

*"Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que se soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de la Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux"*  
*Le présent document n'engage que son auteur.*

*Communauté française de Belgique*

**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES  
DE GEMBLoux**

**Contribution à la caractérisation moléculaire des  
relations hôte-pathogène de plants de pêchers infectés  
par le viroïde de la mosaïque latente du pêcher  
(PLMVd)**

Travail de fin d'études

Année académique 2006-2007

Présenté par: Parisi Olivier

Promoteur: Professeur Dr. M.H. Jjakli  
Co-Promoteur: S. Massart

En vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes  
Approfondies en Sciences Agronomiques et  
Ingénierie Biologique

## Remerciements.

Je remercie tout d'abord le Professeur M.H. Jijakli pour m'avoir permis d'évoluer au sein de l'Unité de Phytopathologie ainsi que pour sa rigueur et ses nombreux conseils.

Mes remerciements vont ensuite à M. Massart Sébastien qui m'a guidé et soutenu tout au long de ces deux dernières années. Sa patience, sa rigueur et ses connaissances scientifiques ont permis de nombreux et riches échanges.

Je tiens également à remercier particulièrement les personnes suivantes:  
M. Dresen F. Technicien à l'unité de Phytopathologie pour avoir pris soin des pêchers avec tant d'attention.

Mlle Lassois et M Aldaghi pour leurs nombreux conseils et le temps qu'ils ont consacré à m'initier à la cDNA-AFLP.

M. Muhovski Yordan du centre de Biotechnologies du CRA-W de Grand-Manil pour son accueil chaleureux au sein de cette institution ainsi que pour son expérience dont il m'a fait profiter mais aussi pour le temps qu'il m'a consacré.

Je voudrais également remercier l'ensemble du personnel de l'Unité de Phytopathologie pour l'ambiance conviviale et propice au travail que j'y ai trouvée ainsi que pour leurs nombreux encouragements.

Je tiens à remercier tous les re-lecteurs attentifs de ce travail et en particulier mes parents qui m'ont soutenu jusqu'aux dernières heures de rédaction de ce travail.

Enfin, je remercie Amélie pour la patience dont elle a fait preuve ces derniers mois et pour son soutien journalier.

## Résumé

Des études sur le *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), et sur d'autres viroïdes des arbres fruitiers, sont menées depuis plusieurs années au sein de l'Unité de Phytopathologie. Ces études ont débouché sur deux nouvelles hypothèses. La première concerne la mise en évidence de structures secondaires en pseudo-noeuds potentiellement impliquées dans la pathogénicité de ce viroïde tandis que la seconde suppose l'existence de phénomènes de recombinaison entre viroïdes. Le premier objectif de ce travail a été de créer une collection de variants dimérisés afin de pouvoir vérifier les deux hypothèses citées ci-dessus. Des variants latents et symptomatiques ont pu être dimérisés avec succès et des amorces ont été sélectionnées afin de muter leurs pseudo-noeuds. Par contre, les variants sélectionnés pour vérifier les hypothèses de recombinaison ont subi trop de mutations durant le processus de dimérisation. Des amorces spécifiques ont cependant déjà été sélectionnées afin de pouvoir détecter les recombinants. Le second objectif de ce travail a été de mettre au point la cDNA-AFLP afin de pouvoir, par la suite, caractériser les relations hôte-pathogène entre le PLMVd et le pêcher en collaboration avec le Département de biochimie et ARN catalytique de l'Université de Sherbrooke qui analysera le profil en miRNA de plantes saines et de plantes infectées. En se basant sur des travaux antérieurs de pathogénicité de différents variants au sein de l'Unité, un modèle de comparaison de type plante saine-plante infectée symptomatique-plante infectée asymptomatique a été sélectionné. Les extractions d'ARN total ont été menées avec succès et un profil d'AFLP a d'ailleurs déjà été obtenu à l'aide de différents témoins. Certaines étapes de la manipulation restent cependant à optimiser afin de pouvoir l'employer efficacement sur les objets retenus.

## Abstract.

Since several years, the Plant Pathology Unit studies the *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) and other viroids from fruit trees. These studies have led, first, to the lightening of new pseudoknot interactions potentially involved in the pathogenic mechanisms of the PLMVd. Secondly the existence of recombination events during the replication of the viroids was expressed. The first goal of this work was to create a collection of dimeric variants to be able to verify these hypotheses during the following years. Dimeric constructions of severe and latent variants were successfully obtained. Unfortunately, the variants selected to perform the recombination analysis contained too much mutations to be used. Finally two design of specific primers were performed. The first provides the possibility to create mutations in the pseudoknots and the second makes us able to detect recombinant variants. The second goal of this work was to set up the cDNA-AFLP on peach extracts to perform the characterization of host-pathogen interactions between peach trees and the PLMVd. This will be made with collaboration of the Biochemistry and Catalytic RNA Department of the University of Sherbrooke which will analyze the miRNA pattern of infected and healthy plants. Based on former pathogenicity studies of different variants performed in our Department, the comparison of differentially expressed genes will include symptomatic and non symptomatic plants and also an healthy plant. Total RNA extracts were successfully performed and a first AFLP profile was obtained. However some steps of the manipulation need an optimization to produce reliable results.

# Table des matières

Liste des abréviations.....	8
Introduction.....	9
Synthèse bibliographique.....	10
1 Les viroïdes.....	10
1.1 Généralités.....	10
1.2 Classification.....	10
1.3 Les Avsunviroidae.....	12
1.4 La réplication.....	12
1.5 Le ribozyme et l'auto-clivage.....	12
1.6 Le pouvoir pathogène.....	14
1.7 Effet des viroïdes sur l'expression des gènes chez la plante.....	16
1.8 Déplacement dans la plante.....	20
1.9 Méthodes de lutte contre les viroïdes.....	21
1.9.1 L'assainissement de plants.....	21
1.9.2 La protection croisée.....	21
1.9.3 Les méthodes utilisant le génie génétique.....	21
1.10 Le viroïde de la mosaïque latente du pêcher.....	22
1.10.1 Gamme d'hôte.....	22
1.10.2 Symptômes.....	22
1.10.3 Distribution géographique.....	24
1.10.4 Réplication du Peach latent mosaic viroid.....	24
1.10.5 Transmission.....	25
1.10.6 Méthodes de détection.....	25
1.10.7 Méthodes de lutte contre le viroïde de la mosaïque latente du pêcher.....	26
1.10.8 Caractérisation moléculaire.....	27
2 La recombinaison: mécanisme d'évolution chez les virus et les viroïdes.....	29
3 Étude de l'expression différentielle.....	31
3.1 La cDNA-AFLP.....	31
3.2 Principe.....	32
3.3 Avantages.....	32
3.4 Inconvénients.....	32
3.5 Utilisation en phytopathologie.....	33
3.6 Utilisation de l'expression différentielle chez les viroïdes.....	33
4 Le gene silencing.....	33
4.1 Introduction.....	33
4.2 Mécanisme de régulation de l'expression des gènes dans le cadre de la protection du génome.....	35
4.2.1 L'extinction post-transcriptionnelle de gènes.....	35
4.2.1.1 Caractéristiques générales.....	35
4.2.1.2 Mécanisme d'action du PTGS.....	35
4.2.1.3 La transmission du PTGS.....	37
4.3 Stratégies d'utilisation du silencing.....	37
Objectifs.....	39
Matériel et Méthodes.....	40
1 Matériel biologique.....	40
1.1 Matériel végétal.....	40
1.2 Souche bactérienne.....	40
1.3 Vecteur de clonage.....	41

1.4 Clones de PLMVd.....	41
2 Méthodes.....	41
2.1 Préambule.....	41
2.2 Construction des dimères.....	41
2.2.1 Purification de l'ADN plasmidique d'E. coli en utilisant le kit GeneJET™ plasmid Miniprep kit (Fermentas).....	41
2.2.2 Amplification des inserts de plasmides recombinants.....	41
2.2.3 Purification des produits PCR.....	42
2.2.4 Phosphorylation de l'ADN purifié.....	42
2.2.5 Réaction de ligation.....	42
2.2.6 Amplification du produit de ligation.....	43
2.2.7 Purification des dimères.....	43
2.2.8 Clonage des dimères dans le vecteur pCR2.1.....	43
2.2.9 Vérification de la présence du dimère.....	43
2.2.9.1 Purification de l'ADN plasmidique d'E. coli en utilisant le kit GeneJET™ plasmid Miniprep kit (Fermentas).....	43
2.2.9.2 Digestion du plasmide par l'enzyme de restriction KpnI (Fermentas).....	44
2.2.9.3 Séquençage des inserts dimériques.....	44
2.3 La cDNA-AFLP.....	45
2.3.1 Extraction d'ARN total.....	45
2.3.2 Vérification de la qualité de l'ARN extrait.....	45
2.3.3 Quantification des acides nucléiques avec le NanoDrop®.....	45
2.3.3.1 Principe.....	45
2.3.3.2 Méthode.....	45
2.3.4 Électrophorèse sur gel d'agarose.....	46
2.3.4.1 Migration d'ADN.....	46
2.3.4.2 Migration d'ARN.....	46
2.3.5 Traitement DNase Rnase-free (Ambion).....	46
2.3.6 Purification de l'ARN total et enrichissement en ARN messager.....	46
2.3.7 Détection moléculaire du PLMVd.....	47
2.3.7.1 Les amorces utilisées.....	47
2.3.7.2 Méthode.....	47
2.3.8 La cDNA-AFLP.....	47
2.3.8.1 Principe.....	47
2.3.8.2 Méthode.....	48
2.3.8.2.1 Extraction de l'ARN.....	48
2.3.8.2.2 Rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire.....	48
2.3.8.2.3 Digestion.....	48
2.3.8.2.4 Ligation.....	49
2.3.8.2.5 Pré-amplification.....	49
2.3.8.2.6 Marquage des amorces.....	49
2.3.8.2.7 Amplification sélective.....	49
2.3.8.2.8 Migration des produits d'amplification sélective sur gel de polyacrylamide.....	50
2.3.8.2.9 Révélation de la radioactivité.....	51
Résultats et discussion.....	52
1 Dimérisation de variants du PLMVd.....	52
1.1 Introduction.....	52
1.1.1 La mutagenèse dirigée.....	52
1.1.2 Hypothèses de recombinaison.....	54

1.2 Purification de l'ADN plasmidique d'E.coli et amplification des inserts.....	56
1.3 Phosphorylation et ligation des produits PCR purifiés.....	57
1.4 Amplification des produits de ligation.....	58
1.5 Purification des produits de l'amplification et clonage des dimères.....	59
1.6 Vérification de l'orientation des dimères.....	60
1.7 Analyse des séquences.....	61
1.8 Discussion.....	63
1.8.1 La recombinaison.....	63
1.8.2 La mutagenèse dirigée.....	64
2 Mise au point de la cDNA-AFLP.....	67
2.1 Mise au point de la technique.....	67
2.1.1 Extraction d'ARN et vérification de la qualité de l'ARN.....	67
2.1.2 Rétrotranscription de l'ARN en ADNc.....	68
2.1.3 optimisation de différents paramètres de l'AFLP.....	68
2.1.3.1 Digestion de l'ADNc par un couple d'enzyme.....	68
2.1.3.2 La pré-amplification.....	68
2.1.3.3 Choix, marquage des amorces sélectives.....	70
2.1.3.4 Amplification sélective.....	70
2.2 Choix du modèle de comparaison.....	73
2.2.1 Introduction.....	73
2.2.2 Les différents modèles de comparaisons.....	73
2.3 Extraction de l'ARN total des objets choisis pour la cDNA-AFLP.....	74
2.3.1 Choix des objets.....	74
2.3.2 Extractions.....	75
2.4 Discussion.....	75
Conclusion et perspectives.....	78
Annexes.....	80
1 Protocoles utilisés.....	80
1.1 Protocole du Genejet Plasmid miniprep kit (Fermentas).....	80
1.2 Protocole du QIAEXII Gel extraction kit (QIAGEN).....	81
1.3 Protocole du QIAquick PCR Purification kit.....	83
1.4 Protocole du TA Cloning.....	84
1.5 Protocole du RNeasy MinElute Cleanup.....	86
2. Alignements de séquences.....	90
2.1 Variant 151.1 et les amorces de mutagenèse de L1.....	90
2.2 Variant 151.1 et les amorces de mutagenèse de P8.....	91
2.3 Variant 124.4.3 et les amorces de mutation L1.....	91
2.4 Variant 124.4.3 et les amorces de mutation P8.....	93
2.5 Alignement des séquences de variants des groupes II-A, II-B et II-C.....	94
2.6 Alignement de séquence des variants Hd6-Hd8 et des variants du groupe I.....	95
Bibliographie.....	96

## Liste des abréviations.

abRNA: aberrant RNA (ARN aberrant)  
ADN: Acide Désoxyribonucléique  
ADNc: ADN complémentaire  
ARN ou RNA: Acide Ribonucléique ou Ribonucleic acid  
ARNm ou mRNA: ARN messenger ou messenger RNA  
ARNr: ARN ribosomique  
ASBVd: Avocado Sunblotch viroid  
ATP: Adénosine Tri-Phosphate  
CChMVd: Chrysanthemum Chlorotic Mottled viroid  
CCR: Central Conserved Region (région centrale conservée)  
cDNA-AFLP: cDNA Amplified length Polymorphism  
CEVd: Citrus Exocortis viroid  
CSVd: Chrysanthemum Stunt viroid  
DEPC: DiéthylPyrocarbonate  
EDTA: Acide -éthylène-diamine-tétraacétique  
miRNA: micro RNA  
NEP: Nuclear Encoded Polymerase  
PEP: Plastid Encoded Polymérase  
PLMVd: Peach latent Mosaic viroid  
PSTVd: Potato Spindle Tuber viroid  
PTGS: Posttranscriptionnal Gene silencing (Extinction post-transcriptionnelle de gènes)  
RISC: RNA induced Silencing Complex  
RT-PCR: Reverse Transcriptase PCR  
SDS: Sodium Dodécyl Sulfate  
siRNA: Small interferring RNA  
TAE: Tris-Acétate-EDTA  
TCH: Terminal Conserved Hairpin (épinglé à cheveux terminal conservée)  
TCR: Terminal Conserved Region (région terminale conservée)  
TMV: Tobacco Mosaic Virus



## Introduction.

Les viroïdes sont d'importants agents phytopathogènes responsables de maladies sur de nombreuses espèces herbacées et ligneuses. Il s'agit de molécules d'ARN circulaires monocaténares dont la taille est comprise entre 246 et 401 nucléotides. Contrairement aux virus, les viroïdes ne codent pour aucune protéine, ils ne sont pas encapsidés, et sont, a priori, les plus petits pathogènes des végétaux. Malgré cette étonnante simplicité, les viroïdes causent de nombreux dégâts sur différentes cultures.

L'unité de Phytopathologie étudie *Peach latent mosaic viroid* depuis plusieurs années dans le cadre d'une collaboration internationale. Ce viroïde répandu mondialement est considéré comme un organisme de qualité en Europe.

Le PLMVd peut induire une mosaïque (mais aussi des chloroses et une diminution de la qualité des fruits chez les plantes infectées). Il est cependant latent en verger ce qui ne facilite pas sa détection. Ce viroïde dont la taille est comprise entre 338 et 351 nucléotides possède une structure secondaire très branchée et sa séquence nucléotidique est très variable. De plus, les isolats composés de ce viroïde peuvent être latents ou sévères. Certaines différences de séquence, dans le cas présent une insertion d'une dizaine de nucléotides ont déjà pu être mises en relation avec l'observation de symptômes appelés peach calico et correspondant à une forme extrême de chlorose.

Les études menées sur le PLMVd à l'Unité de Phytopathologie ont déjà permis de caractériser la pathogénicité de différents variants et de mettre en évidence la présence du phénomène de gene silencing au niveau de plantes infectées par ces mêmes variants (Fekih Hassen, 2006; Parisi, 2006).

Suite à ces résultats, nous avons décidé de tenter de caractériser davantage la relation hôte-pathogène entre le PLMVd et le pêcher.

Grâce à une collaboration avec le Département de Biochimie et ARN catalytique de l'Université de Sherbrooke (Canada), cette caractérisation sera envisagée selon deux axes complémentaires. Ainsi, l'Unité de Phytopathologie tentera de caractériser cette relation par la mise au point et l'utilisation de la cDNA-AFLP sur des extraits d'ARN de plantes infectées tandis que le Département de Biochimie de l'Université de Sherbrooke analysera les profils en micro-RNA (fortement impliqués dans le développement) des plantes infectées. Les résultats obtenus seront mis en relation afin de tenter de mettre à jour les relations hôte-pathogène existant entre cette molécule d'ARN et la plante.

D'autre part, ce travail s'inscrit dans la poursuite d'une thèse de doctorat visant à la caractérisation moléculaire des relations hôte-pathogène entre le PLMVd et le pêcher. Des constructions d'ARN dimérique de PLMVd, dont la séquence a été modifiée de façon à déstabiliser la structure secondaire du viroïde, ont été réalisées. Ces nouveaux variants seront inoculés par la suite.

Ainsi, les objectifs de ce travail sont donc (i) de créer des variants mutés du PLMVd au niveau des régions en pseudo-noeud, (ii) de choisir et de créer des variants permettant de vérifier l'hypothèse de recombinaison émise par Fekih *et al.*, (2007) et (iii) de mettre au point la cDNA-AFLP afin de pouvoir caractériser par la suite la relation hôte-pathogène.

# Synthèse bibliographique.

## 1 Les viroïdes.

### 1.1 Généralités.

Les viroïdes ont été découverts par Diener en 1967 au cours d'études sur la maladie des tubercules en fuseaux de la pomme de terre. Il démontra en effet cette année-là que le pathogène responsable de cette infection était un acide nucléique non encapsidé. Plus précisément, il s'agissait de molécules d'ARN de faible poids moléculaire se répliquant dans les cellules infectées. Il faudra cependant encore attendre 1971 avant que Diener ne leur consacre le terme de « viroïde » afin de pouvoir distinguer ces pathogènes particuliers des virus conventionnels (Elleuch, 2004).

### 1.2 Classification.

Les viroïdes ont été classés en deux familles sur base de l'analyse de différents critères: l'analyse des séquences conservées, des formes présentes lors de la réplication et de leur évolution, des motifs structuraux et d'une analyse phylogénétique. Il s'agit des familles des *Pospiviroidae* représentée par le *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) et des *Avsunviroidae* représentée par l'*Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) (Flores *et al.*, 2001). Ainsi, les viroïdes possédant une région centrale conservée (CCR) mais étant dépourvus de structures d'autoclivage, appartiennent aux *Pospiviroidae* tandis que ceux dépourvus de CCR mais possédant des structures permettant l'autoclivage, les ribozymes en tête de marteau, ainsi qu'une structure secondaire en branche appartiennent à la famille des *Avsunviroidae* (Flores *et al.*, 1998).

Les genres auxquels appartiennent les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* ont été définis sur base des caractéristiques de la CCR ainsi que sur la présence ou l'absence de deux domaines qui ne sont jamais simultanément présents dans la molécule viroïdale à savoir la région terminale conservée (TCR<sup>1</sup>) et la structure en épingle à cheveux conservée (TCH<sup>2</sup>) (Koltunow et Rezaian 1998 et Flores *et al.*, 1997 cité par Jamar, 2005). Chez les *Avsunviroidae*, la classification des genres se base sur le contenu en G-C, sur la structure prédite par informatique, sur la morphologie des ribozymes, ainsi que sur la solubilité de la molécule dans le LiCl 2M (Flores *et al.*, 1998). Le tableau 1 reprend la classification actuelle des viroïdes.

Enfin, la limite permettant de distinguer les espèces des variants a été arbitrairement fixée à un seuil d'homologie de 90% (Flores *et al.*, 1998). Cette synthèse bibliographique se focalisera sur la famille des *Avsunviroidae*, à laquelle appartient le PLMVD.

