

# PROPRIETES ET VARIATIONS GEOGRAPHIQUES DE PARTICULES DE GEMINIVIRUS EXTRAITES DE MANIOCS MALADES

HARRISON, B.D.  
Scottish Crop Research Institute,  
INVERGOWRIE, DUNDEE DD2 5DA, UK

On peut distinguer trois étapes dans la recherche sur la Mosaïque Africaine du Manioc en Afrique. La première (1894-1974) fut une étape de description de la maladie où on démontra que son agent causal était transmissible par greffe et par la mouche blanche *Bemisia tabaci* (Storey & Nichols, 1938). La seconde débuta en 1975 avec la transmission de particules de virus extraites du manioc par inoculation à des plantes herbacées expérimentales telles que *Nicotiana clevelandii* et *N. benthamiana* (Bock, 1975; Bock *et al.*, 1978). Il n'était pas certain, de prime abord, que ces particules soient la cause de la Mosaïque Africaine du Manioc et on les nomma cassava latent virus. Par la suite elles furent retransmises au manioc, provoquant ainsi la mosaïque (Bock & Woods, 1983) et on recommanda dès lors de les nommer Mosaïque Africaine du Manioc (ACMV). La transmission de ces particules a permis une étude plus approfondie de l'ACMV et sa caractérisation. Les particules virales furent purifiées, on montra qu'elles étaient géminées et contenaient des ADN circulaires à un seul brin (Harrison *et al.*, 1977); un antisérum de virus fut préparé et utilisé pour établir le diagnostic et entreprendre la recherche des relations de ce virus; la localisation intracellulaire de l'antigène du virus fut mise en évidence (Séqueira & Harrison, 1982) et les effets ultrastructurels de la contamination déterminés (Horvat & Verhoyen, 1981). Au cours de la troisième étape, qui débuta en 1983, la structure et la nature bipartite du génôme du virus furent mises en évidence par le séquençage des deux types de molécules d'ADN obtenues à partir des particules virales (Stanley & Gay, 1983). Ceci a conduit à des études plus approfondies en biologie moléculaire de la fonction et de l'expression du gène, de la réplication du virus et de la variation à la fois entre les géminivirus des différents hôtes et entre les différents isolats de géminivirus du manioc.

## CARACTERES PRINCIPAUX DE L'ACMV

En plus de *Manihot esculenta*, la gamme d'hôtes de l'ACMV comprend plusieurs autres espèces d'euphorbiacées, en particulier *Jatropha multifida*, et six espèces de *Manihot* contaminées par un isolat Ouest africain, lors de tests de transmission par mouches blanches. On suppose que les hôtes naturels comprennent également *Hewittia sublobata* (Convolvulaceae) dans les régions côtières du Kenya et *Laportea aestuans* (Urticaceae) au Nigéria, mais le virus ne fut pas transmis au manioc à partir de ces espèces et des essais complémentaires sont nécessaires pour déterminer sans équivoque leur statut d'hôte. Plusieurs plantes solanacées peuvent être contaminées par transmission, en particulier des plantes du genre *Nicotiana* et *Datura*. Sur *N. benthamiana* des lésions locales chlorotiques apparaissent, suivies d'un grave enrroulement systémique des feuilles et d'un rabougrissement accompagné ou non de tâches jaunes. Il constitue la meilleure source de particules virales pour la purification. Inoculé par certains isolats, *D. stramonium* présente des lésions locales chlorotiques et nécrotiques, suivies d'une panachure systémique et d'une déformation des feuilles; on peut l'utiliser pour des essais de lésions locales. Le pouvoir infectieux de la sève est peu stable, il disparaît en quelques jours à température ambiante ou en 10 minutes à 55°C (Bock & Harrison, 1985).

Les particules virales sont plus aisément purifiées à partir de plantes inoculées, par une méthode qui implique l'extraction de sève dans un tampon contenant un agent réducteur et du chloroforme, suivie d'une précipitation au polyéthylène glycol, d'une centrifugation différentielle et d'un cycle de sédimentation dans des gradients de densité de saccharose. Les particules ont une forme géminée, elles mesurent environ 30 x 20nm avec un étranglement au milieu du grand axe et ont un coefficient de sédimentation de 76S. Elles contiennent une protéine d'un poids moléculaire d'environ 30 000 (peut-être 110 molécules par particule) et une molécule d'ADN circulaire à un seul brin d'un poids moléculaire d'environ  $0.92 \times 10^6$ . Dans le tissu des feuilles, les particules virales s'accumulent principalement dans le noyau des cellules du phloème parenchyme, mais également dans le noyau de quelques cellules corticales, épidermiques ou autres. Les anomalies générées dans le noyau comprennent des inclusions granuleuses fortement teintées par la méthode "immunogold" qui utilise les anticorps des particules virales (Roberts & Harrison, 1987). On trouve également des anneaux de cylindres creux de fibrilles dans quelques noyaux virosés.

