needed to confirm and provide experimental support to molecular models of the different transmission pathways adopted by nano- and geminiviruses as suggested here from comparison of FBNSV and ALCV.

5. Conclusions

Our results demonstrate that the transmission pathways of ALCV and FBNSV are qualitatively and quantitatively different in the vector *A. craccivora*. This original result is consistent with the prediction that geminiviruses and nanoviruses have evolved different virus–vector interactions. The low rate of ALCV transmission by aphids reported earlier [13] is confirmed here by comparison with a nanovirus under the same experimental conditions and with the same *A. craccivora* cohort. Altogether, these results

indicate that ALCV has not evolved virus–aphid interactions that readily lead to high transmission efficiencies. It is remarkable that the eight components of the nanovirus were conveyed from plant to plant by the aphid vector more easily than the unique capulavirus component.

Author Contributions: The following statements should be used Conceptualization, J.-L.Z., M.P., J.D.M., F.R. and S.B.; methodology, J.D.M., F.R., M.-S.V., E.P. and J.-L.Z.; validation, J.D.M., F.R., N.S., J.-L.Z., M.P. and S.B.; writing—original draft preparation, J.D.M.; writing—review and editing, J.-L.Z., M.P. and S.B.; supervision, J.-L.Z., M.P., N.S. and S.B.; project administration, M.P. and S.B.; funding acquisition, M.P. and S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: MP acknowledges support from CIRAD. S.B., M.S.V., E.P. and N.S. acknowledge support from INRAE, and J.-L.Z. from IRD This work was funded by French ANR grant N° ANR-18-CE92-0028-01.

Acknowledgments: We are grateful to Sophie Leblaye for plants and aphids production and maintenance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Hogenhout, S.A.; El Ammar, D.; Whitfield, A.E.; Redinbaugh, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2008**, *46*, 327–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blanc, S.; Drucker, M.; Uzest, M. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52*, 403–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ammar, E.D.; Gargani, D.; Lett, J.M.; Peterschmitt, M. Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 255–262. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Watanabe, S.; Bressan, A. Tropism, compartmentalization and retention of banana bunchy top virus (Nanoviridae) in the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 209–219. [[CrossRef](#)]
- Vetten, H.J.; Dale, J.L.; Grigoras, I.; Gronenborn, B.; Harding, R.; Randles, J.W.; Thomas, J.E.; Timchenko, T.; Yeh, H.H. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses: The 9th report of the ICTV. In *Nanoviridae*; King, A.M.Q., Lefkowitz, E.J., Adams, M.J., Carstens, E.B., Eds.; Elsevier-AP Press: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 395–404.
- Czosnek, H.; Ghanim, M. Back to Basics: Are Begomoviruses Whitefly Pathogens? *J. Integr. Agric.* **2012**, *11*, 225–234. [[CrossRef](#)]
- Varsani, A.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Hernandez-Zepeda, C.; Idris, A.; Brown, J.K.; Murilo Zerbini, F.; Martin, D.P. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 2193–2203. [[CrossRef](#)]
- Bejerman, N. *Geminivirus–Vector Relationship*; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 137–145. [[CrossRef](#)]
- Wang, L.L.; Wang, X.R.; Wei, X.M.; Huang, H.; Wu, J.X.; Chen, X.X.; Liu, S.S.; Wang, X.W. The autophagy pathway participates in resistance to tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies. *Autophagy* **2016**, *12*, 1560–1574. [[CrossRef](#)]
- Zerbini, F.M.; Briddon, R.W.; Idris, A.; Martin, D.P.; Moriones, E.; Navas-Castillo, J.; Rivera-Bustamante, R.; Roumagnac, P.; Varsani, A.; Ictv Report, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 131–133. [[CrossRef](#)]
- Roumagnac, P.; Granier, M.; Bernardo, P.; Deshoux, M.; Ferdinand, R.; Galzi, S.; Fernandez, E.; Julian, C.; Abt, I.; Filloux, D.; et al. Alfalfa Leaf Curl Virus: An Aphid-Transmitted Geminivirus. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9683–9688. [[CrossRef](#)]
- Ryckebusch, F.; Sauvion, N.; Granier, M.; Roumagnac, P.; Peterschmitt, M. Alfalfa leaf curl virus is transmitted by *Aphis craccivora* in a highly specific circulative manner. *BioRxiv* **2019**. (Under Review). [[CrossRef](#)]
- Ryckebusch, F.; Peterschmitt, M.; Granier, M.; Sauvion, N. Alfalfa leaf curl virus is efficiently acquired by its aphid vector *Aphis craccivora* but inefficiently transmitted. *BioRxiv* **2020**. (Under Review).
- Hipper, C.; Brault, V.; Ziegler-Graff, V.; Revers, F. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hunter, W.B.; Hiebert, E.; Webb, S.E.; Tsai, J.H.; Polston, J.E. Location of Geminiviruses in the Whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Dis.* **1998**, *82*, 1147–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

16. Bressan, A.; Watanabe, S. Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. *Virus Res.* **2011**, *155*, 520–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Wei, J.; Zhao, J.J.; Zhang, T.; Li, F.F.; Ghanim, M.; Zhou, X.P.; Ye, G.Y.; Liu, S.S.; Wang, X.W. Specific cells in the primary salivary glands of the whitefly *Bemisia tabaci* control retention and transmission of begomoviruses. *J. Virol.* **2014**, *88*, 13460–13468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Briddon, R.W.; Pinner, M.S.; Stanley, J.; Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **1990**, *177*, 85–94. [[CrossRef](#)]
19. Azzam, O.; Frazer, J.; de la Rosa, D.; Beaver, J.S.; Ahlquist, P.; Maxwell, D.P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **1994**, *204*, 289–296. [[CrossRef](#)]
20. Franz, A.W.; van der Wilk, F.; Verbeek, M.; Dullemans, A.M.; van den Heuvel, J.F. Faba bean necrotic yellows virus (genus *Nanovirus*) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology* **1999**, *262*, 210–219. [[CrossRef](#)]
21. Grigoras, I.; Vetten, H.J.; Commandeur, U.; Ziebell, H.; Gronenborn, B.; Timchenko, T. Nanovirus DNA-N encodes a protein mandatory for aphid transmission. *Virology* **2018**, *522*, 281–291. [[CrossRef](#)]
22. Di Mattia, J.; Vernerey, M.S.; Yvon, M.; Piroles, E.; Villegas, M.; Gaafar, Y.; Ziebell, H.; Michalakakis, Y.; Zeddani, J.L.; Blanc, S. Route of a multipartite (nano)virus across the body of its aphid vector. *J. Virol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
23. Grigoras, I.; Timchenko, T.; Katul, L.; Grande-Perez, A.; Vetten, H.J.; Gronenborn, B. Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *J. Virol.* **2009**, *83*, 10778–10787. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sicard, A.; Yvon, M.; Timchenko, T.; Gronenborn, B.; Michalakakis, Y.; Gutierrez, S.; Blanc, S. Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Boissinot, S.; Pichon, E.; Sorin, C.; Piccini, C.; Scheidecker, D.; Ziegler-Graff, V.; Brault, V. Systemic propagation of a fluorescent infectious clone of a polerovirus following inoculation by agrobacteria and aphids. *Viruses* **2017**, *9*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Vernerey, M.S.; Piroles, E.; Sicard, A.; Blanc, S. Localizing Genome Segments and Protein Products of a Multipartite Virus in Host Plant Cells. *Bio-Protocol* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)]
27. Sicard, A.; Piroles, E.; Gallet, R.; Vernerey, M.S.; Yvon, M.; Urbino, C.; Peterschmitt, M.; Gutierrez, S.; Michalakakis, Y.; Blanc, S. A multicellular way of life for a multipartite virus. *eLife* **2019**, *8*, e43599. [[CrossRef](#)]
28. Ghanim, M.; Brumin, M.; Popovski, S. A simple, rapid and inexpensive method for localization of Tomato yellow leaf curl virus and *Potato leafroll* virus in plant and insect vectors. *J. Virol. Methods* **2009**, *159*, 311–314. [[CrossRef](#)]
29. Gallet, R.; Fabre, F.; Michalakakis, Y.; Blanc, S. The number of target molecules of the amplification step limits accuracy and sensitivity in ultra deep sequencing viral population studies. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00561-17. [[CrossRef](#)]
30. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017; Available online: <http://www.r-project.org> (accessed on 14 December 2019).
31. Franz, A.; Makkouk, K.M.; Vetten, H.J. Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean. *Phytopathol. Mediterr.* **1997**, *36*, 94–103.
32. Gronenborn, B. Nanoviruses: Genome organisation and protein function. *Vet. Microbiol.* **2004**, *98*, 103–109. [[CrossRef](#)]
33. Timchenko, T.; Bernardi, F. Les nanovirus, petits virus de plantes: Similitudes et différences avec les géminivirus. *Virologie* **2007**, *11*, 27–42. [[CrossRef](#)]
34. Moreno, A.B.; Lopez-Moya, J.J. When viruses play team sports: Mixed infections in plants. *Phytopathology* **2020**, *110*, 29–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Saunders, K.; Stanley, J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* **1999**, *264*, 142–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mansoor, S.; Khan, S.H.; Hussain, M.; Zafar, Y.; Pinner, M.S.; Briddon, R.W.; Stanley, J.; Markham, P.G. Association of a begomovirus and nanovirus-like molecule with *Ageratum* Yellow Vein Disease in Pakistan. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Stanley, J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Vet. Microbiol.* **2004**, *98*, 121–129. [[CrossRef](#)]
38. Simon, K.O.; Cardamone, J.J., Jr.; Whitaker-Dowling, P.A.; Youngner, J.S.; Widnell, C.C. Cellular mechanisms in the superinfection exclusion of vesicular stomatitis virus. *Virology* **1990**, *177*, 375–379. [[CrossRef](#)]
39. Gray, S.; Cilia, M.; Ghanim, M. Circulative, “nonpropagative” virus transmission: An orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Adv. Virus Res.* **2014**, *89*, 141–199. [[CrossRef](#)]
40. Sicard, A.; Zeddani, J.L.; Yvon, M.; Michalakis, Y.; Gutierrez, S.; Blanc, S. Circulative nonpropagative aphid transmission of nanoviruses: An oversimplified view. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9719–9726. [[CrossRef](#)]
41. Watanabe, S.; Borthakur, D.; Bressan, A. Localization of Banana bunchy top virus and cellular compartments in gut and salivary gland tissues of the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *Insect Sci.* **2016**, *23*, 591–602. [[CrossRef](#)]
42. Pan, L.L.; Chen, Q.F.; Zhao, J.J.; Guo, T.; Wang, X.W.; Hariton-Shalev, A.; Czosnek, H.; Liu, S.S. Clathrin-mediated endocytosis is involved in Tomato yellow leaf curl virus transport across the midgut barrier of its whitefly vector. *Virology* **2017**, *502*, 152–159. [[CrossRef](#)]
43. Xia, W.Q.; Liang, Y.; Chi, Y.; Pan, L.L.; Zhao, J.; Liu, S.S.; Wang, X.W. Intracellular trafficking of begomoviruses in the midgut cells of their insect vector. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1006866. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Chapitre 4 :

**Recherche d'interactants potentiels des
capulavirus avec leur puceron vecteur**

I. Contexte

La transmission dite circulante non-propagative est une spécificité des virus de plante. Elle s'apparente à la transmission non-circulante par le caractère non-propagatif du virus, et la transmission circulante multipliante par le caractère invasif du virus. L'évolution d'un virus permettant d'aboutir à un tel mode de transmission paraît complexe. Il faut tout à la fois réussir à franchir des épithéliums sans finir dans une voie de dégradation des lysosomes et entrer dans un mécanisme de circulation vers les glandes salivaires, sans être contrarié par les réactions de défense du vecteur. On s'attend à ce qu'une transmission aussi singulière soit déterminée par des interactions virus-vecteur d'une grande spécificité. Aussi, dans cette dernière partie de ma thèse je me suis appliquée à identifier des récepteurs de géminivirus chez les hémiptères. A terme, l'application serait de parvenir à bloquer ou modifier ces récepteurs pour empêcher la transmission des géminivirus par les hémiptères. Il est supposé que les protéines qui peuvent être impliquées dans la reconnaissance du virus se trouvent là où le virus circule dans le corps de l'insecte, c'est à dire dans le tube digestif, dans les glandes salivaires et peut-être dans l'hémolymphe. Pour les géminivirus, la principale barrière à la transmission a été décrite au niveau du tube digestif. C'est donc dans cet organe que des interactants protéiques ont été recherchés. Entreprendre une telle étude pour les capulavirus était de nature à nourrir quelques espoirs de faire avancer la connaissance de la transmission circulante des géminivirus dans leur ensemble. En effet, contrairement aux ressources disponibles sur les vecteurs des autres géminivirus, les ressources génétiques chez les pucerons sont très étendues y compris dans le genre *Aphis* dans lequel des représentants de plusieurs espèces ont été entièrement séquencés et leurs génomes annotés par homologie de séquence. La protéine de capsid est la seule protéine structurale des géminivirus. Des travaux ont montré qu'elle détermine la spécificité de transmission et la pénétration de la particule virale dans les cellules épithéliales du tube digestif de l'insecte vecteur. C'est donc très logiquement que le criblage d'interactants a été réalisé avec la CP de l'ALCV, face à une banque de protéines produites à partir de transcrits issues des tubes digestifs du puceron vecteur de l'ALCV, *A. craccivora*. Ce criblage a été opéré par la technique du double hybride en levure à laquelle Baptiste Monsion, ancien post-doctorant de l'équipe m'a initié. Je tiens aussi à notifier que toutes les expériences qui y figurent sont le fruit d'un travail collaboratif au sein de mon équipe avec Jeremy Di Mattia, et Jean-Louis Zeddani, un chercheur IRD de l'équipe. Ces derniers ont en parallèle procédé au criblage de la banque d'ADNc de *A. craccivora* face à la CP et à la NSP du FBNSV (famille *Nanoviridae*).

II. Principe du système double-hybride en levure

1. Principe général

La technique dite “double hybride en levure” (Yeast two-hybrid system (Y2H)) consiste à produire au sein d’une levure une protéine d’intérêt (appât) que l’on expose à une banque de peptides (proies) produite à partir d’une banque de ADNc dérivée des transcrits d’un organe d’intérêt. Par l’intermédiaire d’un gène rapporteur qui n’est activé qu’en cas d’interaction appât-proie, les peptides de la banque peuvent être criblés à grande échelle dans des levures co-transformées avec d’une part le plasmide recombinant contenant le gène de l’appât, et avec d’autre part la gamme de plasmides recombinants qui contiennent les ADNc proies.

2. Principe de la technique classique

Le système est basé sur le fait que pour certains facteurs de transcription les deux domaines protéiques peuvent être séparés, domaine de liaison à l’ADN (DNA binding domain, DBD) et domaine d’activation de transcription (activation domain, AD). Le domaine de liaison à l’ADN seul ne peut pas induire la transcription du gène rapporteur. Cette transcription ne sera théoriquement possible que si l’intégrité du facteur de transcription est restauré par le rapprochement du domaine DBD avec le domaine AD. Dans le système Y2H classique (**Fig. 33**), le gène d’intérêt codant pour l’appât est cloné en phase avec une séquence codant pour le domaine de liaison à l’ADN d’un facteur de transcription d’un gène rapporteur. Le domaine AD est porté par le plasmide recombinant utilisé pour cloner la banque de ADNc. Le rapprochement DBD-AD ne sera théoriquement possible que si appât et proie ont la capacité d’interagir. Dans ce cas le gène rapporteur sera transcrit et la colonie dans laquelle cette interaction a eu lieu pourra être repérée.

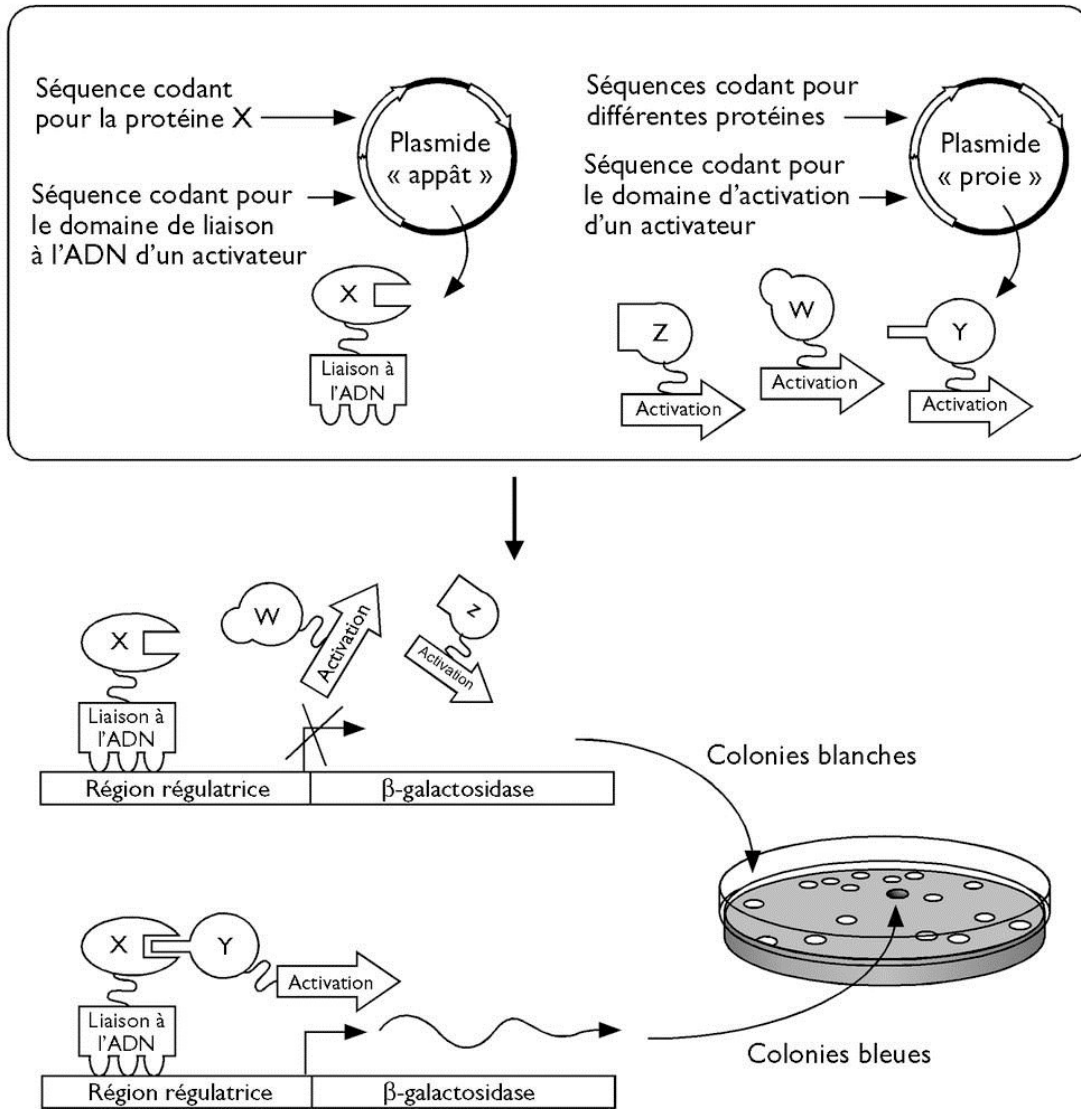


Figure 33 : Schéma du système double-hybride classique. La protéine d'intérêt (X) est fusionnée à son extrémité N-terminale à un domaine de liaison à ADN de facteur de transcription d'un gène rapporteur. Une proie est exprimée en tant que protéine de fusion à un domaine d'activation de ce facteur de transcription. La proie va dans le noyau où se trouve aussi la protéine appât qui est accroché à la région régulatrice du gène rapporteur. Dans le cadre d'une interaction entre la protéine appât et la protéine proie, le domaine de liaison à l'ADN et domaine d'activation de la transcription vont se rapprocher ce qui va provoquer l'activation de la transcription du gène rapporteur. Sur l'exemple du schéma, le gène rapporteur est celui de la Béta-galactosidase. L'activation de la transcription de ce gène provoque l'accumulation d'un composé bleu dans les levures correspondantes.

3. Variante split-ubiquitine

La technique classique du double-hybride en levure rappelée brièvement ci-dessus, permet la reconnaissance entre la protéine appât (qui est fusionnée au domaine de liaison à ADN et donc se trouve fixée à l'ADN dans le noyau de la levure) et la protéine proie à condition que celle-ci soit soluble et qu'elle puisse se déplacer dans le noyau. Toutefois, ce système ne permet pas la reconnaissance de protéines insolubles et hydrophobes (ex: protéines enchassées dans une membrane) qui elles ne peuvent pas se déplacer dans le noyau pour activer la transcription. Or, dans notre cas, la recherche des récepteurs impliqués dans le passage du virion à travers la membrane plasmique apicale des cellules épithéliales du tube digestif implique très probablement une protéine membranaire présente à la surface de ces cellules. Dans ce contexte, nous nous sommes tournés vers la variante du système double-hybride classique en levure qui est le système split-ubiquitine. C'est un système qui favorise l'interaction de la protéine appât avec une protéine proie membranaire. Le principe de cette variante est basé sur une petite protéine conservée, l'ubiquitine qui est un acteur des voies de signalisation cellulaire. L'ubiquitine s'attache covalamment à une protéine cible et marque cette protéine pour la dégradation par le protéasome 26S. Elle ne peut effectuer cette action que si elle est entière, mais l'association physique de ses moitiés permet de restaurer cette activité. La variante split-ubiquitine du double-hybride prends appui sur la capacité de cette protéine à engendrer indirectement un clivage protéolytique. Dans ce système, le plasmide appât code pour la protéine d'intérêt mais code aussi, dans l'ordre d'apparition, pour la moitié C-terminale de la protéine ubiquitine (Cub), pour un domaine de fixation au gène rapporteur (LexA), et pour un domaine d'activation du gène rapporteur (VP16) (**Fig. 34**). Le plasmide proie code pour la protéine proie en fusion avec la moitié N-terminale de la protéine ubiquitine (Nub). L'interaction entre une protéine proie membranaire et une protéine appât peut avoir lieu dans ce système grâce à une petite protéine d'ancrage (yeast ER protein Ost4), fusionnée en N-terminale de la protéine de fusion Appât-Cub-LexA-VP16 et qui la maintient accrochée à une membrane dans le cytoplasme. Ainsi, l'interaction entre la protéine proie et la protéine appât accrochée à la membrane a lieu en dehors du noyau. La réunion de Cub et de Nub provoque le clivage protéolytique de la protéine de fusion ost4-Appât-Cub-LexA-VP16 qui résulte en la libération du complexe LexA-VP16. Ce complexe est transloqué vers le noyau et active la transcription du gène rapporteur.