1 Terminal Conserved Region

2 Terminal Conserved Hairpin

Tableau 1: Classification des viroïdes selon Flores 1998

Classification des viroïdes		
Familles	Genres	Espèces
<b>Avsunviroidae</b>	<b>Avsunviroid</b>	Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd)
	<b>Pelamoviroid</b>	Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd) Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid (CChMVd)
<b>Pospiviroidae</b>	<b>Pospiviroid</b>	Chrysanthemum stunt viroid (CSVd)
		Citrus exocortis viroid (CEVd)
		Columnnes latent viroid (CLVd)
		Iresine viroid1 (IrVd)
		Mexican papita viroid (MPTVd)
		Potato spindle tuber viroid (PSTVd)
Tomato apical stunt viroid (TASVd)		
Tomato planta macho viroid (TPMVd)		
<b>Hostuviroid</b>	<b>Hostuviroid</b>	Hop stunt viroid (HSVd)
		(Citrus cachexia viroid)
		(Cucumber pale fruit viroid) (Peach dapple viroid) (Plum dapple viroid)
<b>Cocadviroid</b>	<b>Cocadviroid</b>	Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd)
		Citrus viroid IV (Cvd-IV)
		Coconut tinangaja viroid (CtiVd)
		Hop latent viroid (HLVd)
<b>Apscaviroid</b>	<b>Apscaviroid</b>	Apple scar skin viroid (ASSVd)
		(Dapple apple viroid)
		(Pear rusty skin viroid)
		(Japanese pear fruit dimple viroid)
		Apple dimple fruit viroid (ADFVd)
		Australian grapevine viroid (AGVd)
		Citrus bent leaf viroid (CBLVd)
		Citrus viroid III (Cvd-III)
		Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1)
		Grapevine yellow speckle viroid 2 (GSYVd-2)
Pear blister canker viroid (PBCVd)		
<b>Coleviroid</b>	<b>Coleviroid</b>	Coleus blumei viroid 1 (CbVd-1)
		Coleus blumei viroid 2 (CbVd-2)
		Coleus blumei viroid 3 (CbVd-3)

### 1.3 Les *Avsunviroidae*.

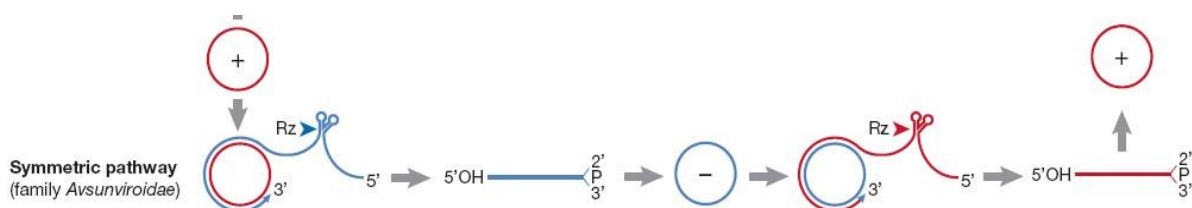
Les *Avsunviroidae* ont une localisation chloroplastique. Cette famille est divisée en deux genres sur base de la solubilité des molécules viroïdales dans le LiCl 2 M. On distingue donc les *Avsunviroides* avec pour seul membre l'Avocado sunblotch viroid, soluble dans le LiCl 2M (Navarro et Flores, 1997; Steger et Riesner, 2003) et présentant une double structure ribozyme instable et les *Pelamoviroides* regroupant quant à eux le Peach Latent Mosaic Viroid et le Chrysanthemum Chlorotic mottle Viroid tous deux insolubles dans le LiCl 2M et possédant une structure ribozyme simple stable (Navarro et Flores, 1997; Steger et Riesner, 2003; Gora-Sochacka, 2004).

### 1.4 La réplication.

Contrairement aux virus, le génome des viroïdes ne code pour aucune protéine. Ces derniers n'utilisent donc pas le système de traduction cellulaire; par contre, ils sont totalement dépendants du système de transcription des cellules infectées pour l'accomplissement de leur cycle de réplication (Flores *et al.*, 2001; Tabler *et al.*, 2004).

Les *Avsunviroidae* se répliquent suivant un modèle symétrique: L'ARN circulaire monomérique de polarité positive sert de modèle pour un premier cycle de transcription. Les oligomères linéaires obtenus sont alors clivés (grâce aux structures ribozyme) et circularisés en monomères de polarité négative servant à leur tour de modèle pour le second cycle de transcription donnant la descendance de polarité positive (Figure 1)(Bussière *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2001; Gora-Sochcka 2004; Tabler 2004).

Figure 1: Réplication des viroïdes selon le modèle symétrique des *Avsunviroidae*. Rz représente le ribozyme des *Avsunviroidae* (Daros *et al.*, 2006)



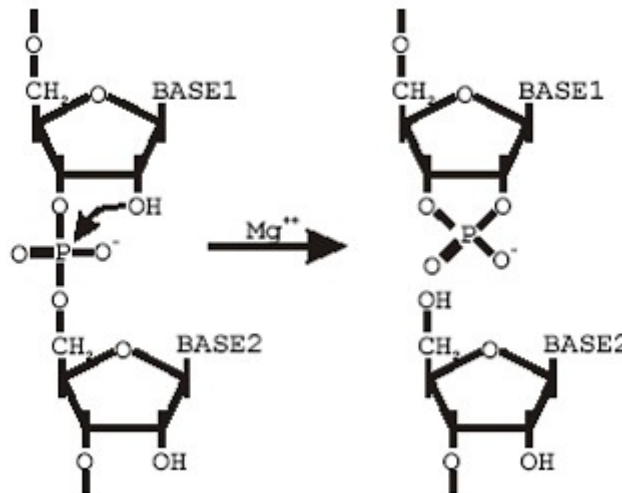
### 1.5 Le ribozyme et l'auto-clivage.

Tous les *Avsunviroidae* peuvent en effet potentiellement adopter une structure catalytique (appelée ribozyme) en tête de marteau (*Hammerhead*). Cette structure basée sur des prédictions informatiques et sur des covariations de séquences est conservée sur les brins des deux polarités

chez tous les viroïdes de cette famille (Côté *et al.*, 2003).

Le ribozyme en tête de marteau est un petit motif d'ARN formé de trois doubles hélices de séquences non spécifiques entourant un noyau catalytique de 11 résidus très conservés. La formation de ce complexe en présence de cations bivalents (comme le magnésium) entraîne l'autoclivage de l'ARN au niveau d'un lien phosphodiester particulier produisant ainsi des extrémités 2',3'phosphate cyclique et 5'hydroxyle (Figure 2) (Côté *et al.*, 2003).

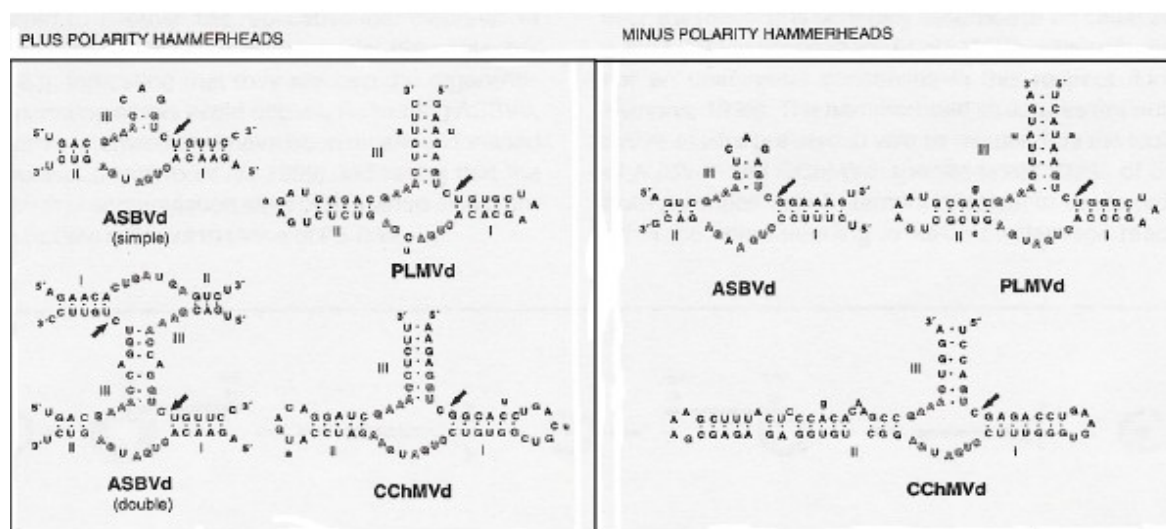
Figure 2: Réaction d'autoclivage



Les structures ribozymes adoptées par les différents membres de la famille des *Avsunviroidae* sont légèrement différentes d'une espèce à l'autre: l'*Avocado sunblotch viroid* peut adopter une structure ribozyme double stable (la structure simple étant instable) tandis que le *Peach latent mosaic viroid* adopte une structure ribozyme simple stable très efficace dans les deux polarités (Figure 3). Cette meilleure efficacité se traduit par l'accumulation de formes monomériques circulaires chez les plantes infectées par le PLMVd<sup>3</sup> tandis que le manque d'efficacité du ribozyme de polarité positive chez l' ASBVd induit l'accumulation de formes linéaires multimériques 1- à 8-mères (Bussière *et al.*, 1999; Côté *et al.*, 2003).

3 La situation est identique chez le CChMVd

Figure 3: Structures ribozymes des deux polarités chez les *Avsunviroidae*. Les flèches représentent le site d'autoclivage; les chiffres romains numérotent les hélices



## 1.6 Le pouvoir pathogène.

Etant donné que les viroïdes ne codent pour aucune protéine, le pouvoir pathogène doit dépendre de la séquence nucléotidique ainsi que de la conformation structurale des viroïdes. On peut donc distinguer, pour un même viroïde, des variants latents, peu sévères ou sévères suivant l'importance des symptômes qu'ils induisent et ce avec peu de différences nucléotidiques (Flores *et al.*, 2001).

L'action des viroïdes sur les plantes serait principalement due à la phosphorylation de certaines protéines, à l'activation de gènes codant une protéine kinase voire à l'altération de l'expression de gènes (Hammond et Zhao 2000). La façon selon laquelle les viroïdes arrivent à modifier l'expression de gènes chez les végétaux n'est pas encore élucidée. Il peut donc s'agir de perturbations au niveau de l'épissage des ARN messagers, de l'exportation des ARN hors du noyau, mais aussi d'interférences au niveau de l'activation de protéines kinases, ou d'autres mécanismes d'activation directe ou indirecte de l'expression des gènes (tel que le *gene silencing*) (Itaya *et al.*, 2002).

Une expérience menée sur des plants de tomates transformés pour exprimer une structure tige-boucle auto-complémentaire dont la séquence correspond au domaine de pathogénicité du PSTVd semble indiquer que la possibilité de l'implication du *gene silencing* est fondée. Les plants ainsi transformés présentaient des symptômes spécifiques à une infection par le PSTVd et des siRNA spécifiques au PSTVd ont également été détectés. Ceci suggère que les symptômes observés sont induits par les siRNA détectés étant donné leur absence et l'absence de symptômes dans les lignées non transformées (Wang *et al.*, 2004). De plus, au cours de ces travaux, une analyse des bases de

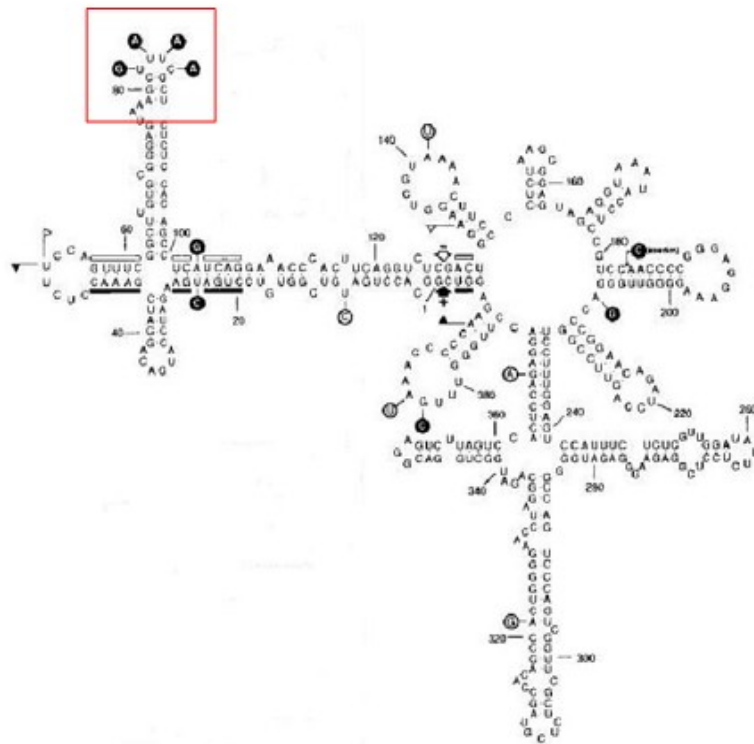
données génomiques a permis de déceler des homologies de séquences entre le PSTVd et différents gènes de diverses espèces végétales. Toutes ces homologies étant situées au niveau du domaine de régulation de la pathogénicité de ce viroïde.

Cependant, les symptômes observés étaient moins sévères que ceux obtenus suite à une infection par le viroïde entier. D'autres facteurs doivent donc intervenir dans l'expression de la pathogénicité du PSTVd (Wang *et al.*, 2004).

A l'opposé des *Pospiviroidae*, pour lesquels l'expression de la pathogénicité est un sujet déjà bien documenté, nous en savons encore peu sur les mécanismes de pathogénicité des *Avsunviroidae*. En effet, à part les ribozymes et les insertions responsables du peach calico chez le PLMVd aucun domaine fonctionnel (et particulier à la pathogénicité) n'a été mis en évidence chez ces derniers. Cependant, certains motifs structuraux ont doré et déjà pu être mis en relation, chez le CChMVd et le PLMVd, avec l'expression de symptômes lors d'une infection (De la Penã *et al.*, 1999).

Dans le premier cas, les différences moléculaires relevées entre les variants symptomatiques et asymptomatiques ont permis de mettre en évidence une boucle, au niveau des régions ribozymes, de la structure du CChMVd impliquée dans l'expression des symptômes. Une substitution de type UUUC→GAAA induit en effet le passage vers un variant latent (Figure 4) (De la Penã *et al.*, 1999).

Figure 4: Structure secondaire du CChMVd montrant la structure responsable de l'expression des symptômes



Dans le cas du PLMVd par contre, la situation est beaucoup moins claire. Certes une insertion de 10-12 nucléotides à gauche de la boucle A (cf figure 9) provoque l'apparition de symptômes appelés *peach calico* correspondant à une chlorose extrême des feuilles. Cette insertion portant la taille des variants la possédant à 351 nucléotides est la seule structure (connue à ce jour) ayant une influence sur la pathogénicité du PLMVd (Malfitano *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006). Il faut toutefois noter que la présence de cette insertion n'implique pas forcément l'expression des symptômes de *peach calico*. Deux types d'insertions ont en effet été découverts: le premier type (symptomatique) est une insertion de type tige-boucle dont la boucle est riche en uracile tandis que le second type (asymptomatique) est constitué d'une insertion dont la boucle contient deux adénines et deux guanines ce qui rappelle la structure responsable de la pathogénicité chez le CChMVd. Notons enfin que nous ne connaissons pas à l'heure actuelle les motifs responsables de la mosaïque chez les variants sans insertion (Flores *et al.*, 2006). De nombreux faits nous amènent cependant à penser que le *gene silencing* est probablement impliqué dans l'expression de la pathogénicité des viroïdes (Flores *et al.*, 2006).

### **1.7 Effet des viroïdes sur l'expression des gènes chez la plante.**

La relation hôte-pathogène s'établissant entre les viroïdes et leur plante hôte peut être étudiée selon trois axes différents. Ainsi, on peut (i) étudier les modifications transcriptionnelles via l'étude des ARN messager, (ii) étudier les relations qu'établissent les viroïdes avec les protéines de l'hôte et (iii) étudier le *gene silencing* induit par les viroïdes chez les plantes hôtes.

Deux réactions peuvent être observées lors de l'infection d'une plante par un viroïde. Il s'agit de l'apparition de symptômes ou de l'absence de développement de symptômes chez la plante hôte. Pour un même viroïde infectant un même hôte, il semble que ce soit la séquence nucléotidique du pathogène qui détermine l'installation d'une infection latente ou symptomatique.

Lors d'une infection par un viroïde, on observe généralement une modification dans la concentration de diverses protéines: on remarque par exemple une augmentation de la transcription de gènes relatifs à la défense. Ainsi, différentes études ont montré que les viroïdes étaient capables d'induire la synthèse de molécules (des enzymes hydrolytiques, des thaumatines et la protéine PR-1b) généralement impliquées dans la défense contre les bactéries, les champignons et les virus (Itaya *et al.*, 2002). De même, les infections par le CEVd induisent une augmentation ou une diminution de la phosphorylation de certaines protéines des feuilles de plants de tomates infectés (Itaya *et al.*, 2002).

Les études concernant les effets d'infections par les viroïdes ont majoritairement été menées sur le PSTVd. Ce viroïde a l'avantage d'être pathogène sur des plantes telles que la tomate bien connue



et fortement utilisée dans le domaine scientifique. Ainsi, des études de l'expression différentielle des gènes de plants de tomates infectés par deux variants de pathogénicité différente (un variant sévère et un variant intermédiaire) ont été menées à différents stades d'infection. Ces études ont notamment montrés que l'infection par le PSTVd affectait l'expression de 55 gènes (Itaya *et al.*, 2002).

Les fonctions des gènes dont l'expression est influencée par l'infection sont variées: il s'agit entre autre de gènes impliqués dans la réponse aux pathogènes, dans la formation de la paroi cellulaire, dans le métabolisme des protéines, dans le transport de sucres et dans le développement, tandis que d'autres n'ont pas de fonction connue (Itaya *et al.*, 2002).

En comparant les gènes différentiellement exprimés lors d'une infection par le TMV et le PSTVd, l'équipe d'Itaya (*et al.*, 2002 ) a également montré que l'infection par les viroïdes peut susciter une réponse spécifique de l'hôte (certains gènes étant affectés à la fois par une infection par le TMV et le PSTVd tandis que d'autres ne sont différentiellement exprimés que lors d'une infection par le PSTVd). Ceci amène deux hypothèses: soit l'expression différentielle de ces gènes est une cause du développement des symptômes, soit il s'agit d'une conséquence de leur apparition (Itaya *et al.*, 2002).

Il reste cependant à élucider comment les viroïdes sont en mesure de modifier l'expression des gènes des plantes hôtes. Différents mécanismes sont envisageables: (1) interférence avec l'exportation des ARNm hors du noyau, (2) action au niveau de l'épissage des ARNm, (3) extinction de certains gènes via le RNA *silencing* et (4) activation de protéines kinase phosphorylant des protéines de l'hôte.

Il semble en effet que la phosphorylation de certaines protéines joue un rôle important dans la pathogénicité des viroïdes (Hammond *et al.*, 2000). Ainsi, lorsque des plants de tomates sont infectés par le CEVd, on remarque une modification du pattern de phosphorylation des protéines des feuilles. De telles observations ont également été faites lors d'infections par le PSTVd (Hammond *et al.*, 2000). Ainsi, il semble que la transcription du gène *pkv* (codant pour une protéine kinase) soit stimulée par une infection par des variants sévères et intermédiaires du PSTVd mais moins lors d'une infection par un variant latent (Hammond *et al.*, 2000). De plus, l'analyse des propriétés de la protéine PKV indique qu'elle agirait dans le noyau (le lieu de réplication du PSTVd), que son activité ne serait pas régulée par une interaction directe avec le PSTVd et que cette protéine aurait également la capacité de s'auto-phosphoryler *in vitro* (Hammond *et al.*, 2000). La sur-expression d'une telle protéine induit donc probablement des perturbations dans la transduction des signaux extracellulaires. Enfin, le promoteur de PKV contient des éléments intervenant probablement dans l'activation de gènes régulant la biosynthèse de phénylpropanoïdes impliqués dans la réponse aux pathogènes. Ces mêmes éléments jouent également un rôle dans la

régulation de gènes suite à divers stimuli tels que les blessures, la présence de pathogènes, la lumière, etc. La signification biologique de ces éléments dans les promoteurs de PKV n'est cependant pas encore connue (Hammond *et al.*, 2000).

La séquence nucléotidique et la structure des viroïdes semblent également très importantes dans l'expression de la pathogénicité des viroïdes. Ainsi, une étude menée sur le PSTVd infectant des plants de tomates a montré qu'une substitution d'un seul nucléotide (U257A) dans la région centrale conservée (plus précisément dans la boucle E) conduisait à la transformation d'un variant de pathogénicité intermédiaire en un variant sévère létal (Yijun Qi *et al.*, 2003). Il s'agit ici d'une des premières mise en évidence du rôle de la CCR dans la pathogénicité (reconnue jusqu'alors pour ne jouer un rôle que dans la réplication des viroïdes). Cette mutation, maintenue au cours des cycles de réplication, semble ne pas influencer la structure du PSTVd, ni sa localisation dans la cellule, ni sa réplication.

Cependant, ces études structurales sont menées *in vitro* et nous ne savons pas, à l'heure actuelle, si ces structures sont maintenues tel quel *in vivo* (Yijun Qi *et al.*, 2003). Tout ceci semble néanmoins indiquer que la pathogénicité du PSTVd est une conséquence de son interaction avec différents facteurs cellulaires de l'hôte.

De plus la création de doubles mutants du PSTVd (U257A / C259U) a permis d'abolir l'effet dû à U257A. Ceci suggère que différentes mutations dans la CCR peuvent se compenser mutuellement (Yijun Qi *et al.*, 2003).

D'après cette même étude, les symptômes particuliers observés lors d'une infection par le variant muté sont dus à une diminution de la croissance des cellules des plantes infectées alors que leur division et leur différenciation ne semble pas affectée par ce viroïde (Yijun Qi *et al.*, 2003). Pour s'en assurer, l'étude de l'expression du gène LeExp2 (codant pour une expansine<sup>4</sup>) a été réalisée. Celle-ci a montré que ce gène est effectivement réprimé de façon importante chez les plantes infectées par le mutant U257A. Une seule mutation chez le viroïde serait donc responsable de la modification de l'expression d'un gène chez la plante hôte.