La dissémination naturelle de l'ACMV est due à la mouche blanche *B. tabaci*, dont on sait quelle est vectrice dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest, sur la côte du Kenya, en Inde et ailleurs, mais les expériences manquent concernant d'autres espèces de *Bemisia* pour que l'on puisse affirmer qu'elles transmettent également l'ACMV. Les individus de *B. tabaci* doivent séjourner au moins 3 heures et demie sur des plantes malades pour acquérir la maladie, la période de latence est d'au moins 8 heures chez l'insecte et 10 minutes au moins sont nécessaires pour que le virus soit inoculé aux plantes saines (Chant, 1958; Dubern, 1979). Les mouches blanches vectrices peuvent conserver leur pouvoir infectieux pendant 9 jours, même à travers la mue, montrant ainsi qu'il est porté intérieurement. Cependant, il n'est pas transmis par les oeufs des mouches blanches aux descendants. Dans le cas du manioc, le virus n'est pas transmissible par la graine mais il est conservé et disséminé par l'homme et le matériel végétal de plantation.

Les propriétés de l'ACMV, notamment la forme de ses particules, son génôme d'ADN circulaire à un seul brin, sa mouche blanche vectrice et ses effets ultrastructuraux, en font un membre typique du groupe des géminivirus.

## STRUCTURE DU GENOME ET FONCTION DU GENE

Le génôme de l'ACMV est composé de deux molécules circulaires d'ADN à un seul brin qui ont des tailles similaires (DNA-1, 2779 nt; DNA-2, 2724 nt), dont les séquences sont connues, et qui sont différentes si ce n'est par une séquence qu'elles (?) partagent sur environ 200 nucléotides, appelée région commune (Stanley & Gay, 1983). Les deux ADN : -1 et -2 ont des gènes de molécules positives (la forme des particules virales) et négatives (la forme complémentaire). Le DNA-1 positif contient le gène de protéine du côté de la 3<sup>ème</sup> capsid de la région commune et le DNA-1 négatif contient trois gènes sur l'autre côté de la région commune. Le plus grand de ces trois gènes code pour une protéine de 40Kd qui peut être impliquée dans la réplication du virus ADN. Les fonctions des deux autres gènes ne sont pas connues. Le DNA-2 porte un gène dans chaque sens et un ou deux d'entre eux semble impliqué dans le mouvement de cellule à cellule des virus de plantes (Stanley, 1983; Townsend *et al.*, 1986). Les plantes malades contiennent des transcriptions polyadénylées d'ARN viral de cinq tailles, qui peuvent être attribuées aux six cadres de lecture ouverte qui codent pour des protéines de 15, 16, 29, 30, 34 et 40Kd (Townsend *et al.*, 1985). De plus amples détails concernant la biologie moléculaire de l'ACMV ont été résumés par Stanley (1985). Par les propriétés de son génôme, l'ACMV ressemble à trois autres géminivirus transmissibles à la fois par les mouches blanches et par inoculation de sève, à savoir le bean golden mosaic virus, le mung bean yellow mosaic virus et le tomato golden mosaic virus, qui ont tous des génomes bipartites dont l'organisation est la même que celle de l'ACMV. Les génomes de ces virus contrastent avec ceux des géminivirus transmis par cicadelles, qui sont d'une seule molécule d'ADN circulaire à un seul brin, d'environ 3000 nucléotides, et ont une organisation différente du génôme de l'ACMV

(Harrison, 1985; Stanley, 1985).