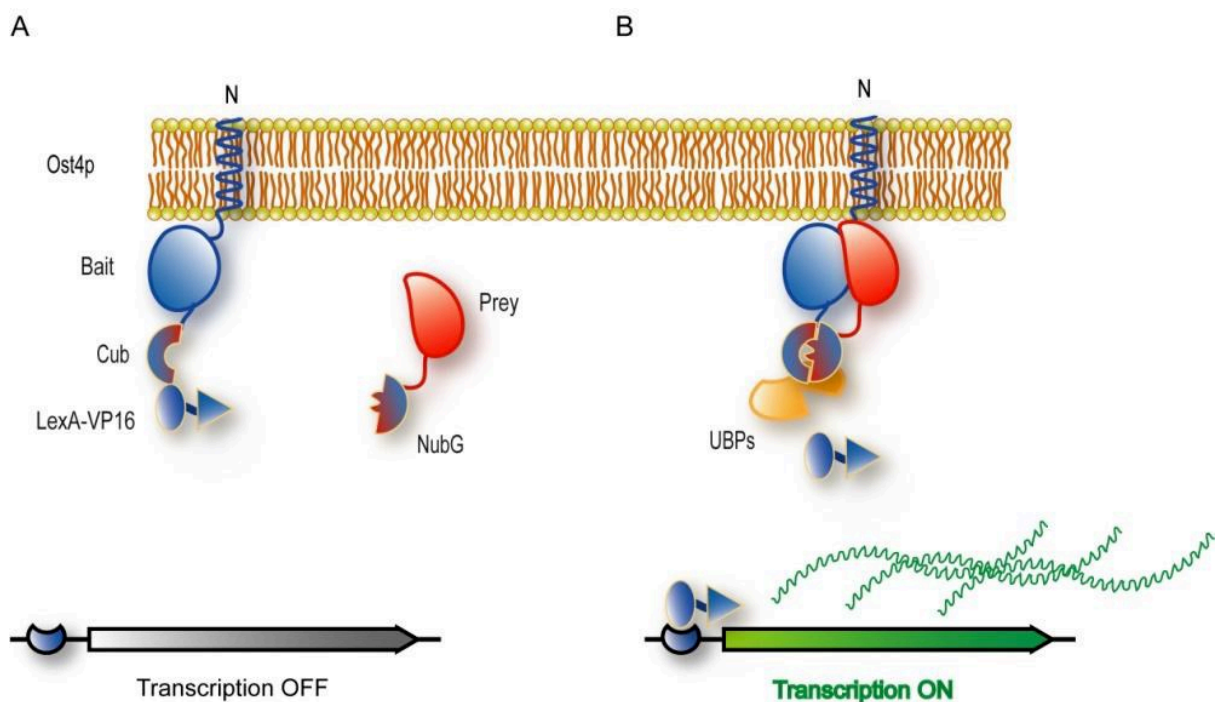


Figure 34 : Schéma représentant le fonctionnement du système double-hybride split ubiquitine en levure dans le kit DUALhunter. La protéine d'intérêt (appât) est fusionnée à son extrémité N-terminale à un petit peptide d'ancrage au réticulum endoplasmique (ost4p) et à son extrémité C-terminale à la moitié de l'ubiquitine (Cub) et à un facteur de transcription (LexA-VP16). Une proie est exprimée en tant que protéine de fusion à la partie mutée N-terminale de l'ubiquitine (NubG). L'interaction entre l'appât et la proie force le rapprochement de NubG et de Cub et résulte en la reconstitution de la split-ubiquitine. La split-ubiquitine est reconnue par des protéases spécifiques de l'ubiquitine qui vont cliver la chaîne polypeptidique qui relie Cub à LexA-VP16. En résultat, le facteur de la transcription est libéré et rejoint le noyau où il active certains gènes rapporteurs.

III. Principe de la sélection sur milieu auxotrophe du kit

DUALhunter

Les levures du kit DUALhunter (Dualsystems Biotech) dont je me suis servie pour réaliser mon criblage de la banque d'ADNc sont de la souche NMY51. Elles ne synthétisent pas le tryptophane, la leucine, l'histidine, et l'adénine. Ainsi, elles ne peuvent pousser que sur un milieu de base SD complétement avec ces quatre marqueurs d'auxotrophie. Le plasmide appât pDHB1 et le contrôle du kit pDHB1-largeT possède le marqueur auxotrophique de la leucine et permettent donc la synthèse de cet acide aminé. Cela a pour conséquence que la présence du plasmide pDHB1 dans la levure NMY51 lui apporte la capacité de pousser sur un milieu de base SD complétement avec seulement le tryptophane, l'histidine, et l'adénine, que l'on appellera SD-L. Le plasmide proie qui est dans le kit pPR3-N possède le marqueur auxotrophique de la tryptophane, ce qui signifie qu'il est capable de synthétiser cet acide aminé. Lorsque la levure NMY51 est transformée avec le plasmide appât pDHB1 et le plasmide proie pPR3-N, cela confère à la levure la capacité de croître sur un milieu de base SD complétement avec seulement de l'histidine et de l'adénine, que l'on appelle SD-TL. Si les deux protéines exprimées par le plasmide appât pDHB1 et le plasmide proie pPR3-N interagissent l'une avec l'autre, cela va permettre l'activation de la synthèse de l'histidine par la levure. Si cette interaction est forte, la levure sera en plus capable de synthétiser l'adénine. Dans ce cas précis, la levure pourra pousser sur un milieu minimum à savoir SD-TLHA.

IV. Protocole de mise en place du système double-hybride

split-ubiquitine

Les instructions du kit DUALhunter (Dualsystems Biotech) ont été suivies pour la majorité des étapes du protocole. Tous les protocoles sont disponibles dans la partie annexe à la fin de ce manuscrit. Les grandes étapes que nous avons suivies sont dans l'ordre :

- Vérification du génotype auxotrophe du clone de levure NMY51
- Construction du plasmide avec le gène de la protéine d'intérêt et vérification de l'expression de la protéine en levure
- Test d'interaction de notre protéine d'intérêt avec des protéines contrôles
- Mise au point de la stringence du milieu de criblage

- Criblage des interactions entre la protéine d'intérêt et les protéines exprimées par la banque d'ADNc
- Contrôle de l'intégration des plasmides de la banque d'ADNc dans les levures transformées
- Identification par séquençage des ADNcs des protéines candidates à l'interaction avec notre protéine d'intérêt
- Validation en levure de l'interaction des protéines candidates isolées, avec notre protéine d'intérêt
- Validation en levure de l'interaction spécifique des protéines candidates isolées
- Test préliminaire de validation en dehors du système double-hybride levure

Pour des raisons de confidentialité, le reste de ce chapitre n'est pas disponible dans la version diffusée publiquement.

Discussion générale

Il y a dix ans, les premiers capulavirus étaient mis au jour grâce aux techniques de métagénomique virale. Des analyses génomiques de ces virus ont donné lieu à la création du genre *Capulavirus*. Lors de mon arrivée en thèse fin 2016, Pauline Bernardo, ancienne doctorante de mon laboratoire venait de faire la découverte de la transmission d'un capulavirus par puceron. Ce résultat était très original puisque les insectes vecteurs de géminivirus connus jusqu'alors étaient des aleurodes, cicadelles et membracides. Mon projet de thèse s'est focalisé sur la caractérisation de la transmission de géminivirus par puceron à la fois pour estimer les risques épidémiologiques de ces virus et pour faire progresser la compréhension fondamentale de la biologie des géminivirus.

I. Epidémiologie de la transmission des capulavirus par puceron

1. Spécificité de la transmission vectorielle des capulavirus

Au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence que le vecteur de l'EcmLV était un puceron de l'espèce *A. craccivora* trouvé sur euphorbes. Ainsi, sur les quatre capulavirus connus, l'ALCV et l'EcmLV ont pour vecteur des pucerons de l'espèce *A. craccivora*. Nous soupçonnons fortement que *A. craccivora* soit aussi le vecteur du capulavirus trouvé sur haricot vert en Inde, le FbSLCV. La première raison est que les pucerons de l'espèce *A. craccivora* sont fréquents dans les champs de haricot vert ; comme la luzerne, ces plantes sont des fabacées, une famille de plantes particulièrement appréciée des pucerons de l'espèce *A. craccivora*. De plus, il est intéressant de noter que des infestations du puceron *A. craccivora* sont généralement constatées dans les champs de haricot vert, quelques semaines avant l'apparition des symptômes du FbSLCV. La seconde raison qui nous fait penser que le FbSLCV pourrait être transmis par *A. craccivora*, vient de la comparaison des séquences de la CP, le déterminant de la spécificité de transmission des géminivirus. En effet, comme l'homologie avec la CP de l'ALCV est plus forte pour la CP du FbSLCV que pour la CP de l'EcmLV, une transmission du FbSLCV par *A. craccivora* est une hypothèse très forte.

Concernant le PILV, nous avons montré au laboratoire que sa transmission par puceron était possible avec un clone infectieux, donc sans l'assistance d'un organisme tiers (virus, satellite...) que l'on pouvait suspecter dans la transmission d'un isolat naturel (Susi, 2019). De plus nous montrons que la transmission n'est pas spécifique d'une population finlandaise de

D. plantaginea car la transmission a été possible avec une population française. La transmission du PILV par des pucerons de l'espèce *A. craccivora*, était exclue du simple fait que cette espèce n'a jamais été décrite sur le plantain. Inversement les pucerons de l'espèce *D. plantaginea* ne peuvent pas être vecteur de capulavirus de fabacées car ils ne se nourrissent pas sur des plantes hôtes de cette famille végétale. C'est un puceron spécialiste qui alterne entre son hôte primaire le pommier et son hôte secondaire le plantain. Il n'est donc pas curieux de constater qu'à la différence des autres espèces de capulavirus, aucune recombinaison interspécifique du PILV avec une autre espèce de capulavirus n'a été démontrée puisque, vraisemblablement, ils ne partagent pas de plantes hôtes communes. Si le PILV est uniquement transmis par *D. plantaginea*, ces éléments laissent sous-entendre que ce virus pourrait infecter un nombre limité de plantes hôtes due à la spécialisation de son insecte vecteur. La découverte d'autres capulavirus sera nécessaire pour savoir si l'isolement évolutif du PILV est une exception.

Malgré la transmission de plusieurs capulavirus par le puceron de l'espèce *A. craccivora*, la spécificité de transmission au sein des capulavirus est très élevée. Nous avons montré que l'ALCV était transmissible par plusieurs populations de *A. craccivora* collectées sur des plantes de la famille des *Fabaceae* mais étonnamment, pas par la population de *A. craccivora* d'euphorbe, pourtant vectrice d'un autre capulavirus. Avec cette espèce *A. craccivora*, nous pourrions avoir affaire à un complexe d'espèces comportant des populations éventuellement spécialistes de certaines plantes hôtes (Mehrpourvar, 2012), comme cela a été décrit pour le puceron du pois ou l'aleurode *B. tabaci*. Cependant, alors qu'à une exception près la transmission est possible pour toutes les combinaisons "populations de *B. tabaci* / espèce de bégomovirus" testées, chez les capulavirus, nous avons d'ores et déjà trouvé sur un nombre pourtant restreint de combinaisons testées, une population de l'espèce *A. craccivora* (Euphorbe) qui transmet un capulavirus (EcmLV) mais pas un autre (ALCV) (Wei, 2014). Au vu de ces premiers résultats, la transmission des capulavirus par des hémiptères appartenant à d'autres familles que celle des Aphididae nous semble fort peu probable. En cohérence avec cette hypothèse, des tests de transmission de l'ALCV et de l'EcmLV réalisés par la précédente doctorante, avec une cicadelle *A. laevis* et les biotypes MEAM et MED de l'aleurode *B. tabaci* se sont révélés négatifs.

2. Efficacité de transmission des capulavirus

Les tests de transmission ont été réalisés avec un clone de l'ALCV qui infecte quasiment 100% des plantes agroinoculées. Il appartient au génotype A, le groupe le plus répandu et prévalent

au niveau géographique. Quant à la population de *A. craccivora*, nous avons sélectionné celle qui transmettait le plus efficacement ce clone viral. Cette population est issue du robinier faux-acacia, une plante arbustive de la famille des *Fabaceae*, qui a été détectée positive pour la présence de l'ALCV en Iran ([Communication personnelle Z. Davoodi](#)). Malgré des conditions standardisées de transmission (âge des insectes, charges virales des plantes, températures etc.) et une population clonale de *A. craccivora*, les efficacités de transmissions de l'ALCV ont été très variables d'un test à l'autre. Aucune explication à ce phénomène n'a pu être trouvée à ce jour. On note cependant que les taux de transmission les plus élevés sont nettement plus faibles que ceux de géminivirus transmis par d'autres hémiptères. En effet, en conditions d'acquisitions et d'inoculations optimales de laboratoire (4 jours d'AAP - 5 jours d'IAP), le taux de transmission individuelle de l'ALCV par notre population de *A. craccivora* est au maximum 12%. En comparaison, un taux de 90% a été observé pour le TYLCV transmis par aleurode ([Perefarres, 2014](#)) et pour le MSV transmis par cicadelle ([Reynaud et Peterschmitt 1992](#)). L'efficacité de transmission de l'ALCV dans nos conditions de laboratoire est aussi inférieure à ce qui est constaté chez les virus de la famille *Nanoviridae* comme le BBTV ([Hu, 1996](#)). Dans ce cas précis, l'exemple le plus parlant est très certainement celui des quatre premiers tests de transmission du 3ème chapitre, où malgré des conditions de transmission identiques entre le nanovirus et l'ALCV, le taux de transmission moyen de l'ALCV est de 13% alors que celui du FBNSV est de 95%. Cependant, on ne peut pas exclure qu'il existerait une population de *A. craccivora* ou un clone d'ALCV plus favorable à la transmission. Il est intéressant de noter que l'ALCV a été détecté dans tous les pays où il a été cherché (bassin méditerranéen, Argentine, Chine) à l'exception de l'Afrique du Sud, de la Namibie et de l'Australie. De plus, sa prévalence estimée sur un échantillonnage sans a priori est relativement élevée (33%) ([Davoodi, 2018](#)). Le paradoxe entre le faible taux de transmission obtenu au laboratoire et la prévalence relativement importante de l'ALCV en condition naturelle s'expliquerait à mon avis par la biologie de la luzerne. Notre hypothèse est que, contrairement à une culture annuelle où une incidence de 33% pourrait nécessiter un taux de transmission très élevé, dans le cas d'une culture telle que la luzerne qui reste en place pendant 5 à 10 ans on peut considérer qu'une telle incidence puisse être atteinte avec un taux de transmission plus faible. Des travaux récents réalisés par une équipe d'Argentine semblent soutenir cette hypothèse. Alors que la prévalence de l'ALCV en Argentine est en moyenne de 75% dans les champs de luzernes cultivées, les tests de transmission réalisés avec des isolats naturels de l'ALCV ont montré que seul 2 à 10% des plantes tests inoculées chacune avec 5 pucerons, présentent des symptômes associés à l'ALCV. Pour valider pleinement l'hypothèse d'une faible transmission en champ,

la dynamique d'infection de champs de luzerne devrait être suivie au cours du temps depuis le semis.

Les tests de transmission effectués avec les autres capulavirus sont pour le moment trop embryonnaires pour considérer qu'un faible taux de transmission est une caractéristique de ce genre viral. Cependant, les résultats préliminaires vont dans le sens de cette hypothèse. Alors que l'EcmLV a pu être transmis efficacement (100%) par *A. craccivora* dans des conditions optimum (plusieurs semaines d'AAP et d'IAP avec 50 insectes par plante test) la transmission ne s'est pas produite dans des conditions standard de transmission (3 jours d'AAP et 5 jours d'IAP avec 10 insectes par plante). De même, alors que le PILV a pu être transmis relativement efficacement (90%) dans des conditions optimums (deux semaines d'AAP et 5 jours d'IAP avec 10 insectes par plante), la transmission réalisée par une équipe finlandaise dans des conditions plus standard (1 jour d'AAP, 2 jours d'IAP et 5 insectes par plante) n'a donné que 20% de succès (Susi, 2019). Enfin, la prévalence de ces trois capulavirus en milieu naturel est elle aussi cohérente avec un taux de transmission faible. Pour le PILV, une étude approfondie du profil d'infection virale de 12 populations de plantain échantillonnées dans différentes zones des îles Åland, révèlent que ce virus est le plus rare des 8 virus détectés, avec une seule population positive et une incidence dans celle-ci de 1,2%. Pour le FbSLCV, l'incidence ne dépasse pas 2% et pour l'EcmLV l'incidence moyenne est de 15%.

3. Mode de transmission des capulavirus

Au vu de la faible efficacité de transmission de l'ALCV mais de sa prévalence assez importante dans l'environnement, nous nous sommes demandés s'il pouvait exister des modes de transmission alternatifs à la transmission vectorielle horizontale. Des tests effectués au sein de mon équipe n'ont pas permis de mettre en évidence une transmission verticale par la graine. De même, la transmission verticale par le puceron n'a pas été validée non plus. En effet, les larves issues de pucerons virulifères n'étaient ni positives pour la présence d'ADN viral, ni pour la transmission.

La transmission mécanique de l'ALCV sur fève s'est révélée négative tout comme Pauline Bernardo l'avait montrée il y a quelques années pour l'EcmLV sur tomate et *N. benthamiana*. A noter que le PILV, selon une publication de l'équipe finlandaise, serait transmis mécaniquement, un résultat que nous n'avons pas pu reproduire avec aucun des protocoles mis en œuvre. Cependant, si ce résultat était confirmé, il suggérerait que certains capulavirus sont

capables d'envahir les cellules du mésophylle contrairement à l'ALCV dont nous avons montré la restriction au phloème. Une autre explication serait que le tropisme des capulavirus dépend de leur plante hôte.

En considérant des analyses phylogénétiques de l'ALCV par rapport à l'historique de l'extension de la culture de la luzerne depuis son centre de diversification au Moyen Orient, l'ALCV aurait été disséminé en suivant l'extension géographique du périmètre de culture de son hôte qui s'est faite en deux vagues. L'une a eu lieu avant notre ère à partir de l'an 700 par les Mèdes et l'autre vers l'an 700 par les Arabes. Ainsi, on suppose que lors de conquêtes vers l'Europe centrale du fourrage de luzerne a vraisemblablement été déplacé pour nourrir les bêtes et peut être pour le commerce (Melillo, 2015). En l'absence de transmission avérée par graines ou de manière mécanique, l'extension géographique de l'ALCV ne peut être envisagée que par des pucerons. Le scénario le plus parcimonieux, serait la progression d'un front d'infection par des vols de pucerons virulifères qui auraient suivi de proche en proche le front d'extension géographique de la culture de la luzerne. Nous avons montré que le pouvoir infectieux chez des adultes d'*A. craccivora* pouvait persister plusieurs jours après le retrait de la source virale, un atout incontestable dans la progression du front d'infection. L'arrivée de l'ALCV en Argentine est plus difficile à comprendre du fait de la grande distance transatlantique. On peut envisager un déplacement d'un lot de fourrage contenant des plantes infectées de luzernes. Cette hypothèse pourrait être validée en testant la transmissibilité de l'ALCV à partir de luzerne coupée et son appétence pour le puceron. Une autre possibilité, basée sur la transmission persistante de l'ALCV par puceron et la polyphagie d'*A. craccivora*, serait le déplacement de pucerons virulifères via des plants de pépinière, de plantes ornementales ou de produits frais. Cette hypothèse est cohérente avec une forte résistance des pucerons à la privation de support végétal et donc au jeûne. En effet, nous avons observé pour une des population d'élevage de *A. craccivora* que des individus peuvent survivre dans un tube en verre pendant une dizaine de jours à 4°C.

4. Influence des conditions environnementales

a. Un puceron vecteur migrateur

Au regard des résultats obtenus sur les modes de transmission de l'ALCV, le puceron *A. craccivora* est certainement le principal responsable de la dissémination de l'ALCV à travers le monde. Malgré la faible efficacité de transmission de l'ALCV par les individus de cette

espèce, les pucerons *A. craccivora* possèdent d'autres caractéristiques susceptibles de compenser le faible taux d'inoculation de l'ALCV à une plante hôte. Nos tests de transmission au laboratoire démontrent que *A. craccivora* est capable de transmettre l'ALCV jusqu'à 8 jours après avoir quitté sa plante source. De plus, nos résultats montrent que *A. craccivora* peut survivre une dizaine de jours sans alimentation ce qui ouvre des possibilités de dissémination à grande distance par des phénomènes climatiques (cyclone) ou des activités humaines (commerce). Cette espèce produit énormément d'ailés, permettant de disséminer l'ALCV sur de longues distances et dans des environnements aux climats très variés. En outre, la reproduction de ce puceron essentiellement parthénogénétique lui donne la possibilité de pulluler rapidement sur sa plante hôte et de multiplier par là même la quantité de vecteurs de l'ALCV et donc les chances de transmettre le virus. De plus, étant donné qu'aucun impact négatif de l'ALCV sur son vecteur n'a pu être mis en évidence, on peut supposer que les pucerons virulifères ne sont pas défavorisés par rapport aux non virulifères ce qui joue également en faveur de la dissémination du virus. De ce point de vue, on peut considérer que l'adaptation de l'ALCV à son vecteur *A. craccivora* est réussie.

Enfin, la polyphagie de *A. craccivora* permet aux virus d'augmenter la palette de plantes qui peuvent servir de relais pour son maintien dans l'agroécosystème. Cet avantage est validé par la gamme d'espèce hôte de l'ALCV déterminée en conditions naturelles en Iran par Z. Davoodi, et dans ma thèse en conditions contrôlées sur des fabacées (résultats non-présentés dans ce manuscrit) mais qui incluent la féverolle, l'arachide, le pois chiche, la gesse et le haricot vert.

b. Une plante hôte pérenne

En dehors des résultats de Z. Davoodi, la luzerne est la seule plante décrite comme hôte naturel de l'ALCV. Alors que l'efficacité de transmission déterminée en conditions contrôlées est très médiocre, la luzerne présente des caractéristiques qui potentiellement font de cette plante un excellent refuge pour l'ALCV. La première caractéristique est sa nature pérenne. En exploitation fourragère, elle reste généralement aux champs pour une période de 4 à 7 ans. En marge des cultures et suite à des cultures antérieures des luzernes, des plantes peuvent se maintenir dans l'agroécosystème jusqu'à une vingtaine d'année selon certains témoignages (Ellsworth Getty, 1934). La deuxième caractéristique est que son potentiel pérenne est porté par sa partie souterraine. Ainsi, avec une racine pivot qui peut atteindre plusieurs mètres, la luzerne peut résister à des conditions climatiques extrêmes et à la prédation ou au fauchage de ses parties aériennes. A Montpellier, lorsque les températures avoisinent les 35°C à la fin de

l'été, les luzernes sont les seules plantes encore verdoyantes aux abords des chemins, ce qui a pour effet d'attirer les pucerons *A. craccivora* et probablement d'amplifier les réservoirs de l'ALCV. Le virus semble avoir bien exploité cette caractéristique car c'est dans les racines que la concentration d'ADN viral est la plus forte, à la fois chez la luzerne et chez la fève (résultats non décrits dans le manuscrit). Ainsi, il est peu probable que le fauchage des parties aériennes de la luzerne, plusieurs fois par an pour la production de fourrage, puisse éliminer l'infection virale. Cette hypothèse a été validée en condition de laboratoire sur une luzerne infectée naturellement au champ et installée dans une chambre de culture. J'ai constaté que la taille, ne semblait pas soulager la plante de sa charge virale. En effet malgré les fréquentes tailles, cette plante a servi de témoin positif pour l'ALCV pendant plusieurs années avec une réponse PCR qui a toujours été parmi les plus fortes au sein des échantillons testés. De plus au fil des tailles, la sévérité des symptômes d'enroulement observés sur les repousses n'a pas diminué. En outre, les résultats de quantification de l'ALCV ou du FBNSV dans la fève après agroinoculation montrent une concentration en ADN de l'ALCV dix à cent fois supérieure à celle du nanovirus. En s'accumulant fortement dans la plante, le virus augmenterait non seulement ses chances d'être accessible au puceron mais aussi d'atteindre la concentration critique dans le puceron, nécessaire à sa transmission.

Enfin, à l'échelle du genre *Capulavirus*, on peut noter que les hôtes naturels de l'EcmLV et du PILV sont aussi des plantes pérennes qui, à ce titre, n'exerceraient pas non plus de fortes pressions de sélection sur l'efficacité de transmission vectorielle. De plus, *E. caput medusae* est capable de se reproduire de façon végétative ce qui permettrait de transmettre le virus à la descendance sans avoir recours à un insecte vecteur. Le cas de l'hôte naturel du FbSLCV est une exception mais semble valider l'hypothèse de l'adaptation des capulavirus aux plantes pérennes de façon inverse ou symétrique. En effet, le plafonnement à 2% de l'incidence de ce virus sur plante annuelle montre que ce virus, contrairement à des géminivirus transmis par aleurode avec des incidences plus fortes, a du mal à se propager par infection secondaire. Cette situation suggère en creux l'existence d'un hôte pérenne qui maintient ce virus dans l'environnement et explique ces incursions fugaces sur une plante annuelle.

5. Etiologie de la maladie et adaptation à l'hôte

Il est communément admis que les virus du compartiment sauvage sont bien adaptés à leur plante hôte suite à des centaines voire des milliers d'années de co-évolution (Malmstrom, 2011). Cette co-évolution du virus et de sa plante hôte, est souvent associée à une faible

virulence, qui se traduit par l'absence de symptômes et reflète un comportement viral qui tend à ménager l'intégrité de son hôte. L'EcmLV et le PILV sont à mon avis dans ce cas de figure car ils ont été trouvés dans des plantes appartenant au compartiment sauvage, qu'ils infectent de manière asymptomatique. Il est intéressant de noter que l'EcmLV provoque des symptômes extrêmement sévères sur tomate, un hôte de laboratoire, qui n'a quasiment aucune chance de rencontrer l'EcmLV en conditions naturelles; la tomate n'est pas un hôte de *A. craccivora*. Cette interaction spectaculaire illustre de façon inverse et complémentaire le lien entre virulence et co-évolution.