Un même domaine chez le viroïde peut donc jouer différents rôles (la CCR est impliquée dans la réplication et dans la pathogénicité et dans la spécificité d'hôte). De plus, ces fonctions semblent également hôte-spécifique: les mutations U257A et C259U n'induisent pas d'augmentation de la pathogénicité chez le tabac<sup>5</sup> mais augmentent de 5 à 10 fois le taux de transcription du viroïde (Yijun Qi *et al.*, 2003).

Le rôle de cette boucle E n'est pas sans rappeler le rôle de la boucle responsable de la

---

4 L'expansine joue un rôle important dans la croissance des cellules des organes grandissant rapidement.

5 Hôte alternatif du PSTVd

pathogénicité chez le CChMVd. De plus, ce type de boucle est fréquent dans les molécules d'ARN où elles jouent des rôles importants dans les interactions ARN-ARN et ARN-protéine. Différentes possibilités d'interactions de cette boucle semblent donc envisageables: (1) des sous-motifs de la boucle E pourraient jouer le rôle de médiateur dans des interactions avec différents facteurs de l'hôte et (2) différentes structures métastables pourraient être formées par des interactions entre la boucle E et d'autres régions du viroïde. Ces interactions interviendraient ensuite spécifiquement avec différents facteurs de l'hôte et seraient responsables de l'apparition des symptômes (Yijun Qi *et al.*, 2003).

Il est cependant encore difficile de relier l'apparition des symptômes lors d'une infection à la modification de l'expression de certains gènes. En effet, l'étude des processus cellulaires altérés servant de lien entre la modification de l'expression des gènes et l'apparition des symptômes chez une plante infectée est encore peu documentée.

L'étude menée par Yijun Qi (2003) présente néanmoins un exemple concret où des symptômes induits par un pathogène peuvent être mis en relation avec la perturbation d'un processus cellulaire spécifique qui peut elle-même être corrélée positivement avec la répression de l'expression d'un gène explicitement impliqué dans ledit processus. D'autres études devraient permettre de mieux comprendre la relation hôte-pathogène en essayant de déterminer les gènes régulant l'expression de LeExp2 ainsi que les cibles primaires du PSTVd mutant.

Au cours de ces dernières années, il a été possible d'identifier quelques protéines pouvant entrer en interaction avec le PSTVd. Ainsi, la protéine VIRP1 semble pouvoir se lier au PSTVd bien qu'elle soit légèrement réprimée lors d'une infection par ce viroïde (Martinez de Alba, 2003). La présence d'un bromo-domaine dans cette protéine est des plus intéressante. Il s'agit en fait d'un domaine très conservé de 110 acides aminés pouvant adopter différents arrangements structuraux et présent dans de nombreuses cellules eucaryotes. La complexité des protéines contenant ce domaine est un indicateur de leurs rôles multiples. Cependant, un rôle commun à toutes ces protéines semble émerger: le bromo-domaine serait un marqueur de localisation nucléaire des protéines correspondantes et en particulier au niveau de la chromatine dynamique (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

Ces protéines semblent également jouer un rôle important dans le développement. De plus, il est possible qu'elles agissent dans l'initiation et le maintien de marques épigénétiques (en agissant sur la structure de la chromatine), résultant en un état transcriptionnel particulier durant le développement, indépendant de la fonction spécifique des gènes régulés. Ceci pourrait expliquer les importants niveaux d'expression de ces protéines (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

Comme les symptômes dus aux viroïdes correspondent à des désordres développementaux, il est

possible que leur interaction avec VIRP1 soit impliquée dans l'apparition des symptômes. Cette interaction pourrait causer quelques, voire la totalité des symptômes pléiotropiques qui caractérisent l'infection viroïdale. Dans ce contexte, il est également intéressant d'avoir pu établir que le PSTVd puisse interagir avec les histones (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

Ensuite, VIRP1 est la première protéine dont le bromo-domaine est associé à un domaine de fixation de l'ARN. Au vu de l'importance de la méthylation médiée par l'ARN comme mécanisme de régulation et de défense chez les végétaux, ce type de protéine acquiert une importance particulière. Puisque le PSTVd est capable d'induire une méthylation de novo de l'ADN, il paraît concevable que VIRP1 puisse jouer un rôle en interagissant avec la machinerie de méthylation de façon à induire un phénomène de spécificité de séquence (Martinez de Alba *et al.*, 2003). Dans ce cas, toute séquence ADN de l'hôte présentant une homologie (de séquence) avec une ou plusieurs régions du viroïde se verrait méthylée. Ceci pourrait donc également jouer un rôle dans la pathogénicité du PSTVd (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

Enfin, on ne peut exclure la possibilité d'intervention de VIRP1 dans le cycle de réplication du PSTVd. Cette protéine semble en effet être un candidat idéal pouvant potentiellement intervenir dans différentes étapes du cycle de réplication et de pathogénicité telles que le transport du viroïde hors ou vers le noyau, la présentation du viroïde au complexe de transcription de la RNA polymérase II ou encore la transmission du signal de méthylation et le déplacement du viroïde à courte et à longue distance (Martinez de Alba *et al.*, 2003).

La pathogénicité des *Pospiviroidae* est beaucoup mieux appréhendée du fait de leur localisation nucléaire. En effet, la localisation chloroplastique des *Avsunviroidae* rend leur étude plus délicate étant donné les difficultés d'isolement des chloroplastes et d'extraction de leurs protéines (Perreault J.P., communication personnelle).

## **1.8 Déplacement dans la plante.**

Contrairement aux virus, les viroïdes ne codent pour aucune protéine de mouvement. Ils doivent donc faire appel à une autre stratégie pour se déplacer.

Les mouvements à courte distance semblent se faire via les plasmodesmes avec l'intervention de séquence et de structures spécifiques, non caractérisées à l'heure actuelle, contenues dans les viroïdes (Flores *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2003). Les mouvements à longue distance semblent par contre se faire par l'intermédiaire du phloème. Cependant, en raison de la répartition non uniforme de certains viroïdes dans les plantes (notamment le PSTVd), il semble que leur déplacement soit sous la dépendance de multiples facteurs inconnus à l'heure actuelle. De plus, la question du déplacement *Avsunviroidae* reste posée en raison de l'absence de chloroplastes dans le phloème

(Ding *et al.*, 2003). Malgré ce fait, des tests d'inoculation ont montré que la répartition du PLMVd est uniforme chez le pêcher.

## **1.9 Méthodes de lutte contre les viroïdes.**

Différentes méthodes existent pour lutter contre les viroïdes. Leur efficacité reste cependant relative.

### **1.9.1 L'assainissement de plants.**

La culture de méristème couplée à la thermothérapie (2 mois à 38°C) s'est montrée efficace dans la lutte contre le PLMVd (tous les plants régénérés se sont avérés sains) mais pas contre le PSTVd. Par contre la thérapie par le froid semble efficace contre le PSTVd, le CChMVd et le CSVd (Singh *et al.*, 2003). Enfin, certains viroïdes comme le *Hop latent viroid* peuvent être éliminés par simple culture de méristèmes sans passage préalable par la thermothérapie (Singh *et al.*, 2003).

### **1.9.2 La protection croisée.**

Cette méthode connue depuis longtemps pour la protection contre les virus consiste à infecter une plante par un variant latent afin de la protéger contre les variants sévères (Flores *et al.*, 2001). L'atténuation des symptômes est cependant incertaine dans le temps en raison de l'importance des mutations survenant lors de la réplication des viroïdes. Enfin, il ne faut pas oublier que le mécanisme de protection n'est pas encore élucidé. Deux phénomènes peuvent en effet expliquer cette protection. Le premier serait un phénomène de compétition entre le variant asymptomatique et le variant symptomatique (De la Penã *et al.*, 2002). Le second serait la conséquence de l'intervention du *gene silencing* (ou d'un autre mécanisme de défense inconnu à l'heure actuelle): le variant asymptomatique serait dégradé en siRNA lors de l'inoculation. Ces derniers seraient alors en mesure de dégrader le variant symptomatique lors d'une infection ultérieure (Flores *et al.*, 2006). Cependant, comme nous le verrons plus tard, ce mécanisme est peut-être impliqué dans l'expression de la pathogénicité des viroïdes. Il convient donc d'être prudent dans l'utilisation de cette technique et de se rappeler son instabilité.

### **1.9.3 Les méthodes utilisant le génie génétique.**

Etant donné le peu de connaissances que nous avons à l'heure actuelle en ce qui concerne les mécanismes de résistance des plantes aux viroïdes, la création de plantes résistantes s'avère relativement compliquée. Cependant, certaines pistes semblent se dégager.

Ainsi, des plantules produisant un ARN antisens visant l'ARN de polarité négative du CEVd ont permis de limiter l'accumulation du pathogène. Par contre, les plantules produisant de l'ARN visant l'ARN de polarité positive du CEVd ont renforcé l'action du viroïde (Singh *et al.*, 2003).

Un second mécanisme mérite d'être exploité: il s'agit du *gene silencing* et en particulier du *Posttranscriptionnal gene silencing*. Ce mécanisme est responsable de la protection naturelle des plantes vis-à-vis de virus et de viroïdes en les dégradant en petits fragments d'ARN, appelés siRNA, d'une vingtaine de nucléotides de long et complémentaire du génome viroïdal (Conejero, 2003). Il faut de plus noter que de tels fragments ont été détectés chez des plantes infectées par le PLMVd, le CChMVd et le PSTVd mais jamais chez des plantes saines. Au vu de son importance tant dans le développement que dans la protection du génome, un chapitre sera consacré à l'étude du *gene silencing*.

## **1.10 Le viroïde de la mosaïque latente du pêcher.**

La taille de ce viroïde est comprise entre 337 et 351 nucléotides suivant les souches. Il s'agit d'un membre de la famille des *Avsunviroidae* du genre des *Pelamoviroides*. Ce viroïde est l'agent responsable de la mosaïque latente du pêcher (Ambros *et al.*, 1998; Malfitano *et al.*, 2003). L'importance économique de cette maladie provient principalement de la perte de qualité des fruits, de la diminution de la longévité des arbres et de leur sensibilité accrue aux pathogènes ainsi qu'aux stress abiotiques (Flores *et al.*, 2006).

### **1.10.1 Gamme d'hôte.**

Le PLMVd est connu pour infester naturellement les plants de pêchers mais il est également possible de le transmettre par greffe à d'autres hybrides tels que l'amandier x pêcher et amandier x prunier. Cependant, les essais de transmission à d'autres espèces de *prunus* se sont avérées infructueuses (Flores *et al.*, 2003). Par contre, ce viroïde a aussi été détecté sur poirier, cerisier, abricotier, nectarine et prunier (Flores *et al.*, 2003), ainsi que sur amandier (Fekih Hassen, 2006).

### **1.10.2 Symptômes.**

La maladie est souvent latente en verger: la plupart du temps, aucun symptôme foliaire n'est observé (Flores *et al.*, 2006). De plus, même s'ils apparaissent, les symptômes foliaires disparaissent fréquemment avec le temps (Flores *et al.*, 2006). Lorsque des symptômes apparaissent, ceux-ci consistent en des stries roses sur les pétales des fleurs (Figure 5) ainsi qu'en la présence d'une suture liégeuse sur les fruits (Figure 6). Il faut également noter la plus forte propension des noyaux, plus aplatis, à éclater. Les pêches peuvent également être aplaties, ternes, décolorées et moins savoureuses. Des cannelures peuvent également apparaître sur le tronc, les bourgeons sont nécrosés et une moindre vigueur est généralement observée durant les quatre premières années (Ambros *et al.*, 1998; flores *et al.*, 2003). A noter également un retard de croissance de 4 à 6 jours (Flores *et al.*, 2006).

Cinq ans après la plantation de matériel infecté, les arbres vieillissent prématurément (Figure 7), la production chute tant en quantité qu'en qualité, les plants deviennent également plus sensibles aux maladies et aux aléas climatiques (Flores *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006)

Les plants de pêcher GF-305 sont généralement utilisés lors des expérimentations en serre car ils sont très sensibles au PLMVd. Cette variété, considérée comme plante indicatrice pour les tests d'incidence biologique (Llacer, 1998), porte des symptômes caractéristiques lors d'infections par le PLMVd.

Ainsi, en présence de variants non latents, des marbrures jaunâtre, une mosaïque diffuse, des taches chlorotiques floues ou des plages jaunes vif ou crème (calico) apparaissent. Les variants les plus sévères peuvent quant à eux provoquer une chlorose complète des feuilles qui peuvent également se recourber et se nécroser (figure 8).

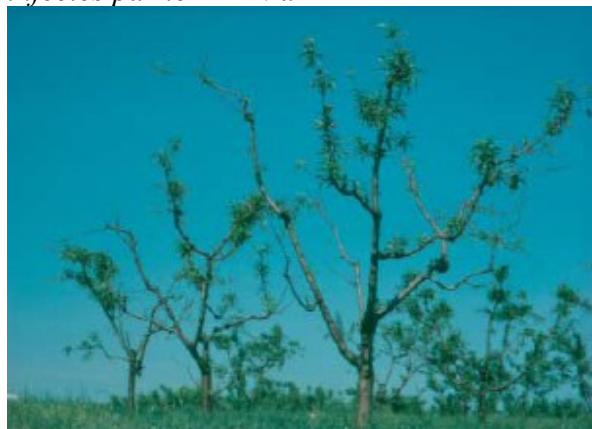
*Figure 5: Stries roses sur pétales de fleurs d'un pêcher infecté*



*Figure 6: Suture liégeuse sur fruit suite à une infection par le PLMVd*



*Figure 7: Dépérissement de plants de pêcher infectés par le PLMVd*



*Figure 8: Gamme de symptômes sur cultivar GF-305. (1-3) taches chlorotiques floues et mosaïques, (4) taches chlorotiques de couleur crème et (5) déformations et nécroses marginales*



### **1.10.3 Distribution géographique.**

Le viroïde de la mosaïque latente du pêcher est présente aux Etats-Unis, en Amérique du Sud, au Japon, en Chine, dans le bassin méditerranéen et en Australie (Flores *et al.*, 2003). Les échanges de matériel infecté sont considérés comme les principaux facteurs d'extension géographique du PLMVd (Flores *et al.*, 2003).

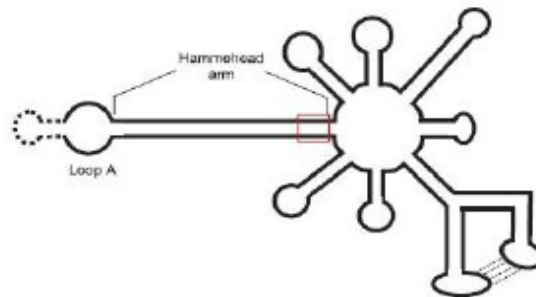
### **1.10.4 Réplication du Peach latent mosaic viroid.**

Comme tous les *Avsunviroidae*, le PLMVd se réplique suivant le modèle symétrique. Le PLMVd se rencontre essentiellement sous forme de monomères linéaires de polarité positive ou négative (le ratio de ces formes étant de 1:1) ce qui montre la grande efficacité des ribozymes (des deux polarités) du PLMVd (Flores *et al.*, 2006).

Les tentatives de localisation de l'origine de réplication du PLMVd réalisées par Delgado et Flores indiquent que ce point d'initiation serait situé à la base des séquences ribozymes en tête de marteau, au niveau d'une région bicaténaire de 6 à 7 paires de bases et comprenant le motif conservé GUC précédant le site d'autoclivage (Figure 9) (Delgado *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). Cette région contiendrait également les promoteurs qui seuls ou par l'intermédiaire de facteurs de transcription non encore connus mobiliseraient la polymérase responsable de la réplication. Bien que deux polymérases différentes coexistent dans les chloroplastes (la NEP et la PEP), des données récentes ont montré que l'accumulation et la synthèse du PLMVd est très active dans des feuilles montrant une symptomatologie de *peach calico*. Or dans ces feuilles, le développement des protoplastes en chloroplastes ainsi que le processing de certains précurseurs d'ARNr (et donc la synthèse de protéines) sont perturbés (Delgado *et al.*, 2005; flores *et al.*, 2006). Il semblerait donc que la réplication du PLMVd soit dans ce cas, maintenue grâce à la présence de la NEP ou d'une polymérase de la même classe. De plus, la NEP semble beaucoup plus flexible et capable d'endosser ce rôle de synthèse étant donné qu'il a été démontré qu'elle est en mesure de transcrire des gènes plastidiques dans du tabac transgénique déficient en PEP (Delgado *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). Enfin, il est également intéressant de signaler que cet emplacement du site d'initiation de la transcription implique que les structures ribozyme simple brin naissant sont synthétisées avant celles provoquant le clivage des multimères en monomères (Delgado *et al.*, 2005).



Figure 9: Sites d'initiation de la transcription et emplacement des régions ribozymes



### 1.10.5 Transmission.

Le PLMVd est facilement transmissible par blessure mécanique. Ainsi, dans un verger, la taille est le facteur principal de dispersion de ce pathogène. La transmission par la graine et le pollen semble inexistante. Enfin, le PLMVd peut être transmis à un très faible taux par *Myzus persicae* (Flores *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006).

### 1.10.6 Méthodes de détection.

- Les méthodes biologiques.

Les méthodes biologiques ont été mises au point avant la caractérisation et l'identification du PLMVd comme un viroïde. Ces méthodes sont basées sur la protection croisée et mises en oeuvre sur la variété de pêcher indicatrice GF-305 (pour sa grande sensibilité) saine et cultivée en serre. Ces plants de pêchers sont d'abord infectés par *chip budding* avec du matériel provenant des arbres à tester. Environ deux mois plus tard, ils sont ré-inoculés avec des variants sévères du PLMVd. Si les plants ont été infectés lors de la première inoculation, ils ne développeront pas les symptômes caractéristiques de la souche sévère suite à la compétition existant entre les deux souches (Flores *et al.*, 2003).

- Les méthodes moléculaires.

Ces méthodes permettent une détection fiable et rapide des agents pathogènes et en particulier du viroïde de la mosaïque latente du pêcher. De plus, contrairement aux méthodes biologiques, elles permettent de manipuler simultanément un grand nombre d'échantillons à moindre coût.

Différentes méthodes existent pour détecter le PLMVd et ont déjà été documentées dans un autre travail (Parisi, 2006). Nous rappellerons simplement ici la méthode de détection par RT-PCR.

La RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*) utilise le principe d'amplification de séquences cibles d'acides nucléiques propre à la PCR mais ici le matériel de départ à amplifier est constitué d'ARN. Cet ARN cible doit donc être rétrotranscrit sous forme

d'ADN complémentaire simple brin, étape réalisée par une transcriptase inverse.

Plusieurs protocoles de détection du viroïde par la RT-PCR ont été mis au point (Hadidi *et al.*, 2003). Parmi ces protocoles, Fekih Hassen *et al.*, (2006) ont développé un test RT-PCR en une seule étape à partir de jus brut sans passage par une fastidieuse étape d'extraction et de purification de l'ARN total.

#### **1.10.7 Méthodes de lutte contre le viroïde de la mosaïque latente du pêcher.**

Comme pour les virus, il n'existe pas de méthode de lutte chimique contre ce viroïde. La seule façon de limiter l'infestation des vergers est d'utiliser un matériel végétal exempt de viroïde et de bien désinfecter les outils de taille. La prévention est donc très importante dans la gestion de cette maladie (Flores *et al.*, 2003).

La seule méthode en cas d'infestation reste l'assainissement par culture de méristèmes ou par thérapie pendant 35 à 45 jours à 37°C (Flores *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2003).

La stratégie de lutte la plus efficace serait l'identification de variétés résistantes. Malheureusement, peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature. On sait cependant que le viroïde induit, chez les plantes infectées, un phénomène de *PostTranscriptional Gene Silencing* (PTGS) se traduisant par l'apparition de petits fragments d'ARN de 21 à 25 nucléotides complémentaires du génome viroïdal. Ces fragments d'ARN proviendraient de la dégradation du viroïde par la plante. Ce sujet sera traité ultérieurement dans ce travail.

Une autre alternative à l'idée de variétés résistantes serait la création de plants résistants par transgénèse. Deux stratégies différentes sont potentiellement envisageables: (1) le renforcement du phénomène de *gene silencing* par production d'un ARN antisens à l'un des brins du PLMVd (formant un complexe stable avec le PLMVd) ou (2) l'utilisation de ribozyme en trans. La molécule de PLMVd contient en effet deux sites d'auto-clivage exploités par ses propres ribozymes durant la réplication. L'objectif serait alors de diriger un ribozyme vers un de ces sites afin de provoquer un clivage du viroïde en « trans » en dehors de la réplication (le clivage est dit en « trans » car c'est un ribozyme externe au PLMVd qui clivera ce dernier). Cependant, cette approche semble délicate à bien des égards étant donné la conformation et la localisation chloroplastique du viroïde.



*vivo* par le PLMVd. De plus, une caractéristique partagée à la fois par le PLMVd et le CChMVd renforce l'existence de cette structure particulière. Il s'agit des interactions en pseudo-noeuds entre les deux épingles à cheveux P7-P8 et entre les boucles L1-L11 (cf Figure 10). Chez le CChMVd, ce type de structure facilite le repliement du brin de polarité positive. Il n'est donc pas exclu qu'elle joue un rôle (peut-être vital) chez le PLMVd (Gago *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). Ainsi, l'interaction entre L1 et L11 pourrait protéger le site d'initiation de la transcription et rendre les séquences ribozymes peu accessibles. De plus la conservation d'une structure commune entre deux viroïdes ne possédant que peu de similitudes suggère que l'augmentation de stabilité apportée à la molécule viroïdale est nécessaire aux viroïdes possédant une structure secondaire complexe (Gago *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006).