## RELATIONS AVEC LES AUTRES GEMINIVIRUS ET AVEC LES ISOLATS DE GEMINIVIRUS DU MANIOC

La souche type d'ACMV en provenance de l'Ouest du Kenya (ACMV-T) est sérologiquement reliée à plusieurs autres géminivirus, tous transmis par mouches blanches (Roberts *et al.*, 1984). Ces relations sont aisément mises en évidence par des tests Elisa utilisant des anticorps polyclonaux à l'ACMV-T, ou par sérologie en microscopie électronique et par l'utilisation d'une gamme d'antisérums polyclonaux. Par contre, l'ACMV n'est pas relié sérologiquement aux géminivirus dont on sait ou dont on suppose qu'ils sont transmis par ciccadelles et qui, pour la plupart, ne sont pas reliés sérologiquement entre eux. Des travaux plus récents ont montré que tous les géminivirus transmis par mouches blanches et testés à ce jour sont sérologiquement reliés à l'ACMV, même s'ils n'ont pas d'hôte en commun et qu'on puisse les trouver dans des endroits très éloignés en Afrique, en Inde, au Moyen-Orient, dans le Sud-Est asiatique ou en Amérique du Sud, du Nord ou Centrale. La découverte de telles relations, associée au fait que tous ces virus sont transmis par la même espèce de mouche blanche, *B. tabaci*, alors que d'autres géminivirus transmis par ciccadelles ont différentes espèces vectrices et sont pour la plupart non reliés sérologiquement, laisse penser que les particules de protéine de virus jouent un rôle clé dans la spécificité du vecteur (Roberts *et al.*, 1984).

Si l'on compare les séquences de nucléotides de différents géminivirus transmis par mouches blanches, on trouve de nombreuses similitudes dans les séquences de codage, en particulier dans le gène pour la protéine de particule virale, tandis que les autres gènes présentent moins d'homologie et peu ou pas d'homologie dans les séquences non codées des différents virus, si ce n'est qu'une petite partie de la région commune est semblable dans tous les géminivirus (Hamilton *et al.*, 1984; Harrison, 1985). L'une des conséquences de ces homologies de génomes est que les (?) d'ADN complémentaires (cDNA) for ACMV-T DNA-1 (?) réagissent avec l'ADN de plusieurs autres géminivirus transmis par mouches blanches, tandis que les (?) probes de ACMV-T DNA-2 réagissent avec l'ADN d'un très petit nombre de ces virus.

Lorsque l'on compare des isolats de virus extraits d'un manioc atteint de mosaïque récolté dans différentes parties d'Afrique et du sub-continent indien, on s'aperçoit qu'ils se divisent en trois groupes (Robinson *et al.*, 1984; Harrison *et al.*, 1986). Le Groupe A comprend les isolats en provenance d'Angola, de Côte d'Ivoire, du Nigéria, d'Afrique du Sud et de l'Ouest du Kenya. Ils se multiplient de façon optimale à 25°C environ, leur ADN est fortement hybridé avec des probes pour chaque ADN-1 ou ADN-2 d'ACMV-T, et leurs particules réagissent à 21 au moins des 23 anticorps monoclonaux d'ACMV-T qui ont été testés. Le groupe A compte également des isolats défectueux qui ne produisent pas de particules virales et ne sont donc pas décelables sérologiquement mais ont une grande homologie séquentielle de nucléotide avec l'ADN-1 et l'ADN-2 d'ACMV-T (Sequeira & Harrison, 1982; Robinson *et al.*, 1984). Il est probable que ces isolats défectueux ne soient maintenus que par propagation végétative de plantes malades. Le groupe B comprend les isolats en provenance de la région côtière du Kenya, de Madagascar et du Malawi. Ces isolats se multiplient mieux aux environs de 30°C, leur ADN s'hybride fortement avec des probes pour l'ADN-1 d'ACMV-T, mais seulement faiblement avec les probes d'ADN-2 et leurs particules réagissent avec seulement environ la moitié des anticorps monoclonaux d'ACMV-T. Le groupe C comprend les isolats en provenance de l'Inde et de Sri Lanka. Leur comportement ressemble plus aux isolats du groupe B qu'à ceux du groupe A, si ce n'est que leurs particules réagissent à seulement 3 des 23 anticorps monoclonaux. De la même façon leur ADN, contrairement à celui des isolats du groupe B, ne semble pas s'hybrider avec un probe pour la région commune d'ADN de l'ACMV-T. Il se peut que le mode d'apparition de ces trois groupes d'isolats reflète trois voies différentes d'introduction du manioc en provenance d'Amérique, par les colons et les marchands portugais, du 16ème au 18ème siècles : (a) par l'Atlantique vers l'Afrique de l'Ouest d'où il s'est propagé vers l'Est du continent, (b) par le Cap

de Bonne espérance vers les côtes Est Africaines, et (c) par le Cap vers l'île Maurice, d'où il fut par la suite introduit à Sri Lanka et en Inde. La variation actuelle entre les isolats de virus confirme l'hypothèse selon laquelle, au moment de son introduction, le manioc fut atteint par les différentes variantes de gémivirus, endémiques dans les trois différentes régions géographiques. De fait il vaudrait mieux considérer les isolats du groupe C comme un virus séparé, car ils ne semblent pas être plus étroitement reliés aux autres isolats d'ACMV que ne le sont d'autres gémivirus transmis par mouches blanches que l'on trouve sur d'autres espèces de plantes.