L'absence de symptôme de l'EcmLV et du PILV sur leur plante hôte en condition naturelle permet d'expliquer la découverte tardive de ces deux capulavirus. En effet, pour des raisons économiques, les virus présents dans le compartiment sauvage ont été caractérisés plus tardivement que ceux présents dans le compartiment cultivé. Malheureusement, avec l'extension des zones cultivées, certains virus jusqu'alors cantonnés au compartiment sauvage peuvent infecter des plantes cultivées et se révéler très virulents pour celles-ci. Le FbSLCV pourrait en être une illustration éloquentes par la sévérité des symptômes d'enroulement qu'il induit sur haricot vert. Sa découverte tardive s'explique par la faible prévalence de ce virus sur le terrain et par la présence d'autres géminivirus déjà connus qui provoquent entre autres des symptômes d'enroulement. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le FbSLCV aurait un ou des hôte(s) alternatif(s), vraisemblablement pérenne(s), qui assureraient son maintien dans l'environnement. Les traces d'événements de recombinaison entre le FbSLCV et l'EcmLV supportent cette hypothèse. En effet, qui dit recombinaison, dit rencontre des virus protagonistes, ce qui pointe tout naturellement vers un hôte commun au FbSLCV et au EcmLCV qui reste à découvrir. Les campagnes d'échantillonnages organisées de plus en plus fréquemment dans le cadre d'analyse par métagénomique sont à même de découvrir ces hôtes suspectés.

L'ALCV a été principalement décrit sur luzerne, une plante présente dans le compartiment cultivé et sauvage, et dont la domestication date du néolithique, soit environ 7000 ans avant J.C. La découverte tardive de l'ALCV peut s'expliquer de différentes manières. Premièrement, la luzerne en tant que plante fourragère reçoit généralement moins d'attention et de soins que des cultures destinées à la consommation humaine, surtout dans le Midi de la France. Deuxièmement, l'infection de la luzerne par l'ALCV n'est pas toujours corrélée à la présence de symptômes. En effet, alors que l'ALCV est détecté dans plus de 86% des plantes

symptomatiques échantillonnées dans plusieurs pays sur la base de symptômes de rabougrissement/enroulement, l'agro-infection de luzerne avec notre clone d'ALCV n'a jamais engendré ce type de symptômes sur les plantes détectées positives pour la présence du virus. Ainsi, nos résultats n'ont pas pu valider le postulat de Koch. Afin d'écarter l'hypothèse d'un défaut du clone agro-infectieux pour l'induction de symptômes, nous avons réalisé des tests de transmission à partir de luzernes symptomatiques du terrain, mais là aussi les plantes ainsi infectées n'ont pas développé de symptômes. Ces résultats semblent indiquer que l'ALCV seul ne provoque pas de symptômes dans la luzerne, une hypothèse qui le mettrait en cohérence avec l'EcmLV et le PILV par une longue co-évolution avec la luzerne. Dans cette hypothèse, comment expliquer la fréquence relativement élevée dans les champs de plantes positives pour la présence de l'ALCV présentant des symptômes ? De par son caractère pérenne, la luzerne est exposée à accumuler au fil du temps de nombreux virus, d'autant que la rémission chez les phytovirus n'est pas un phénomène courant. L'hypothèse que nous privilégions est celle d'une synergie entre l'ALCV et un ou plusieurs virus qui infectent la luzerne. Les éléments qui étayent cette hypothèse sont liés à l'observation de symptômes sur des luzernes co-infectées avec l'ALCV en milieu naturel. Dans les années 70, des symptômes identiques à ceux de l'ALCV et transmissibles par *A. craccivora* ont été attribués à la présence du rhabdovirus LEV. A posteriori, il n'est pas exclu que les plantes symptomatiques examinées, étaient en fait co-infectées par l'ALCV et le LEV. De même, comme je l'ai détaillé dans l'introduction, un complexe viral touchant les cultures de luzerne en Argentine est associé à des symptômes ressemblant à ceux que nous avons observés en France ([Trucco - 2nd Worldwide Congress on Alfalfa](#)). Les chercheurs suggèrent au regard des symptômes induits par différentes combinaisons de ces virus, que l'ALCV en co-infection avec l'AMV (de la famille *Bromoviridae* - transmis entre autre par *A. craccivora*) provoque les mêmes symptômes que ceux décrits au champs. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'en Chine, toutes les luzernes symptomatiques ont été trouvées positives pour la présence de l'ALCV et de l'AMV ([Guo, 2019](#)). L'effet de la co-infection de l'ALCV avec d'autres virus de luzerne sur l'expression de symptômes, devra être confirmé par des études complémentaires. Mais la complexité des interactions plantes-virus, et virus-virus en milieu naturel rendent difficiles les inférences sur l'adaptation virale telles que celles proposées ci-dessus. Les raisons de la découverte tardive de l'ALCV sont vraisemblablement multiples et il n'est pas exclu qu'à la fois l'absence de symptômes dans les cas de mono-infection par l'ALCV et son "camouflage" sous des symptômes attribués à des virus co-infectant connus, y aient contribué conjointement.

En conclusion de la partie épidémiologie, nous proposons qu'en dépit d'un taux de transmission faible, l'ALCV a pu se maintenir dans l'environnement grâce au fort potentiel de dispersion de son insecte vecteur et aux qualités de refuge de son hôte principal. Il reste cependant à savoir si le faible taux de transmission a été sélectionné au cours de l'adaptation aux plantes pérennes ou si, alternativement, le faible taux de transmission est constitutif des géminivirus transmis par puceron et de ce fait seule une niche au sein de plantes pérennes a pu être colonisée. Quel que soit le scénario, l'absence d'effet sur *A. craccivora* et l'absence de symptôme sur des plantes inoculées avec l'ALCV seul témoignent d'une adaptation issue d'une coévolution prolongée. En supposant que le différentiel d'efficacité de transmission et de virulence observé entre l'ALCV et le FBNSV en conditions contrôlées soit représentatif de différences qui existent en conditions naturelles, l'hypothèse dite du trade-off pourrait être évoquée ici, c'est à dire que l'efficacité de transmission augmente avec la réduction du temps d'infection d'une plante (Froissart, 2010). En effet, alors que le FBNSV est très virulent pour la fève et est efficacement transmis, l'ALCV au contraire est peu virulent et est inefficacement transmis. Cela suggère que le FBNSV requiert une efficacité de transmission élevée lui permettant de quitter la plante dans un délai de 1 à quelques mois avant que sa plante source ne meurt. Cette pression est vraisemblablement moins forte pour l'ALCV qui bénéficie de plusieurs années pour produire une descendance avant la disparition de son hôte.

II. Biologie de la transmission des capulavirus

Le choix de l'analyse des caractéristiques de la transmission de l'ALCV par rapport à d'autres capulavirus a été motivé par le fait que l'ALCV était selon les données disponibles au début de mes travaux de thèse, le capulavirus le plus prévalent et avec la plus large distribution géographique. Le choix de ce modèle d'étude a également été motivé par la potentielle généralité de nos travaux pour mieux comprendre les interactions capulavirus-puceron en général.

1. Des caractéristiques classiques de la transmission par géminivirus

Nombre de caractéristiques de la transmission de l'ALCV par son vecteur *A. craccivora* sont partagées avec les autres géminivirus connus. Par exemple, l'ALCV est un virus restreint au phloème tout comme la majorité des géminivirus. L'analyse du comportement alimentaire des pucerons *A. craccivora* sur fève infectée confirme que ces pucerons réalisent de nombreuses

piqûres d'essais dans le mésophylle de la plante avant que les stylets ne parviennent jusqu'aux tissus du phloème et commencent à ingérer la sève phloémienne. Le début de l'ingestion commence en moyenne 1h après la première piqûre dans la plante. Cependant, certains pucerons commencent leur repas beaucoup plus vite (18 min). Nous avons montré que l'ALCV, une fois ingéré, est acheminé jusqu'à l'intestin moyen antérieur, voire dans une moindre mesure jusqu'à l'intestin moyen postérieur, où nous l'avons retrouvé internalisé dans les cellules épithéliales.

Ces points d'entrées sont similaires aux nanovirus et aux babuvirus de la famille des *Nanoviridae* (Watanabe, 2013). Le cas des lutéovirus est particulier puisque certains sont internalisés dans l'intestin moyen antérieur comme l'ALCV, d'autres dans l'intestin postérieur et certains dans ces deux compartiments cellulaires. Bien que l'organisation du tube digestif des cicadelles et des aleurodes soit un peu différente, les virus qu'ils transmettent, respectivement les bégomovirus et mastrevirus, envahissent aussi les cellules épithéliales de l'intestin moyen antérieur et postérieur, mais envahissent également des organes qui ne sont pas présents chez les pucerons, la chambre filtrante et les caeca. Je n'ai jamais observé de marquage de l'ADN de l'ALCV dans les glandes salivaires accessoires d'*Aphis craccivora* comme cela est le cas pour les virus de la famille *Luteoviridae*. L'ADN de l'ALCV a par contre été marqué dans de rares cas dans les glandes salivaires principales, tout comme les autres géminivirus et les virus de la famille des *Nanoviridae*. Les agrégats qui renferment l'ADN de l'ALCV semblent être répartis dans différentes cellules de la glande salivaire sans qu'il y ait de spécificité pour un type cellulaire en particulier comme par exemple pour les nanovirus qui semblent être restreints aux cellules de type 4 des glandes salivaires principales. La localisation de l'ALCV dans les glandes salivaires principales ne ressemble pas non plus à celle des bégomovirus qui sont observés aux temps précoces de circulation dans toute la glande salivaire principale de l'aleurode puis seulement dans les cellules sécrétrices. En conclusion, le trajet qu'emprunte l'ALCV dans le corps de son puceron vecteur ressemble le plus à ce que l'on observe chez les autres géminivirus et aussi chez les virus de la famille *Nanoviridae*. Par contre, l'absence de colocalisation de l'ALCV et d'un nanovirus au sein de cellules co-infectées de l'intestin moyen iraient dans le sens de transmission circulantes selon des parcours distincts.

Le temps de trajet ou plus exactement le temps de latence de l'ALCV dans le puceron *A. craccivora* est plus long (27 h) que pour d'autres géminivirus (8 h pour le TYLCV et 16 h pour le MSV) mais similaire à ce que l'on peut observer chez les lutéovirus (environ 24 h).

Nous pouvons spéculer que l'anatomie du tube digestif des aleurodes et des cicadelles pourrait accélérer le passage des géminivirus dans les glandes salivaires principales avec notamment l'infection d'organes telle que la chambre filtrante qui est plus proche des glandes salivaires que l'intestin moyen.

Concernant le mode de transmission de l'ALCV, la détection d'ADN viral dans l'hémolymphe des pucerons ainsi que la transmission du virus par des pucerons adultes qui avaient acquis le virus lors de leur stade larvaire, atteste de la transmission circulante persistante de l'ALCV, tout comme les autres géminivirus. En effet, les virus transmis selon le mode non-circulant et qui comprennent les semi-persistants, sont fixés sur la cuticule et sont par conséquent perdus avec les mues de l'insecte.

Nos résultats indiquent aussi que l'ALCV ne serait pas transmis à la descendance ni capable de se multiplier dans le corps de *A. craccivora*. Même si ces affirmations doivent être confirmées à l'avenir par l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons, le mode de transmission ni vertical ni propagatif de l'ALCV est comparable à la majorité des géminivirus. En résumé, ce capulavirus semble partager de nombreuses caractéristiques communes avec les autres virus de sa famille.

2. Tentative d'explication de l'efficacité de transmission relativement faible de l'ALCV

Les efficacités de transmission individuelle de l'ALCV par *A. craccivora* démontrent un plus faible taux de transmission que la plupart des géminivirus. Nos résultats dévoilent que la charge virale contenue dans l'insecte doit nécessairement dépasser un certain seuil pour que le puceron soit capable de transmettre l'ALCV. Or, le pourcentage de puceron qui atteignent ce seuil est très faible ($\leq 12\%$), même dans des conditions optimum d'acquisition (3 jours d'AAP) et d'inoculation (5 jours d'IAP). Les **différences d'accumulation** de l'ALCV entre les individus qui ont bénéficié de la même AAP, pourraient s'expliquer par la distribution hétérogène de l'ALCV dans les tissus de la plante comme nous l'avons visualisé en FISH et suggéré par nos résultats d'EPG. Il est possible que certains pucerons aient pu établir leur site d'alimentation prolongée dans un élément du tube criblé contigu à une cellule compagne infectée par l'ALCV alors que d'autres se sont établis par hasard dans un secteur du réseau phloémien qui ne contient pas de cellules compagnes infectées par l'ALCV. Cela n'empêcherai pas totalement l'acquisition virale, mais expliquerait les différences d'accumulation entre les individus puisque

nos résultats exposent que le virus reste accessible à ces pucerons, vraisemblablement par le flux de sève qui transporte le virus de façon systémique dans la plante. En effet, nous montrons qu'à partir de 90 minutes de mise en contact avec une plante tous les pucerons sont positifs pour la présence de l'ALCV. De manière générale, peu de pucerons parviennent à dépasser le seuil d'accumulation de l'ALCV même au delà de 48 h d'acquisition, ce qui explique probablement pourquoi le taux de transmission individuel est si bas. Les durées d'AAP efficaces de l'ALCV estimées à un minimum de 2 h vont aussi dans ce sens puisqu'elles sont plus longues que pour les autres géminivirus tel que le TYLCV qui peut être transmis par des aleurodes qui n'ont eu que 15 min d'AAP. Ce résultat peut s'expliquer en partie par une arrivée plus rapide des aleurodes aux tissus du phloème mais selon nos résultats il s'expliquerait surtout par la quantité critique de virus pour la transmission, qu'un puceron ne peut apparemment acquérir en moins de 2 heures.

En outre, il est troublant de constater que parmi les rares individus qui ont atteint le seuil de transmission virale, **seulement la moitié sont parvenu à transmettre l'ALCV** sur une période 5 jours d'AAP, dans notre test. Plusieurs raisons pourraient expliquer pourquoi alors que nous avons affaire à une population clonale, certains individus ne transmettent pas l'ALCV avec une charge virale pourtant comparable à ceux qui y parviennent. Ainsi on pourrait imaginer que selon que le puceron acquiert le virus de façon continue à flux faible ou à un flux plus élevé mais par vague, des mécanismes de défense anti-viraux chez l'insecte pourraient être différenciellement élicités. En fonction du rythme d'acquisition de l'ALCV par le puceron, des mécanismes de défense de l'insecte pourrait séquestrer l'ALCV dans les cellules épithéliales de l'insecte ou provoquer sa dégradation dans l'hémolymphe plus ou moins précocément. Malheureusement, nous n'avons pas de données expérimentales suffisantes, ni trouvé d'exemples de tels mécanismes dans la littérature pour valider cette hypothèse. Nous pouvons aussi envisager une variabilité du comportement alimentaire des individus qui pourrait favoriser une excrétion du virus dans certains types cellulaires du phloème, plus ou moins propice à la réplication du virus, peut-être là aussi en fonction de mécanisme de défense de la plante spécifiques à certaines cellules.

La nécessité pour le puceron d'acquérir une charge virale élevée pour transmettre l'ALCV est peut-être à mettre en lien avec la capacité de persistance de l'ALCV dans certains organes du puceron. Alors que la rétention du virus dans le tube digestif est extrêmement efficace, l'ALCV diminue rapidement au cours du temps dans l'hémolymphe et la tête. Ces résultats suggèrent

que le passage de l'ALCV depuis les cellules épithéliales de l'intestin jusqu'à son excrétion par la salive, est un parcours hostile où le virus est exposé à des mécanismes de défense conduisant à sa **dégradation**, ou à sa **séquestration** dans le tube digestif afin de limiter sa dégradation dans l'hémolymphe. Sachant qu'une fraction importante de la population virale de l'hémolymphe et de la tête est éliminé au cours du temps ou n'est plus excrété du tube digestif, le nombre de particules virales qui pourront être excrétées dans la plante pourrait être proportionnel à la quantité de virus transloqué de l'intestin vers l'hémolymphe, possiblement favorisé par une très forte accumulation au niveau de l'intestin. Ce scénario est cohérent avec le seuil critique de teneur viral nécessaire à la transmission mis en évidence expérimentalement. Ce seuil a été estimé sur insecte entier mais peut être considéré comme pertinent pour le tube digestif qui contient à lui seule la majeure partie de la teneur totale en virus.

Si la diminution de la quantité d'ADN viral observé dans l'hémolymphe et la tête est dû à un phénomène de **dégradation** du virus dans l'hémolymphe, des mécanismes de défense antivirale tel que l'autophagie ont été mis en évidence pour le TYLCV dans l'aleurode *B. tabaci* (Wang, 2016) Sur le modèle *B. tabaci*, l'autophagie induite par le TYLCV n'est induite que 24 heures après acquisition du virus. Cette observation révèle que les interactions précoces du virus avec l'insecte vecteur peuvent être différentes de celles aux temps plus tardifs. Ainsi, la diminution de l'ADN de l'ALCV au cours du temps dans l'hémolymphe pourrait s'expliquer par un déclenchement progressif de la mise en place de l'autophagie dans l'hémolymphe de *A. craccivora*. Du fait de la faible efficacité de transmission de l'ALCV par *A. craccivora* nous avons réalisé la plupart de nos tests de transmission et analyses à la suite de temps longs d'acquisition pour pouvoir atteindre le seuil d'accumulation nécessaire à la transmission. Il n'est cependant pas exclu qu'au cours des premières 24 heures la translocation du virus de l'intestin vers les glandes salivaires soit plus intense que dans les jours suivants. Cette hypothèse semble cohérente avec les tests de transmission qui ont servi à déterminer les durées minimum et optimum d'IAP. De façon inattendue, les taux de transmission les plus élevés ont été obtenus avec de courtes AAPs et IAPs. Nous proposons deux hypothèses pour expliquer ce paradoxe. Premièrement, comme décrit ci-dessus pour le TYLCV, aux temps précoces, les réactions de défenses élicitées par le virus ne seraient pas encore actives ou pleinement actives. Deuxièmement, même si la quantité de virus accumulée aux temps précoces est largement en dessous du seuil critique nécessaire à la transmission, elle pourrait suffire pour un parcours alternatif qui passerait directement de l'intestin aux glandes salivaires, sans passage par l'hémolymphe tel que décrit pour le WDV (Wang, 2014) ou qui peut être déduit des

observations anatomiques sur *B. tabaci* (Cicero, 2011). En définitive, il pourrait être intéressant de regarder s'il existe deux parcours de transmission circulante de l'ALCV par *A. craccivora*. Le premier via l'hémolymphe qui fonctionnerait seulement avec une acquisition longue permettant d'atteindre le seuil critique d'accumulation virale pour la transmission, et un second plus spéculatif qui serait dépendant d'une translocation directe du virus de l'intestin aux glandes salivaires sans passage par l'hémolymphe. Ce deuxième type de parcours, ne serait alors pas tributaire d'une accumulation virale suffisante car n'étant pas confronté à la dégradation dans l'hémolymphe.

Chez la population de *A. craccivora* d'euphorbe non-vectrice de l'ALCV, ce serait plutôt l'hypothèse d'une **séquestration** du virus dans l'intestin qui serait privilégiée car nous avons prouvé que le virus s'accumulait efficacement dans l'intestin moyen antérieur et que la plupart des particules virales de l'ALCV étaient retenues sous forme d'agrégats de grosse taille dans cet organe. La présence de ces agrégats de plus grosse taille que ceux de la population de Robinia dans les intestins moyens sont peut-être le reflet d'un engorgement lié à une difficulté d'excrétion du virus dans l'hémolymphe. Le même type d'agrégats est d'ailleurs observé dans les glandes salivaires de la population vectrice ce qui irait dans le sens d'une double barrière à la fois à la sorti de l'intestin et dans les glandes salivaires. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en testant la transmission du virus après inoculation du virus purifié directement dans l'hémolymphe de ces pucerons non-vecteur. Néanmoins, les tentatives de purification de l'ALCV avant mon arrivée se sont révélées infructueuses.

L'implication potentielle d'**endosymbiontes** secondaires est une autre piste à creuser pour expliquer la faible efficacité de transmission de l'ALCV. Une des hypothèses est basée sur la protéine GroEL de bactéries endosymbiotiques. Des résultats montrent que de tels protéines interagissent avec des lutéovirus et des géminivirus et que ces interactions les protègent de la **dégradation** dans l'hémolymphe (Van den Heuve, 1997 ; Morin 2000). Pour valider cette hypothèse, il faudrait tout d'abord trouver une population de *A. craccivora* qui transmet l'ALCV plus efficacement que la population de Robinier faux-acacia et ensuite voir si les populations diffèrent par leur profil endosymbiotique. De manière intéressante, des travaux d'un autre laboratoire ont montré que la population de *A. craccivora* de luzerne présente la bactérie endosymbiotique *Hamiltonella defensa* alors que celle de Robinier ne la présente pas. Malheureusement, les tests de détection de symbiotes dans nos quatre populations de *A.*

craccivora disponibles au laboratoire, n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de tels endosymbiontes secondaires.

Perspectives

I. Une menace pour l'agriculture ?

L'ALCV est un virus assez répandu dans le paysage agricole en France et ailleurs. Selon Davoodi et al, 2018 malgré sa découverte tardive, nous ne serions pas face à un virus émergent mais plutôt à une détection tardive grâce aux nouvelles méthodes de séquençage à haut débit. Cette longue co-évolution suggérée entre l'ALCV et la luzerne, ainsi que l'absence de symptômes sur luzerne en conditions d'infection simple de l'ALCV, sous-entend que l'ALCV ne constituerait pas une menace directe pour la culture de la luzerne. Néanmoins, la co-infection de l'ALCV avec d'autres virus de la luzerne (ex: AVV), provoque des symptômes d'enroulements, de nanisme ainsi que selon une source en Argentine, une diminution de 38% de la quantité de graines produites par les luzernes infectées. Si dans le Sud de la France les quelques cultivateurs de luzerne interrogés constatent des symptômes de nanisme et des semis qui doivent être fait de manière plus fréquente qu'auparavant, ils ne semblent pas particulièrement inquiétés par ces observations. De plus la société Jouffray-Drillaud qui commercialise de la semence de luzerne dans le nord de la France ne semblait pas préoccupé, voire ignorait ces symptômes d'enroulement et de rabougrissement ([Gratadou, communication personnelle](#)). Nous avons pourtant détecté la présence de l'AMV dans les champs où nous sommes allés échantillonner l'ALCV, ce qui atteste que ces deux virus seraient susceptibles de se rencontrer en France aussi. En Argentine, la luzerne est la plante fourragère la plus cultivée du pays et sert à nourrir les bovins qui constituent une part importante de l'économie dans ce pays. Le discours des scientifiques argentins, vis à vis de l'ADD est tout autre. Sergio Lenardon, le directeur de l'Institut de Phytopathologie et de Physiologie Végétale (Iffive) à l'Institut National de la Technologie Agricole (INTA) de Cordoue déclare que les symptômes d'enroulement et de nanisme de la luzerne ont un impact négatif sur la production de matière verte à l'hectare et le nombre de plantes par hectare, en raison de la faiblesse des repousses et de la concurrence avec les graminées et les mauvaises herbes à feuilles larges. Depuis 2010, les estimations faites par l'INTA sur les lots de luzerne infectées montrent une perte de rendement en matière sèche de près de 30%. Ainsi, avec une production en Argentine de 9 tonnes de matière sèche par hectare et par an, Jesús Pérez Fernández de l'INTA de Anguil estime que, si cette diminution de rendement était appliquée à tout le pays, la perte économique dû à cette maladie s'élèverait à plus de 3 millions de dollars (<https://intainforma.inta.gob.ar/descubren-una-nueva-enfermedad-en-alfalfa/>). Avec l'accroissement démographique, la satisfaction des besoins en protéines végétales au niveau mondial sera au fil des années de plus en plus problématique. Or, la luzerne présente des avantages certains autant pour le foyer de

biodiversité qu'elle représente que pour sa productivité en protéines (2,4 tonnes de protéines à l'hectare contre 0,9 tonnes pour le soja) (Popovic, 2001).