Comme il a déjà été décrit (Fekih Hassen *et al.*, 2007), le viroïde de la mosaïque latente du pêcher présente une forte variabilité nucléotidique (41% de la molécule possède des positions polymorphes). La molécule peut d'ailleurs être divisée en deux régions correspondant d'une part à une région de forte variabilité nucléotidique mais de structure conservée (correspondant aux tige-boucles P1-P5-P6-P7-P8-P9-P10-P11; P5 et P8 sont cependant moins variables) et d'autre part en une région de faible variabilité nucléotidique mais de forte variabilité structurale (correspondant aux tige-boucles P2-P3-P4) (Fekih Hassen *et al.*, 2007). Malgré cela, l'hétérogénéité de la séquence du viroïde est limitée par la nécessité de conserver les séquences ribozymes et la structure secondaire: entendons par là notamment la conservation de la structure branchée et la formation éventuelle de pseudo-noeuds (Ambros *et al.*, 1998; Bussière *et al.*, 2000; Pelchat *et al.*, 2000). De plus, la présence d'une région de structure conservée dans la molécule pourrait être le signe d'une nécessité biologique pour le PLMVd: cette région pourrait en effet être impliquée dans la réplication par le biais des ribozymes en tête de marteau, dans l'interaction entre le PLMVd et des facteurs cellulaires de l'hôte telles que des protéines de mouvement (Ambros *et al.*, 1998; Fekih Hassen *et al.*, 2007). La région de forte variabilité structurale pourrait, quant à elle, être impliquée dans des fonctions non vitales pour le PLMVd telle que la pathogénicité (Fekih Hassen, 2007). Il faut cependant rester prudent: la structure secondaire du PLMVd est prédite par ordinateur à partir d'expérimentation *in vitro*. Rien ne permet de démontrer, à l'heure actuelle, que cette structure est adoptée *in vivo*. Cependant, de plus en plus de données tendent à indiquer que c'est bien le cas. Il s'agit notamment de l'étude des covariations nucléotidiques en relation avec la structure secondaire, de l'existence d'une interaction en pseudo-noeud entre deux épingles à cheveux P7 et P8 de la structure. Enfin, l'étude comparative des structures du PLMVd et du CChMVd montre des similitudes, dont l'interaction en pseudo-noeud (Flores *et al.*, 2006). L'étude menée par Ambros (sur 29 séquences de PLMVd provenant d'un isolat sévère et de deux isolats latents) a de plus montré que le viroïde se

propage dans son hôte sous forme d'une population de variants similaires mais non identiques du point de vue moléculaire. Il a également montré que la descendance d'un variant choisi au sein d'un isolat sévère pouvait donner une infection latente lorsqu'il est inoculé (sous forme d'ADNc sur une plante indicatrice). Ceci conforte l'importance des structures primaire et secondaire sur la pathogénicité (Ambros *et al.*, 1998).

La taille des variants peut être mise en relation avec les symptômes observés sur les plantes indicatrices. Ainsi, les isolats latents et les isolats sévères provoquant une mosaïque se composent de variants dont la taille est comprise entre 335 et 342 nucléotides, les isolats provoquant des symptômes de calico sont quant à eux composés de variants comportant une insertion nucléotidique d'environ 10 nucléotides supplémentaires (Malfitano *et al.*, 2003). Ce type de symptômes n'est en effet observé qu'en présence de variant possédant cette insertion. De plus, l'élimination de cette boucle chez les mêmes variants les rend asymptomatique. Il s'agit donc de la première démonstration de l'existence d'une relation entre la structure primaire ou secondaire et la fonction chez le PLMVd.

## **2 La recombinaison: mécanisme d'évolution chez les virus et les viroïdes.**

Depuis quelques années seulement la recombinaison est fort étudiée chez les virus. En effet, on pensait jusqu'alors que les mutations étaient le moteur principal de l'évolution des virus. Ces études ont cependant permis de montrer que la recombinaison est une source de variabilité et d'évolution très importante chez ces agents pathogènes. Ce phénomène est également beaucoup plus fréquent que l'on ne le pensait auparavant (Bousalem *et al.*, 2000). En effet, à l'origine, on pensait que les événements de recombinaison étaient rares et ils étaient de ce fait peu observés dans les populations naturelles (Bousalem *et al.*, 2000). Cependant, avec le séquençage de nombreux virus et la disponibilité d'un nombre de séquences toujours croissant, il est vite apparu que les événements de recombinaisons étaient (i) beaucoup plus fréquents que ce qu'on l'avait estimé et (ii) beaucoup plus porteurs d'évolutions (Froissart *et al.*, 2005). De plus, l'équipe de Froissart (2005) a montré que la proportion de recombinants de CaMV observés (dans une même plante) lors de co-inoculations dépasse 50%.

Il est aujourd'hui très clair que l'évolution des différentes familles virales est due à différents facteurs tels que les mutations, les recombinaisons, l'érosion génétique, les goulots d'étranglement des populations causés par des vecteurs, les plantes-hôtes et les pratiques agricoles (Bonnet *et al.*, 2005; Garcia-Andrés *et al.*, 2006). Il s'est vite avéré que l'étude des recombinaisons pouvait mener à une bien meilleure compréhension de l'évolution des grandes familles virales mais cela devrait

également permettre d'expliquer ou en tout cas de mieux comprendre les relations hôte-pathogène qui existent entre les virus et les végétaux (Garcia-Andrès *et al.*, 2006).

De plus, il semble de plus en plus clair que mieux connaître les populations virales tant au niveau de leur biologie, de leur génétique que leurs mécanismes d'évolution permettra à l'avenir, de mieux protéger les cultures face aux phytovirus (Garcia-Andrès *et al.*, 2006).

Ainsi, ces études ont notamment montré que des recombinaisons ont probablement mené à l'apparition de graves épidémies dues au virus de la mosaïque du manioc (YMV) (Bousalem *et al.*, 2000). En effet, les virus recombinants peuvent posséder une pathogénicité accrue et/ou une meilleure fitness en fonction des parents de cette recombinaison. Ceci augmente les inconnues en ce qui concerne l'évolution des populations virales tant de façon spatiale et temporelle qu'au point de vue de l'importance des épidémies qu'elles produiront (Garcia-Andrès *et al.*, 2006).

Bien que le rôle des mutations dans le processus d'évolution ait été décrit en détail pour les virus possédant un génome ARN, celui des recombinaisons l'a été nettement moins avant les années 2000. Pourtant, il est probable que le taux de recombinaison des virus ARN soit très élevé (Bonnet *et al.*, 2004). Comme pour les virus à ADN, les événements de recombinaisons sont nombreux chez les virus à ARN (Bonnet *et al.*, 2004). Ils peuvent ainsi affecter la pathogénicité, la capacité de multiplication, modifier la gamme d'hôtes des recombinants posant ainsi de gros problèmes de protection des cultures (Bonnet *et al.*, 2004).

Les mutations sont un des mécanismes importants dans l'apparition de diversité chez les viroïdes. Différentes études ont d'ailleurs montré que ces dernières pouvaient avoir des effets très importants sur la pathogénicité des viroïdes. Ainsi, il n'est pas rare qu'une seule mutation puisse induire le passage d'un variant latent à un variant sévère ou inversement.

Les phénomènes de recombinaison ont également été mis en évidence chez les viroïdes et notamment chez le PSTVd, le Cvd, le CLVd et le HSVd. Comme pour les virus, ces recombinaisons contribuent à augmenter la diversité de séquence des viroïdes.

Ainsi, une étude menée sur le PSTVd par l'équipe de Podstolski en 2005 a montré que la co-inoculation de variants latents du PSTVd pouvait mener à leur recombinaison et à l'apparition de symptômes plus ou moins importants. De plus, les variants inoculés au départ n'ont pas été retrouvés lors du séquençage de leur descendance. Ceci permet de supposer que les variants recombinants détectés étaient en mesure de se répliquer beaucoup plus rapidement mais également de se déplacer de cellules en cellules ce qui ne semblait pas être le cas des viroïdes inoculés au départ (Podstolski *et al.*, 2005). Cependant, il faut toutefois garder à l'esprit que la recombinaison n'est pas la seule à avoir agi dans ce cas. Ainsi, plusieurs mutations ont également été observées pouvant peut-être jouer un rôle dans l'expression de la pathogénicité. Cette expérience nous a

montré que la recombinaison pouvait en quelque sorte être un mécanisme de « sauvetage » (Podstolski *et al.*, 2005). En effet, la co-inoculation de variants a priori incapables de se déplacer sur de longues distances et de se répliquer efficacement a mené à leur recombinaison et à l'apparition de variants infectieux (Podstolski *et al.*, 2005).

Différents événements de recombinaisons sont très certainement à l'origine du *Columnnea latent viroid* (CLVd). Ce viroïde présente en effet une grande homologie de séquence avec le PSTVd mais possède une région centrale conservée similaire au *Hop stunt latent viroid* (HSVd). D'après Hammond (1989) ce viroïde proviendrait de recombinaisons inter-spécifiques entre le HSVd et le PSTVd. Des études de la gamme d'hôtes de ce viroïde ont de plus montré qu'il était en mesure d'infecter à la fois des hôtes spécifiques du HSVd et du PSTVd (Hammond *et al.*, 1989). Le CLVd semble donc posséder des caractéristiques de ces deux viroïdes. A notre connaissance, d'autres rapports de recombinaisons inter-spécifiques chez les viroïdes n'ont pas été publiés. Il est cependant fort peu probable qu'une évolution convergente du CLVd ait pu mener à l'apparition d'un viroïde possédant autant de similarités de séquences avec deux viroïdes indépendants (Hammond *et al.*, 1989).

La recombinaison apparaît donc ici comme un mécanisme d'évolution relativement efficace. En se recombinant, ces deux viroïdes ont en effet agrandi leur gamme d'hôte d'une façon non négligeable. Ce type de recombinaison (dont on ne connaît pas la fréquence chez les viroïdes) pourrait être très dommageable pour l'agriculture suite à l'apparition de variants avec un pouvoir pathogène et un spectre d'hôte différent.

### **3 Étude de l'expression différentielle.**

#### **3.1 La cDNA-AFLP.**

A l'origine, les techniques d'étude de l'expression différentielle des gènes, comme le Northern blot, ne permettaient l'étude que d'un nombre très limité de gènes. Depuis un peu plus de quinze ans, le nombre de gènes pouvant être simultanément étudiés a considérablement augmenté avec les développements successifs des techniques dites à haut débit. Il est ainsi possible, à l'heure actuelle, d'évaluer simultanément l'expression de presque tous les gènes d'un organisme (Lorkowski et Cullen, 2004).

Une technique d'analyse des gènes différentiellement exprimés doit idéalement répondre à plusieurs critères (Bachem *et al.*, 1998): (i) visualisation de la plupart des ARN messager transcrits dans la cellule, (ii) reproductibilité élevée, (iii) comparaison possible entre ARNm de différentes sources, (iv) facilité et rapidité de mise en oeuvre et (v) identification et isolement aisé du gène correspondant à la bande différemment exprimée sur le gel.

La cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphisme a été mise au point par Bachem et al. (1996) pour analyser l'expression des ARNm (Massart, 2006).

### **3.2 Principe.**

Après rétrotranscription, l'ADNc double brin est digéré par un couple d'enzymes de restriction possédant un site reconnaissance de 4 paires de bases et de 6 paires de bases. Ensuite, des adaptateurs spécifiques des sites de restriction sont ligués au fragments digérés. Tous les ADNc digérés et ligués sont alors amplifiés par PCR grâce à un couple d'amorces s'hybridant aux adaptateurs. Cette étape, la pré-amplification, produit un très grand nombre de fragments différents qui ne peuvent pas être séparés sur un gel de polyacrylamide. Une seconde étape d'amplification, l'amplification sélective, est réalisée avec des amorces spécifiques. Ces amorces possèdent, outre la séquence de l'adaptateur, une, deux, ou trois bases supplémentaires en 3' qui permettent d'amplifier les fragments d'ADNc qui contiennent en 5' les nucléotides complémentaires. Dès lors, seuls un nombre limité de fragments est ainsi amplifié ce qui permet de les séparer sur un gel de polyacrylamide. La visualisation sur gel de polyacrylamide de tous les fragments d'ADNc préamplifiés est réalisée par l'amplification sélective avec toutes les combinaisons possibles de bases supplémentaires. Le marquage supplémentaire d'une des amorces permet de visualiser les fragments par autoradiographie.

### **3.3 Avantages.**

L'avantage le plus fréquemment cité est la reproductibilité de cette technique (Kuhn, 2001; Campalans *et al.*, 2001). Ceci provenant essentiellement de l'utilisation d'amorces spécifiques et de températures d'hybridation élevées (de 56°C à 63°C) lors des amplifications.

Grâce à l'utilisation de toutes les combinaisons possibles d'amorces spécifiques, cette technique systématique permet en principe d'amplifier l'ensemble des ADNc digérés (Donson *et al.*, 2002).

De plus, d'après Bachem *et al.* (1998), la cDNA-AFLP permet de détecter une seule copie d'ARNm par cellule. Par ailleurs, la très faible quantité d'ARN total nécessaire à la réalisation de cette technique est également un atout important.

Enfin, l'utilisation de cette technique ne nécessite pas de disposer de beaucoup d'informations sur le génome de l'organisme étudié (Teemu Kivioja *et al.*, 2005)

### **3.4 Inconvénients.**

Les efforts à fournir lors de la réalisation des nombreuses PCR, de l'isolement et du séquençage des fragments d'intérêt sont les principales faiblesses de cette technique (Breyne et Zabeau, 2001; Donson *et al.*, 2002). De même, l'apparition de faux positifs suite au co-isolement de séquences



d'une taille identique à celle du fragment d'intérêt, la faible taille des fragments obtenus et la possibilité d'obtention de plusieurs fragments amplifiés à partir d'un seul ARN messager initial complexifient l'analyse des résultats. Enfin, les ADNc ne possédant pas les sites de restriction des enzymes utilisées ne sont pas pris en compte par cette technique (Lokowski et Cullen, 2004).

### **3.5 Utilisation en phytopathologie.**

De nombreuses publications relatent l'utilisation de la cDNA-AFLP afin d'identifier des gènes différemment exprimés lors d'infections de végétaux par divers pathogènes tels que des champignons (Eckey *et al.*, 2005), des nématodes (Ling Qin *et al.*, 2000), des bactéries (Noel *et al.*, 2001) et des virus (Bret Cooper, 2001).

Ces études ont notamment permis de mettre en évidence des gènes intervenant dans les réactions d'hypersensibilité, des gènes codant pour des transporteurs, des transférases et des kinases (Bret Cooper, 2001). De plus, outre ces gènes caractérisés, la cDNA-AFLP permet également de mettre en évidence des gènes différentiellement exprimés qui n'ont encore jamais été caractérisés auparavant (Itaya *et al.*, 2002).

Cette technique permet donc d'explorer les mécanismes intervenant dans les relations hôte-pathogène. Cependant, de nouvelles voies d'utilisation de la technique se dessinent avec l'évolution des méthodes de lutttes contre les agents pathogènes.

Ainsi, cette technique a été utilisée pour caractériser les relations entre les pathogènes et les agents de contrôle biologique (Massart et Jijakli, 2006). Ces auteurs ont d'ailleurs utilisé cette technique afin de caractériser des gènes impliqués dans le bio-contrôle de *Botrytis cinerea* par la souche Kh5 de *Pichia anomala* (Massart et Jijakli, 2006). Ils ont ainsi pu caractériser onze fragments correspondant à des gènes surexprimés en présence de paroi cellulaire de *B. cinerea* et potentiellement impliqués, entre autre, dans la sécrétion d'enzyme et dans la réponse au stress.

### **3.6 Utilisation de l'expression différentielle chez les viroïdes.**

A notre connaissance, il n'existe que très peu d'études de l'expression différentielle de gènes chez les viroïdes. Ainsi, comme il a été expliqué au point 1.7 ce type d'étude a majoritairement été mené sur le PSTVd et a permis de mettre en évidence plusieurs gènes dont l'expression est modifiée lors d'une infection par un viroïde.

## **4 Le gene silencing.**

### **4.1 Introduction.**

Différents mécanismes sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes par l'ARN



## **4.2 Mécanisme de régulation de l'expression des gènes dans le cadre de la protection du génome.**

### **4.2.1 L'extinction post-transcriptionnelle de gènes.**

La première observation de PTGS a eu lieu au cours de transformations génétiques de pétunias. Par la suite, des expériences de transformation sur tomates et pommes de terre ont permis de démontrer que ce phénomène n'était pas propre au pétunias. D'autre part, ces expériences ont montré que ce type de régulation était accompagné d'une diminution de la quantité d'ARN messager du gène ciblé au cours du temps (Franche *et al.*, 2001; Wassenegger *et al.*, 1998).

#### **4.2.1.1 Caractéristiques générales.**

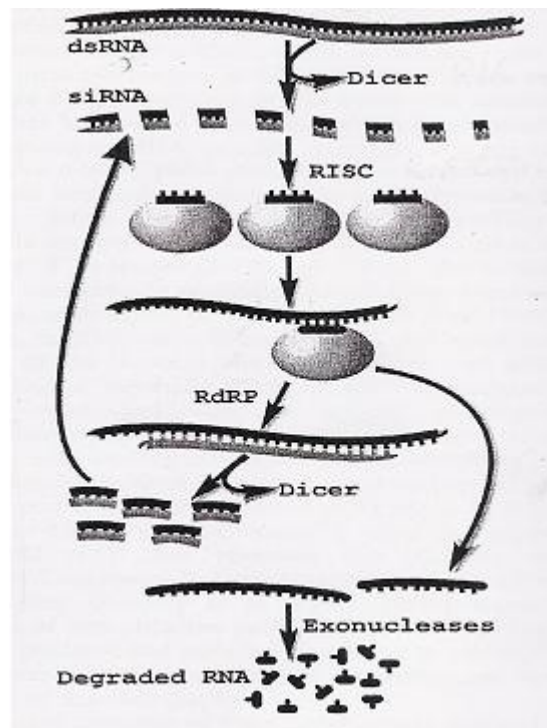
L'extinction post-transcriptionnelle de gènes est un phénomène cytoplasmique menant à la dégradation d'ARN messagers endogènes ou exogènes. Il ne s'agit pas d'un mécanisme de régulation de l'expression des gènes propre aux végétaux. Ce mécanisme a également été mis en évidence chez les animaux (où il est appelé interférence ARN) et chez les champignons (*quelling*) (Snehasis *et al.*, 2004; Wassenegger *et al.*, 1998). Il s'agit d'une réponse de la cellule à la présence de transposons ou de matériel génétique étranger tels que les virus, les viroïdes, les transgènes. Dans cette optique le PTGS peut être vu comme un mécanisme de défense de l'organisme (Snehasis *et al.*, 2004). Cependant, de plus en plus de faits nous amènent à penser que ce mécanisme est également impliqué dans la pathogénicité de ces mêmes virus et viroïdes (Wang *et al.*, 2004). Les virus, les viroïdes et les éléments transposables sont donc à la fois les initiateurs et les cibles du *post-transcriptional gene silencing*. Nous y reviendrons par la suite.

#### **4.2.1.2 Mécanisme d'action du PTGS.**

Lorsque de l'ARN double brin (ou de l'ARN reconnu comme étant exogène) est détecté dans la cellule, celui-ci est clivé par le Dicer, une ribonucléase appartenant à la famille des RNaseIII. Les fragments d'ARN générés par ce clivage, les siRNA, ont une taille de 21-25 nucléotides et sont bicaténaires. Une hélicase intervient alors afin de séparer les deux brins des siRNA initialement appariés. Ces derniers sont alors pris en charge séparément par un complexe multi-protéique appelé RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*). Le nouveau complexe ainsi formé (siRNA-RISC) est alors capable de repérer une séquence d'ARN cible possédant une région complémentaire au siRNA fixé sur le complexe protéique. Après cette fixation, deux voies sont envisageables. Soit la RNA dépendante RNA polymérase utilise le complexe fixé comme amorce et synthétise le brin complémentaire du brin cible et l'ARN bicaténaire formé est alors clivé par le Dicer, soit le brin cible est clivé en deux fragments au niveau du site d'hybridation du complexe et les fragments

résultants sont ensuite totalement dégradés par une exonucléase (Figure 12). Comme on peut s'en douter, la première voie permet d'amplifier le phénomène de *post-transcriptional gene silencing* par la production d'une plus grande quantité de siRNA. Les facteurs influençant l'emprunt de l'une ou de l'autre voie ne sont cependant pas encore connus (Chellappan *et al.*, 2004; Hily *et al.*, 2005; Snehasis *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2004; Wassenegger *et al.*, 1998).