Du DNA -1 de l'ACMV-T réagit avec le DNA de la plupart des gémivirus transmis par mouches blanches, alors que les sondes faites avec le DNA-2 de l'ACMV-T réagissent avec très peu de virus.

## LE VIRUS DE LA MOSAÏQUE INDIENNE DU MANIOC (ICMV) : AUTRES PROPRIETES

Jusqu'à récemment, on disposait de très peu d'informations sur les isolats de virus extraits du manioc atteint de mosaïque en Inde ou au Sri Lanka. Néanmoins, les travaux récents menés à Dundee ont mis en évidence que de tels isolats pouvaient se transmettre, bien que difficilement, par inoculation de sève de manioc à *N. benthamiana*, dont les symptômes ressemblent à ceux des isolats en provenance des régions côtières du Kenya. Des particules d'ICMV furent purifiées, dont la morphologie était semblable à celle des particules d'ACMV-T, et on montra que l'ADN extrait des particules de virus se composait de molécules circulaires à un seul brin de même taille que celles d'ACMV-T. Cependant, les particules de protéines d'ICMV migraient légèrement plus lentement que celles d'ACMV-T dans des gels de polyacrylamide. Par des tests Elisa, il fut facile d'identifier un isolat indien, grâce à son propre anticorps ou par l'anticorps d'ACMV-T, mais il fut plus facile de trouver l'ACMV-T par son anticorps homologue, que par l'anticorps de l'ICMV. C'est ainsi que l'on peut distinguer sérologiquement l'ICMV de l'ACMV-T en utilisant des anticorps polyclonaux et la relative facilité de détection de chaque virus par l'anticorps homologue reflète probablement les différents titres des deux antisérums utilisés dans ces essais (Lennon, Aiton & Harrison, 1987).

## DECOUVERTE DU VIRUS ET DIAGNOSTIC

Habituellement, les feuilles d'un manioc atteint par un gémivirus présentent des symptômes caractéristiques. Cependant, des complications peuvent apparaître avec des génotypes de manioc qui ne réagissent pas de façon typique, avec des plantes atteintes par un ensemble de deux virus ou plus, ou qui présentent des anomalies chimériques ressemblant à la Mosaïque du Manioc. De plus, il peut être nécessaire en épidémiologie de tester d'autres espèces de plantes, ou même des mouches blanches vectrices, pour déterminer si elles sont porteuses d'ACMV. C'est pour l'ensemble de ces raisons qu'un test définitif et sensible est nécessaire pour les souches d'ACMV. Cependant, des réactions aux antisérums polyclonaux d'ACMV ou avec des sondes d'ADNc pour l'ADN-1 d'ACMV ne suffisent pas à identifier le virus parce que ces réactifs peuvent déceler en outre de nombreux autres gémivirus transmis par mouches blanches. Des essais avec des sondes pour la région commune d'ADN d'ACMV conviennent en principe, mais il n'est pas certain qu'ils soient assez sensibles et, pour le moment, ils nécessitent l'utilisation de réactifs radioactifs qui, dans de nombreux pays, ne sont pas toujours facilement disponibles. Le diagnostic actuellement le plus satisfaisant est le test Elisa qui utilise les anticorps monoclonaux à l'ACMV (Thomas *et al.*, 1986). Cette méthode de diagnostic a donné des résultats prometteurs lors de tests préliminaires à Dundee et en Côte d'Ivoire. Il est possible de sélectionner des anticorps monoclonaux qui décèlent seulement les isolats du groupe A, ou seulement ceux des groupes A et B, de sorte que des isolats de ces deux groupes puissent être décelés et distingués (Harrison *et al.*, 1986). Actuellement, aucun anticorps monoclonal n'est disponible qui permette

de distinguer les isolats du groupe C des autres géminivirus transmis par mouches blanches, mais le test Elisa utilisant un anticorps polyclonal d'un isolat du groupe C est disponible et en partie efficace. Les tests Elisa semblent convenir à la détection d'isolats des trois groupes dans le manioc malade, sous réserve que l'on utilise de jeunes feuilles présentant des symptômes. Cependant, les anticorps monoclonaux spécifiques des isolats du groupe C manquent encore et les travaux actuels tentent de les produire.

## CONCLUSIONS

Les conclusions principales que l'on peut tirer de cet exposé sur les isolats de virus provoquant la mosaïque du manioc en Afrique et en Asie sont les suivantes :

1. La mosaïque du manioc en Afrique et sur le sub-continent indien est due à des isolats de géminivirus transmis par mouches blanches et se distingue radicalement d'autres maladies superficiellement semblables que l'on rencontre en Amérique du Sud.