La première des pratiques qui limiterait cette perte de rendement dans les cultures de luzernes serait d'empêcher ou de réduire fortement l'arrivée de l'AVV sur la parcelle en contrôlant les pucerons. La lutte chimique entraîne des dommages collatéraux pour l'environnement (destructions d'insectes bénéfiques, pollution de l'air et des sols), d'autant que les champs de luzerne hébergent une grande biodiversité d'insectes, notamment des pollinisateurs (Elbert et Nauen, 2000 ; Otoïdobia, 2003 ; Horowitz, 2005). Elle présente d'autres inconvénients, comme l'apparition de résistances aux insecticides chez les pucerons, ou un accroissement de la mobilité de ceux-ci, favorisant la transmission des virus (Budnick, 1996 ; Bass, 2014 ; Hooks et Fereres, 2006). Puisque l'AVV est un complexe de maladies virales, il paraît également difficile d'appliquer une lutte spécifique tel que l'inhibition de l'interaction entre le virus et le vecteur ou l'utilisation de variétés de luzernes résistantes. Des alternatives seraient donc conseillées comme la lutte biologique contre le vecteur par utilisation de parasitoïdes ou de prédateurs. Un fauchage plus régulier ou des semis plus fréquents pourraient aussi contribuer à limiter la persistance de réservoirs viraux dans les champs de luzerne.

II. Un outils pour l'étude des mécanismes d'interaction insecte vecteur / géminivirus

Au regard des caractéristiques de la transmission de l'ALCV par *A. craccivora*, les capulavirus semblent partager de nombreux points communs avec les autres géminivirus. L'ALCV constituerait donc un outil novateur dans la comparaison des mécanismes de la transmission des géminivirus avec les virus transmis selon un mode de transmission circulant persistant (*Luteoviridae*, *Nanoviridae*). L'analyse plus fine de la comparaison entre les voies de circulation de l'ALCV et du FBNSV permettrait par exemple de conclure sur la nature des vésicules qui participent au transport différentiel des géminivirus et des nanovirus dans l'intestin de leur insecte vecteur. De plus, nous espérons que la validation des protéines candidates obtenues en double-hybride dans un autre système *in vitro* ou *in vivo* mènera à l'identification de récepteurs viraux impliquée dans la transmission des géminivirus, et permettra de conclure si géminivirus et nanovirus partagent des récepteurs communs chez leur insecte vecteur.

Annexes

I. Matériels et méthodes du double-hybride

1. Matériels

a. Levure et plasmides du kit

Les levures fournies par le kit DUALhunter sont de la souche NMY51 [MATa his3 200 trp1-901 leu2-3,112 ade2 LYS2::(lexAop)4-HIS3 ura3::(lexAop)8-lacZ ade2::(lexAop)8-ADE2 GAL4].

Plasmide	Fonction	Protéine produite	Marqueur auxotrophique	Résistance à l'antibiotique
pDHB1	appât	ost4-(appât)-Cub-LexA-VP16	LEU2 (L)	Kanamycine
pPR3-N	proie (bibliothèque)	(proie)-NubG	TRP1 (T)	Ampicilline
pDHB1-LargeT	contrôle	ost4-LargeT-Cub-LexA-VP16	LEU2 (L)	Kanamycine
pAl-Alg5	contrôle	Nubl	TRP1 (T)	Ampicilline
pDL2-Alg5	contrôle	NubG	TRP1 (T)	Ampicilline

b. Milieux de croissance pour levures

SD solide			
Composition	Nom (fournisseur)	Quantité / Litre	Concentration finale
Base azotée sans acides aminés	Yeast nitrogen base without amino acids (Sigma-Aldrich)	6,7 g	0,70%
Base d'acides aminés et de nucléotides	Dropout mix (Sigma-Aldrich)	0,6-0,7 g	0,10%
Glucose monohydraté	Glucose monohydrate (Sigma-Aldrich)	20 g	2%
Agar	Bacto agar (Thermo Fisher Scientific)	20 g	2%
H2O	-	jusqu'à 1 litre	-

SD liquide			
Composition	Nom (fournisseur)	Quantité / Litre	Concentration finale
Base azotée sans acides aminés	Yeast nitrogen base without amino acids (Sigma-Aldrich)	6,7 g	0,70%
Base d'acides aminés et de nucléotides	Dropout mix (Sigma-Aldrich)	0,6-0,7 g	0,10%
Glucose monohydraté	Glucose monohydrate (Sigma-Aldrich)	20 g	2%
H2O	-	jusqu'à 1 litre	-

YPAD solide			
Composition	Nom (fournisseur)	Quantité / Litre	Concentration finale
Extrait de levures	Bacto yeast extract (Thermo Fisher Scientific)	10 g	1%
Peptone	Bacto peptone (Thermo Fisher Scientific)	20 g	2%
Glucose monohydraté	Glucose monohydrate (Sigma-Aldrich)	20 g	2%
Agar	Bacto agar (Thermo Fisher Scientific)	20 g	2%
Adénine sulfate	Adenine sulfate (Sigma-Aldrich)	40 mg	0,004%
H2O	-	jusqu'à 1 litre	-

YPAD liquide			
Composition	Nom (fournisseur)	Quantité / Litre	Concentration finale
Extrait de levures	Bacto yeast extract (Thermo Fisher Scientific)	10 g	1%
Peptone	Bacto peptone (Thermo Fisher Scientific)	20 g	2%
Glucose monohydraté	Glucose monohydrate (Sigma-Aldrich)	20 g	2%
Adénine sulfate	Adenine sulfate (Sigma-Aldrich)	40 mg	0,004%
H2O	-	jusqu'à 1 litre	-

2x YPAD liquide			
Composition	Nom (fournisseur)	Quantité / Litre	Concentration finale
Extrait de levures	Bacto yeast extract (Thermo Fisher Scientific)	20 g	2%
Peptone	Bacto peptone (Thermo Fisher Scientific)	40 g	4%
Glucose monohydraté	Glucose monohydrate (Sigma-Aldrich)	40 g	4%
Adénine sulfate	Adenine sulfate (Sigma-Aldrich)	40 mg	0,004%
H2O	-	jusqu'à 1 litre	-

Stock d'acides aminés				
Acide aminé	Nom (fournisseur)	Concentration stock	Quantité / Litre	Concentration finale
Tryptophane	L-Tryptophan (Sigma-Aldrich)	10 g/L	2 mL	0,02 g/L
Leucine	L-Leucin (Sigma-Aldrich)	10 g/L	2 mL	0,02 g/L
Histidine	L-Histidine (Sigma-Aldrich)	10 g/L	10 mL	0,1 g/L
Adénine sulfate	Adenine sulfate (Sigma-Aldrich)	4 g/L	10 mL	0,1 g/L

Ces milieux sont autoclavés à 121°C pendant 15 minutes. Lorsque du glucose monohydraté est présent dans la composition de ces milieux, il est filtré puis ajouté après l'autoclavage pour éviter que celui-ci ne caramélise.

b. Milieux de transformations et autres pour levures

Ces milieux sont rendus stérile par un passage sur un filtre de 0.22 µM.

50% PEG		
Composition	Nom (fournisseur)	Pour 100 mL
PEG 4000	PEG 4000 (Sigma-Aldrich)	50 g
H2O	-	80 mL

10x TE pH 7,5		
Composition	Nom (fournisseur)	Pour 1 litre
Tris-Cl pH 7,5	1M Tris-HCl pH 6,5 (Sigma-Aldrich)	100 mL
EDTA pH 8,0	EDTA (0,5M), pH 8,0 (Thermo Fisher Scientific)	20 mL
H2O	-	jusqu'à 1 litre

1M LiOAc		
Composition	Nom (fournisseur)	Pour 100 mL
LiOAc x 2 H2O	Lithium acetate (Sigma-Aldrich)	10,2 g
H2O	-	jusqu'à 100 mL

Mélange PEG/LiOAc		
Composition	Nom (fournisseur)	Pour 12 mL
50% PEG	PEG 4000 (Sigma-Aldrich)	9,6 mL
1 M LiOAc	Lithium acetate (Sigma-Aldrich)	1,2 mL
10x TE pH 7,5	-	1,2 mL

Solution de TCA à 50%			
Composition	Nom (fournisseur)	Concentration finale	Pour 100 mL
TCA (acide trichloroacétique)	Trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich)	50%	50 g
H2O	-	-	jusqu'à 100 mL

Tampon SDS			
Composition	Nom (fournisseur)	Concentration finale	Pour 50 mL
Tris-Cl pH 6,8	1M Tris-HCl pH 6,5 (Sigma-Aldrich)	25 mM	1,25 mL
Urée	Urea (Sigma-Aldrich)	9 M	27 g
EDTA	EDTA (0,5M), pH 8,0 (Thermo Fisher Scientific)	1 mM	0,1 mL
SDS	Sodium dodecyl sulfate 98% (Sigma-Aldrich)	1%	2,5 mL
β-mercaptoéthanol	2-Mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich)	0,7 M	2 mL
Glycérol	Glycerol (Sigma-Aldrich)	10%	5 mL
H2O	-	-	jusqu'à 50 mL

Mélange LiOAc/TE		
Composition	Nom (fournisseur)	Pour 8 mL
1 M LiOAc	Lithium acetate (Sigma-Aldrich)	0,88 mL
10x TE pH 7,5	-	0,88 mL
H2O	-	6,24 mL

Solution stock de 3-AT			
Composition	Nom (fournisseur)	Concentration finale	Pour 100 mL
3-Amino-1,2,4-triazole	3-Amino-1,2,4-triazole-5-thiol (Sigma-Aldrich)	1 M	8,4 g
H2O	-	-	jusqu'à 100 mL

Tampon de lyse			
Composition	Nom (fournisseur)	Concentration finale	Pour 10 mL
Tris-HCl pH 7,5	1M Tris-HCl pH 6,5 (Sigma-Aldrich)	50 mM	500 µL
Sorbitol	D-Sorbitol (Thermo Fisher Scientific)	1,2 M	2,4 mL
EDTA	EDTA (0,5 M), pH 8,0 (Thermo Fisher Scientific)	10 mM	200 µL
H2O	-	-	jusqu'à 10 mL

2. Construction de la banque d'ADNc des pucerons

Cette partie a été réalisée avant mon arrivée en thèse par Jean-Louis Zeddami. La banque d'ADN complémentaire (ADNc) a été construite à partir de 2000 tubes digestifs (TD) de femelles adultes aptères de l'espèce *A. craccivora* élevées sur fève de la variété Séville. Les dissections ont été faites sous la loupe binoculaire comme décrit dans Ryckebusch, 2020a mais dans un tampon RNAlater de chez Thermo Fisher Scientific qui permet de stabiliser et de protéger l'ARN. Les TD collectés sont déposés dans des tubes Eppendorf contenant aussi du RNAlater (100 µL). Après broyage avec des pilons en téflon dans le tube Eppendorf, le broyat a été clarifié et le surnageant collecté pour en extraire l'ARN. Le fournisseur Vertis Biotechnologie AG s'est chargé du reste de la préparation des ADNc. Les ARN extraits ont été contrôlés par électrophorèse pour vérifier l'intégrité des 28S/18S. Leur quantification a permis d'estimer 4.8 µg d'ARN au total. Suite à cela, les ARN ont été traités à la DNase puis les ARN polyadénylés ont été sélectionnés et le premier brin de ADNc a été produit en utilisant un random primer (N6) pour la reverse-transcription. Les ADNcs ont été fragmentés en morceaux de 400 à 600 pb et des adaptateurs complémentaires des extrémités du plasmide proie pPR3-N ont été ajoutés. La synthèse du second brin ainsi que l'amplification des ADNc ont été réalisées en utilisant la Herculase II Fusion DNA Polymerase de chez Agilent. Les ADNc ont été purifiés en utilisant le kit Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter Genomics) et analysés par électrophorèse capillaire avant leur clonage dans pPR3-N. La banque de ADNc a été normalisée et elle contient environ 10⁶ clones.

3. Protocole de vérification du génotype auxotrophe du clone de la levure NMY51

Des levures glycerolées de la souche NMY51 issues du -80°C ont été prélevées avec une oese. Elles sont étalées sur un milieu YPAD solide et laissées à pousser à 30°C pendant 3 jours. Une des colonies ayant poussé est resuspendue dans 1 mL de 0.9% NaCl. La suspension est ensuite étalée avec une oese sur les milieux SD-T, SD-L, SD-H, SD-A et SD complet, avant d'être laissée à croître à 30°C pendant 3 jours.

4. Protocole de construction du plasmide avec le gène de la protéine d'intérêt

a. Design des amorces

La première étape du clonage du gène de la protéine de capsid (CP) de l'ALCV 44-1E (NC_027714.1) dans le plasmide appât pDHB1 est le design des amorces afin que le gène de la CP possède à ces extrémités N- et C-terminale des sites de restriction *sfiI* cohésifs, lui permettant de s'introduire dans la cassette de clonage du plasmide pDHB1. L'insertion du gène de la CP de l'ALCV se fait dans une cassette de clonage entourée en N-terminal par *ost4* et en C-terminale par *Cub-LexA-VP16*. L'expression de cette partie du plasmide pDHB1 résulte donc en une protéine de fusion *ost4-CP-Cub-LexA-VP16*. Afin d'obtenir cette protéine de fusion entière, la suppression de la séquence codant pour le codon stop à l'extrémité C-terminale de la CP était obligatoire. En outre, le maintien de ces protéines dans leur cadre de lecture a été assuré par l'ajout d'un nucléotide entre l'extrémité C-terminale de la CP et le site de restriction *sfiI*, produisant l'acide aminé neutre sérine à la place du codon stop. Les amorces utilisées pour la réaction d'amplification par PCR du gène de la CP étaient CP_ALCV_Y2H_*sfiI*-F, 5'- GGC CAT TAC GGC CAT GGT TCG CAC GAG ATC C -3' et CP_ALCV_Y2H_*sfiI*-R, 5'- ACA TGG CCG AGG CGG CCG AAA CTA TTG ACG TAT ATT TCA TTG TAC AAT GAC -3'.

b. PCR de l'insert CP ALCV

La réaction de PCR de l'amplification du gène de la CP a été réalisée à partir d'un mix contenant l'ADN polymérase Phusion haute fidélité de chez NEB, selon le protocole du fournisseur. La quantité d'ADN matrice utilisée pour cette réaction était de $2 \cdot 10^5$ copies d'ADN de l'ALCV 44-1E, contenu dans des plasmides pCambia. Le programme du thermocycleur était comme suit : 2 minutes de dénaturation initiale à 98°C, 30 secondes d'hybridation à 68°C, 30 secondes d'élongation à 72°C suivi de 30 cycles chacun de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 68°C et 30 secondes à 72°C. Enfin une élongation finale à 72°C de 10 minutes permet de clore la réaction. Le produit de PCR a ensuite été observé en migration par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% trempé dans du bromure d'éthidium (BET). Une bande unique de 764 pb est découpée et purifiée grâce au kit Nucleospin gel and PCR clean-up de Macherey-Nagel selon les instructions du fournisseur.

c. Digestion et ligation de l'insert CP ALCV et du plasmide pDHB1

La digestion du produit PCR purifié du gène de la CP et du plasmide pDHB1 fournit par le kit DUALhunter garanti à la fois l'ouverture du plasmide et l'élimination des extrémités double-brin de l'insert aux sites de restriction *Sfi*I. La réaction de digestion est réalisée en incubant pendant 2 heures au thermocycleur à 50°C le plasmide et l'insert avec l'enzyme *Sfi*I et le Cutsmart buffer de chez NEB. Les produits de la digestion ont été contrôlés par électrophorèse grâce à un plasmide du kit, pDHB1 témoin qui contient l'insert largeT entre les sites de restriction *Sfi*I. A nouveau, l'insert et le plasmide ont été purifiés grâce au kit Nucleospin gel and PCR clean-up de chez Macherey-Nagel. Une étape supplémentaire de purification a été ajoutée pour enlever les petits fragments d'ADN résiduels issus de la digestion. Celle-ci consiste à mélanger les échantillons au binding buffer NTI de chez Macherey-Nagel à une concentration de 13% avant de les passer sur colonne. Une fois la purification de l'insert et de plasmide digéré obtenus, ils ont été concentrés par une étape de speedVac de 20 minutes pour obtenir un volume final de 30 µL. Dans le cadre de la réaction de ligation, le ratio de l'insert CP (31 ng) pour le plasmide pDHB1 (85 ng) était de 1/5 ème, calculé selon la formule (quantité de vecteur (ng) x taille insert (kb) x5 / taille du vecteur (kb)). L'enzyme T4 DNA ligase de chez Thermo Fisher Scientific a été utilisée pour la réaction qui a eu lieu sur la nuit à +4°C.

5. Protocole de vérification de l'expression de la protéine d'intérêt

a. Transformation en bactérie DH5a du plasmide appât

Le plasmide pDHB1 ligué avec le gène de la CP a été tout d'abord cloné dans des bactéries DH5a afin d'amplifier la quantité de plasmides transformés. Pour cela, un lot de 50 uL de bactéries DH5a ont été laissés à décongeler dans la glace pendant 10 minutes. Puis, en condition stérile, 5 uL du produit de ligation ont été mélangé avec la suspension bactérienne et laissés à incuber dans la glace pendant 30 minutes. Ensuite, un choc thermique sur le bloc sec à 42°C pendant 45 minutes est effectué pour permettre la pénétration des plasmides dans les bactéries. On laisse deux minutes le mélange se refroidir dans la glace puis on ajoute toujours en condition stérile 600 uL de LB sur les bactéries, puis une heure sous agitation à 37°C. Enfin les bactéries sont étalées sur milieu LB + Kanamycine car pDHB1 contient le gène de résistance à la kanamycine, et on laisse les bactéries pousser à 37°C sur la nuit. Les colonies qui ont poussées sont criblées par PCR avec les amorces fournis dans le kit pDHB1-F 5'- TTT CTG CAC AAT ATT TCA AAG C -3' et pDHB1-R 5'- GTA AGG TGG ACT CCT TCT -3', qui s'hybrident de part et d'autres du site de clonage de pDHB1. La réaction de PCR est faite avec la GoTaq G2 DNA polymérase de chez Promega suivant le même programme que précédemment mais avec une température d'hybridation de 55°C et un temps d'hybridation de 1 min 30. Le produit de PCR a ensuite été observé en migration par électrophorèse le produit de la réaction dans un gel d'agarose à 1% trempé dans du bromure d'éthidium (BET). Une bande 1056 paire de base qui est la taille attendue pour les colonies ayant intégrés le plasmide est observée. Les colonies correspondantes ont été inoculées en milieu liquide LB + kanamycine sur la nuit à 37°C puis une mini-prep est réalisée en suivant les instructions du kit Genejet Plasmid miniprep de Thermo Fisher Scientific. Le séquençage de ses plasmides a permis de vérifier que l'insert de la CP était bien intégré dans le plasmide pDHB1, qu'il ne révélait pas de mutation et que les codons étaient tous dans le bon cadre de lecture.

b. Transformation en levure NMY51 du plasmide appât

Pour cette partie, le protocole 2 de la notice du fournisseur DUALhunter a été suivi. L'une des colonies de levure obtenue sur milieu SD complet lors du test d'auxotrophie est utilisée pour inoculer 50 mL de milieu liquide YPAD puis le milieu est laissé à pousser sous agitation une nuit à 30°C. Le lendemain, on arrête la DO600nm de la culture de levure en milieu YPAD entre

0.6 et 0.8. Les levures sont précipitées par une centrifugation de 5 minutes à 2500 g et resuspendues dans de l'eau stérile. On prépare ensuite le milieu propice à la transformation des levures appelé "mélange PEG/LiOAc". Il est composé de 80% de PEG à 50%, de 12% de LiOAc à 1M et de 8% d'ADN de sperme de saumon, qui aura préalablement été dénaturé deux fois pendant 5 minutes à 95°C. La réaction de transformation est réalisée dans 300µL du mélange PEG/LiOAc et 1.5 µg de plasmide appât. En parallèle, des plasmides contrôles que sont pDHB1-largeT, pDHB1 vide et le plasmide proie vide pPR3-N, sont également préparés pour la transformation dans la levure NMY51. A chacun de ces mélanges est ajouté 100 µL de la suspension homogène de levures, puis le choc de la transformation se produit au bain-marie à 42°C pendant 45 secondes. Suite à cela, les levures sont centrifugées pendant 2.5 minutes à 1500 g et le culot est resuspendue dans 100 µL de NaCl à 0.9%. Les transformations avec pDHB1 sont étalées sur les boîtes avec un milieu SD-L car ce plasmide contient le gène qui code pour la synthèse de la leucine et permet donc de sélectionner seulement les levures ayant intégré ce plasmide. La transformation des levures avec le plasmide pPR3-N est étalée sur milieu SD-T car le plasmide contient le gène codant pour la synthèse du tryptophane. Toutes les boîtes sont mises à incuber 4 jours à 30°C.

c. Extraction des protéines produites en levure NMY51 transformées avec pDHB1

La lyse et l'extraction des protéines produites par les levures transformées est une étape préalable au western blot. Pour cette partie, le protocole 3 de la notice du fournisseur DUALhunter a été suivi. Une colonie de chaque transformation qui doit contenir pDHB1 est inoculée dans 10 mL de milieu SD-L et laissé à incuber sur la nuit à 30°C. Le lendemain, la croissance des levures est stoppée une fois qu'elles ont au moins atteint une DO600nm de 1. Elles sont centrifugées à 700g dans des falcon de 50 mL pendant 5 minutes. Les culots sont nettoyés avec 1 mM d'EDTA. On ajoute à ces culots 200 µL de NaOH à 2M puis on les transfère dans des tubes à eppendorf pendant 10 minutes sur glace. On ajoute tout en agitant 200 µL d'acide trichloroacétique à 50 g/100 mL, avant de laisser le mélange dans la glace pendant 2 heures. Puis, les levures sont à nouveau centrifugées à 14000 g pendant 20 minutes dans une centrifugeuse réfrigérée à 4°C. Un volume de 200 µL d'acétone froid est délicatement déposé sur le culot des protéines, suivi d'une centrifugation identique à la précédente. Le culot est ensuite resuspendu dans 200 µL de 5% de SDS puis 200 µL de tampon SDS (25 mM de Tris-Cl pH 6.8, 9 M d'urée, 1 mM d'EDTA, 1% de SDS, 0.7M de Béta-mercaptoéthanol et 10% de

glycérol). Le mélange est incubé à 37°C pendant 15 minutes sous agitation. Une dernière centrifugation est effectuée à 14000 g pendant 5 minutes. Un volume de 20 µL de Laemmli sans Béta-mercaptoéthanol (4% de SDS, 100 mM de Tris pH 6,8, 50% de glycérol et 0,02% de bleu de bromophénol) sert à resuspendre chacun des culots. Les échantillons sont ensuite dénaturés pendant 5 minutes à 105°C au bain-marie.

d. Western-blot

Les différents échantillons sont ensuite chargés sur un gel SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Le dispositif de montage de la cuve consiste en deux plaques de verre rendues étanches à l'aide d'un joint en plastique. Des espaceurs sont glissés entre les plaques de verre et le tout est serré à l'aide de deux pinces sur les côtés et de deux pinces qui servent de support. Un gel de séparation à 12% (30% d'acrylamide, 20% de 2M Tris pH 8.8, 1% de 10% SDS, 5% de 2.5% APS, 0.1% de TEMED) est d'abord coulé puis un gel de tassement à 6% (15% d'acrylamide, 7,5% de 2M Tris pH 8.8, 1% de 10% SDS, 1% de 2.5% APS, 0.1% TEMED) et on place un peigne. Une fois polymérisé, le peigne est retiré et un volume de 10 µL de chacun des échantillons est déposé dans les puits. L'électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS) et avec un courant électrique de 25 mA par gel. L'efficacité de la migration est vérifiée par l'incubation du gel dans 20 mL de bleu de coomassie pendant 1 heure. Une fois l'observation de toutes les protéines réalisées, le gel est décoloré plusieurs fois dans un tampon de décoloration (50% d'EtOH, 5% de méthanol, 10% d'acide acétique glacial). Les protéines sont ensuite transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose dans un appareil de transfert semi-sec EBU 4000 (C.B.S. Scientific) avec du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol). L'ampérage est de 400 mA. Après transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, celle-ci est incubée sous agitation pendant une heure dans du TS-lait (20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,4 avec 5% de lait écrémé en poudre) pour éviter les interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. Une fois saturée, la membrane est incubée pendant la nuit sous agitation à +4°C en présence de l'anticorps primaire anti-LexA fournit dans le kit DUALhunter dilué au 1/1000ème dans du TS-lait. Ensuite, la membrane est rincée trois fois avec du TS et est incubée en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) dilué au 1/20000ème dans du TS-lait pendant une heure à 37°C. La membrane est à nouveau rincée trois fois pendant 10 minutes avec du TS. La révélation des protéines se fait par réaction enzymatique avec un tampon substrat ECL Pierce (Invitrogen) préparé en mélangeant volume à volume les deux

réactifs et on dépose ce mélange sur toute la surface des membranes. Les bandes sont révélées en une dizaine de minute dans une G-box par chimioluminescence.