*Figure 12: Schématisation du Post-transcriptional gene silencing. Le DsRNA (double stranded RNA) est clivé par le Dicer en siRNA (short interfering RNA) pris en charge par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Ce dernier reconnaît ou clive alors une séquence cible et sert d'amorce pour la RdRP (RNA dépendant RNA polymerase). L'ARN ds formé est alors clivé par le Dicer.*



L'ARN bicaténaire, impliqué dans le déclenchement du *silencing* peut avoir différentes origines. Il peut tout d'abord s'agir d'ARN aberrants (abRNA) monocaténaire servant de modèle à la RNA polymérase RNA dépendante qui en synthétise le brin complémentaire. Ces ARN aberrants correspondent à des ARN messagers auxquels il manque une caractéristique de mRNA. Différents processus peuvent mener à leur production: des erreurs de transcription, une vitesse de dégradation supérieure à la traduction, un processing défectueux voire une méthylation inopportune des

séquences d'ADN transcrites. Enfin l'ARN double brin peut également provenir d'intermédiaires de réplication de virus (à ADN ou ARN), de viroïdes (dans ce dernier cas il s'agit souvent de structures tiges-boucles) et de transgènes (Wassenegger *et al.*, 1998).

Deux classes de siRNA ont été mises au jour: les siRNA de petite taille (22 nucléotides) et les siRNA de grande taille (25-26 nucléotides). Il semblerait que les siRNA de petite taille proviennent de la dégradation de virus ou d'ARN messager et jouent un rôle local. A l'inverse, les siRNA de grande taille sont quant à eux associés à la méthylation de l'ADN et semblent jouer un rôle dans la propagation systémique du silencing comme nous le verrons par la suite (Hily *et al.*, 2005).

#### **4.2.1.3 La transmission du PTGS.**

Le PTGS est transmis de façon systémique dans toute la plante. Cependant, à l'heure actuelle, les facteurs de transmission du signal de *silencing* ne sont pas encore connus. On pense qu'il s'agit d'acides nucléiques mais aucune démonstration n'a encore été apportée (Snehasis *et al.*, 2004).

### **4.3 Stratégies d'utilisation du silencing.**

Les stratégies de protection des végétaux par l'intermédiaire du PTGS sont en pleine prospection. En effet, les mécanismes qui y sont liés commencent seulement à être connus et maîtrisés. Il est évident que les stratégies qui seront brièvement décrites dans les paragraphes suivants sont toujours à l'état expérimental. A notre connaissance, l'équipe de Singh (2003) est la seule à avoir produits des plants résistants au *Citrus exocortic viroid* (CEVd).

- Protection contre les viroïdes.

Le mécanisme de PTGS peut théoriquement être utilisé afin de protéger les plantes contre des viroïdes. Ceci est réalisé en transformant génétiquement des plantes afin que ces dernières produisent des fragments d'ARN correspondant à des fragments du viroïde. Plusieurs essais de telles protection ont été réalisés. Ainsi, dans le cas de la protection des citrus contre le *Citrus exocortic viroid*, des plants ont été transformés de façon à produire les brins de polarités positive ou négative correspondant à ce viroïde. Cependant, les résultats obtenus au terme de cette transformation furent surprenants: seuls les plants exprimant un ARN antisens ciblant l'ARN de polarité négative du CEVd se sont avérés résistants à ce viroïde. Par contre les plants produisant un ARN visant l'ARN de polarité positive du CEVd ont renforcé l'action du viroïde (Singh *et al.*, 2003).

La mise en place d'une telle technique de protection dans le cas des viroïdes semble ainsi plus complexe que pour les virus. En effet, bien que ne codant pour aucune protéine, les viroïdes possèdent généralement une structure secondaire plus importante et plus compacte que les virus. Leur localisation dans les cellules hôtes (les chloroplastes pour les *Avsunviroidae* et le noyau pour

les Pospiviroidae) est également un frein au développement du silencing qui est un phénomène essentiellement cytoplasmique.

De plus, une étude récente a montré que la pathogénicité des viroïdes est probablement le fait du *gene silencing* lui-même. Ce qui en d'autres termes signifie que la pathogénicité de certains viroïdes serait due à l'extinction post-transcriptionnelle de gènes de la plante infectée par l'intermédiaire de siRNA provenant de la dégradation du viroïde par le Dicer (Ming-Bo Wang *et al.*, 2004).

Il faut donc rester prudent lors du développement de telles méthodes de lutte car comme le suggère ce dernier exemple le *gene silencing* peut jouer des rôles bien différents lors d'une infection par un virus, un viroïde ou un ARN satellite. Ce mécanisme dégradera l'agent envahisseur dans tous les cas mais il pourra également jouer un rôle dans l'expression des symptômes (Wang *et al.*, 2004).

Une meilleure connaissance des relations hôte-pathogène s'impose donc si on veut pouvoir lutter efficacement contre ce type de pathogène par le biais de technologies nouvelles.

## **Objectifs.**

Les travaux réalisés par Fekih Hassen au sein de l'Unité de Pythopathologie ont mené à la formulation de deux hypothèses: tout d'abord l'existence de pseudo-noeuds potentiellement impliqués dans la pathogénicité et/ou la réplication du PLMVd et ensuite l'existence de phénomènes de recombinaison ayant mené à l'évolution de ce viroïde. Afin de vérifier ces hypothèses, la création d'une collection de dimères de variants de pathogénicité différente et de variants potentiellement impliqués dans des phénomènes de recombinaison s'avère indispensable. Il était également nécessaire de sélectionner deux types d'amorces: d'une part des amorces capables de muter ces pseudo-noeuds et d'autre part, des amorces capables de rendre la détection des recombinants possible.

Le second objectif de ce travail consistait à mettre au point la cDNA-AFLP sur des extraits d'ARN totaux de pêchers afin de pouvoir, à l'avenir, caractériser les relations hôte-pathogène s'établissant entre le PLMVd et les plants de pêchers infectés. Un modèle de comparaison pour l'étude de l'expression différentielle de gènes a également dû être sélectionné. Enfin, les extractions d'ARN des objets de la cDNA-AFLP ont été réalisées.

# Matériel et Méthodes.

## 1 Matériel biologique.

### 1.1 Matériel végétal.

- Sources des variants utilisés.

Le tableau(2) reprend les caractéristiques des plants à partir desquels les variants utilisés ont été isolés.

Tableau 2: Origine des variants utilisés

Variants	Région/Gouvernorat	Variétés
151.1.10.4	Nord/Morneg (Tunisie)	Alberta
124.4.2.1	Mehrine/Tebourba (Tunisie)	Early May Crest
88.1/88.3	Jdaïda Chouate(Tunisie)	Séville
240.4.1	Grimbelia	Royal glory
369.3.3.3	Nord Bizerte	Mygold
377.1.2	Bizerte	Red Top
210.1.2.4	Morneg/GOVPF	Carnival
Hd6/Hd8	Amérique du Nord	GF-305

Les variants Hd6 et Hd8 nous ont été fournis (sous forme de clone) dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Prof. J.P. Perreault de l'Université de Sherbrooke (Canada).

- Témoins positifs.

Des échantillons de feuilles et de rameaux pris sur des plantes indicatrices infectées par le PLMVd (4 isolats) nous ont été fournis par B. Pradier (Station de Quarantaine des Ligneux, Lempdes, France). Ce matériel a été originalement obtenu par greffage de matériel infecté sur des plantes indicatrices de pêchers.

Des extraits d'ARN totaux obtenus à partir de plants de pêchers infectés par le PLMVd, nous ont été fournis par le professeur Ricardo Flores de l'Université polytechnique de Valence (Espagne).

- Témoin négatif.

Il s'agit d'un plant sain de la variété GF-305, également fourni par le CRA-W de Gembloux.

### 1.2 Souche bactérienne.

La souche bactérienne INVαF' appartenant à *Escherichia coli* a été utilisée dans les réactions de



clonage.

### **1.3 Vecteur de clonage.**

Le vecteur utilisé dans les réactions de clonage est le pCR2.1 fournit avec le *TA cloning kit* (Invitrogen).

### **1.4 Clones de PLMVd.**

Les clones de PLMVd monomériques utilisés dans ce travail ont été obtenus par le Dr Fekih Hassen par isolement et clonage de variants à partir d'isolats de PLMVd provenant de pêcheurs tunisiens (Fekih Hassen *et al.*, 2007).

## **2 Méthodes.**

### **2.1 Préambule.**

Lorsque l'ARN est manipulé ou lorsque les manipulations ont mené à la production d'ARN, de la verrerie RNase free (chauffage à 210°C pendant une nuit) a été utilisée, les solutions aqueuses ont été traitées au DiéthylPyroCarbonate (DEPC) 0,1% et autoclavées. Tout le matériel ne supportant pas les hautes températures a été traité au sodium dodécyl sulfate (SDS) 1% durant une nuit.

### **2.2 Construction des dimères.**

#### **2.2.1 Purification de l'ADN plasmidique d'*E. coli* en utilisant le kit GeneJET<sup>TM</sup> plasmid Miniprep kit (Fermentas).**

La purification a été basée sur la lyse des cellules suivie d'une précipitation de l'ADN chromosomique et des protéines des bactéries. Différents lavages ont permis ensuite d'obtenir une grande quantité de plasmides purs. Dès lors, après mise en culture d'une colonie transformée à 37°C dans 3ml de milieu NZY liquide (pour 1 litre de milieu: 5g NaCl, 2g MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 5g Yeast extract, 10g NZ amine, pH 7) en présence de 100µg/ml d'ampicilline, la purification de l'ADN plasmidique a été réalisée en suivant le protocole du kit tel que décrit en annexe n° 1.1

#### **2.2.2 Amplification des inserts de plasmides recombinants.**

Des inserts de plasmides recombinants ont été amplifiés à l'aide de la Pfu DNA polymérase afin d'obtenir des bouts francs en utilisant le couple d'amorce hPLMVd/cPLMVd. De plus, cette polymérase possède une activité *proofreading* ce qui limite les erreurs d'amplification.

Le mélange réactionnel comprend: 0,2µM des amorces sens et anti-sens, du tampon Pfu 1X (Fermentas), 0,2mM de dNTP (Fermentas), 1,25 unité de Pfu DNA polymérase (Fermentas) et 10ng

de plasmide recombinant.

Le programme PCR comprend:

- une dénaturation pendant 5 min à 95°C,
- 35 cycles comportant chacun:
  - une phase de dénaturation à 95°C pendant 30s,
  - une phase d'hybridation des amorces à 60°C pendant 60s,
  - une phase d'élongation à 72°C pendant 60s,

une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7min.

### **2.2.3 Purification des produits PCR.**

Afin de récupérer l'ADN amplifié, les produits PCR ont été migrés sur gel d'agarose 1,2% et la bande PCR de la taille attendue a été purifiée à l'aide du *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN) en suivant le protocole fourni avec le kit (voir annexe 1.2).

### **2.2.4 Phosphorylation de l'ADN purifié.**

La phosphorylation de l'ADN purifié a été réalisée à l'aide de la *T4 polynucléotide kinase* (Fermentas). Cette réaction permet le transfert d'un groupe  $\gamma$ -phosphate de l'ATP au groupement 5'OH d'un oligonucléotide afin de permettre sa ligation à un autre oligonucléotide permettant ainsi l'obtention de multi-mères de PLMVd.

Le milieu réactionnel comprend: du tampon A 1X, 10 $\mu$ M d'ATP, 10 unités de T4 polynucléotide kinase et 1  $\mu$ g de produit PCR à bouts francs.

Le mélange est incubé 30 minutes à 37°C. La réaction est stoppée par ajout d'un microlitre d'EDTA 0,5M pH8. L'ADN phosphorylé a ensuite été purifié à l'aide du *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant (voir annexe 1.3).

### **2.2.5 Réaction de ligation.**

Cette étape a pour but d'obtenir des multimères d'ADN à partir des monomères phosphorylés et a été réalisée avec la *T4 DNA ligase* de Fermentas.

Le milieu réactionnel comprend: du tampon de ligation 1X, 5% de PEG 4000, 5 unités de T4 DNA ligase et 1 $\mu$ g d'ADN phosphorylé.

Le mélange réactionnel a été incubé 1 heure à 22°C. La T4 DNA ligase a ensuite été inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 minutes.

L'ADN a ensuite été extrait par un volume de phénol en centrifugeant 15 minutes à 13200rpm. Le

produit extrait a été précipité dans 2,5 volumes d'éthanol froid en présence de 10% d'acétate de sodium (3M pH 5,2) pendant 2 heures à -20°C. Une centrifugation de 15 minutes à 13200rpm a permis de récupérer le culot contenant l'ADN. Il a été lavé avec 400µl d'éthanol 70% et centrifugé pendant 20 minutes à 13200 rpm. Le culot a été séché à l'air libre jusqu'à ce qu'il prenne une coloration blanchâtre. Ensuite il a été resuspendu dans 10µl d'eau stérile.

### **2.2.6 Amplification du produit de ligation.**

Afin d'augmenter la quantité des produits de ligation multimériques et de pouvoir en séparer les dimères, une PCR a été réalisée en utilisant le kit *High Fidelity PCR Enzyme Mix* de Fermentas et les amorces cPLMVd et hPLMVd. Le mélange réactionnel suivant a été utilisé: 0,2µM des amorces sens et anti-sens, du tampon PCR 1X, 0,2mM de dNTPs, 1,75 unité du mélange d'enzyme High Fidelity (Taq DNA polymérase et Pfu DNA polymérase) et 100ng du produit de ligation.

Le cycle PCR est le même que celui utilisé pour l'amplification des inserts recombinants.

### **2.2.7 Purification des dimères.**

Après migration sur gel d'agarose, le produit PCR correspondant aux dimères (d'une taille de +/- 680 pb) a été purifié à l'aide du *QIAEX II Gel Extraction Kit* (QIAGEN) en suivant le protocole fourni avec le kit (voir annexe 1.2).

### **2.2.8 Clonage des dimères dans le vecteur pCR2.1.**

Le système du TA cloning (Invitrogen) a permis le clonage direct des produits PCR dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 sans digestion préalable par une enzyme de restriction. Le clonage a été réalisé en trois étapes : (1) la synthèse du produit de la PCR, (2) la ligation dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 et (3) la transformation des bactéries compétentes *E. coli* (Ultra Comp<sup>™</sup> INVαF', Invitrogen) avec le produit de ligation. Cette manipulation a été réalisée en suivant le protocole de la firme fourni en annexe 1.4.

### **2.2.9 Vérification de la présence du dimère.**

#### **2.2.9.1 Purification de l'ADN plasmidique d'*E. coli* en utilisant le kit *GeneJET<sup>™</sup> plasmid Miniprep kit* (Fermentas).**

En suivant le protocole cité en annexe 1.1

### 2.2.9.2 Digestion du plasmide par l'enzyme de restriction KpnI (Fermentas).

Cette réaction de digestion est réalisée pour sélectionner les plasmides recombinants qui ont inséré l'ADNc dimérique contenant deux monomères ayant le même sens et l'orientation appropriée pour la transcription *in vitro* du brin de polarité positive par la T7 RNA polymérase. En effet, le profil de restriction sera différent en fonction de l'orientation des monomères (formant le dimère) dans le plasmide. Toutefois, un séquençage doit être réalisé pour s'assurer de l'orientation globale du dimères.

#### Méthode.

Le mélange réactionnel suivant a été utilisé: 0,2 unité d'enzyme KpnI, du tampon KpnI 1X et 1µg de plasmide recombinant.

Le mélange a été incubé une nuit à 37°C. Le lendemain, l'enzyme a été inactivée par chauffage à 80°C pendant vingt minutes.

Le profil de digestion est ensuite visualisé par migration sur gel d'agarose 2%.

### 2.2.9.3 Séquençage des inserts dimériques.

La réaction de séquençage a été réalisée à l'aide du Big Dye Terminator de la firme Applied Biosystems.

Deux mix ont été réalisés pour chaque échantillon: un pour la réaction *forward* et un pour la réaction *reverse*.

Composants	Volumes/quantité
ADN à séquencer	50ng
Amorce M13 (Forward ou Reverse)	0,7µl
Big Dye Terminator	2µl
H <sub>2</sub> O	5,2µl

Le cycle réalisé pour la réaction de séquençage comprend:

- 25 cycles comportant chacun:
  - une phase à 96°C durant 10 secondes,
  - une phase à 50°C durant 5 secondes
- une phase à 60°C durant 4 minutes

Après l'amplification, 80µl de solution de précipitation froide (3µl d'acétate de sodium 3M pH 4,6, 62,5µl d'éthanol 96% et 14,5µl d'eau distillée stérile) a été ajouté. Le mélange a été centrifugé durant 30 minutes à 3000g à 4°C. Ensuite, le surnageant a été éliminé et le culot lavé avec 150µl d'éthanol à 70% en pipettant légèrement. Après centrifugation et élimination de l'éthanol les

échantillons sont séchés à température ambiante.

## **2.3 La cDNA-AFLP.**

### ***2.3.1 Extraction d'ARN total.***

Cent milligrammes de feuilles ont été broyés dans de l'azote liquide. Le broyat a été mis en suspension dans 1 millilitre de tampon QIAzol (Qiagen)l. Après vortexage, l'échantillon a été centrifugé à 12000g durant 10 minutes. Le surnageant a été récupéré et laissé 5 minutes à température ambiante. 200µl de chloroforme ont alors été ajoutés. Le mélange a été vortexé durant 15 secondes pour ensuite être laissé à température ambiante durant 3 minutes. L'échantillon a ensuite été centrifugé à 12000g pendant 15 minutes. Après récupération de la phase aqueuse, la concentration en sodium de la solution a alors été ajustée à 300mM par l'ajout d'un dixième de volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,2). Les acides nucléiques ont été précipités une nuit à -20°C avec 2,5 volumes d'éthanol absolu. Le mix a subi une centrifugation à 13000rpm pendant 20 minutes et un lavage à l'éthanol 75%. Après séchage du culot contenant l'ARN, 50µl d'eau DEPC ont été ajoutés afin de mettre l'ARN en solution.

### ***2.3.2 Vérification de la qualité de l'ARN extrait.***

La qualité de l'ARN total extrait a été évaluée par migration sur gel d'agarose concentré à 1%.

### ***2.3.3 Quantification des acides nucléiques avec le NanoDrop®.***

#### **2.3.3.1 Principe.**

Le NanoDrop® est un spectrophotomètre à spectre complet (220-700nm) pouvant réaliser les mesures d'absorbance dans 1 µl de solution : l'appareil exploite les phénomènes de tension de surface afin de maintenir l'échantillon en place. Par rapport aux spectrophotomètres à cuvette classiques, le NanoDrop® est capable de réaliser des mesures sur des échantillons 50X plus concentrés.

Les mesures d'absorbance à 230, 260 et 280nm ont été réalisées pour la quantification des acides nucléiques. La quantification est basée sur la mesure de l'absorbance à 260 nm alors que la qualité de l'échantillon est donnée par les rapports des absorbances à 260 et 280 nm (compris entre 1,8 et 2 pour une bonne qualité) ainsi que par le rapport des absorbances mesurées à 260 et 230 nm.

#### **2.3.3.2 Méthode.**

Un à deux microlitres d'échantillon ont été déposés sur la fibre optique réceptrice. La seconde fibre optique (émettrice) a été mise en contact avec la goutte d'échantillon (prenant la forme d'une

colonne) permettant ainsi de fermer le chemin séparant les extrémités des deux fibres optiques. Une lampe à décharge à Xénon produit alors un flash lumineux qui sera analysé après son passage dans la colonne d'échantillon.

### **2.3.4 Électrophorèse sur gel d'agarose.**

#### **2.3.4.1 Migration d'ADN.**

Les produits d'amplification obtenus lors des RT-PCR ou des PCR ont été analysés par migration sur gel d'agarose 1,2% (poids:volume).

L'agarose a été dissous à chaud dans du tampon TAE 1X porté à ébullition (pour un litre de TAE 50X: 242g de Tris hydroxyaminométhane, 37,2g EDTA, 57,1ml d'acide acétique et compléter avec de l'eau distillée). Dix microlitres de bromure d'éthidium (BEt) (10mg/ml) ont été ajoutés après refroidissement. Le gel a été coulé sur un support sur lequel un peigne a été fixé afin de former les puits.

Dès que le gel a été totalement polymérisé, il a été placé dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1X. Après ajout d'un tampon de chargement (Glycérol 60%, TAE 1X, 0,25% bleu de bromophénol), les échantillons ont été déposés au fond des puits du gel. La migration a été conduite à 120mA durant une heure. Après ce laps de temps, l'ADN a été visualisé grâce au bromure d'éthidium qui émet une fluorescence lorsqu'il est soumis aux rayons ultra-violetts d'une longueur d'onde de 320nm.

#### **2.3.4.2 Migration d'ARN.**

La préparation du gel et la migration en condition non dénaturante et RNase free ont été réalisées dans du tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM pH7). Dans ce cas, le tampon de chargement correspondait à un mélange en proportion équivalente de tampon phosphate 10mM et de glycérol. La migration a été réalisée sur glace afin de limiter la dégradation de l'ARN et de travailler à une température constante.

### **2.3.5 Traitement DNase Rnase-free (Ambion).**

Afin d'éviter la présence d'ADN génomique dans les profils d'AFLP, un traitement DNase a été réalisé. Pour ce faire; 0,5 $\mu$ l de DNase RNase-free ont été ajouté à 50 $\mu$ l d'échantillon en présence de tampon DNase I (1X). Le mélange réactionnel a été incubé durant 15 minutes à 37°C.