2. Aucun hôte, différent de *Manihot* spp. ou de *J. multifida*, n'a pu être nettement identifié.

3. Les isolats de géminivirus issus du manioc sont rassemblés en trois groupes répartis différemment, les isolats du groupe A apparaissant en Afrique de l'Ouest et à l'Ouest du Kenya, ceux du groupe B en Afrique de l'Est, y compris dans les régions côtières, et ceux du groupe C en Inde et à Sri Lanka. Il est possible de considérer les isolats du groupe C comme un virus séparé.

4. Chaque groupe d'isolats doit être étudié séparément afin de déterminer son écologie et son épidémiologie ainsi que sa capacité à contaminer des génotypes de manioc sélectionnés pour la résistance aux isolats d'un autre groupe.

5. Il est nécessaire d'employer diverses méthodes pour déceler tous les isolats et distinguer ceux des différents groupes. Les tests Elisa utilisant les anticorps monoclonaux sont la meilleure méthode facilement utilisable pour les isolats des groupes A et B.

## REMERCIEMENTS

Une grande partie du travail réalisé sur l'ACMV au Scottish Crop Research Institute a été financée par l'Administration Britannique du Département d'Outre-Mer, et les collègues de nombreux autres pays nous ont aidés en nous fournissant du matériel végétal virosé.

## BIBLIOGRAPHIE

- ATKINSON, M. (1977). *Nature* **270**, 760-762.
- BOCK, K.R. (1975). *Third International Congress of Virology Abstracts*, 93.
- BOCK, K.R. & HARRISON, B.D. (1985). *AAB Description of Plant Viruses* **297**.
- BOCK, K.R. & WOODS, R.D. (1983). *Plant Disease* **67**, 994-995.
- BOCK, K.R., GUTHRIE, E.J. & MEREDITH, G. (1978). *Annals of Applied Biology* **90**, 361-367.
- CHANT, S.R. (1958). *Annals of Applied Biology* **46**, 210-215.
- DUBERN, J. (1979). *Phytopathologische Zeitschrift* **96**, 25-39.
- HAMILTON, W.D.O., STEIN, V.E., COUTTS, R.H.A. & BUCK, K.W. (1984). *EMBO Journal* **3**, 2197-2205.
- HARRISON, B.D. (1985). *Annual Review of Phytopathology* **23**, 55-82.
- HARRISON, B.D., BARKER, H., BOCK, K.R., GUTHRIE, E.J., MEREDITH, G. & ATKINSON, M. (1977). *Nature* **270**, 760-762.
- HARRISON, B.D., LENNON, A.M., MASSALSKI, P.R., ROBINSON, D.J. & THOMAS, J.E. (1986). *Proceedings of the Workshop on Epidemiology of Plant Virus Diseases*. Orlando, Florida, X9-11.
- HORVAT, F. & VERHOYEN, M. (1981). *Parasitica* **37**, 119-130.
- LENNON, A.M., AITON, M.M. & HARRISON, B.D. (1987). *Report of the Scottish Crop Research Institute*, 1986, in press.
- ROBERTS, I.M. & HARRISON, B.D. (1987). *Report of the Scottish Crop Research Institute* 1986, in press.
- ROBERTS, I.M., ROBINSON, D.J. & HARRISON, B.D. (1984). *Journal of general Virology* **65**, 1723-1730.
- ROBINSON, D.J., HARRISON, B.D., SEQUEIRA, J.C. & DUNCAN, G.H. (1984). *Annals of Applied Biology* **105**, 483-493.
- SEQUEIRA, J.C. & HARRISON, B.D. (1982). *Annals of Applied Biology* **101**, 33-42.
- STANLEY, J. (1983). *Nature* **305**, 643-645.
- STANLEY, J. (1985). *Advances in Virus Research* **30**, 139-177.
- STANLEY, J. & GAY, M.R. (1983). *Nature* **301**, 260-262.
- STOREY, H.H. & NICHOLS, R.F.W. (1938). *Annals of Applied Biology* **25**, 790-806.
- THOMAS, J.E., MASSALSKI, P.R. & HARRISON, B.D. (1986). *Journal of general Virology* **67**, 2739-2748.
- TOWNSEND, R., STANLEY, J., CURSON, S. & SHORT, M.N. (1985). *EMBO Journal* **4**, 33-38.
- TOWNSEND, R., WATTS, J. & STANLEY, J. (1986). *Nucleic Acids Research* **14**, 1253-1265.