6. Protocole du test d'interaction de notre protéine d'intérêt avec des protéines contrôles

Pour cette partie, le protocole 4 de la notice du fournisseur DUALhunter a été suivi. Le protocole de transformation est identique à celui présenté pour la transformation des levures avec le plasmide appât à la différence des plasmides transformés dans la levure. La quantité de chaque plasmide est toujours de 1.5 µg. Ici, on a 2 réactions différentes avec le plasmide appât : pDHB1 CP ALCV + pAI-Alg5 ; pDHB1 CP ALCV + pDL2-Alg5, et trois témoins : pDHB1-largeT + pAI-Alg5 ; pDHB1-largeT + pDL2-Alg5 ; pDHB1-largeT + pDSL-Δp53. Chaque réaction est étalée sur milieu SD-TL, SD-TLH et SD-TLHA.

7. Protocole de mise au point de la stringence du milieu de criblage

Des boîtes de milieu SD-TLH et SD-TLHA sont supplémentées avec 0, 7.5, 10, 15, 20, 50 mM de 3-AT. On inocule ensuite 10 mL de milieu SD-L avec 40 µL des pré-cultures de levures contenant l'appât pDHB1-CP qu'on laisse pousser pendant 8 heures à 30°C sous agitation. On inocule 100 mL de milieu SD-L avec cette préculture et on laisse pousser sur la nuit à 30°C sous agitation. On prélève 1 mL du milieu de culture puis on centrifuge à 2500 g pendant 5 minutes et on resuspend le culot dans 1 mL d'eau pure. La DO_{600nm} de la suspension est mesurée contre un blanc qui consiste en de l'eau. A partir de la DO, on calcule le volume du milieu de culture à prélever pour avoir 22.5 unités de DO, en sachant que 150 mL de milieu de culture avec une DO_{600nm} de 0.15 = 22.5 unités de DO. On aliquote le volume choisi dans un falcon de 50 mL et on le centrifuge à 700 g pendant 5 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans 150 mL de YPAD 2x, pré-chauffé à 30°C dans une bouteille de 1L, et on prélève 1 mL. A nouveau, l'aliquot est centrifugé à 2500 g pendant 5 minutes, avant de resuspendre le culot dans de l'eau. La DO de l'aliquot doit être de 0.15. Les cellules sont ensuite laissées à pousser à 30°C sous agitation jusqu'à ce qu'elles atteignent une DO de 0.6-0.7, c'est à dire deux phases de division cellulaire. L'ADN de sperme de saumon est dénaturé deux fois à 95°C sur un bloc sec avec un passage sur la glace de 5 minutes entre chaque dénaturation. Le mélange Peg/LiOAc est préparé ainsi que le mélange "LiOAc/TE. La culture de levure est partagée en 3 falcons de 50 mL qui sont centrifugés à 700 g pendant 5 minutes. Les culots sont resuspendu dans 1 mL

de mélange LiOAc/TE et transférés dans des Eppendorfs. Le mélange est centrifugé à 700 g pendant 5 minutes. Le culot est ensuite centrifugé dans 600 µL de LiOAc/TE. On prépare 3 falcons et dans chacun on dépose 7 µg du plasmide pPR3-N, 100 µL de l'ADN de sperme de saumon, 600 µL de la resuspension de levure, et 2.5 mL du mélange PEG/LiOAc. Le tout est homogénéisé avant d'être incubé à 30°C pendant 45 minutes. On ajoute 160 µL de DMSO à chaque tube puis on incube à 42°C pendant 20 minutes. Les levures sont culottées à 700 g pour 5 minutes. On resuspend chaque culot dans 3 mL de 2x YPAD et on rassemble les suspensions. Les cellules sont ensuite laissées en régénération pendant 90 minutes à 30°C sous agitation. Enfin les cellules sont centrifugées à 700 g pendant 5 minutes et on resuspend le culot dans 3.6 mL de NaCl à 0.9%. On étale 200 µL de la resuspension sur chacun des milieux SD-TLH et SD-TLHA contenant le 3-AT. Les boîtes sont laissées à incuber 3 jours à 30°C.

8. Criblage des interactions entre la protéine d'intérêt et les protéines exprimées par la banque d'ADNc

Douze boîtes de SD-TLH et de SD-TLHA avec 20 mM de 3-AT sont préparées. Trois boîtes SD-TL sont également préparées mais sans ajout de 3-AT. Les étapes de ce protocole sont les mêmes que pour la mise au point de la stringence, à la différence du plasmide qui a la place d'être pPR3-N vide, est pPR3-N avec la banque d'ADNc. Une quantité de 7 µg d'ADN de plasmide est ajoutée aux cellules, ce qui correspond à un volume de 3 µL de la banque d'ADNc préparée par le fournisseur. Une étape supplémentaire de contrôle de l'efficacité de la transformation est ajoutée. Pour cela, une fois les levures étalées sur les milieux SD-TLH et SD-TLHA, le restant de levure est dilué au 1/100ème, au 1/1000ème, et au 1/10 000 et étalé sur les milieux SD-TL. Selon le protocole du kit DUALhunter, la quantité totale de transformant est calculée par la formule "Nombre total de transformants" = nombre de colonies sur milieu SD-TL x le facteur de dilution x 10 x 4.8 (le volume de resuspension des levures dans le NaCl). L'efficacité de transformation (clones / µg ADN) est calculée en divisant le nombre total de transformant par 28 µg.

9. Contrôle de l'intégration des plasmides de la banque d'ADNc dans les levures transformées

a. Sauvegarde des candidats levures obtenus

Toutes les levures obtenues lors du criblage (SD-TLH et SD-TLHA) ont été mises à pousser dans des tubes à hémolyse avec 3 mL de milieu SD-TLH à 30°C sous agitation sur la nuit. Le lendemain, un volume de 300 µL de ces levures a été mélangé à 1.2 mL de glycérol et stocké à -80°C.

b. PCR sur les colonies de levures candidates

Seuls les candidats obtenus sur milieu SD-TLHA ont été caractérisés dans la suite des expériences de double-hybride. Une PCR avec les amorces pPR3-N fournies par le kit DUALhunter dont la séquence est pPR3-N F-5'-GTC GAA AAT TCA AGA CAA GAC AAG G -3' et pPR3-N R-5'- AAG CGT GAC ATA ACT AAT TAC -3' est réalisée sur ces levures afin de trier celles qui sont vides et d'estimer le nombre de plasmides pPR3-N contenus dans chaque clone. Le milieu réactionnel contient la GoTaq Hot start de Promega et le volume d'ADN matrice utilisé est 1 µL du volume de culture de l'étape précédente. Le programme du thermocycleur était comme suit : 2 minutes de dénaturation initiale à 95°C, 1 minute d'hybridation à 55°C, 1 minute d'élongation à 72°C suivi de 39 cycles chacun de 20 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C et 1 minute à 72°C. Enfin une élongation finale à 72°C de 5 minutes permet de clore la réaction. Le produit de PCR a ensuite été observé en migration par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% avec un BenchTop ladder de 100 paires de base (Promega) comme marqueur de taille. Le gel est enfin trempé dans du bromure d'éthidium (BET) avant son observation aux U.Vs.

10. Identification des protéines candidates à l'interaction avec notre protéine d'intérêt

a. Lyse et extraction des plasmides des levures candidate

Le volume restant de 1.8 mL de chacune des cultures des candidats SD-TLHA est resuspendu dans 50 µL de tampon de lyse. On homogénéise vigoureusement puis on ajoute 200 unités de lyticase (30 unités / µL) de chez Sigma à chacun des tubes. L'enzyme est laissé à lyser la membrane des levures sur la nuit sous incubation à 37°C. Le lendemain les levures sont

collectées par une centrifugation de 5 minutes à 4000 rpm. Enfin le kit Genejet plasmid Miniprep de chez Thermo Fisher scientific a été utilisé pour récupérer les plasmides de levures.

b. Transformation des bactéries

Les plasmides extraits sont clonés en bactéries DH5a suivant le même protocole que pour le clonage du plasmide appât dans les DH5a. La quantité de plasmide utilisée pour réaliser la transformation est de 150 ng et les bactéries ont été étalées sur milieu LB (Thermo Fisher Scientific) + Amp. La sélection à cet antibiotique permet de ne pas sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide pDHB1.

c. PCR sur bactéries DH5a transformées

Le protocole suivi est le même que pour les PCR sur levures excepté que le prélèvement de la matrice se fait directement en piquant la colonie avec un cône de pipette 10 µL avant de le plonger dans le milieu réactionnel.

d. Miniprep sur les DH5a ayant intégré le plasmide pPR3-N

Les colonies qui présentent des tailles de bandes (ou d'insert) différentes après la PCR pour une même levure sont mises en pré-cultures dans 3 mL de milieu LB + Amp à 37°C sur la nuit. Un volume de 300 µL de cette culture est mélangé à 1.2 mL de glycerol, homogénéisé puis stocké à -80°C. Le reste sert à extraire les plasmides grâce au kit Genejet plasmid Miniprep de chez Thermo Fisher Scientific en suivant le protocole du fournisseur.

e. Blast des ADNc de la librairie isolée

Les plasmides avec des inserts sont envoyés avec les amorces spécifiques pour pPR3-N. La séquence reçue est blastée sur NCBI avec le "Blastn" et la séquence la plus homologue est retenue pour chaque insert de la librairie.

11. Protocole de validation en levure de l'interaction des protéines candidates isolées avec notre protéine d'intérêt

Des boîtes de milieux SD-TLHA à une concentration en 3-AT de 20 mM et des boîtes SD-TL sont coulées. Le protocole suivi ici est identique à celui du criblage sauf qu'on dépose 1.5 µg de plasmide proie pour chacun des plasmides de la librairie dans le milieu de transformation.

12. Protocole de validation en levure de l'interaction spécifique des protéines candidates isolées

Le protocole est similaire à l'étape précédente à la différence que les levures qui servent à faire la transformation contiennent le plasmide pDHB1-largeT.

13. Test préliminaire de validation en dehors du système double-hybride levure

a. Co-marquage de l'ADN de la CP de l'ALCV et des anticorps anti-TMEM165

Deux échantillons d'anticorps commerciaux anti-TMEM165 humaine nous ont été donné par François Foulquier, chercheur au CNRS dans l'unité de glycobiochimie structurale et fonctionnelle de l'Université Lille 1. Les anticorps des marques Thermo Fisher Scientific et Sigma-Aldrich ciblent respectivement la boucle dans le lumen du golgi situé entre le 1er et le 2ème domaine transmembranaire (acides aminés 33 à 71) et la boucle cytosolique entre le 4ème et le 5ème domaine transmembranaire (acides aminés 176 à 229). Le protocole de co-marquage de l'ADN de la CP de l'ALCV et de la TMEM165 dans les intestins moyen antérieur de *A. craccivora* est tel que décrit dans Ryckebusch et. al., 2020a avec une étape d'immunomarquage supplémentaire. Ainsi après le dernier bain de PBS et avant de monter les intestins sur les lames, ces organes sont mis à incuber dans une solution de saturation avec du PBS à 5% de Séralbumine bovine (BSA) pendant 90 minutes à température ambiante. Puis les intestins sont mis à incuber pendant la nuit dans une solution d'anticorps primaire anti-TMEM165 de chez Thermo Fisher Scientific ou Sigma-Aldrich diluée dans du PBS + BSA à 5% à une concentration de 1/300ème avant d'être mis à incuber à + 4°C pendant la nuit. Le lendemain trois lavages avec 500 µL de PBS 1x sont effectués puis les intestins sont mélangés à une solution d'anticorps secondaires anti-lapin conjugué à un fluorochrome Alexa-Fluor 594

(Invitrogen) à une concentration de 1/600ème dans du PBS+BSA. Enfin on incube 1 heure à 37°C, puis trois lavages de 10 minutes au PBS avant que ne soient montés les intestins entre lame et lamelle avec du DAPI. Les échantillons ont été regardé au microscope confocal Zeiss comme dans Ryckebusch et. al. 2020a.

Références

- Acosta, E.G., Castilla, V., Damonte, E.B., 2009. Alternative infectious entry pathways for dengue virus serotypes into mammalian cells. *Cell. Microbiol.* 11, 1533–1549. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01345.x>
- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252, 1651–1656. <https://doi.org/10.1126/science.2047873>
- Alliot, B., Signoret, P.A., 1972. La «maladie à étiologies de la Luzerne», une maladie nouvelle pour la France. *J Phytopathol* 74, 69–73. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1972.tb04647.x>
- Ammar, E.-D., Gargani, D., Lett, J.M., Peterschmitt, M., 2009. Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. *Arch Virol* 154, 255. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0308-2>
- Ammar, E.-D., Peterschmitt, M., 2004. Maize yellow stripe : Maize yellow stripe virus (Possible member of the Tenuivirus genus) [WWW Document]. *Viruses and virus diseases of Poaceae (Gramineae)*. URL <http://agritrop.cirad.fr/522308/>
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A., Mann, M., 2003. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570–574. <https://doi.org/10.1038/nature02166>
- Anderson, R.E., Sogin, M.L., Baross, J.A., 2014. Evolutionary Strategies of Viruses, Bacteria and Archaea in Hydrothermal Vent Ecosystems Revealed through Metagenomics. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109696>
- Andreazzoli, M., De Lucchini, S., Costa, M., Barsacchi, G., 1993. RNA binding properties and evolutionary conservation of the *Xenopus* multifinger protein Xfin. *Nucleic Acids Res.* 21, 4218–4225. <https://doi.org/10.1093/nar/21.18.4218>
- Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V., Fuchs, M., 2004. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology* 320, 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.11.022>
- Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M.J., Moon, R.T., Zheng, N., 2006. Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 443, 590–593. <https://doi.org/10.1038/nature05175>
- Aranda, M.A., Escaler, M., Wang, D., Maule, A.J., 1996. Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15289–15293. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15289>
- Arguello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.-J., Orozco, B.M., Settlage, S.B., Hanley-Bowdoin, L., 2004. A Novel Motif in Geminivirus Replication Proteins Interacts with the Plant Retinoblastoma-Related Protein. *Journal of Virology* 78, 4817–4826. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4817-4826.2004>
- Atzmon, G., 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. <https://doi.org/10.1023/A:1008699603559>
- Avota, E., Gulbins, E., Schneider-Schaulies, S., 2011. DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS Pathog.* 7, e1001290. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001290>
- Bacsa, S., Karasneh, G., Dosa, S., Liu, J., Valyi-Nagy, T., Shukla, D., 2011. Syndecan-1 and syndecan-2 play key roles in herpes simplex virus type-1 infection. *J Gen Virol* 92, 733–743. <https://doi.org/10.1099/vir.0.027052-0>

- Bagnall, R.H., MacGillivray, M.E., Becker, E.C., 1963. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses, by J. S. Kennedy, M. F. Day and V. F. Eastop.
<https://doi.org/10.4039/Ent951119-10>
- Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L.D., Duvallet, G., Jittapalapong, S., 2014. Tabanids: neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infect. Genet. Evol.* 28, 596–615. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.029>
- Bass, C., Puinean, A.M., Zimmer, C.T., Denholm, I., Field, L.M., Foster, S.P., Gutbrod, O., Nauen, R., Slater, R., Williamson, M.S., 2014. The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51, 41–51.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.05.003>
- Becker, N., Rimbaud, L., Chiroleu, F., Reynaud, B., Thébaud, G., Lett, J.-M., 2015. Rapid accumulation and low degradation: key parameters of Tomato yellow leaf curl virus persistence in its insect vector *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* 5, 1–10.
<https://doi.org/10.1038/srep17696>
- Bencharki, B., Boissinot, S., Revollon, S., Ziegler-Graff, V., Erdinger, M., Wiss, L., Dinant, S., Renard, D., Beuve, M., Lemaitre-Guillier, C., Brault, V., 2010. Phloem protein partners of Cucurbit aphid borne yellows virus: possible involvement of phloem proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 799–810.
<https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI-23-6-0799>
- Berberet, R.C., Giles, K.L., Zarrabi, A.A., Payton, M.E., 2009. Development, Reproduction, and Within-Plant Infestation Patterns of *Aphis craccivora* (Homoptera: Aphididae) on Alfalfa. *Environ Entomol* 38, 1765–1771. <https://doi.org/10.1603/022.038.0630>
- Bernardo, P., Golden, M., Akram, M., Naimuddin, Nadarajan, N., Fernandez, E., Granier, M., Rebelo, A.G., Peterschmitt, M., Martin, D.P., Roumagnac, P., 2013. Identification and characterisation of a highly divergent geminivirus: Evolutionary and taxonomic implications. *Virus Research* 177, 35–45. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.07.006>
- Beyenbach, K.W., Skaer, H., Dow, J.A.T., 2010. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 351–374.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085512>
- Bideshi, D.K., Demattei, M.-V., Rouleux-Bonnin, F., Stasiak, K., Tan, Y., Bigot, S., Bigot, Y., Federici, B.A., 2006. Genomic sequence of *Spodoptera frugiperda* Ascovirus 1a, an enveloped, double-stranded DNA insect virus that manipulates apoptosis for viral reproduction. *J. Virol.* 80, 11791–11805. <https://doi.org/10.1128/JVI.01639-06>
- Bisaro, D.M., 2006. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* 344, 158–168.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.041>
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2007. Taxonomic issues., in: Emden, H.F. van, Harrington, R. (Eds.), *Aphids as Crop Pests*. CABI, Wallingford, pp. 1–29.
<https://doi.org/10.1079/9780851998190.0001>
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J., Pirone, T.P., 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 12), 3119–3122.
<https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3119>
- Blanc, S., Drucker, M., Uzest, M., 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu Rev Phytopathol* 52, 403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045920>
- Blanc, S., Gutiérrez, S., 2015. The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants. *Curr Opin Virol* 15, 27–33.
<https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.003>
- Blattný, C., 1959. Virus papillosity of the leaves of lucerne. *Folia Microbiol* 4, 212–215.
<https://doi.org/10.1007/BF02928312>

- Bollinger, C.R., Teichgräber, V., Gulbins, E., 2005. Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1746, 284–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.09.001>
- Bosco, D., Mason, G., Accotto, G.P., 2004. TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Virology* 323, 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.010>
- Bosque-Pérez, N.A., Eigenbrode, S.D., 2011. The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: insights from luteovirus pathosystems. *Virus Res.* 159, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.020>
- Bouvaine, S., Boonham, N., Douglas, A., 2011. Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids. *Journal of General Virology* 92, 1467–74. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029355-0>
- Brady, C.M., Asplen, M.K., Desneux, N., Heimpel, G.E., Hopper, K.R., Linnen, C.R., Oliver, K.M., Wulff, J.A., White, J.A., 2014. Worldwide Populations of the Aphid *Aphis craccivora* Are Infected with Diverse Facultative Bacterial Symbionts. *Microbial Ecology* 67, 195–204. <https://doi.org/10.1007/s00248-013-0314-0>
- Braendle, C., Davis, G.K., Brisson, J.A., Stern, D.L., 2006. Wing dimorphism in aphids. *Heredity* 97, 192–199. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800863>
- Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez-Moya, J.J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi, P., Torrance, L., 2013. Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. *Annual Review of Phytopathology* 51, 177–201. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102346>
- Brault, V., Herrbach, E., Reinbold, C., 2007. Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* 38, 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.04.005>
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M.T., Herrbach, E., Richards, K., Ziegler-Graff, V., 2000. Effects of Point Mutations in the Readthrough Domain of the Beet Western Yellows Virus Minor Capsid Protein on Virus Accumulation In Planta and on Transmission by Aphids. *Journal of Virology* 74, 1140–1148. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.3.1140-1148.2000>
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., Blanc, S., 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* 333, 524–538. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.04.001>
- Bressan, A., Watanabe, S., 2011. Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. *Virus Res.* 155, 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.12.005>
- Briddon, R.W., 2015. Geminiviridae, in: *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000750.pub3>
- Briddon, R.W., Pinner, M.S., Stanley, J., Markham, P.G., 1990. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* 177, 85–94. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(90\)90462-z](https://doi.org/10.1016/0042-6822(90)90462-z)
- Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C.F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S., Varsani, A., 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch Virol* 160, 1593–1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>
- Bruyère, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M. T., 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 Virus Accumulation, Symptoms, and Aphid Transmission. *Virology* 230, 323–34. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8476>

- Budnik, K., Laing, M.D., da Graça, J.V., 1996. Reduction of yield losses in pepper crops caused by potato virus Y in KwaZulu-Natal, South Africa, using plastic mulch and Yellow sticky traps. *Phytoparasitica* 24, 119–124. <https://doi.org/10.1007/BF02981406>
- Cao, C., Subhawong, T., Albert, J.M., Kim, K.W., Geng, L., Sekhar, K.R., Gi, Y.J., Lu, B., 2006. Inhibition of mammalian target of rapamycin or apoptotic pathway induces autophagy and radiosensitizes PTEN null prostate cancer cells. *Cancer Res.* 66, 10040–10047. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0802>
- Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., 2001. Transmission Characteristics of the European Stone Fruit Yellows Phytoplasma and its Vector *Cacopsylla Pruni*. *European Journal of Plant Pathology* 107, 695–700. <https://doi.org/10.1023/A:1011923801387>
- Castillo, A.G., Kong, L.J., Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E.R., 2004. Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J. Virol.* 78, 2758–2769. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.6.2758-2769.2004>
- Castro, I.F. de, Zamora, P.F., Ooms, L., Fernández, J.J., Lai, C.M.-H., Mainou, B.A., Dermody, T.S., Risco, C., 2014. Reovirus Forms Neo-Organelles for Progeny Particle Assembly within Reorganized Cell Membranes. *mBio* 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.00931-13>
- Chagas, C.M., Kitajima, E.W., Rodrigues, J.C.V., 2003. Coffee Ringspot Virus Vected by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) in Coffee. *Exp Appl Acarol* 30, 203–213. <https://doi.org/10.1023/B:APPA.0000006549.87310.41>
- Chen, A.Y.S., Walker, G.P., Carter, D., Ng, J.C.K., 2011. A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *PNAS* 108, 16777–16782. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109384108>
- Chen, Q., Chen, H., Mao, Q., Liu, Q., Shimizu, T., Uehara-Ichiki, T., Wu, Z., Xie, L., Omura, T., Wei, T., 2012. Tubular Structure Induced by a Plant Virus Facilitates Viral Spread in Its Vector Insect. *PLoS Pathog* 8, e1003032. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003032>
- Chen, Q., Wang, H., Ren, T., Xie, L., Wei, T., 2015. Interaction between non-structural protein Pns10 of rice dwarf virus and cytoplasmic actin of leafhoppers is correlated with insect vector specificity. *J. Gen. Virol.* 96, 933–938. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000022>
- Chougule, N.P., Li, H., Liu, S., Linz, L.B., Narva, K.E., Meade, T., Bonning, B.C., 2013. Retargeting of the *Bacillus thuringiensis* toxin Cyt2Aa against hemipteran insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 8465–8470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222144110>
- Cilia, M., Peter, K.A., Bereman, M.S., Howe, K., Fish, T., Smith, D., Gildow, F., MacCoss, M.J., Thannhauser, T.W., Gray, S.M., 2012. Discovery and Targeted LC-MS/MS of Purified Polerovirus Reveals Differences in the Virus-Host Interactome Associated with Altered Aphid Transmission. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048177>
- Cilia, M., Tamborindeguy, C., Fish, T., Howe, K., Thannhauser, T.W., Gray, S., 2011. Genetics Coupled to Quantitative Intact Proteomics Links Heritable Aphid and Endosymbiont Protein Expression to Circulative Polerovirus Transmission. *Journal of Virology* 85, 2148–2166. <https://doi.org/10.1128/JVI.01504-10>
- Coleman, J., Juhn, J., James, A.A., 2007. Dissection of Midgut and Salivary Glands from *Ae. aegypti* Mosquitoes. *J Vis Exp.* <https://doi.org/10.3791/228>
- Conti, M., Lovisolò, O., 1984. Transmission des virus de végétaux par les Cicadelles. *Bulletin de la Société Entomologique de France* 89, 730–740.
- Cook, A.A., Wilton, A.C., 1984. Alfalfa enation virus in the Kingdom of Saudi Arabia. *FAO, Bull. Phytosanit* 32, 139–140.
- Corcoran, C.A., He, Q., Ponnusamy, S., Ogretmen, B., Huang, Y., Sheikh, M.S., 2008. Neutral Sphingomyelinase-3 Is a DNA Damage and Nongenotoxic Stress-Regulated