### **2.3.6 Purification de l'ARN total et enrichissement en ARN messager.**

Après avoir vérifié la qualité de l'ARN total extrait et effectué un traitement DNase, l'ARN a été purifié à l'aide du kit *RNeasy®minElute Cleanup* de QIAGEN dont le protocole est fourni en annexe

1.5. Ce Kit a la particularité d'exclure les molécules d'ARN ayant une taille inférieure à 200 nucléotides; ceci a donc permis d'éliminer les ARN de transfert et les plus petits ARN messagers.

### **2.3.7 Détection moléculaire du PLMVd.**

#### **2.3.7.1 Les amorces utilisées.**

L'amorce cPLMVd est l'oligonucléotide anti-sens correspondant aux nucléotides 91 à 115 (5'AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC3') du PLMVd. L'amorce hPLMVd est l'oligonucléotide sens correspondant aux nucléotides 116 à 140 du PLMVd et de séquence: (5'CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG3'). Ces amorces ont été commandées auprès d'Eurogentec (Liège, Belgique).

#### **2.3.7.2 Méthode.**

La RT-PCR en une seule étape a été réalisée avec le *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche diagnostics, Penzberg, Germany) selon les conditions spécifiées par le fournisseur, dans un volume réactionnel de composition suivante: 400nM des amorces sens et anti-sens, tampon PCR 1X, 5mM de DTT<sup>6</sup>, 0,2mM de dNTP (Fermentas), XU (0,5µl) du mélange d'enzymes (AMV reverse transcriptase et High fidelity Taq-polymérase) et 200ng d'ARN.

Après dénaturation de l'échantillon durant 5 minutes à 95°C en présence de l'amorce complémentaire, le mélange réactionnel est ajouté.

Le programme de RT-PCR utilisé pour amplifier le PLMVd comprend:

- Une première étape de rétrotranscription de l'ARN à 50°C durant une heure,
- une dénaturation à 95°C durant 3 minutes,
- 35 cycles comportant chacun:
  - une phase de dénaturation: 30 secondes à 95°C,
  - une phase d'hybridation des amorces: 45 secondes à 60°C,
  - une phase d'élongation: 45 secondes à 72°C,
- une dernière phase d' élongation à 72°C durant 5 minutes.

Il faut toutefois noter la nécessité de réaliser une dénaturation préalable du viroïde (en présence de l'amorce anti-sens) à 95°C durant 5 minutes afin de dénaturer sa structure secondaire.

### **2.3.8 La cDNA-AFLP.**

#### **2.3.8.1 Principe.**

La cDNA-AFLP est une technique qui donne une image globale de l'expression des gènes chez

---

<sup>6</sup> Dithiothreitol

l'organisme étudié à un moment donné. Cette technique sans a priori permet de visualiser des fragments d'ARN messager différentiellement exprimés entre deux objets différents (par exemple, une plante saine et une plante infectée). Cette technique a été utilisée afin de tenter de caractériser les relations hôte-pathogène entre le PLMVd et le pêcher.

En effet, les profils d'expression génique obtenus (après mise au point) chez une plante saine et chez une plante infectée nous donnent une information en ce qui concerne la modification de l'expression des gènes entre ces deux plantes.

### **2.3.8.2 Méthode.**

#### **2.3.8.2.1 Extraction de l'ARN.**

L'ARN est extrait en suivant le protocole donné au point 2.3.1. La qualité de l'ARN extrait a ensuite été vérifiée par migration sur gel d'agarose comme expliqué au point 2.3.4.

#### **2.3.8.2.2 Rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire.**

La rétrotranscription a été réalisée à l'aide du kit *SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis* (Invitrogen). Une fois l'ADNc double brin obtenu, ce dernier a été extrait à l'aide de 130µl de Phénol-Chloroforme-Alcool isoamylique (PCAi). Le mélange a ensuite été centrifugé à 14000g pendant 20 minutes. 140µl de la phase aqueuse ont été récupérés et placés dans un eppendorf de 1,5 millilitre en présence de 500µl d'éthanol absolu froid (-20°C) et de 7µl d'acétate d'ammonium 3M. Le mélange a été placé à -20°C pendant une nuit. Le lendemain, l'ADNc précipité a été centrifugé durant 20 minutes à 14000g. L'éthanol absolu a ensuite été éliminé et le culot a été lavé avec 500µl d'éthanol à 70%. Le mélange a ensuite été centrifugé à 14000g pendant 10 minutes. Après avoir éliminé délicatement l'éthanol à l'aide d'une micro-pipette, les échantillons ont été séchés durant 5 minutes au *speedvac* (séchage réfrigéré sous vide). Finalement, l'ADNc a été resuspendu dans 30µl d'eau DEPC.

#### **2.3.8.2.3 Digestion.**

La digestion de l'ADNc a été réalisée à l'aide des enzymes de restriction présentes dans le *AFLP Core Reagents kit* d'Invitrogen à savoir les enzymes EcoRI et MseI.

Le mélange réactionnel suivant a été utilisé: 250ng d'ADN complémentaire, du tampon de digestion 1X et 2,5 unités de chaque enzyme de restriction.

Le mélange réactionnel a été incubé durant 2h à 37°C. Les enzymes ont été inactivées en incubant les tubes durant 15 minutes à 70°C.



#### **2.3.8.2.4 Ligation.**

Une fois l'ADNc digéré, les adaptateurs ont été ajoutés par ligation à l'aide de la T4 DNA ligase. 24µl de « l'adapter ligation solution » ont été incubés durant deux heures à 20°C avec la T4 DNA ligase. Ensuite, le produit de ligation a été dilué 10X avec du Tampon TE en vue de la pré-amplification.

#### **2.3.8.2.5 Pré-amplification.**

La pré-amplification a été réalisée avec « *l'Expand High Fidelity system* » (Fermentas). Le mélange réactionnel suivant a été utilisé: 75,6ng d'amorce E-0, 80,4ng d'amorce M-0, du tampon PCR 1X (avec MgCl<sub>2</sub>, 0,2 unités du mélange d'enzyme High Fidelity (Taq DNA polymérase et Pfu DNA polymérase), et 5µl du produit de ligation dilué 10X.

La PCR de pré-amplification comprend:

- 20 cycles comportant chacun:
  - une phase de dénaturation à 94°C durant 30 secondes,
  - une phase d'hybridation des amorces à 56°C durant 60 secondes,
  - une phase d'élongation à 72°C durant 90 secondes,
- une phase d'élongation finale à 72°C durant 5 minutes.

Les produits PCR ont ensuite été dilués 50X avec du tampon TE stérile.

#### **2.3.8.2.6 Marquage des amorces.**

Seules les amorces sélectives EcoRI ont été marquées en vue de l'amplification sélective.

Le marquage a été réalisé dans le mélange réactionnel suivant: 250,2ng de l'amorce EcoRI, du tampon kinase 1X, 5µl de [<sup>33</sup>P]ATP (200Ci/mmol) et 10 unités de T4 polynucléotide kinase.

Le mélange a été incubé durant une heure à 37°C. Ensuite, l'enzyme a été inactivée par chauffage à 70°C durant 10 minutes.

#### **2.3.8.2.7 Amplification sélective.**

L'amplification sélective a été réalisée à l'aide de couples d'amorces EcoRI/MseI possédant deux ou trois nucléotides supplémentaires en 3'. Ceci permet de limiter le nombre de fragments amplifiés donnant ainsi la possibilité de visualiser d'éventuels fragments différentiellement exprimés.

Les différents couples d'amorces testés pour la mise au point de la cDNA-AFLP sont repris dans le tableau (3)

Tableau 3: Couples d'amorces testés

Amorces (marquées)	EcoRI	Amorces MseI
E-TG		M-ATT
E-TG		M-ATA
E-TC		M-GT

Un premier mélange réactionnel a été utilisé avec par échantillon 5µl de l'amorce marquée et 30,1ng de l'amorce MseI (+dNTP). Un second mélange réactionnel a été réalisé avec par échantillon: Tampon PCR 1X et 0,7 unités du mélange d'enzymes High Fidelity (Taq DNA polymerase et Pfu DNA polymerase).

Pour chaque échantillon, le mix AFLP suivant est réalisé:

Composants	Volumes
ADNc	5µl
Pré-mix 1	5µ
Pré-mix 2	10µl

La PCR d'amplification sélective comporte les étapes suivantes:

un cycle composé de:

- une phase de dénaturation à 94°C durant 60 secondes,
- une phase d'hybridation des amorces à 65°C durant 60 secondes,
- une phase d'élongation à 72°C durant 90 secondes.

Ensuite, la température d'hybridation est diminuée de 0,7°C durant 12 cycles.

Enfin, on réalise 23 cycles comportant chacun:

- une phase de dénaturation à 94°C durant une minute,
- une phase d'hybridation des amorces à 56°C durant 30 secondes,
- une phase d'élongation durant 90 secondes.

#### 2.3.8.2.8 Migration des produits d'amplification sélective sur gel de polyacrylamide.

Après la PCR d'amplification sélective, 20µl de solution « Stop » (formamide 98%, EDTA 10mM, bleu de bromophénol, xylène cyanol) ont été ajoutés à chaque échantillon. Le mélange a été laissé une heure sur glace durant le préchauffage du gel à 80W. Afin d'observer le résultat de l'amplification sélective, les échantillons ont été placés en migration dans un gel de polyacrylamide 5% à 60W durant 2h-2h30 (lorsque le front bleu atteint le bas du gel). Deux tampons ont été utilisés durant la migration: un tampon « haut » (en contact avec le haut du gel) composé de TBE 1X et un

tampon « bas » composé de TBE 1X et d'acétate de sodium.

La composition du tampon TBE pour un litre est la suivante: 162g de Tris hydroxyaminométhane, 27,5g d'acide borique et 9,5 EDTA.

Le tampon base est quant à lui composé de (pour un litre de solution): 82g d'acétate de sodium, porter à 333 millilitres d'eau et enfin, porter à un litre avec du TBE 1X.

Le gel d'acrylamide est donc composé de 25,2g d'urée, 6ml de TBE 10X, 10ml d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide (30%/1,5%), la solution est portée à 60 millilitres avec de l'eau après dissolution totale de l'urée.

La polymérisation du gel s'effectue en présence de 60µl de persulfate d'ammonium 25% et de 60µl de Temed.

#### **2.3.8.2.9 Révélation de la radioactivité.**

Après migration, le gel a été séparé des plaques du dispositif à l'aide d'une solution de fixation et d'une feuille de papier wattman. Le gel a ensuite été séché à chaud et sous vide à l'aide d'un « gel dryer ». Le gel, couvert d'une feuille de papier plastique, a été placé en contact durant 2 ou 3 jours avec de film de révélation compatible avec le phosphoImager au centre de Biotechnologie du CRA de Grand-Manil.

# Résultats et discussion

## 1 Dimérisation de variants du PLMVd.

### 1.1 Introduction.

L'objectif de cette manipulation était de disposer d'une collection de dimères de variants d'intérêt en vue de vérifier deux hypothèses soulevées au cours d'un doctorat réalisé précédemment au sein de l'Unité de Phytopathologie (Fekih Hassen, 2006). Ainsi, la possibilité de l'existence de phénomènes de recombinaisons entre des variants du PLMVd ainsi que l'importance des structures en pseudo-noeud dans la structure du PLMVd ont été émises.

Deux hypothèses de recombinaison ont été envisagées. La première hypothèse fait référence à la recombinaison des variants Hd6 et Hd8 qui aurait donné naissance au groupe I des variants du PLMVd (Fekih Hassen *et al.*, 2007). Par contre, suivant la seconde hypothèse de recombinaison, les variants des groupes II-A et II-C auraient mené à la formation du groupe II-B.

Ainsi, la vérification de l'existence de phénomènes de recombinaisons entre viroïdes infectant une même plante sera réalisée en co-inoculant deux viroïdes de séquences connues. Dans ce cadre, des couples d'amorces ont été sélectionnés afin d'être en mesure de détecter les viroïdes recombinants par PCR.

Afin de déterminer l'impact des structures secondaires en pseudo-noeud présentes chez le PLMVd sur sa pathogénicité ou sur sa réplication, des viroïdes dont ces régions ont été mutées par PCR (selon le principe de la mutagenèse dirigée) seront inoculés sur des plants de pêcher GF-305.

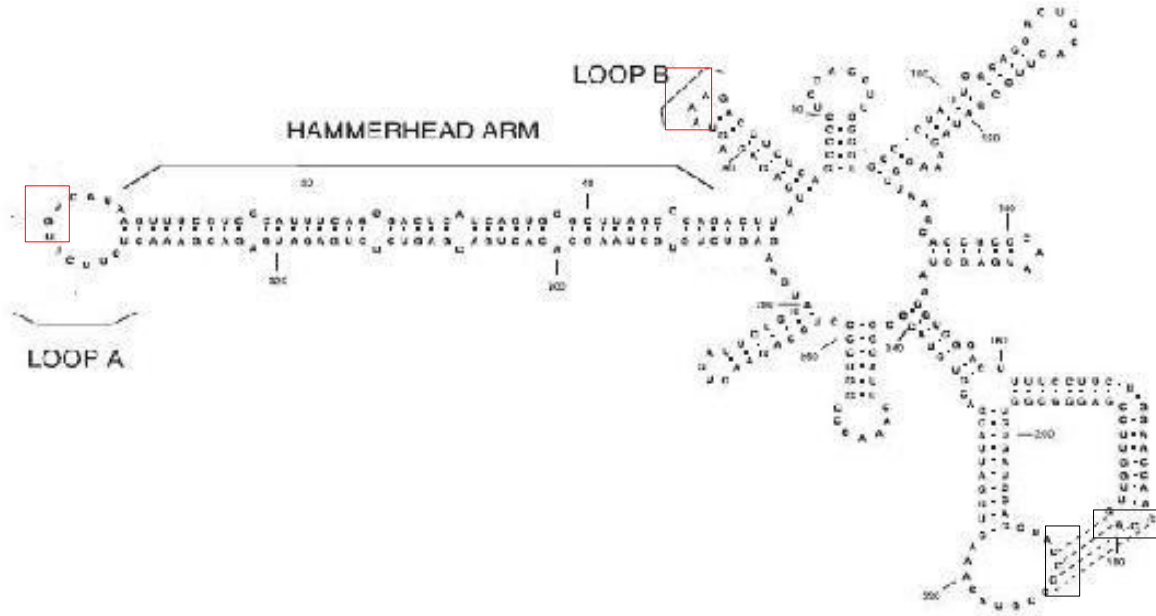
Ces objectifs à long terme nécessitaient donc d'identifier les variants d'intérêt, de sélectionner des amorces permettant de détecter des viroïdes recombinants ou de réaliser des mutations dans les régions ciblées.

#### 1.1.1 La mutagenèse dirigée.

Les variants qui seront utilisés pour vérifier l'importance des structures en pseudo-noeud doivent être caractérisés du point de vue de leur pathogénicité. À cette fin, les variants 151.1 et 124.4 appartenant respectivement aux groupes I-A et II-A ont été retenus. Il s'agit respectivement d'un variant présentant une pathogénicité sévère et d'un variant latent.

Les amorces qui seront utilisées pour la mutagenèse dirigée ont été sélectionnées de façon à déstabiliser les pseudo-noeuds P8 (nucléotides 178 à 181 et nucléotides 212-215) ainsi que le pseudo-noeud présent entre L1 (nucléotides 64 à 67) et L11 (nucléotides 338 à 2) (figure 13).

Figure 13: Structure secondaire prédite pour la séquence du PLMVd. Les nucléotides intervenant dans les interactions en pseudo-noeuds sont encadrés. En rouge: Pseudo-noeud entre L1 et L11, en noir: Pseudo-noeud P8



Les amorces ont été sélectionnées de façon à muter les pseudo-noeuds au niveau de deux et trois nucléotides situés dans la boucle L1 pour le pseudo-noeud L1-L11 (Figure14) et au niveau de deux nucléotides à l'extrémité de P6b pour le pseudo-noeud P8 (figure 15). Les mutations se trouvent donc au niveau de l'extrémité 5' des amorces de façon à permettre une bonne hybridation des amorces en 3' (Tableau 4).

Tableau 4: Amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée des variants 124.4 et 151.1. Les nucléotides en rouge et en gras sont les nucléotides mutés par rapport à la séquence des variants originaux.

Mutations	Variant	Amorces Forward	Amorces Reverse
P6b	151.1	<b>CCT</b> CGAACCCAGGGGGAGTG	GCTCAAACCCTAGGGAAAAGT
	124.4	<b>CCT</b> AGGTTCCGAGGGGGGTG	GCTAGGTTCCAGAAGGAAAAG
L1	151.1	<b>CCT</b> TACCTCTCAGCCCCTCC	ACTCTCTCATAAGTCTGGGCTTAG
		<b>CC</b> A <b>T</b> ACCTCTCAGCCCCTCC	ACTCTCTCATAAGTCTGGGCTTAG
	124.4	<b>TCT</b> CACCTCTCAGCCCCTCC	ACTCTCTCATAAGTCTGGGCTTAG
		<b>TC</b> A <b>C</b> ACCTCTCAGCCCCTCC	ACTCTCTCATAAGTCTGGGCTTAG

Figure 14: Représentation des Pseudo-noeuds entre L1 et L11 ainsi que leurs mutations (en rouge). Les nombres au dessus et au dessous indiquent la position des nucléotides.

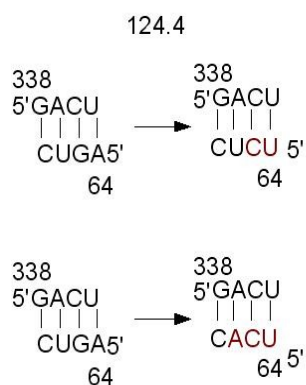
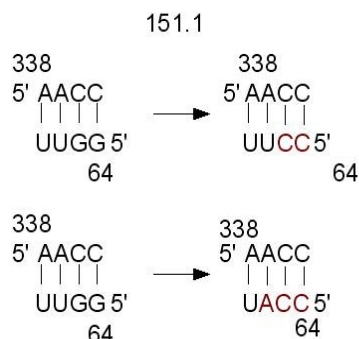
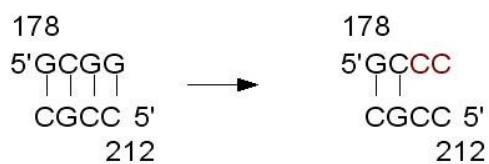


Illustration 15: Représentation du pseudo-noeud P8 ainsi que des mutations (en rouge). Les nombres au dessus et au dessous indique la position des nucléotides



Quelques exemples d'alignements de séquences des variants sont données en annexe 2.1 à 2.4 avec la délimitation des amorces et des mutations.

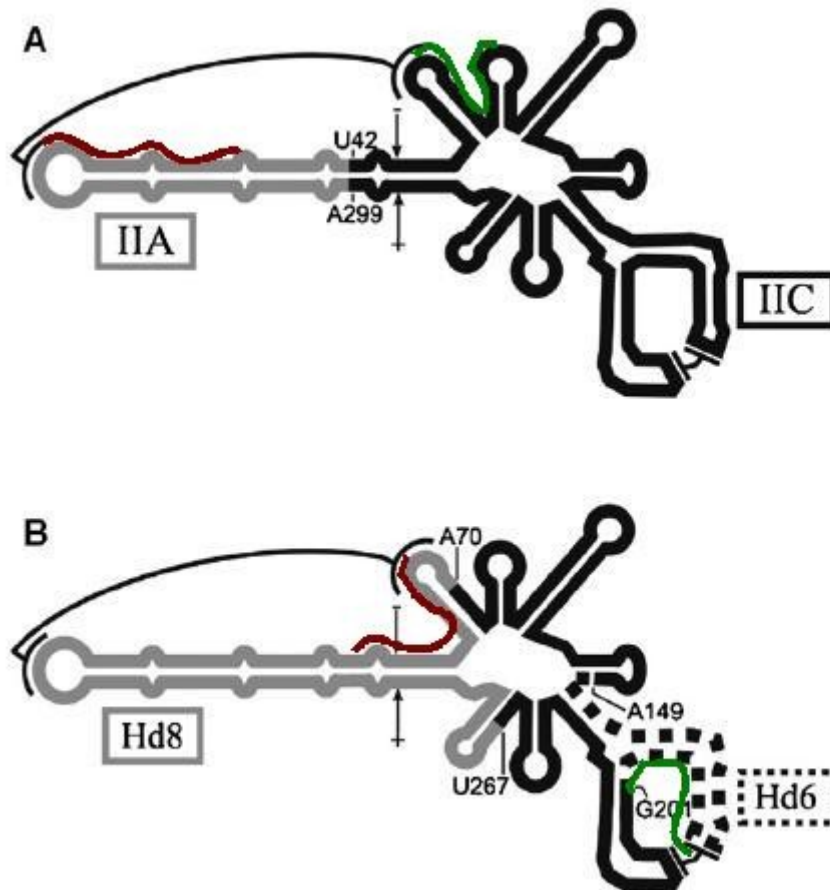
### 1.1.2 Hypothèses de recombinaison.