- Gene That Is Deregulated in Human Malignancies. *Mol Cancer Res* 6, 795–807. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2097>
- Cortasio, C.L., Perrin, B.J., Bennin, D.A., Huttenlocher, A., 2010. Actin-binding Protein-1 Interacts with WASp-interacting Protein to Regulate Growth Factor-induced Dorsal Ruffle Formation. *Mol. Biol. Cell* 21, 186–197. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-02-0106>
- Cui, X., Li, G., Wang, D., Hu, D., Zhou, X., 2005. A Begomovirus DNA β -encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J. Virol.* 79, 10764–10775. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10764-10775.2005>
- Czosnek, H., 2007. Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: Management, Molecular Biology, Breeding for Resistance. Springer Science & Business Media.
- Czosnek, H., Ghanim, M., 2012. Back to Basics: Are Begomoviruses Whitefly Pathogens? *Journal of Integrative Agriculture* 11, 225–234. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60007-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60007-0)
- Czosnek, H., Ghanim, Miriam, Ghanim, Murad, 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*— insights from studies with Tomato yellow leaf curl virus. *Annals of Applied Biology* 140, 215–231. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00175.x>
- Davoodi, Z., Heydarnejad, J., Massumi, H., Richet, C., Galzi, S., Filloux, D., Roumagnac, P., 2018. First Report of Alfalfa Leaf Curl Virus from Alfalfa in Iran. *Plant Dis.* 102, 2385–2386. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0571-PDN>
- de Assis Filho, F.M., Deom, C.M., Sherwood, J.L., 2004. Acquisition of Tomato spotted wilt virus by Adults of Two Thrips Species. *Phytopathology* 94, 333–336. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2004.94.4.333>
- De Barro, P.J., Liu, S.-S., Boykin, L.M., Dinsdale, A.B., 2011. *Bemisia tabaci*: A Statement of Species Status. *Annual Review of Entomology* 56, 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085504>
- De Lucchini, S., Rijli, F.M., Ciliberto, G., Barsacchi, G., 1991. A *Xenopus* multifinger protein, Xfin, is expressed in specialized cell types and is localized in the cytoplasm. *Mech. Dev.* 36, 31–40. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(91\)90069-i](https://doi.org/10.1016/0925-4773(91)90069-i)
- de Zoeten, G.A., Skaf, J.S., 2001. Pea enation mosaic and the vagaries of a plant virus. *Adv. Virus Res.* 57, 323–350. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(01\)57007-4](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(01)57007-4)
- Demaegd, D., Foulquier, F., Colinet, A.-S., Gremillon, L., Legrand, D., Mariot, P., Peiter, E., Van Schaffingen, E., Matthijs, G., Morsomme, P., 2013. Newly characterized Golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 6859–6864. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219871110>
- Demangeat, G., 2007. Transmission des Nepovirus par les nématodes Longidoridae. *Virologie* 11, 309–321. <https://doi.org/10.1684/vir.2007.0102>
- Dickinson, V.J., Halder, J., Woolston, C.J., 1996. The Product of Maize Streak Virus ORF V1 Is Associated with Secondary Plasmodesmata and Is First Detected with the Onset of Viral Lesions. *Virology* 220, 51–59. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0285>
- Dietzgen, R.G., Mann, K.S., Johnson, K.N., 2016. Plant Virus–Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. *Viruses* 8, 303. <https://doi.org/10.3390/v8110303>
- Dombrovsky, A., Gollop, N., Chen, S., Chejanovsky, N., Raccach, B., 2007. In vitro association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*. *Journal of General Virology* 88, 1602–1610. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82769-0>

- Dombrovsky, A., Sobolev, I., Chejanovsky, N., Racciah, B., 2007. Characterization of RR-1 and RR-2 cuticular proteins from *Myzus persicae*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 146, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.11.013>
- Dreschers, S., Franz, P., Dumitru, C., Wilker, B., Jahnke, K., Gulbins, E., 2007. Infections with human rhinovirus induce the formation of distinct functional membrane domains. *Cell. Physiol. Biochem.* 20, 241–254. <https://doi.org/10.1159/000104170>
- Dykstra, H.R., Weldon, S.R., Martinez, A.J., White, J.A., Hopper, K.R., Heimpel, G.E., Asplen, M.K., Oliver, K.M., 2014. Factors limiting the spread of the protective symbiont *Hamiltonella defensa* in *Aphis craccivora* Aphids. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 5818–5827. <https://doi.org/10.1128/AEM.01775-14>
- Elbert, A., Nauen, R., 2000. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Management Science* 56, 60–64. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1526-4998\(200001\)56:1<60::AID-PS88>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1526-4998(200001)56:1<60::AID-PS88>3.0.CO;2-K)
- El-Defrawi, G.M.M., El-Harty, E.H., n.d. Injury levels and yield loss model for the cowpea aphid (*Aphis craccivora* Koch) on *Vicia faba* L. Egypt. *J. Agric. Res.*, 87, 1- 25.
- Elliott, R.M., 1997. Emerging Viruses: The Bunyaviridae. *Mol Med* 3, 572–577. <https://doi.org/10.1007/BF03401814>
- Erlenhoefer, C., Wurzer, W., Löffler, S., Schneider-Schaulies, S., Meulen, V., Schneider-Schaulies, J., 2001. CD150 (SLAM) Is a Receptor for Measles Virus but Is Not Involved in Viral Contact-Mediated Proliferation Inhibition. *Journal of virology* 75, 4499–4505. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4499-4505.2001>
- Espinoza, A.M., Medina, V., Hull, R., Markham, P.G., 1991. Cauliflower mosaic virus gene II product forms distinct inclusion bodies in infected plant cells. *Virology* 185, 337–344. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90781-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90781-6)
- Fantini, J., Tamalet, C., Hammache, D., Tourrès, C., Duclos, N., Yahi, N., 1998. HIV-1-Induced Perturbations of Glycosphingolipid Metabolism Are Cell-Specific and Can Be Detected at Early Stages of HIV-1 Infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 19, 221–9. <https://doi.org/10.1097/00042560-199811010-00003>
- Fiallo-Olivé, E., Martínez-Zubiaur, Y., Moriones, E., Navas-Castillo, J., 2012. A novel class of DNA satellites associated with New World begomoviruses. *Virology* 426, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.01.024>
- Filichkin, S.A., Brumfield, S., Filichkin, T.P., Young, M.J., 1997. In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J. Virol.* 71, 569–577.
- Fontes, E.P., Eagle, P.A., Sipe, P.S., Luckow, V.A., Hanley-Bowdoin, L., 1994. Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* 269, 8459–8465.
- Forbes, A.R., 1977. CHAPTER 3 - The Mouthparts and Feeding Mechanism of Aphids, in: Harris, K.F., Maramorosch, K. (Eds.), *Aphids As Virus Vectors*. Academic Press, pp. 83–103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-327550-9.50008-2>
- Foulquier, F., Amyere, M., Jaeken, J., Zeevaert, R., Schollen, E., Race, V., Bammens, R., Morelle, W., Rosnoblet, C., Legrand, D., Demaegd, D., Buist, N., Cheillan, D., Guffon, N., Morsomme, P., Annaert, W., Freeze, H.H., Van Schaftingen, E., Vikkula, M., Matthijs, G., 2012. TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am. J. Hum. Genet.* 91, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.05.002>

- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04703.x>
- Franz, A.W.E., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., Clem, R.J., 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7, 3741–3767. <https://doi.org/10.3390/v7072795>
- Froissart, R., Doumayrou, J., Vuillaume, F., Alizon, S., Michalakakis, Y., 2010. The virulence-transmission trade-off in vector-borne plant viruses: a review of (non-)existing studies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 1907–1918. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0068>
- Gafni, Y., Epel, B.L., 2002. The role of host and viral proteins in intra- and inter-cellular trafficking of geminiviruses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 231–241. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0402>
- Garret, A., Kerlan, C., Thomas, D., 1996. Ultrastructural study of acquisition and retention of potato leafroll luteovirus in the alimentary canal of its aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Arch. Virol.* 141, 1279–1292. <https://doi.org/10.1007/bf01718830>
- Gassert, E., Avota, E., Harms, H., Krohne, G., Gulbins, E., Schneider-Schaulies, S., 2009. Induction of Membrane Ceramides: A Novel Strategy to Interfere with T Lymphocyte Cytoskeletal Reorganisation in Viral Immunosuppression. *PLOS Pathogens* 5, e1000623. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000623>
- Gault, C.R., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688, 1–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6741-1_1
- 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. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8937>
- Ghosh, S., Kanakala, S., Lebedev, G., Kontsedalov, S., Silverman, D., Alon, T., Mor, N., Sela, N., Luria, N., Dombrovsky, A., Mawassi, M., Haviv, S., Czosnek, H., Ghanim, M., 2019. Transmission of a new polerovirus infecting pepper by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/JVI.00488-19>
- Gillott, C., 2005 *Entomology* 3rd ed. [WWW Document]. calameo.com. URL <https://www.calameo.com/books/00041071531d5a0f203a8> (accessed 1.23.20).
- Goberdhan, D.C.I., Meredith, D., Boyd, C.A.R., Wilson, C., 2005. PAT-related amino acid transporters regulate growth via a novel mechanism that does not require bulk transport of amino acids. *Development* 132, 2365–2375. <https://doi.org/10.1242/dev.01821>
- Goodchild, A.J.P., 1966. Evolution of the Alimentary Canal in the Hemiptera. *Biological Reviews* 41, 97–139. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1966.tb01540.x>
- Gorovits, R., Fridman, L., Kolot, M., Rotem, O., Ghanim, M., Shriki, O., Czosnek, H., 2016. Tomato yellow leaf curl virus confronts host degradation by sheltering in small/midsized protein aggregates. *Virus Res.* 213, 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.11.020>
- Götz, M., Popovski, S., Kollenberg, M., Gorovits, R., Brown, J.K., Cicero, J.M., Czosnek, H., Winter, S., Ghanim, M., 2012. Implication of *Bemisia tabaci* heat shock protein 70 in Begomovirus-whitefly interactions. *J. Virol.* 86, 13241–13252. <https://doi.org/10.1128/JVI.00880-12>
- Govier, D.A., Kassanis, B., Pirone, T.P., 1977. Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* 78, 306–314. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(77\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(77)90101-5)

- Grassmé, H., Riehle, A., Wilker, B., Gulbins, E., 2005. Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J. Biol. Chem.* 280, 26256–26262. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500835200>
- Gray, S., Cilia, M., Ghanim, M., 2014. Chapter Four - Circulative, “Nonpropagative” Virus Transmission: An Orchestra of Virus-, Insect-, and Plant-Derived Instruments, in: Maramorosch, K., Murphy, F.A. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 141–199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00004-5>
- Gulbins, E., Dreschers, S., Wilker, B., Grassmé, H., 2004. Ceramide, membrane rafts and infections. *J. Mol. Med.* 82, 357–363. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0539-y>
- Gulbins, E., Grassmé, H., 2002. Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 139–145. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(02\)00334-7](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(02)00334-7)
- Guo, Z.P., Zhang, J.X., Wang, M.L., Guan, Y.Z., Qu, G., Liu, J.Y., Guo, Y.X., Yan, X.B., 2019. First Report of Alfalfa Leaf Curl Virus Infecting Alfalfa (*Medicago sativa*) in China. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0318-PDN>
- Gutierrez, A.P., Morgan, D.J., Havenstein, D.E., 1971. The Ecology of *Aphis craccivora* Koch and Subterranean Clover Stunt Virus. I. The Phenology of Aphid Populations and the Epidemiology of Virus in Pastures in South-East Australia. *Journal of Applied Ecology* 8, 699–721. <https://doi.org/10.2307/2402678>
- Gutierrez, C., 2002. Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 219–230. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2002.0401>
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S.B., Orozco, B.M., Nagar, S., Robertson, D., 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35, 105–140.
- Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2002. The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J. Biol. Chem.* 277, 25847–25850. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200008200>
- Harrington, L.C., Edman, J.D., Scott, T.W., 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? *J. Med. Entomol.* 38, 411–422. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.3.411>
- Harris, K.F., Maramorosch, K. (Eds), 1977. *Aphids as Virus Vectors*, Academic Press. <https://www.elsevier.com/books/aphids-as-virus-vectors/harris/978-0-12-327550-9%20harris> (accessed 1.23.20).
- Harris, K.F., Maramorosch, K. (Eds) 1980. *Vectors of Plant Pathogens*. Academic Press.
- Hayashida, K., Johnston, D.R., Goldberger, O., Park, P.W., 2006. Syndecan-1 expression in epithelial cells is induced by transforming growth factor beta through a PKA-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 24365–24374. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509320200>
- Herrbach, E., Le Maguet, J., Hommay, G., 2016. Virus Transmission by Mealybugs and Soft Scales (Hemiptera: Coccoidea), in: Brown, J.K. (Ed.), *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*. Phytopathological Society, pp. 147–161. <https://doi.org/10.1094/9780890545355.011>
- Hibino, H., 1996. Biology and Epidemiology of Rice Viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34, 249–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.249>
- Hoch, A.L., Ii, T.P.G., Bailey, C.L., 1985. Mechanical Transmission of Rift Valley Fever Virus by Hematophagous Diptera*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34, 188–193. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.188>
- Hogenhout, S.A., Ammar, E.-D., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol* 46, 327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>

- Holman, J., 2008. Book Review: Blackman R.L. & Eastop V.F.: Aphids on the World's Herbaceous Plants and Shrubs. *European Journal of Entomology* 105, 164–164. <https://doi.org/10.14411/eje.2008.024>
- Holopainen, J., Penate Medina, O., Metso, A.J., Kinnunen, P., 2000. Sphingomyelinase activity associated with human plasma low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 16484–9.
- Honda, K., Wei, T., Hagiwara, K., Higashi, T., Kimura, I., Akutsu, K., Omura, T., 2007. Retention of Rice dwarf virus by Descendants of Pairs of Viruliferous Vector Insects After Rearing for 6 Years. *Phytopathology* 97, 712–716. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-6-0712>
- Hooks, C.R.R., Fereres, A., 2006. Protecting crops from non-persistently aphid-transmitted viruses: a review on the use of barrier plants as a management tool. *Virus Res.* 120, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2006.02.006>
- Horowitz, A.R., Kontsedalov, S., Khasdan, V., Ishaaya, I., 2005. Biotypes B and Q of Bemisia tabaci and their relevance to neonicotinoid and pyriproxyfen resistance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58, 216–225. <https://doi.org/10.1002/arch.20044>
- Hu, J.S., Wang, M., Sether, D., Xie, W., Leonhardt, K.W., 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of banana bunchy top virus by the banana aphid (Pentalonia nigronervosa). *Annals of Applied Biology* 128, 55–64. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1996.tb07089.x>
- Huang, E.S., Johnson, R.A., 2000. Human cytomegalovirus - no longer just a DNA virus. *Nat. Med.* 6, 863–864. <https://doi.org/10.1038/78612>
- Huang, X., Qiao, G., Lei, F., 2006. Diversity and distribution of aphids in the Qinghai–Tibetan Plateau–Himalayas. *Ecological Entomology* 31, 608–615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2006.00819.x>
- Hudson, A., 1970. Notes on the Piercing Mouthparts of Three Species of Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Viewed with the Scanning Electron Microscope. *The Canadian Entomologist* 102, 501–509. <https://doi.org/10.4039/Ent102501-4>
- Hutchinson, J., 1964. The genera of flowering plants. Dicotylédones. Vol. 1. Clarendon Press: Oxford University Press, London.
- Ingwell, L.L., Eigenbrode, S.D., Bosque-Pérez, N.A., 2012. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Sci Rep* 2, 578. <https://doi.org/10.1038/srep00578>
- Inoue-Nagata, A.K., Lima, M.F., Gilbertson, R.L., 2016. A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Hortic. Bras.* 34, 8–18. <https://doi.org/10.1590/S0102-053620160000100002>
- Iskra Caruana, M.-L., Lheureux, F., Dallot, S., 2003. Les séquences pararétrovirales endogènes des plantes : nouvelle voie d'émergence du virus de mosaïque en tirets des bananiers. 5^{ème} Journées Francophones de Virologie, 10-11 avril 2003, Paris.
- Iwamaru, A., Kondo, Y., Iwado, E., Aoki, H., Fujiwara, K., Yokoyama, T., Mills, G.B., Kondo, S., 2007. Silencing mammalian target of rapamycin signaling by small interfering RNA enhances rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells. *Oncogene* 26, 1840–1851. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209992>
- J, R.S., J, N.L., 1973. [A virus disease of alfalfa with formation of enations]. [Spanish]. *Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Ser. Produccion Vegetal* 3, 131-146.
- Jackson, A.O., Dietzgen, R.G., Goodin, M.M., Bragg, J.N., Deng, M., 2005. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43, 623–660. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.011205.141136>

- Jeske, H., 2009. Geminiviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331, 185–226.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-70972-5_11
- Jia, D., Mao, Q., Chen, H., Wang, A., Liu, Y., Wang, H., Xie, L., Wei, T., 2014. Virus-Induced Tubule: a Vehicle for Rapid Spread of Virions through Basal Lamina from Midgut Epithelium in the Insect Vector. *J Virol* 88, 10488–10500.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01261-14>
- Jiao, W.-J., Li, F.-Q., Bai, Y.-L., Shi, X.-X., Zhu, M.-F., Zhang, M.-J., Mao, C.-G., Zhu, Z.-R., 2017. Rice Stripe Virus Infection Alters mRNA Levels of Sphingolipid-Metabolizing Enzymes and Sphingolipids Content in *Laodelphax striatellus*. *J Insect Sci* 17, 16. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iew111>
- Jin, J., Arias, E.E., Chen, J., Harper, J.W., Walter, J.C., 2006. A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol. Cell* 23, 709–721.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.010>
- Johnson, K.P., Dietrich, C.H., Friedrich, F., Beutel, R.G., Wipfler, B., Peters, R.S., Allen, J.M., Petersen, M., Donath, A., Walden, K.K.O., Kozlov, A.M, Podsiadlowski, L., Mayer, C., Meusemann, K., Vasilikopoulos, A., Waterhouse, R.M, Cameron, S.L., Weirauch, C., Swanson, D., Contributed, K., 2018. Phylogenomics and the evolution of hemipteroid insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Jones, R.A.C., 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, 141, 113–130. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.028>
- Jouret-Mourin, A., Haot, J., 2003. A propos de quelques pseudotumeurs du tractus digestif. *Acta Endoscopica* 33, 347–356. <https://doi.org/10.1007/BF03015748>
- Jupin, I., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., 1994. Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology* 204, 82–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1512>
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S.A., Sehgal, D., Jameel, S., 2009. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J. Virol.* 83, 12714–12724.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00717-09>
- Kamphuis, L.G., Gao, L., Singh, K.B., 2012. Identification and characterization of resistance to cowpea aphid (*Aphis craccivora* Koch) in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 12, 101. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-101>
- Kanakala, S., Ghanim, M., 2016. Implication of the Whitefly *Bemisia tabaci* Cyclophilin B Protein in the Transmission of Tomato yellow leaf curl virus. *Front Plant Sci* 7.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01702>
- Kato, S., Hayashi, R., Tsuda, T., Taniguchi, K. High pressure-induced changes of biological membrane. *European Journal of Biochemistry*
<https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.0014-2956.2002.02621.x>
- Kaufman, W.R., Nuttall, P.A., 1996. *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae): mechanism and control of arbovirus secretion in tick saliva. *Exp. Parasitol.* 82, 316–323.
<https://doi.org/10.1006/expr.1996.0039>
- Kerkut, G.A., 2013. *Regulation: Digestion, Nutrition, Excretion*. Elsevier.
- Kim, W., Lee, S., Son, Y., Ko, C., Ryu, W.-S., 2016. DDB1 Stimulates Viral Transcription of Hepatitis B Virus via HBx-Independent Mechanisms. *J Virol* 90, 9644–9653.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00977-16>
- Kritzman, A., Gera, A., Raccach, B., van Lent, J.W.M., Peters, D., 2002. The route of tomato spotted wilt virus inside the thrips body in relation to transmission efficiency. *Arch Virol* 147, 2143–2156. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0871-x>

- Krut, O., Wiegmann, K., Kashkar, H., Yazdanpanah, B., Krönke, M., 2006. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J. Biol. Chem.* 281, 13784–13793. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511306200>
- Kudchodkar, S.B., Levine, B., 2009. Viruses and autophagy. *Rev Med Virol* 19, 359–378. <https://doi.org/10.1002/rmv.630>
- Kumar, R.V. (Ed.), 2019. *Geminiviruses: Impact, Challenges and Approaches*. Springer.
- Kumari, S.G., Moukahel, A.R., Richet, C., Galzi, S., Filloux, D., Roumagnac, P., Asaad, N., Hijazi, J., Mghandef, S., 2018. First Report of Alfalfa Leaf Curl Virus Affecting Alfalfa (*Medicago sativa*) in Jordan, Lebanon, Syria, and Tunisia. *Plant Disease* 102, 2052–2052. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-18-0404-PDN>
- Kuno, G., Chang, G.-J.J., 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 608–637. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.608-637.2005>
- Kurz, T., Ozlü, N., Rudolf, F., O'Rourke, S.M., Luke, B., Hofmann, K., Hyman, A.A., Bowerman, B., Peter, M., 2005. The conserved protein DCN-1/Dcn1p is required for cullin neddylation in *C. elegans* and *S. cerevisiae*. *Nature* 435, 1257–1261. <https://doi.org/10.1038/nature03662>
- Kvarnheden, A., Sathees, K., 2016. Complete genome characterization of Barley yellow dwarf virus-OYV. Mémoire, 2nd cycle, A1E. Uppsala: SLU, Department of Plant Biology. <https://stud.epsilon.slu.se/9859/>
- La Scola, B., Desnues, C., Pagnier, I., Robert, C., Barrassi, L., Fournous, G., Merchat, M., Suzan-Monti, M., Forterre, P., Koonin, E., Raoult, D., 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 455, 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature07218>
- Latham, J.R., Saunders, K., Pinner, M.S., Stanley, J., 1997. Induction of plant cell division by beet curly top virus gene C4. *The Plant Journal* 11, 1273–1283. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061273.x>
- Leclant, F., Alliot, B., Signoret, P.A., 1973. Preliminary results on transmission and epidemiology of luteo-retrovirus (LEV): First results. [*Aphis craccivora*, *Acyrtosiphon pisum*]. *Annales de Phytopathologie*, 441-445.
- Lee, W., Park, J., Lee, G.-S., Lee, S., Akimoto, S., 2013. Taxonomic Status of the Bemisia tabaci Complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and Reassessment of the Number of Its Constituent Species. *PLOS ONE* 8, e63817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063817>
- Levy, A., Czosnek, H., 2003. The DNA-B of the non-phloem-limited bean dwarf mosaic virus (BDMV) is able to move the phloem-limited Abutilon mosaic virus (AbMV) out of the phloem, but DNA-B of AbMV is unable to confine BDMV to the phloem. *Plant Mol Biol* 53, 789–803. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.0000023662.25756.43>
- Li, C., Cox-Foster, D., Gray, S.M., Gildow, F., 2001. Vector specificity of barley yellow dwarf virus (BYDV) transmission: identification of potential cellular receptors binding BYDV-MAV in the aphid, *Sitobion avenae*. *Virology* 286, 125–133. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.0929>
- Li, H., Leavengood, J.M., Chapman, E.G., Burkhardt, D., Song, F., Jiang, P., Liu, J., Zhou, X., Cai, W., 2017. Mitochondrial phylogenomics of Hemiptera reveals adaptive innovations driving the diversification of true bugs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284, 20171223. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1223>
- Lingwood, D., Simons, K., 2010. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science (New York, N.Y.)* 327, 46–50. <https://doi.org/10.1126/science.1174621>

- Linz, L.B., Liu, S., Chougule, N.P., Bonning, B.C., 2015. In Vitro Evidence Supports Membrane Alanine Aminopeptidase N as a Receptor for a Plant Virus in the Pea Aphid Vector. *J. Virol.* 89, 11203–11212. <https://doi.org/10.1128/JVI.01479-15>
- Liu, S., Sivakumar, S., Sparks, W.O., Miller, W.A., Bonning, B.C., 2010. A peptide that binds the pea aphid gut impedes entry of Pea enation mosaic virus into the aphid hemocoel. *Virology* 401, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.009>
- Loehle, C., 1995. Social Barriers to Pathogen Transmission in Wild Animal Populations. *Ecology* 76, 326–335. <https://doi.org/10.2307/1941192>
- Lozano, G., Trenado, H.P., Fiallo-Olivé, E., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., Briddon, R.W., Navas-Castillo, J., 2016. Characterization of Non-coding DNA Satellites Associated with Sweepoviruses (Genus Begomovirus, Geminiviridae) – Definition of a Distinct Class of Begomovirus-Associated Satellites. *Front. Microbiol.* 7, e88636. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00162>
- Lu, G., Li, S., Zhou, C., Qian, X., Xiang, Q., Yang, T., Wu, J., Zhou, X., Zhou, Y., Ding, X.S., Tao, X., 2019. Tenuivirus utilizes its glycoprotein as a helper component to overcome insect midgut barriers for its circulative and propagative transmission. *PLoS Pathog.* 15, e1007655. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007655>
- Lu, G., Zhou, Z.H., Baker, M.L., Jakana, J., Cai, D., Wei, X., Chen, S., Gu, X., Chiu, W., 1998. Structure of Double-Shelled Rice Dwarf Virus. *J Virol* 72, 8541–8549.
- Luan, H., Niu, H., Luo, J., Zhi, H., 2019. Soybean Cytochrome b5 Is a Restriction Factor for Soybean Mosaic Virus. *Viruses* 11, 546. <https://doi.org/10.3390/v11060546>
- Luan, J.-B., Li, J.-M., Varela, N., Wang, Y.-L., Li, F.-F., Bao, Y.-Y., Zhang, C.-X., Liu, S.-S., Wang, X.-W., 2011. Global Analysis of the Transcriptional Response of Whitefly to Tomato Yellow Leaf Curl China Virus Reveals the Relationship of Coevolved Adaptations. *Journal of Virology* 85, 3330–3340. <https://doi.org/10.1128/JVI.02507-10>
- Lubinga, J.C., Clift, S.J., Tuppurainen, E.S.M., Stoltz, W.H., Babiuk, S., Coetzer, J.A.W., Venter, E.H., 2014. Demonstration of lumpy skin disease virus infection in *Amblyomma hebraeum* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks using immunohistochemistry. *Ticks Tick Borne Dis* 5, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.09.010>
- Lubinga, J.C., Tuppurainen, E.S.M., Mahlare, R., Coetzer, J. a. W., Stoltz, W.H., Venter, E.H., 2015. Evidence of Transstadial and Mechanical Transmission of Lumpy Skin Disease Virus by *Amblyomma hebraeum* Ticks. *Transboundary and Emerging Diseases* 62, 174–182. <https://doi.org/10.1111/tbed.12102>
- Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 1994. Plasmodesmata in Relation to Viral Movement Within Leaf Tissues. *Annual Review of Phytopathology* 32, 387–415. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.32.090194.002131>
- Lucy, A.P., Boulton, M.I., Davies, J.W., Maule, A.J., 1996. Tissue specificity of Zea mays infection by maize streak virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 22-31.
- Makkonen, K.-E., Turkki, P., Laakkonen, J.P., Ylä-Herttua, S., Marjomäki, V., Airene, K.J., 2013. 6-O- and N-Sulfated Syndecan-1 Promotes Baculovirus Binding and Entry into Mammalian Cells. *J Virol* 87, 11148–11159. <https://doi.org/10.1128/JVI.01919-13>
- Malagnini, V., de Lillo, E., Saldarelli, P., Beber, R., Duso, C., Raiola, A., Zanotelli, L., Valenzano, D., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Ratti, C., Causin, R., Gualandri, V., 2016. Transmission of grapevine Pinot gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine. *Arch. Virol.* 161, 2595–2599. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2935-3>
- Malmstrom, C.M., Melcher, U., Bosque-Pérez, N.A., 2011. The expanding field of plant virus ecology: historical foundations, knowledge gaps, and research directions. *Virus Res.* 159, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.05.010>

- Mann, K.S., Dietzgen, R.G., 2014. Plant rhabdoviruses: new insights and research needs in the interplay of negative-strand RNA viruses with plant and insect hosts. *Arch Virol* 159, 1889–1900. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2029-z>
- Mansoor, S., Khan, S.H., Bashir, A., Saeed, M., Zafar, Y., Malik, K.A., Briddon, R., Stanley, J., Markham, P.G., 1999. Identification of a novel circular single-stranded DNA associated with cotton leaf curl disease in Pakistan. *Virology* 259, 190–199. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9766>
- Mao, Q., Liao, Z., Li, J., Liu, Y., Wu, W., Chen, H., Chen, Q., Jia, D., Wei, T., 2017. Filamentous Structures Induced by a Phytoreovirus Mediate Viral Release from Salivary Glands in Its Insect Vector. *Journal of Virology* 91, e00265-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00265-17>
- Martín, B., Collar, J.L., Tjallingii, W.F., Fereres, A., 1997. Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 10), 2701–2705. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2701>
- Martinière, A., Bak, A., Macia, J.-L., Lautredou, N., Gargani, D., Doumayrou, J., Garzo, E., Moreno, A., Fereres, A., Blanc, S., Drucker, M., 2013. A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *eLife* 2, e00183. <https://doi.org/10.7554/eLife.00183>
- Mauriès, M., 2003. *La luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation*. France Agricole Editions.
- Mecklenburg, K.L., Takemori, N., Komori, N., Chu, B., Hardie, R.C., Matsumoto, H., O'Tousa, J.E., 2010. Retinophilin Is a Light-Regulated Phosphoprotein Required to Suppress Photoreceptor Dark Noise in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* 30, 1238–1249. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4464-09.2010>
- Medina-Ortega, K.J., Bosque-Pérez, N.A., Ngumbi, E., Jiménez-Martínez, E.S., Eigenbrode, S.D., 2009. *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from Barley yellow dwarf virus-infected wheat. *Environ. Entomol.* 38, 836–845. <https://doi.org/10.1603/022.038.0337>
- Mehrpour, M., Madidzadeh, S.M., Mahdavi-Arab, N., Esmailbeygi, M., Ebrahimpour, E., 2012. Morphometric discrimination of Black Legume Aphid, *Aphis craccivora* Koch (Hemiptera: Aphididae) populations associated with different host plants. *North-Western Journal of Zoology* 8, 172-180.
- Mikona, C., Jelkmann, W., 2010. Replication of Grapevine leafroll-associated virus-7 (GLRaV-7) by *Cuscuta* Species and Its Transmission to Herbaceous Plants. *Plant Dis.* 94, 471–476. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-4-0471>
- Miller, E.H., Obernosterer, G., Raaben, M., Herbert, A.S., Deffieu, M.S., Krishnan, A., Ndungo, E., Sandesara, R.G., Carette, J.E., Kuehne, A.I., Ruthel, G., Pfeffer, S.R., Dye, J.M., Whelan, S.P., Brummelkamp, T.R., Chandran, K., 2012. Ebola virus entry requires the host-programmed recognition of an intracellular receptor. *EMBO J.* 31, 1947–1960. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.53>
- Miller, W.A., Dinesh-Kumar, S.P., Paul, C.P., 1995. Luteovirus Gene Expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14, 179–211. <https://doi.org/10.1080/07352689509701926>
- Moeini, P., Tahmasebi, A., 2019. Maize Iranian mosaic virus infection promotes the energy sources of its insect vector, *Laodelphax striatellus*. *Journal of Applied Entomology* 143, 271–276. <https://doi.org/10.1111/jen.12585>
- Mokili, J.L., Rohwer, F., Dutilh, B.E., 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol* 2, 63–77. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.004>

- Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I., Vincentelli, R., Rabut, G., Stewart, D., Way, M., 2000. A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol* 2, 441–448. <https://doi.org/10.1038/35017080>
- Morin, S., Ghanim, M., Sobol, I., Czosnek, H., 2000. The GroEL Protein of the Whitefly *Bemisia tabaci* Interacts with the Coat Protein of Transmissible and Nontransmissible Begomoviruses in the Yeast Two-Hybrid System. *Virology* 276, 404–416. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0549>
- Moritz, G., Kumm, S., Mound, L., 2004. Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus Research* 100, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.022>
- Mosig, G., 1998. Recombination and Recombination-Dependent Dna Replication in Bacteriophage T4. *Annual Review of Genetics* 32, 379–413. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.32.1.379>
- Mosig, G., Gewin, J., Luder, A., Colowick, N., Vo, D., 2001. Two recombination-dependent DNA replication pathways of bacteriophage T4, and their roles in mutagenesis and horizontal gene transfer. *PNAS* 98, 8306–8311. <https://doi.org/10.1073/pnas.131007398>
- Muller, M.-H., Poncet, C., Prospero, J.M., Santoni, S., Ronfort, J., 2006. Domestication history in the *Medicago sativa* species complex: inferences from nuclear sequence polymorphism. *Molecular Ecology* 15, 1589–1602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02851.x>
- Murant, A.F., 1990. Dependence of groundnut rosette virus on its satellite RNA as well as on groundnut rosette assistor luteovirus for transmission by *Aphis craccivora*. *Journal of General Virology* 71, 2163–2166. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-71-9-2163>
- Murray, J., Zhang, B., Taylor, S.W., Oglesbee, D., Fahy, E., Marusich, M.F., Ghosh, S.S., Capaldi, R.A., 2003. The subunit composition of the human NADH dehydrogenase obtained by rapid one-step immunopurification. *J. Biol. Chem.* 278, 13619–13622. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300064200>
- Nagata, T., 1999. Competence and specificity of thrips in the transmission of tomato spotted wilt virus. Thèse de doctorat, Landbouwniversiteit Wageningen, NL.
- Nagata, T., Inoue-Nagata, A.K., Prins, M., Goldbach, R., Peters, D., 2000. Impeded Thrips Transmission of Defective Tomato spotted wilt virus Isolates. *Phytopathology* 90, 454–459. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.5.454>
- Nault, L.R., 1988. Multiplication of Maize Stripe Virus in *Peregrinus maidis*. *Phytopathology* 78, 991. <https://doi.org/10.1094/Phyto-78-991>
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., Sánchez-Campos, S., 2011. Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annual Review of Phytopathology* 49, 219–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>
- Nel, A., Roques, P., Nel, P., Prokin, A.A., Bourgoïn, T., Prokop, J., Szewedo, J., Azar, D., Desutter-Grandcolas, L., Wappler, T., Garrouste, R., Coty, D., Huang, D., Engel, M.S., Kirejtshuk, A.G., 2013. The earliest known holometabolous insects. *Nature* 503, 257–261. <https://doi.org/10.1038/nature12629>
- Ng, J.C.K., Falk, B.W., 2006. Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 44, 183–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325>
- Noris, E., Vaira, A.M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B., Accotto, G.P., 1998. Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J. Virol.* 72, 10050–10057.
- Novick, R.P., 1998. Contrasting lifestyles of rolling-circle phages and plasmids. *Trends Biochem. Sci.* 23, 434–438. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(98\)01302-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(98)01302-4)

- Obopile, M., Ositile, B., 2010. Life table and population parameters of cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Homoptera: Aphididae) on five cowpea *Vigna unguiculata* (L. Walp.) varieties. *J Pest Sci* 83, 9–14. <https://doi.org/10.1007/s10340-009-0262-0>
- Ögmundsdóttir, M.H., Heublein, S., Kazi, S., Reynolds, B., Visvalingam, S.M., Shaw, M.K., Goberdhan, D.C.I., 2012. Proton-assisted amino acid transporter PAT1 complexes with Rag GTPases and activates TORC1 on late endosomal and lysosomal membranes. *PLoS ONE* 7, e36616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036616>
- Ohishi, K., Inoue, N., Kinoshita, T., 2001. PIG-S and PIG-T, essential for GPI anchor attachment to proteins, form a complex with GAA1 and GPI8. *EMBO J* 20, 4088–4098. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.15.4088>
- Ohnishi, J., Kitamura, T., Terami, F., Honda, K., 2009. A selective barrier in the midgut epithelial cell membrane of the nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to Tomato yellow leaf curl virus uptake. *J Gen Plant Pathol* 75, 131–139. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0147-3>
- Okuda, K., Caroci, A. de S., Ribolla, P.E.M., de Bianchi, A.G., Bijovsky, A.T., 2002. Functional morphology of adult female *Culex quinquefasciatus* midgut during blood digestion. *Tissue and Cell* 34, 210–219. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(02\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(02)00032-0)
- Omura, T., Yan, J., 1999. Role of Outer Capsid Proteins in Transmission of Phytoreovirus By Insect Vectors, in: Maramorosch, K., Murphy, F.A., Shatkin, A.J. (Eds.), *Advances in Virus Research*. Academic Press, pp. 15–43. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60364-4](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60364-4)
- Otoidobiga, L.C., Vincent, C., Stewart, R.K., 2003. Susceptibility of field populations of adult *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae) and *Eretmocerus* sp (Hymenoptera: Aphelinidae) to cotton insecticides in Burkina Faso (West Africa). *Pest Management Science* 59, 97–106. <https://doi.org/10.1002/ps.611>
- Ozaki, T., 1985. Statistical Identification of Storage Models with Application to Stochastic Hydrology. *Journal of the American Water Resources Association* 21, 663–675. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.1985.tb05381.x>
- Pan, X., Dong, Y., Yuan, T., Yan, Y., Tong, D., 2017. Two cases of hemolymphangioma in the thoracic spinal canal and spinal epidural space on MRI: The first report in the literature. *Medicine (Baltimore)* 96, e9524. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009524>
- Papworth, M., Moore, M., Isalan, M., Minczuk, M., Choo, Y., Klug, A., 2003. Inhibition of herpes simplex virus 1 gene expression by designer zinc-finger transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1621–1626. <https://doi.org/10.1073/pnas.252773399>
- Perera, R., Riley, C., Isaac, G., Hopf-Jannasch, A.S., Moore, R.J., Weitz, K.W., Pasa-Tolic, L., Metz, T.O., Adamec, J., Kuhn, R.J., 2012. Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. *PLOS Pathogens* 8, e1002584. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002584>
- Peter, K.A., Liang, D., Palukaitis, P., Gray, S.M., 2008. Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *J. Gen. Virol.* 89, 2037–2045. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83625-0>
- Pettersson, J., Karunaratne, S., Ahmed, E., Kumar, V., 1998. The cowpea aphid, *Aphis craccivora*, host plant odours and pheromones. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88, 177–184. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00360.x>
- Pinheiro, P.V., Kliot, A., Ghanim, M., Cilia, M., 2015. Is there a role for symbiotic bacteria in plant virus transmission by insects? *Current Opinion in Insect Science* 8, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.010>

- Pirone, T.P., Blanc, S., 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 34, 227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.227>
- Pirone, T.P., Megahed, E.-S., 1966. Aphid transmissibility of some purified viruses and viral RNA's. *Virology* 30, 631–637. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90168-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90168-1)
- Plisson, C., Uzest, M., Drucker, M., Froissart, R., Dumas, C., Conway, J., Thomas, D., Blanc, S., Bron, P., 2005. Structure of the Mature P3-virus Particle Complex of Cauliflower Mosaic Virus Revealed by Cryo-electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology* 346, 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.052>
- Popovic, S., Grljusic, S., Cupic, T., Tucak, M., Stjepanovic, M., 2001. Protein and fiber contents in alfalfa leaves and stems, in: *Options Méditerranéennes. Série A : Séminaires Méditerranéens (CIHEAM)*. Presented at the 14. Réunion Eucarpia du Groupe Medicago spp., Zaragoza and Lleida (Spain), 12-15 Sep 2001, CIHEAM-IAMZ.
- Potelle, S., Dulary, E., Climer, L., Duvet, S., Morelle, W., Vicogne, D., Lebredonchel, E., Houdou, M., Spriet, C., Krzewinski-Recchi, M.-A., Peanne, R., Klein, A., de Bettignies, G., Morsomme, P., Matthijs, G., Marquardt, T., Lupashin, V., Foulquier, F., 2017. Manganese-induced turnover of TMEM165. *Biochem. J.* 474, 1481–1493. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160910>
- Prado, E., Tjallingii, W.F., 1994. Aphid activities during sieve element punctures. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 72, 157–165. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01813.x>
- Preiss, W., Jeske, H., 2003. Multitasking in replication is common among geminiviruses. *J. Virol.* 77, 2972–2980. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.5.2972-2980.2003>
- Prosperi, J.-M., Jenczewski, E., Muller, M.-H., Fournier, S., Sampoux, J.-P., Ronfort, J., 2014. Alfalfa domestication history, genetic diversity and genetic resources. *Legume Perspectives* 4, 13-14.
- Radke, S.G., Yendol, W.G., Benton, A.W., 1974. Studies on parthenogenetic viviparous and sexual forms of the cowpea aphid, *Aphis craccivora* Koch (Aphididae: Homoptera). *Indian Journal of Entomology* 34, 319-324.
- Ramière, C., Rodriguez, J., Enache, L.S., Lotteau, V., André, P., Diaz, O., 2014. Activity of hexokinase is increased by its interaction with hepatitis C virus protein NS5A. *J. Virol.* 88, 3246–3254. <https://doi.org/10.1128/JVI.02862-13>
- Rana, V.S., Popli, S., Saurav, G.K., Raina, H.S., Chaubey, R., Ramamurthy, V.V., Rajagopal, R., 2016. A Bemisia tabaci midgut protein interacts with begomoviruses and plays a role in virus transmission. *Cellular Microbiology* 18, 663–678. <https://doi.org/10.1111/cmi.12538>
- Rana, V.S., Singh, S.T., Priya, N.G., Kumar, J., Rajagopal, R., 2012. Arsenophonus GroEL interacts with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly B. tabaci. *PLoS ONE* 7, e42168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042168>
- Raoult, D., Audic, S., Robert, C., Abergel, C., Renesto, P., Ogata, H., La Scola, B., Suzan, M., Claverie, J.-M., 2004. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* 306, 1344–1350. <https://doi.org/10.1126/science.1101485>
- Reinbold, C., Gildow, F.E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Gonçalves, M.C., van Den Heuvel, J.F., Brault, V., 2001. Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through Myzus persicae. *J. Gen. Virol.* 82, 1995–2007. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1995>
- Reinbold, C., Herrbach, E., Brault, V., 2003. Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Myzus persicae and Aphis gossypii. *J. Gen. Virol.* 84, 3473–3484. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19415-0>
- Resende, R. deO, Avila, A.C. de, Goldbach, R.W., Peters, D., 1991. Comparison of Polyclonal Antisera in the Detection of Tomato Spotted Wilt Virus Using the Double

- Antibody Sandwich and Cocktail ELISA. *Journal of Phytopathology* 132, 46–56. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb00092.x>
- Reynaud, B., Peterschmitt, M., 1992. A study of the mode of transmission of maize streak virus by *Cicadulina mbila* using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Annals of Applied Biology* 121, 85–94. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1992.tb03989.x>
- Rigden, J.E., Krake, L.R., Rezaian, M.A., Dry, I.B., 1994. ORF C4 of tomato leaf curl geminivirus is a determinant of symptom severity. *Virology* 204, 847–850. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1606>
- Rojas, M.R., Hagen, C., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43, 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>
- Rojas, M.R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M.R., Lucas, W.J., Gilbertson, R.L., 2001. Functional Analysis of Proteins Involved in Movement of the Monopartite Begomovirus, Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Virology* 291, 110–125. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1194>
- Roumagnac, P., Granier, M., Bernardo, P., Deshoux, M., Ferdinand, R., Galzi, S., Fernandez, E., Julian, C., Abt, I., Filloux, D., Mesléard, F., Varsani, A., Blanc, S., Martin, D.P., Peterschmitt, M., 2015. Alfalfa Leaf Curl Virus: an Aphid-Transmitted Geminivirus. *J Virol* 89, 9683–9688. <https://doi.org/10.1128/JVI.00453-15>
- Rubio-Aliaga, I., Boll, M., Weisenhorn, D.M.V., Foltz, M., Kottra, G., Daniel, H., 2004. The Proton/Amino Acid Cotransporter PAT2 Is Expressed in Neurons with a Different Subcellular Localization than Its Paralog PAT1. *J. Biol. Chem.* 279, 2754–2760. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305556200>
- Sajjanar, B., Saxena, S., Bisht, D., Singh, A.K., Manjunatha Reddy, G.B., Singh, R., Singh, R.P., Kumar, S., 2016. Effect of nicotinic acetylcholine receptor alpha 1 (nAChR α 1) peptides on rabies virus infection in neuronal cells. *Neuropeptides* 57, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.11.090>
- Salasc, F., Mutuel, D., Debaisieux, S., Perrin, A., Dupressoir, T., Grenet, A.-S.G., Ogliastro, M., 2016. Role of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/target of rapamycin pathway during ambidensovirus infection of insect cells. *J. Gen. Virol.* 97, 233–245. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000327>
- Sanderfoot, A.A., Lazarowitz, S.G., 1996. Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol.* 6, 353–358. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)10031-3](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)10031-3)
- Saunders, K., Lucy, A., Stanley, J., 1992. RNA-primed complementary-sense DNA synthesis of the geminivirus African cassava mosaic virus. *Nucleic Acids Res.* 20, 6311–6315. <https://doi.org/10.1093/nar/20.23.6311>
- Saunders, K., Stanley, J., 1999. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* 264, 142–152. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9948>
- Sauvion, N., Calatayud, P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, F. (Eds), 2013. Interactions insectes-plantes. Editions Quae et IRD.
- Schneider-Schaulies, J., Schneider-Schaulies, S., 2015. Sphingolipids in viral infection. *Biol. Chem.* 396, 585–595. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0273>
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J.-M., Van Dorsselaer, A., Van Regenmortel, M.H.V., Pattus, F., 2004. Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology* 325, 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.05.014>

- Settlage, S.B., Miller, A.B., Gruissem, W., Hanley-Bowdoin, L., 2001. Dual Interaction of a Geminivirus Replication Accessory Factor with a Viral Replication Protein and a Plant Cell Cycle Regulator. *Virology* 279, 570–576. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0719>
- Shafti-Keramat, S., Handisurya, A., Kriehuber, E., Meneguzzi, G., Slupetzky, K., Kirnbauer, R., 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J. Virol.* 77, 13125–13135. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.24.13125-13135.2003>
- Sharma, P., Ikegami, M., 2010. Tomato leaf curl Java virus V2 protein is a determinant of virulence, hypersensitive response and suppression of posttranscriptional gene silencing. *Virology* 396, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.012>
- Shen, X.-M., Brengman, J., Neubauer, D., Sine, S.M., Engel, A.G., 2016. Investigation of Congenital Myasthenia Reveals Functional Asymmetry of Invariant Acetylcholine Receptor (AChR) Cys-loop Aspartates. *J. Biol. Chem.* 291, 3291–3301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683995>
- Sicard, A., Pirolles, E., Gallet, R., Vernerey, M.-S., Yvon, M., Urbino, C., Peterschmitt, M., Gutierrez, S., Michalakakis, Y., Blanc, S., 2019. A multicellular way of life for a multipartite virus. *eLife* 8, e43599. <https://doi.org/10.7554/eLife.43599>
- Sicard, A., Vernerey, M.-S., Michalakakis, Y., Gutiérrez, S., Blanc, S., 2015. Multipartite viruses: A decentralized mode of functioning. [O.24] [WWW Document]. 15èmes Rencontres de Virologie Végétale, Aussois, France, 18-22 janvier 2015. URL <https://agritrop.cirad.fr/575819/> (accessed 1.23.20).
- Sicard, A., Yvon, M., Timchenko, T., Gronenborn, B., Michalakakis, Y., Gutierrez, S., Blanc, S., 2013. Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus. *Nat Commun* 4, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms3248>
- Simon, J.-C., Stoeckel, S., Tagu, D., 2010. Evolutionary and functional insights into reproductive strategies of aphids. *C. R. Biol.* 333, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.03.003>
- Sin, S.-H., McNulty, B.C., Kennedy, G.G., Moyer, J.W., 2005. Viral genetic determinants for thrips transmission of Tomato spotted wilt virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 5168–5173. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407354102>
- Spanner, D.C., 1958. The Translocation of Sugar in Sieve Tubes. *J Exp Bot* 9, 332–342. <https://doi.org/10.1093/jxb/9.3.332>
- Sreenivasulu, P., 1988. Transmission of Peanut Mottle and Peanut Stripe Viruses by *Aphis craccivora* and *Myzus persicae*. *Plant Disease* 72, 722–723. <https://doi.org/10.1094/PD-72-0722>
- Stainton, D., Martin, D.P., Muhire, B.M., Lolohe, S., Halafihi, M., Lepoint, P., Blomme, G., Crew, K.S., Sharman, M., Kraberger, S., Dayaram, A., Walters, M., Collings, D.A., Mabvakure, B., Lemey, P., Harkins, G.W., Thomas, J.E., Varsani, A., 2015. The global distribution of Banana bunchy top virus reveals little evidence for frequent recent, human-mediated long distance dispersal events. *Virus Evol* 1, vev009. <https://doi.org/10.1093/ve/vev009>
- Stenger, D.C., Revington, G.N., Stevenson, M.C., Bisaro, D.M., 1991. Replicational release of geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8029–8033. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.18.8029>
- Stobbe, A.H., Roossinck, M.J., 2014. Plant virus metagenomics: what we know and why we need to know more. *Front Plant Sci* 5, 150. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00150>
- Sunter, G., Bisaro, D.M., 1992. Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4, 1321–1331.