Différents variants ont été sélectionnés pour la vérification de l'hypothèse de recombinaison. Ainsi, les variants Hd6 et Hd8, dont on suppose que leur recombinaison est à l'origine du groupe I des variants du PLMVd (Fekih Hassen *et al.*, 2007), ont été choisis et dimérisés. Dans ce cas le variant recombinant contiendrait les séquences ribozymes, la P1 et la P10 de Hd8 et la P6 de Hd6 (Figure 16B).

D'autre part, une seconde hypothèse de recombinaison suppose que les variants des groupes II-A et II-C seraient à l'origine du groupe II-B. Les recombinaisons à l'origine du groupe I et du groupe II-B impliquant différents domaines. Dans ce dernier cas, les variants du groupe II-A seraient à l'origine d'une partie de la P11 (jusqu'au nucléotide U42/A299) alors que les variants du groupe II-C

généreraient le reste de la molécule (figure 16A). Ces deux hypothèses de recombinaison ont été prises en compte pour l'élaboration des amorces respectives. Nous avons choisi deux couples d'amorces pour chaque événement de recombinaison car chacun des viroïdes de chaque couple est susceptible de donner l'un ou l'autre fragment lors de la recombinaison.

*Figure 16: Représentation des deux hypothèses de recombinaison. Les traits représentent les amorces sens et anti-sens (en rouge et en vert respectivement). (A) recombinaison entre les variants des groupes II-A et II-C, (B) recombinaison entre Hd6 et Hd8.*



Un alignement des séquences de ces variants (fourni en annexe 2.5 et 2.6) a été réalisé de façon à sélectionner des variants dont le produit de recombinaison peut être distingué par PCR. Pour ce faire, il était essentiel de choisir des variants dont les domaines se recombinant étaient suffisamment polymorphes.

C'est dans cette optique que les variants 88.1 et 88.3 ont été choisis et dimérisés.

Les amorces ont été sélectionnées à l'aide du logiciel Primer 3 disponible sur Internet. Les amorces sélectionnées sont présentées au tableau 5. Ces amorces ont été sélectionnées de façon à

n'amplifier que les viroïdes recombinants. Ceci signifie donc que les amorces forward et reverse se situent chacune dans un des domaines de recombinaison.

*Tableau 5: Amorces utilisées pour vérifier l'hypothèse de recombinaison des variants 88.1-88.3 et Hd6-Hd8. Le variant de gauche donnant la partie de la molécule située la plus à gauche et inversement. Les nombres en début et fin de séquence donnent la position de l'amorce sur la séquence de référence.*

<b>Variants recombinants</b>	<b>Amorces Forward</b>	<b>Amorces Reverse</b>
88.3-88.1	3CATAAGTTTCGCCGTATC TCAA24	84GGAGGGGCTGAGAGGT CTTT65
Hd8-Hd6	44GCCCAGACTTATGAGAG AGTGGT65	176TGGGTTCGACCGCTCA AA194
88.1-88.3	4AAAAGTTTCGTCGCATCT CAG24	85AGGGGCTGAGAGGTGA CC65
Hd6-Hd8	1ATCAAAAGTTTCGCCGCA TTT21	208GATCACACCCCCCTCG GAAC188

## **1.2 Purification de l'ADN plasmidique d'*E.coli* et amplification des inserts.**

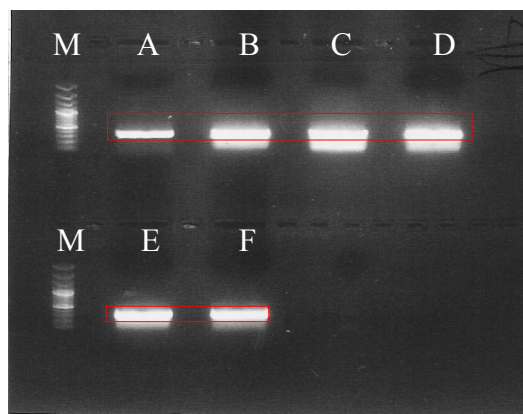
Les plasmides purifiés ont été analysés au Nanodrop. Les rapports de D.O. ont été compris entre 1,8 et 2 tandis que la quantité d'ADN purifiée a été comprise entre 2,3 et 8,8µg. Dix nanogrammes de chaque plasmide purifié ont ensuite été utilisés pour l'amplification PCR des variants insérés. Les produits PCR obtenus ont été purifiés après migration sur gel d'agarose (Figure 17). Seule la portion de gel encadrée en rouge a été prélevée pour réaliser cette purification. Ceci nous assure de purifier de l'ADN amplifié dont la taille correspond au PLMVd. La quantité d'ADN purifié a été évaluée par lecture de densité optique à 260nm au Nanodrop (cf Tableau 6). La qualité de l'ADN purifié est bonne: les rapports de densité optique (D.O. 260nm/D.O.280nm) ont été compris entre 1,8 et 2 soit les valeurs optimales de densité optique. Les quantités d'ADN récupérées ont été suffisantes pour réaliser la phosphorylation.



Tableau 6: Résultats de la purification des produits PCR. La quantité purifiée pour chaque échantillon est donnée en  $\mu\text{g}$ . La qualité de l'ADN purifié est représentée par le rapport  $D.O.260\text{nm}/D.O.280\text{nm}$

Echantillons	Quantité purifiée ( $\mu\text{g}/\text{éch.}$ )	260/280
Hd6	0,478	1,80
Hd8	1,918	2,04
88.1	1,725	1,94
88.3	2,599	1,94
124.4	2,589	1,94
151.1	2,878	1,95

Figure 17: Migration sur gel d'agarose 1,2% des produits PCR avant purification. La portion de gel prélevée est encadrée en rouge. (A) Hd6, (B) Hd8, (C) 88.1, (D) 88.3, (E) 124.4, (F) 151.1. (M) marqueur et (M) marqueur.



### 1.3 Phosphorylation et ligation des produits PCR purifiés.

La phosphorylation permet de transférer un groupement phosphate de l'ATP vers une extrémité 5'-OH d'un brin d'ADN. Le tableau 7 montre les quantités d'ADN utilisées pour la phosphorylation. La quantité recommandée pour réaliser la phosphorylation est d'environ  $1\mu\text{g}$  par réaction. Il est donc possible de réaliser cette réaction dans des conditions optimales pour tous les variants excepté Hd6. Malgré les plus faibles quantités d'ADN disponibles pour ce variant, nous avons poursuivi la dimérisation.

La quantification de la purification du produit de phosphorylation présentée au tableau 7 montre des valeurs supérieures à la quantité d'ADN utilisée dans cette réaction. Ceci est dû à la présence d'ATP résiduelle éluée de la colonne en même temps que l'ADN. Davantage de lavages de la colonne auraient probablement permis d'éliminer tout l'ATP.

Les quantités d'ADN obtenues ont donc été suffisantes pour réaliser la ligation (la quantité d'ADN recommandée par réaction étant également de  $1\mu\text{g}$ ) à l'exception du variant Hd6. Nous avons cependant continué la manipulation en incluant Hd6.

Tableau 7: Quantité d'ADN (i) utilisée pour la phosphorylation, (ii) purifiée après phosphorylation et (iii) utilisée pour la ligation et (iv) purifiée après ligation. Les chiffres romains renvoient aux colonnes du tableau

Echantillons	Quantité d'ADN utilisée pour la phosphorylation (µg/éch)	Quantité d'ADN phosphorylé purifiée (µg/éch)	Quantité d'ADN utilisée pour la ligation (µg/éch)	Purification au Qiaquick (µg/éch.)
Hd6	0,239	0,422	0,2110	0,0948
Hd8	0,959	1,819	0,9095	0,8302
88.1	0,8625	1,427	0,7135	0,703
88.3	1,29	1,611	0,8055	0,8024
124.4	1,29	1,616	0,8080	0,861
151.1	1,44	1,908	0,9540	0,9176

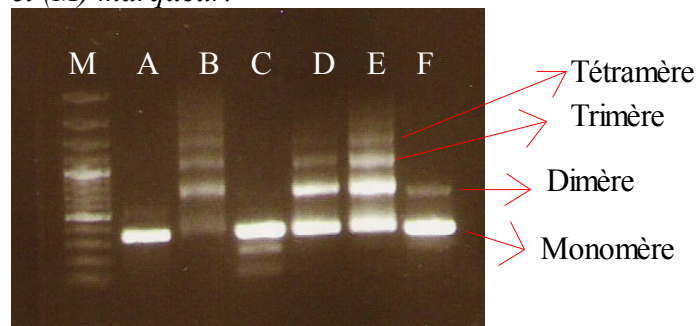
Une purification du produit de ligation a été réalisée avec le *QIAquick PCR purification kit* avec trois lavages de la membrane afin d'éliminer l'ATP résiduel. Le tableau 7 montre les résultats de cette purification. Les quantités d'ADN purifiées sont maintenant en accord avec les quantités utilisées pour la ligation. De plus, les rapports de densité optique (D.O.260nm/D.O.280nm) ont été proches des valeurs optimales comprises entre 1,8 et 2 sauf pour le variant Hd6 dont le rapport a été inférieur (1,42), probablement en raison d'un résidu de phénol.

#### 1.4 Amplification des produits de ligation.

Les quantités d'ADN utilisées pour réaliser l'amplification du produit de ligation ont été ajustées à 10ng par réaction. Cette amplification a été réalisée avec le *High Fidelity PCR Enzyme Mix*. Ce mélange d'enzymes possède une activité *proofreading* et permet également d'ajouter une queue poly-A en 3' nécessaire au clonage dans le vecteur pCR2.1.

La figure 18 montre le résultat de l'amplification. Les dimères dont la taille est d'environ 680 paires de bases ont été observés pour les échantillons Hd8, 88.3, 124.4 et 151.1. D'autres multimères sont également visibles pour ces mêmes échantillons. Par contre, aucun dimère (ni multimère) n'est visible pour les échantillons Hd6 et 88.1.

Figure 18: Migration du produit d'amplification sur gel d'agarose 2%. on peut observer les monomères, dimères, trimère et tétramères. (A) Hd6, (B) Hd8, (C) 88.1, (D) 88.3, (E) 124.4, (F) 151.1 et (M) marqueur.



## 1.5 Purification des produits de l'amplification et clonage des dimères.

Les produits d'amplification ont été purifiés par migration sur gel d'agarose 2% (figure 18). Après migration, les bandes correspondant à la taille des dimères ont été purifiées à l'aide du *QIAexII gel extraction kit*. Pour les variants Hd6 et 88.1, bien que les dimères ne soient pas visibles (le monomère a probablement été préférentiellement amplifié), la portion de gel située au niveau de la taille des dimères a également été excisée et purifiée. Les quantités obtenues ont variés de 300 à 650 ng pour 151.1, 124.4, Hd8 et 88.3. Elles étaient de 146 pour Hd6 et 80,8ng pour 88.1 Les rapports de densité optique étaient proches des valeurs optimales comprises entre 1,8 et 2,0.

Les dimères purifiés ont été clonés dans le vecteur pCR2.1. La ligation a été réalisée avec 24 ng de produits purifiés excepté pour les variants Hd6 et 88.1 pour lesquels 21 et 12 nanogrammes ont été respectivement utilisés.

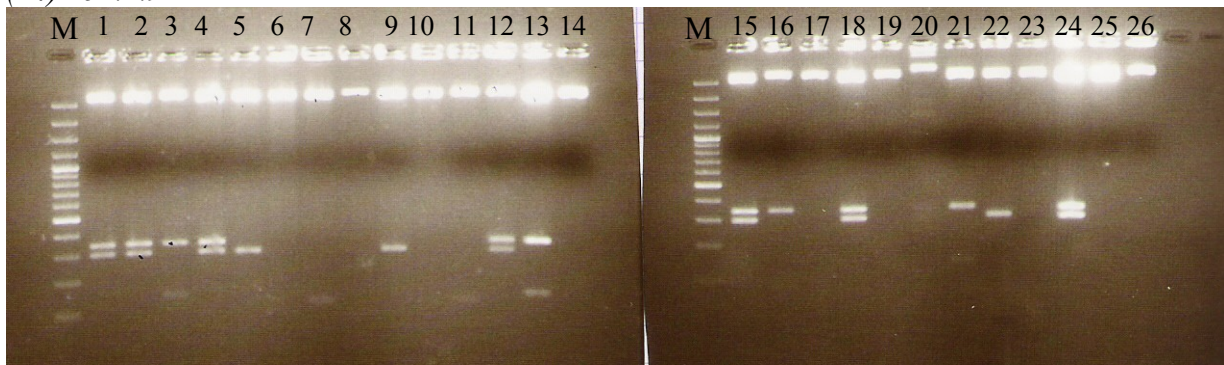
Pour chaque variant dimérique, 10 colonies ont été prélevées sur boîte de Pétri et incubées en milieu liquide. Ensuite, 60 miniprep ont été réalisées à partir de deux millilitres de chaque culture liquide. Après la vérification de la concentration et de la pureté des plasmides recombinants ainsi purifiés, 26 clones ont été sélectionnés pour y vérifier l'orientation des dimères. En effet, pour réaliser une inoculation efficace, il est nécessaire que ceux-ci soient orientés de façon à permettre la transcription du brin de polarité positive du PLMVd. Il faut donc que le dimère possède l'orientation sens et que les deux monomères présents dans le dimère soient également orientés dans ce même sens pour éviter tout appariement auto-complémentaire.

## 1.6 Vérification de l'orientation des dimères.

La présence de dimères est observable par la digestion des plasmides par l'enzyme KpnI. Dans le cas d'une insertion de dimères, trois fragments peuvent être observés à 261, 337 et 405 paires de bases, deux clivages ayant lieu au niveau du PLMVd (un par monomère composant le dimère) et le troisième site de restriction se trouvant au niveau de la séquence du plasmide. A l'inverse, si le dimère est incomplet ou si seul un monomère est inséré ou encore en l'absence d'insertion, seul deux ou un fragment sont respectivement visibles.

La figure 19 montre la migration des produits de digestion sur un gel d'agarose 1,5%. Sept échantillons ont été considérés comme dimériques sur les 26 testés. Il s'agit des échantillons correspondant aux variants Hd8.3, 88.3.5, 88.3.8, Hd8.10, 124.4.3, 124.4.9, 151.1.9. Ces échantillons ont été envoyés au séquençage pour confirmer l'orientation et vérifier la séquence des dimères.

*Figure 19: Profil de migration obtenu après digestion des miniprep de dimères par l'enzyme KpnI. (M) Marqueur, (1) à (26) échantillons analysés, avec, en gras les échantillons dimériques, Soit (1) Hd8.3, (2) 88.3.5, (4) 88.3.8, (12) Hd8.10, (15) 124.4.3, (18) 124.4.9 et (24) 151.1.9*

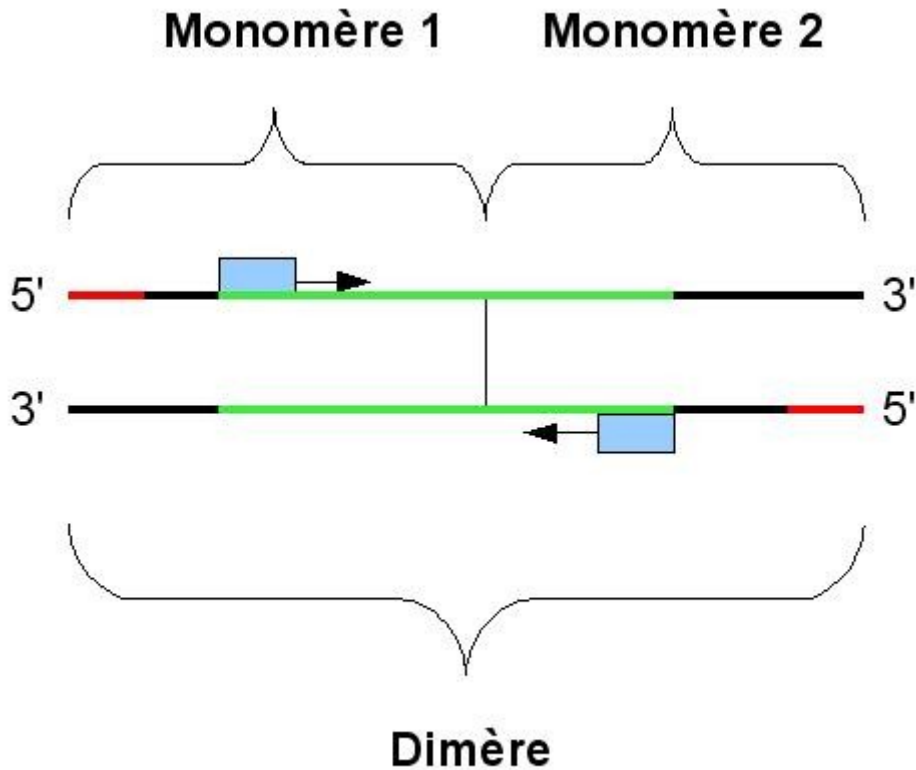


## 1.7 Analyse des séquences.

Les séquences obtenues pour les variants 151.1 et 124.4 correspondent à des dimères complets. Cependant quelques mutations semblent présentes dans la région correspondant à l'amorce hPLMVd du premier monomère composant le dimère. Ces mutations correspondent à des insertions et à des substitutions. Pour le variant 151.1, 10 mutations ponctuelles sont présentes au niveau de l'amorce hPLMVd (aux positions 1 à 3, 10 et 11, 14, 16 et 17, 20 et 21 et 23 à 25). En dehors de cette région, 15 autres mutations (7 substitutions et 8 insertions) ont été détectées. Soit un taux de mutations du dimère de 3,6%. La situation est similaire pour le variant 124.4.3. Pour ce dernier, 11 mutations ont été observées dans la région correspondant à l'amorce hPLMVd (aux positions 4 et 5, 11 et 13, 17 et 18, 20 et 21 ainsi qu'une insertion de 3 nucléotides entre les positions 9 et 10) et 26 autres mutations sont situées au long de la séquence. Soit un taux de mutations de 5,4%. Une quinzaine de mutations ont par contre été observées au niveau de la séquence du variant 124.4.9 (soit un taux de mutations de 2,2%). La majorité de celles-ci (soit 9 mutations) sont également situées au niveau de l'amorce hPLMVd (aux positions 1 à 3, 5, 9 et 10, 11, 12 et 19). Les autres mutations (correspondant à des insertions et des substitutions) sont réparties au long de la séquence sans pour autant se situer aux mêmes positions que pour le variant 124.4.3. D'une manière générale, toutes les mutations recensées sont différentes pour chacun des variants séquencés.

La figure 20 montre un schéma de la portion du dimère qui sera utilisée pour réaliser les mutations du pseudo-noeud entre L1-L11 et au niveau de P8. Comme on peut le voir, cette portion de la séquence est comprise entre les amorces *Forward* et *Reverse* de mutagenèse. La séquence correspondant à l'amorce hPLMVd, fortement mutée, ne sera donc pas amplifiée durant cette manipulation. De plus, l'analyse de cette séquence a montré que seules une et deux mutations sont respectivement présentes respectivement pour les variants 124.4 (3 et 9) et 151.1. Le même type d'analyse réalisé pour les mutations du pseudo-noeud P8 ont montré que deux mutations sont présentes au niveau de la séquence utilisée pour muter le variant 151.1 tandis qu'une seule et deux mutations sont présentes pour les variants 124.4.3 et 124.4.9 respectivement. Les taux de mutations de ces séquences sont donc compris entre 0,3 et 0,6% suivant qu'une seule ou deux mutations sont présentes dans les séquences ciblées.

*Illustration 20: Représentation de la portion de séquence du dimère effectivement utilisée lors du processus de mutagenèse dirigée (en vert). La séquence correspondant à l'amorce hPLMVd est représentée en rouge, les amorces de mutagenèse sont représentées par des rectangles bleu et le sens de synthèse des nouveaux brins est indiqué par des flèches*



Les deux clones comportant les dimères du variant Hd8 ont été séquencés. Les séquences obtenues tant avec les amorces reverse que forward sont incomplètes. Le premier monomère semble présent et complet mais de nombreuses mutations sont présentes tout au long de la séquence. Ainsi, six pour cent de la séquence de Hd8.3 (séquençage par l'amorce Forward) présente des mutations et 7 pour cent de la séquence de Hd8.10 est également mutée (séquençage en Forward également). Le séquençage avec l'amorce Reverse n'a rien donné (aucune séquence) pour le variant Hd8.3. En ce qui concerne le variant Hd8.10 le premier monomère est de nouveau présent mais sa séquence présente beaucoup plus de mutations. Ces dimères ne pourront probablement pas être utilisés pour la suite des manipulations de recombinaison.

Les résultats du séquençage du dimère 88.3.5 sont quant à lui bien meilleurs. Les deux monomères sont en effet présents et forment le dimère. Quelques mutations existent, notamment au niveau de l'amorce hPLMVd (15 mutations). On remarque ainsi une mutation des trois premiers nucléotides de l'amorce hPLMVd (CCC>ATG) et l'insertion de 8 nucléotides entre les nucléotides 13 et 14 par rapport à la séquence de référence. Dix mutations sont également observables au long de la

séquence. L'insertion présente dans les 20 premiers nucléotides risque de poser problème pour la détection des recombinants car nous ne connaissons pas son influence sur la structure du PLMVd.