- Susi, H., Filloux, D., Frilander, M.J., Roumagnac, P., Laine, A.-L., 2019. Diverse and variable virus communities in wild plant populations revealed by metagenomic tools. *PeerJ* 7, e6140. <https://doi.org/10.7717/peerj.6140>
- Susi, H., Laine, A.-L., Filloux, D., Kraberger, S., Farkas, K., Bernardo, P., Frilander, M.J., Martin, D.P., Varsani, A., Roumagnac, P., 2017a. Genome sequences of a capulavirus infecting *Plantago lanceolata* in the Åland archipelago of Finland. *Arch. Virol.* 162, 2041–2045. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3298-0>
- Sylvester, E., 1954. Aphid transmission of nonpersistent plant viruses with special reference to the *Brassica nigra* virus. *Hilgardia* 23, 53–98.
- Tani, H., Shiokawa, M., Kaname, Y., Kambara, H., Mori, Y., Abe, T., Moriishi, K., Matsuura, Y., 2010. Involvement of ceramide in the propagation of Japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 84, 2798–2807. <https://doi.org/10.1128/JVI.02499-09>
- Teng, K., Chen, H., Lai, J., Zhang, Z., Fang, Y., Xia, R., Zhou, X., Guo, H., Xie, Q., 2010. Involvement of C4 Protein of Beet Severe Curly Top Virus (Family Geminiviridae) in Virus Movement. *PLoS One* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011280>
- Tjallingii, W.F., Hogen Esch, 1993. Fine structure of aphid stylet routes in plant tissues in correlation with EPG signals. *Physiological Entomology* 18, 317–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00604.x>
- Tokunaga, E., Suzuki, N., 2008. Colony growth and dispersal in the ant-tended aphid, *Aphis craccivora* Koch, and the non-ant-tended aphid, *Acyrtosiphon pisum* Harris, under the absence of predators and ants. *Population Ecology* 50, 45–52. <https://doi.org/10.1007/s10144-007-0065-1>
- Tuppurainen, E.S.M., Lubinga, J.C., Stoltz, W.H., Troskie, M., Carpenter, S.T., Coetzer, J.A.W., Venter, E.H., Oura, C.A.L., 2013. Evidence of vertical transmission of lumpy skin disease virus in *Rhipicephalus decoloratus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis* 4, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.006>
- Tuppurainen, E.S.M., Venter, E.H., Coetzer, J. a. W., Bell-Sakyi, L., 2015. Lumpy skin disease: attempted propagation in tick cell lines and presence of viral DNA in field ticks collected from naturally-infected cattle. *Ticks Tick Borne Dis* 6, 134–140. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.11.002>
- Uchibori, M., Hirata, A., Suzuki, M., Ugaki, M., 2013. Tomato yellow leaf curl virus accumulates in vesicle-like structures in descending and ascending midgut epithelial cells of the vector whitefly, *Bemisia tabaci*, but not in those of nonvector whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of General Plant Pathology* 79, 115–122.
- Ullman, D.E., Meideros, R., Campbell, L.R., Whitfield, A.E., Sherwood, J.L., German, T.L., 2002. Thrips as vectors of tospoviruses, in: *Advances in Botanical Research*. Academic Press, pp. 113–140. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(02\)36061-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(02)36061-0)
- Uzest, M., 2010. L'acrostyle, ou la face cachée des stylets maxillaires de puceron [WWW Document]. 7. Conférence Internationale Francophone d'Entomologie (CIFE 2010) URL <https://prodinra.inra.fr/?locale=en#!ConsultNotice:306311> (accessed 1.23.20).
- Uzest, M., Blanc, S., 2016. Molecular Mechanisms Involved in Noncirculative Virus?Vector Interactions, in: Brown, J.K. (Ed.), *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens*, American Phytopathological Society, pp. 59–72. <https://doi.org/10.1094/9780890545355.005>
- Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hébrard, E., Garzo, E., Candresse, T., Fereres, A., Blanc, S., 2007. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 17959–17964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706608104>
- Van den Heuvel, J.F., Bruyère, A., Hogenhout, S.A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F., Richards, K., 1997. The N-terminal region of the luteovirus

- readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* 71, 7258–7265.
- Van der Want, J.P.H., Dijkstra, J., 2006. A history of plant virology. *Arch. Virol.* 151, 1467–1498. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0782-3>
- Van Wezel, R., Liu, H., Tien, P., Stanley, J., Hong, Y., 2001. Gene C2 of the monopartite geminivirus tomato yellow leaf curl virus-China encodes a pathogenicity determinant that is localized in the nucleus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 1125–1128. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.9.1125>
- Varsani, A., Martin, D.P., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Murilo Zerbini, F., Brown, J.K., 2014a. Revisiting the classification of curtoviruses based on genome-wide pairwise identity. *Arch. Virol.* 159, 1873–1882. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-1982-x>
- Varsani, A., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Brown, J.K., Murilo Zerbini, F., Martin, D.P., 2014b. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch Virol* 159, 2193–2203. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2050-2>
- Varsani, A., Roumagnac, P., Fuchs, M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Idris, A., Briddon, R.W., Rivera-Bustamante, R., Murilo Zerbini, F., Martin, D.P., 2017. Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Arch. Virol.* 162, 1819–1831. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3268-6>
- Vea, I.M., Grimaldi, D.A., 2016. Putting scales into evolutionary time: the divergence of major scale insect lineages (Hemiptera) predates the radiation of modern angiosperm hosts. *Sci Rep* 6, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep23487>
- Vetten, H.J., Knierim, D., Rakoski, M.S., Menzel, W., Maiss, E., Gronenborn, B., Winter, S., Krenz, B., 2019. Identification of a novel nanovirus in parsley. *Arch. Virol.* 164, 1883–1887. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04280-3>
- Wang, J., Zhao, H., Liu, J., Jiu, M., Qian, Y.-J., Liu, S.-S., 2010. Low frequency of horizontal and vertical transmission of two begomoviruses through whiteflies exhibits little relevance to the vector infectivity. *Annals of Applied Biology* 157, 125–133. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00403.x>
- Wang, L.-L., Wang, X.-R., Wei, X.-M., Huang, H., Wu, J.-X., Chen, X.-X., Liu, S.-S., Wang, X.-W., 2016. The autophagy pathway participates in resistance to *tomato yellow leaf curl virus* infection in whiteflies. *Autophagy* 12, 1560–1574. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192749>
- Wartig, L., Kheyr-Pour, A., Noris, E., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., Jupin, I., 1997. Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology* 228, 132–140. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8406>
- Watanabe, S., Borthakur, D., Bressan, A., 2016. Localization of Banana bunchy top virus and cellular compartments in gut and salivary gland tissues of the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *Insect Sci.* 23, 591–602. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12211>
- Watanabe, S., Bressan, A., 2013. Tropism, compartmentalization and retention of banana bunchy top virus (Nanoviridae) in the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *J. Gen. Virol.* 94, 209–219. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047308-0>
- Watson, M.A., Roberts, F.M., 1939. A comparative study of the transmission of Hyoscyamus virus 3, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences* 127, 543–576. <https://doi.org/10.1098/rspb.1939.0039>

- Weaver, S.C., Kang, W., Shirako, Y., Rumenapf, T., Strauss, E.G., Strauss, J.H., 1997. Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J. Virol.* 71, 613–623.
- Weaver, S.C., Reisen, W.K., 2010. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res.* 85, 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>
- Wefels, E., Morin, J.P., Randles, J.W., 2015. Molecular evidence for a persistent-circulative association between Coconut foliar decay virus and its vector *Myndus taffini*. *Australasian Plant Pathol.* 44, 283–288. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0343-2>
- Wei, J., He, Y.-Z., Guo, Q., Guo, T., Liu, Y.-Q., Zhou, X.-P., Liu, S.-S., Wang, X.-W., 2017. Vector development and vitellogenin determine the transovarial transmission of begomoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 6746–6751. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701720114>
- Wetering, de, van, Posthuma, K., Goldbach, R.W., Peters, D., 1999. Assessing the susceptibility of chrysanthemum cultivars to tomato spotted wilt virus. *Plant Pathology* 48 (1999) 48. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00412.x>
- Whitfield, A.E., Ullman, D.E., German, T.L., 2005. Tospovirus-thrips interactions. *Annu Rev Phytopathol* 43, 459–489. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140017>
- Wijkamp, I., Wetering, F.V.D., Goldbach, R., Peters, D., 1996. Transmission of tomato spotted wilt virus by *Frankliniella occidentalis* median acquisition and inoculation access period. *Annals of Applied Biology* 129, 303–313. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1996.tb05753.x>
- Witte, L. de, Bobardt, M., Chatterji, U., Degeest, G., David, G., Geijtenbeek, T.B.H., Galloway, P., 2007. Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *PNAS* 104, 19464–19469. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703747104>
- Woolston, C.J., Covey, S.N., Penswick, J.R., Davies, J.W., 1983. Aphid transmission and a polypeptide are specified by a defined region of the cauliflower mosaic virus genome. *Gene* 23, 15–23. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90212-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90212-3)
- Wu, W., Zheng, L., Chen, H., Jia, D., Li, F., Wei, T., 2014. Nonstructural Protein NS4 of Rice Stripe Virus Plays a Critical Role in Viral Spread in the Body of Vector Insects. *PLoS One* 9, e88636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088636>
- Xia, W.-Q., Liang, Y., Chi, Y., Pan, L.-L., Zhao, J., Liu, S.-S., Wang, X.-W., 2018. Intracellular trafficking of begomoviruses in the midgut cells of their insect vector. *PLoS Pathog.* 14, e1006866. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006866>
- Yang, X., Zhou, M., Qian, Y., Xie, Y., Zhou, X., 2014. Molecular variability and evolution of a natural population of tomato yellow leaf curl virus in Shanghai, China. *J Zhejiang Univ Sci B* 15, 133–142. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1300110>
- Yao, M., Liu, X., Li, S., Xu, Y., Zhou, Y., Zhou, X., Tao, X., 2014. Rice stripe tenuivirus NSvc2 glycoproteins targeted to the golgi body by the N-terminal transmembrane domain and adjacent cytosolic 24 amino acids via the COP I- and COP II-dependent secretion pathway. *J. Virol.* 88, 3223–3234. <https://doi.org/10.1128/JVI.03006-13>
- Yarwood, C.E., 1957. Mechanical transmission of plant viruses. *Adv. Virus Res.* 4, 243–278. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60601-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60601-6)
- Zha, X., Pierini, L.M., Leopold, P.L., Skiba, P.J., Tabas, I., Maxfield, F.R., 1998. Sphingomyelinase treatment induces ATP-independent endocytosis. *J. Cell Biol.* 140, 39–47. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.1.39>
- Zhang, L., Wu, C., Cai, G., Chen, S., Ye, K., 2016. Stepwise and dynamic assembly of the earliest precursors of small ribosomal subunits in yeast. *Genes Dev.* 30, 718–732. <https://doi.org/10.1101/gad.274688.115>
- Zhang, S.C., Wege, C., Jeske, H., 2001. Movement proteins (BC1 and BV1) of Abutilon mosaic geminivirus are cotransported in and between cells of sink but not of source

- leaves as detected by green fluorescent protein tagging. *Virology* 290, 249–260.
<https://doi.org/10.1006/viro.2001.1185>
- Zheng, L., Mao, Q., Xie, L., Wei, T., 2014. Infection route of rice grassy stunt virus, a tenuivirus, in the body of its brown planthopper vector, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) after ingestion of virus. *Virus Res.* 188, 170–173.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.008>
- Zhou, X., 2013. Advances in understanding begomovirus satellites. *Annu Rev Phytopathol* 51, 357–381. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102234>

Liste des communications orales, posters et publications

Communications orales

Ryckebusch, F., Granier, M., Di Mattia, J., Zeddami, J.L., Sauvion, N. & Peterschmitt, M. Characterization of the transmission of Alfalfa Leaf Curl Virus, an aphid-transmitted geminivirus. *9th International Geminivirus Symposium and 7th ssDNA Comparative Virology Workshop*, University of California- Davis, California, United-States. November 2019 (Best student presentation award).

Ryckebusch, F., Granier, M., Di Mattia, J., Zeddami, J.L., Sauvion, N. & Peterschmitt, M. First characterization of geminivirus transmission by aphids using complementary approaches. *Séminaire à l'unité BGPI*, Montpellier, France. Juin, 2019.

Ryckebusch, F., Granier, M., Di Mattia, J., Zeddami, J.L., Monsion, B., Urbino, C., Sauvion, N. & Peterschmitt, M. Characterization of transmission of geminiviruses by aphids. (RVV) *17th meeting of plant virology*, Aussois, France. January 2019.

Ryckebusch, F., Granier, M., Sauvion, N., Roumagnac, P. & Peterschmitt, M., *Aphis craccivora* : its key role in the transmission of Alfalfa Leaf Curl Virus. (BAPOA) *11th meeting of Adaptive Biology of Aphids and Associated Organisms*. Rennes, France. November 2018.

Ryckebusch, F., Sauvion, N., Quelques explications sur l'électropénétration pour piquer votre curiosité. *Journées scientifiques BGPI*, Montpellier, France. Juin 2018.

Ryckebusch, F., Granier, M., Sauvion, N. & Peterschmitt, M. Characterization of the transmission of Alfalfa Leaf Curl Virus, an aphid-transmitted geminivirus. (BAPOA) *11th meeting of Adaptive Biology of Aphids and Associated Organisms*. Colmar, France. November 2017.

Posters

Ryckebusch, F., Granier, M., Ferdinand, R., Sauvion, N., Roumagnac, P. & Peterschmitt, M. Characterization of the transmission of Alfalfa Leaf Curl Virus, the first aphid-transmitted geminivirus. *Printemps de Baillarguet*, Montpellier, France. May 2017.

Ryckebusch, F., Granier, M., Ferdinand, R., Sauvion, N., Roumagnac, P. & Peterschmitt, M. Characterization of the transmission of Alfalfa Leaf Curl Virus, the first aphid-transmitted geminivirus. (RVV) *16th meeting of plant virology*, Aussois, France. January 2017.

Publications

Rykebusch, F., Sauvion, N., Granier, M., Roumagnac, P., & Peterschmitt, M. Alfalfa leaf curl virus is transmitted by *Aphis craccivora* in a highly specific circulative manner. *Virology*. 2020;546:98-108. doi:10.1016/j.virol.2020.04.004

Rykebusch, F., Granier, M., & Peterschmitt, M., and Sauvion, N. Alfalfa leaf curl virus is efficiently acquired by its aphid vector *Aphis craccivora* but inefficiently transmitted. *J. Gen. Virol* (2020) soumis le 15.01.2020

Di Mattia, J.†, Rykebusch, F.†, Vernerey M.S., Piroilles E., Sauvion, N., Peterschmitt, M., Zeddani, J.L., & Blanc, S. Co-acquired nanovirus and geminivirus exhibit a contrasted localization within their common aphid vector. *Viruses*. 2020;12(3):299. doi:10.3390/v12030299

(† shared first author)

Publication (hors thèse)

Rykebusch, F., Berthet, M., Missé, D. & Choumet, V. Infection of a French Population of *Aedes albopictus* and of *Aedes aegypti* (Paea Strain) with Zika Virus Reveals Low Transmission Rates to These Vectors' Saliva. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):2384. doi:10.3390/ijms18112384

Characterization of the transmission of geminiviruses belonging to the new genus *Capulavirus* typical for aphid transmission

The family *Geminiviridae* is the first group of plant viruses in terms of number and economic importance. They have circular single-stranded (css) DNA genomes and are transmitted in a circulative non-propagative (cnp) manner by leafhoppers, whiteflies, treehoppers and aphids (Hemiptera). While diseases induced by geminiviruses were reported for more than a century, aphid transmitted geminiviruses were discovered only recently by metagenomics. This delayed discovery is puzzling because aphids are the hemipterans that transmit the most plant viruses including the viruses of families *Nanoviridae* and *Luteoviridae*, transmitted in a cnp manner. Aphid transmission was detected among a group of 4 diverging geminiviruses exhibiting a typical genome organization and for which the genus *Capulavirus* was created. Aphid transmission was shown only for 2 of them, the alfalfa leaf curl virus (ALCV) transmitted by *Aphis craccivora* and the plantago lanceolata latent virus (PILV) transmitted by *Dysaphis plantaginae*. By demonstrating aphid transmission of a third capulavirus, euphorbia caput-medusae latent virus (EcMLV), aphid transmission was validated as a generic taxonomic criterion. The population of *A. craccivora* that transmits EcMLV does not transmit ALCV, which reflect high transmission specificity among capulaviruses.

ALCV was selected to investigate further geminivirus transmission by aphids because it was isolated on cultivated plants in France and associated with symptoms. Its localization in plant tissues (FISH) and the accurate analysis of the feeding behavior of the vector by electropenetrography (EPG) revealed that ALCV is phloem restricted and that its distribution is heterogeneous. Transmission tests and estimations of virus contents (qPCR) show that 12% of aphids, at maximum, transmit ALCV and that transmission is dependent on a critical threshold of virus content. We also show that ALCV accumulates and persists efficiently in the digestive tract of the vector aphid, with amounts that are similar to those of geminiviruses in their leafhopper or whitefly vectors. On the contrary, the amount and persistence of ALCV in hemolymph and heads are low, consistently with the low detection of ALCV by FISH in the salivary glands unlike in the digestive tract. These results may explain the low individual transmission rate of ALCV by *A. craccivora*, much lower than the 90% rate observed with geminiviruses transmitted by whiteflies and leafhoppers.

Thanks to a broad bean nanovirus transmitted by *A. craccivora*, faba bean necrotic stunt virus (FBNSV), we showed that the low transmission of ALCV is not imputable to the aphid. Indeed the comparisons carried out with the same *A. craccivora* population show that the transmission rate of FBNSV is 2 to 5 times higher than that of ALCV and FBNSV was excreted much more efficiently. FISH observations show that ALCV and FBNSV do not colocalize in midgut cells, which is consistent with distinct pathways. While nanoviruses and capulaviruses have both a circular single-stranded DNA genome, only nanoviruses encode a helper component for transmission (NSP). In geminiviruses, only CP is determining vector transmission. A yeast two-hybrid analysis carried out against the CP of ALCV identified three proteins of the digestive tract of *A. craccivora*. Their role in ALCV transmission will have to be validated with transmission and complementary interaction tests. Together with a similar study carried out in parallel by another Ph.D. student with the CP and the NSP of FBNSV, we expect to validate the hypothesis of distinct pathways with molecular data.

The generalization of the low transmission efficiency of ALCV to all capulaviruses may explain both their late discovery and their preferential adaptation to perennial hosts. This hypothesis is discussed according to some rare descriptions of capulaviruses in natural conditions and in comparison with viruses of families *Nanoviridae* and *Luteoviridae*.

Keywords : Capulavirus, *Geminiviridae*, *Nanoviridae*, aphid transmission, hemiptera, virus receptor

Caractérisation de la transmission des capulavirus, des géminivirus d'un genre nouveau dont l'originalité est la transmission par puceron

Les virus de la famille *Geminiviridae* sont des virus à ADN simple brin circulaire (ADNsbc), transmis selon le mode circulant non-multipliant (snm) par cicadelle, aleurode, membracide et puceron (Hemiptera). Des maladies causées par des géminivirus sont décrites depuis plus d'un siècle, mais ce n'est que récemment que des géminivirus transmis par puceron ont été découverts. Cette découverte tardive est paradoxale car les pucerons sont les hémiptères qui transmettent le plus de virus de plante, y compris ceux des familles *Nanoviridae* et *Luteoviridae*, transmis selon le mode snm. La transmission par puceron a été détectée au sein d'un groupe de 4 géminivirus qui se distinguent par leurs séquences et organisations génomiques, et pour lesquels le genre *Capulavirus* a été créé. La transmission par puceron n'avait été démontrée que pour 2 d'entre eux, l'alfalfa leaf curl virus (ALCV) transmis par *Aphis craccivora* et le plantago lanceolata latent virus (PILV) par *Dysaphis plantaginea*. En démontrant la transmissibilité d'un 3^e capulavirus par puceron, l'euphorbia caput-medusae latent virus (EcmLV), la transmission par puceron est validée comme critère taxonomique générique. La population de *A. craccivora* qui transmet l'EcmLV, ne transmet pas l'ALCV, ce qui témoigne d'une grande spécificité de transmission au sein des capulavirus.

La circulation de l'ALCV a été suivie dans son puceron vecteur par des approches complémentaires. La localisation de l'ALCV dans les tissus de plante (FISH) et des analyses fines du comportement alimentaire du vecteur par électropénétrographie (EPG) montrent que l'ALCV est restreint au phloème et que sa distribution est hétérogène. Des tests de transmission et des mesures de teneurs virales (qPCR) montrent qu'au maximum 12% des pucerons transmettent l'ALCV et que la transmission est tributaire d'un seuil critique de teneur viral. Nous montrons aussi que l'ALCV s'accumule et persiste efficacement dans le tube digestif du puceron vecteur, comme d'autres géminivirus dans leurs vecteurs aleurode et cicadelle. Par contre, la teneur et la persistance de l'ALCV dans l'hémolymphe et dans la tête est faible, en cohérence avec les traces infimes d'ALCV détectées par FISH dans les glandes salivaires, contrairement au tube digestif. Ces résultats pourraient expliquer que le taux de transmission de l'ALCV par *A. craccivora* est bien inférieur à celui de géminivirus transmis par aleurode ou cicadelle (90%).

Grâce à un nanovirus de fève, le *faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV), nous avons vu que la faible transmission de l'ALCV n'est pas imputable au puceron. Avec une même population de *A. craccivora*, nous montrons que le taux de transmission du FBNSV est 2 à 5 fois plus élevé que celui de l'ALCV, et que le FBNSV est excrété beaucoup plus efficacement. Des observations en FISH montrent que l'ALCV et le FBNSV ne colocalisent pas dans les cellules de l'intestin moyen, suggérant des routes de circulation distinctes. Alors que dans les deux familles virales les génomes sont des ADNsbc, seuls les nanovirus ont une protéine assistante de la transmission (NSP). La transmission des géminivirus est déterminée uniquement par la CP. Un criblage double-hybride en levure contre la CP de l'ALCV a permis d'identifier 3 protéines du tube digestif de *A. craccivora*. Leur rôle dans la transmission devra être validé par des tests d'interaction complémentaire et de transmission. Un travail parallèle réalisé avec la CP et la NSP du FBNSV dans le cadre d'une autre thèse devrait permettre à terme de valider l'hypothèse de parcours propre à chaque virus sur une base moléculaire.

La généralisation du faible taux de transmission de l'ALCV à l'ensemble des capulavirus pourrait expliquer à la fois leur découverte tardive, et leur adaptation préférentielle à des hôtes pérennes. Cette hypothèse est discutée par rapport à quelques observations de terrain et en comparaison avec des virus des familles *Nanoviridae* et *Luteoviridae*.

Mots clés : Capulavirus, *Geminiviridae*, *Nanoviridae*, transmission, hémiptère, puceron, récepteur viral