Le séquençage du variant 88.3.8 a montré la présence d'un dimère complet mais muté en de nombreuses positions (27 mutations). Comme pour les autres variants, l'amorce hPLMVd apparaît particulièrement mutée (16 mutations).

## **1.8 Discussion.**

Les taux de mutation observés durant ces expérimentations est globalement plus élevé que celui observé par Fekih Hassen *et al* (2007) en travaillant sur des monomères de PLMVd. Le taux de mutations qu'ils avaient mis en évidence était de l'ordre de 0,3%. Cependant, il est important de signaler que nous travaillons ici sur des dimères et non sur des monomères de PLMVd. Il est donc normal que nous rencontrions davantage de mutations. Mais ces mutations générées par d'éventuelles erreurs lors des amplifications ne permettent pas de justifier une telle différence entre ces deux valeurs.

Nous avons remarqué que la majorité des mutations étaient présentes au niveau de la séquence correspondant à l'amorce hPLMVd du premier monomère de chaque dimère. Ces mutations sont probablement dues à des dégradations de l'amorce. Il sera donc utile de réaliser de nouvelles dimérisations à partir d'autres amorces afin d'éviter toutes répétitions de ces mutations dans les manipulations à venir.

Comme il sera expliqué dans les paragraphes ultérieures, ce sont les mutations situées hors de la région de l'amorce hPLMVd qui nous intéresseront particulièrement (du moins pour la mutagenèse dirigée).

### **1.8.1 La recombinaison**

L'importance qu'il faut apporter à l'étude des phénomènes de recombinaisons tant inter- qu'intra-spécifiques a été détaillée au point 2 de la synthèse bibliographique. Ce type d'étude apportera davantage de connaissances sur l'évolution et la détermination de la pathogénicité des viroïdes et en particulier chez les *Avsunviroidae*. De plus, cette étude n'ayant, à notre connaissance, jamais été menée sur le PLMVd, il s'agit donc ici d'un axe de recherche original.

Le séquençage du dimère des variants Hd8.3 et Hd8.10 a montré une séquence incomplète. Il peut s'agir d'un problème durant la réaction de séquençage (le profil de restriction pour ces mêmes variants montrait en effet la présence de dimères complets). Une amplification des clones correspondant avec les amorces hPLMVd et cPLMVd suivie de la migration du produit PCR sur un gel d'agarose nous permettra de déterminer si ces séquences sont ou non complètes. Dans la négative, un nouveau cycle de dimérisation sera effectué. Dans l'affirmative, un nouveau

séquençage sera réalisé afin de vérifier les séquences de ces dimères.

Pour les variants 88.3.8 et 88.3.5, les mutations observées en grand nombre auront peut-être un effet négatif sur les possibilités de recombinaison. Nous ne connaissons en effet pas les mécanismes et les déterminants moléculaires intervenant dans ce phénomène. Ainsi, la présence de nombreuses mutations pourrait avoir des effets délétères sur la recombinaison de ces variants.

Il est donc trop tôt pour pouvoir affirmer si ces variants seront utilisés pour vérifier les hypothèses de recombinaison: les tests complémentaires cités ci-dessus nous apporteront davantage d'information quant à cette possibilité. Le variant 88.3 devra cependant être dimérisé de nouveau avec de nouvelles amorces hPLMVd.

### **1.8.2 La mutagenèse dirigée.**

La séquence nucléotidique des viroïdes est un élément fondamental dans la formation de leur structure secondaire, dans les caractéristiques de leur gamme d'hôtes et dans l'expression de leur pathogénicité. De nombreuses études ont déjà été menées sur les structures primaires et secondaires des viroïdes et ont permis de mettre en évidence l'existence des structures branchées chez les *Avsunviroidae* et en bâtonnets chez les *Pospiviroidae* (Gora-Sochacka, 2004).

La structure secondaire des *Avsunviroidae* est toujours apparue beaucoup plus complexe que celle des *Pospiviroidae*. Les *Avsunviroidae* et le PLMVd en général apparaissent beaucoup plus branchés avec, notamment, de nombreuses structures tiges-boucles pouvant éventuellement entrer en interaction. Ces structures secondaires sont généralement maintenues par des covariations de séquences (Fekih Hassen *et al.*, 2007). Ceci laisse donc présager de l'importance de ces structures tant du point de vue de la stabilité des viroïdes que de leur répllication ou de leur pathogénicité.

Les mécanismes de pathogénicité et les séquences responsables de tels phénomènes sont encore, à l'heure actuelle, assez peu documentés pour les *Avsunviroidae*. A notre connaissance, seulement deux structures ont pu être mises en relation avec le développement de symptômes chez cette famille de viroïdes. L'une consiste en une insertion de type tige-boucle d'une dizaine de nucléotide chez le PLMVd et d'une structure également en tige boucle mais en particulier de 4 nucléotides formant cette boucle chez le CChMVd. Chez le PLMVd, cette structure n'est pas toujours présente (Flores *et al.*, 2006) et sa présence n'implique pas toujours l'apparition de symptômes particuliers (appelés *peach calico*). Deux types d'insertion ont en effet été décrits: le premier type dont la boucle est riche en uracile et induit une chlorose sévère (*calico*) et le second type, riche en adénines qui n'induit pas de symptômes particuliers (Flores *et al.*, 2006). Malgré l'analyse des séquences de plus d'une centaine de variants connus du PLMVd, aucun autre déterminant de pathogénicité n'a été mis en évidence chez le PLMVd. Or, ce pathogène induit toute une série de symptômes allant de la



mosaïque légère et diffuse à des mosaïques et des chloroses sévères en absence de l'insertion précitée (Flores *et al.*, 2006).

L'étude de ces séquences a cependant permis de mettre en évidence l'existence de différents pseudo-noeuds l'un entre P6b et P7 et l'autre entre les boucles L1 et L11 (Bussière *et al.*, 2000; Fekih Hassen *et al.*, 2007). Ces interactions semblent maintenues par des covariations de séquence ce qui laisse supposer qu'elles sont d'une grande importance pour la stabilité du PLMVd notamment en ce qui concerne le pseudo-noeud entre L1 et L11 qui semble fermer le domaine de réplication (Fekih Hassen *et al.*, 2007).

Les déterminants de la pathogénicité du PLMVd sont probablement davantage à rechercher dans l'établissement de structures secondaires particulières et dans l'interaction du viroïde avec d'éventuelles protéines.

Ainsi, la mutagenèse dirigée de ces régions particulières en pseudo-noeuds (dont résultera leur déstabilisation) va probablement nous en apprendre davantage sur leur(s) rôle(s) dans la stabilité, la réplication voire peut-être dans la pathogénicité du PLMVd.

On comprend dès lors l'importance de réaliser les amplifications PCR avec la Pfu DNA polymérase. Cette dernière a permis d'obtenir des produits PCR à bouts francs délimités par les amorces hPLMVd et cPLMVd contrairement aux Taq DNA polymérases classiques qui ajoutent une queue Poly-A aux extrémités 3' et sont dépourvues d'activité *proofreading* garantissant le respect de la séquence servant de modèle. En effet, on remarque que le taux de mutation calculé pour la séquence amplifiée durant la mutagenèse dirigée est inférieur à 0,6% ce qui correspond à un maximum deux mutations dans cette séquence. Ceci nous a donc permis de limiter la présence de mutations, dans les séquences utiles, qui pourraient modifier sinon la structure du variant de PLMVd étudié peut-être sa pathogénicité.

Bien que des mutations aient été relevées dans les séquences des dimères obtenus, celles-ci ne devraient pas poser de problème. En effet, la majorité d'entre elles est située au niveau de l'amorce hPLMVd du premier monomère du moins en ce qui concerne les variants 124.4.3, 124.4.9 et 151.1.9.

De plus, l'analyse des séquences devant servir durant la mutagenèse dirigée (cf figure 20) a montré que le taux de mutation de ces séquences était très proche de celui observé par Fekih *et al* (2007). Ces mutations ont été considérées, par ces auteurs, comme inhérentes aux manipulations réalisées. De plus, ces mêmes auteurs supposent également que ces mutations ponctuelles n'ont pas d'influence sur la pathogénicité des variants de PLMVd. Aucune mutation ponctuelle de la séquence des variants du PLMVd n'a pu être mise en relation avec une modification de la pathogénicité du PLMVd dans la littérature. Les mécanismes influençant leur pathogénicité semblent en effet plus

complexes que la simple variation de quelques nucléotides tout au long de leur séquence. Nous pouvons donc également supposer que ces mutations ponctuelles n'influenceront pas la pathogénicité des variants obtenus.

En conclusion, les dimères que nous avons obtenus suite aux manipulations réalisées pourront être utilisés de façon à réaliser la mutagenèse dirigée du pseudo-noeud P8 ainsi que du pseudo-noeud situé entre L1 et L11. Une attention toute particulière sera toutefois accordée au respect de la séquence des dimères mutés obtenus. Nous choisirons les dimères ayant subi le moins de mutations afin de réaliser la transcription *in vitro* ainsi que les inoculations subséquentes.

## 2 Mise au point de la cDNA-AFLP.

### 2.1 Mise au point de la technique.

#### 2.1.1 Extraction d'ARN et vérification de la qualité de l'ARN.

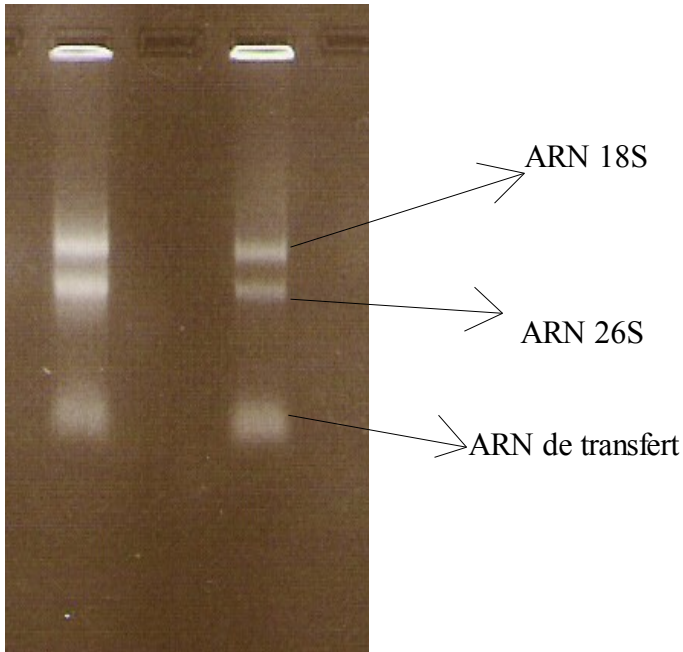
Cette extraction a été réalisée sur une plante positive pour la détection du PLMVd. Quatre répétitions de l'extraction ont été faites de façon à assurer la disponibilité d'une quantité suffisante d'ARN. L'extraction a été réalisée à l'aide du tampon Qiazol en suivant les recommandations du fournisseur. Une légère modification du protocole a cependant été réalisée. Ainsi, la précipitation des acides nucléiques a été réalisée dans un millilitre d'éthanol absolu glacé en présence de 50µl d'acétate de sodium 3M (pH5,2) (au lieu d'une précipitation dans l'isopropanol).

La figure 21 montre le résultat de la migration d'une aliquote de deux répétitions de l'extraction sur gel d'agarose. On peut y observer les deux bandes d'ARN ribosomique ainsi que l'ARN de transfert, laissant présager un ARN sans dégradation. Cet ARN a donc été utilisé dans la suite des manipulations. Le rendement de ces extractions est en moyenne de 30,2µg par extraction ce qui est suffisant pour réaliser la cDNA-AFLP. Cependant, la pureté de ces extractions était faible ( $D.O.260/D.O.280nm < 1,7$ ) en raison de la présence de phénol dans les extraits d'ARN. Afin d'améliorer cette pureté, une purification des extractions a été réalisée à l'aide du *RNeasy MinElute Cleanup kit* de Qiagen. Le tableau 8 présente les quantités d'ARN purifié et les rapports de densité optique mesurés après la purification. Cette purification a été réalisée en regroupant les quatre extractions d'ARN deux par deux. Bien que cette technique permette l'élimination de tous résidus de tampon d'extraction, elle s'accompagne également d'une perte d'ARN. Cette purification de l'ARN a également induit l'exclusion des molécules d'ARN inférieures à 200 nucléotides, concentrant les extractions en ARN messenger.

Tableau 8: Quantification et pureté des extractions d'ARN. La pureté est donnée par le rapport  $D.O.260nm/D.O.280nm$

Echantillons	Quantité d'ARN purifié (µg/ech.)	260/280
A	10,4	2,12
B	4,6	2,03

Figure 21: Migration de deux extractions d'ARN. On peut observer les bandes d'ARN ribosomique 18S et 26S ainsi que la bande correspondant aux ARN de transfert.



### 2.1.2 Rétrotranscription de l'ARN en ADNc.

La rétrotranscription de l'ARN en ADNc a été réalisée comme indiqué au point X du matériel et méthode. Après la rétrotranscription, l'ADNc double brin obtenu a été digéré par un couple d'enzymes de restriction.

### 2.1.3 optimisation de différents paramètres de l'AFLP.

#### 2.1.3.1 Digestion de l'ADNc par un couple d'enzyme.

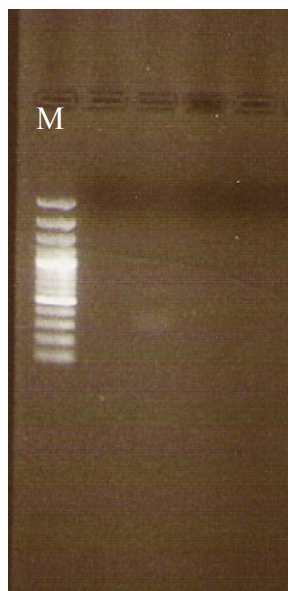
Le couple d'enzymes de restriction utilisé est le couple EcoRI/MseI. La digestion a été réalisée en suivant les recommandations du kit d'AFLP. Un témoin positif (de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana*) a été utilisé comme témoin externe pour contrôler la réalisation des étapes ultérieures.

### 2.1.3.2 La pré-amplification.

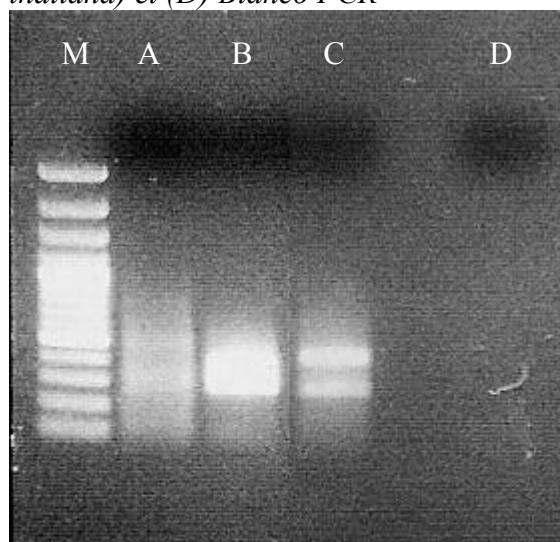
La pré-amplification a été réalisée avec les amorces EcoRI et MseI qui s'hybrident spécifiquement à leurs adaptateurs respectifs.

La première PCR de pré-amplification comportait 20 cycles. Comme on peut le voir sur la figure 22, aucun produit pré-amplifié n'était détectable. Ceci est probablement dû au nombre de cycles peu importants effectués. Afin de s'en assurer, une seconde pré-amplification des mêmes échantillons a été réalisée en augmentant le nombre de cycles PCR à 40 cycles.

*Figure 22: Migration du produit de pré-amplification après 20 cycles PCR. (M) Marqueur*



*Figure 23: Migration du produit de pré-amplification après 40 cycles PCR. (M) Marqueur (A) et (B) ADNC de pêche, (C) Témoin positif (ADNC d'Arabidopsis thaliana) et (D) Blanco PCR*



Comme on peut le voir sur la figure 23, tous les échantillons ont été pré-amplifiés: (A) et (B) correspondent à des extraits d'ARN pré-amplifiés, l'échantillon (C) au témoin positif de digestion utilisé dans le kit d'AFLP et l'échantillon (D) correspond à un blanco PCR. Il semble donc qu'aucune contamination ne soit survenue durant l'amplification proprement dite. Le nombre de fragments amplifiés est important. Le smear visible dans chacun des puits est dû à ce nombre important. Le produit de pré-amplification a donc été utilisé pour réaliser l'amplification sélective. Les deux bandes visibles dans les échantillons A, B et C correspondent probablement à de l'ARN ribosomique rétrotranscrit.

On remarque d'ores et déjà une différence d'intensité de pré-amplification entre les échantillons A et B. Ceci provient peut-être d'une différence de rétrotranscription ou de digestion entre les deux

échantillons. Certaines fragments semblent avoir subi une amplification plus importante dans l'échantillon B et nous observons d'ailleurs un profil type de saturation de la PCR.

Les deux pré-amplifications ont été utilisées pour l'amplification sélective. En effet, malgré l'absence de détection de produits pré-amplifiés avec le premier protocole, il est probable que ces produits existent. De plus, la seconde pré-amplification semble saturée et pourrait compromettre les résultats de l'amplification sélective. En effet, si un nombre trop important de cycle PCR est réalisé durant la préamplification, l'abondance relative des fragments d'ADNc peut être modifiée d'un échantillon à l'autre suite à un effet de saturation.

### **2.1.3.3 Choix, marquage des amorces sélectives.**

Trois couples d'amorces sélectives ont été sélectionnés en fonction des résultats obtenus lors de réalisation d'amplifications sélectives sur de l'ADNc digéré obtenu à partir d'extrait d'ARN de pommier (Aldaghi M, 2007 communication personnelle). Celles-ci ont en effet permis d'obtenir un nombre de fragment suffisamment élevé de fragments amplifiés sans pour autant compromettre leur séparation sur gel de polyacrylamide.

Ainsi, les couples E-TG/M-ATT, E-TG/M-ATA et E-TC/M-GT ont été sélectionnés et l'amplification sélective a été menée sur l'échantillon A et sur le témoin positif. L'amorce E de chaque couple a été marquée au phosphore 33.

### **2.1.3.4 Amplification sélective.**

La figure 24 montre les profils obtenus après migration des produits d'amplification sélective avec le couple d'amorce E-TC/M-GT.

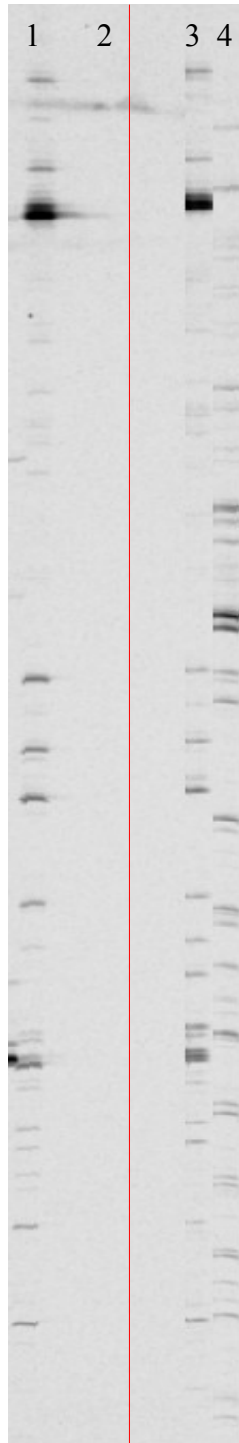
Comme on peut le voir sur la figure 24, l'échantillon A et le témoin positif ont permis d'obtenir des profils d'AFLP. Le témoin positif n'est cependant observé que pour l'amplification sélective du produit de pré-amplification de 40 cycles. A l'opposé, l'échantillon A est quant à lui observé pour l'amplification sélective des deux pré-amplifications (20 cycles et 40 cycles). Le tableau 9 présente le nombre de bandes observées pour le témoin positif et pour les échantillons A et B. On remarque que le nombre de bandes après 40 cycles a été plus importants tant pour le témoin positif que pour les extraits de pêchers. Le nombre de bandes observé dans l'échantillon B est quant à lui très faible.

La figure 24 montre le résultat de la migration sur gel de polyacrylamide du produit d'amplification de l'échantillon A et du témoin positif utilisé durant la manipulation. On remarque bien que les bandes observées étaient plus nombreuses et plus intenses après 40 cycles de pré-amplification (figure 24). Par contre, les bandes présentent pour l'échantillon B étaient moins intenses (résultats non montrés).

Tableau 9: Nombre de bandes observées au terme de l'AFLP pour les deux produits de pré-amplification (20 cycles et 40 cycles)

Echantillons	20 Cycles PCR			40 Cycles PCR		
	ETG/MATA	ETG/MATT	ETC/MGT	ETG/MATA	ETG/MATT	ETC/MGT
A	0	9	23	18	29	29
B	0	2	0	9	9	9
Témoin (+)	0	0	0	44	44	44

Figure 24: Migration des produits d'amplification sélective de l'échantillon A avec le couple E-TC/M-GT sur gel de polyacrylamide 5%. A gauche du repère: échantillons pré-amplifiés par 20 cycles PCR; a droite: échantillons pré-amplifiés par 40 cycles PCR. (1) ADNc de pêcheur, (2) position du Témoin positif, (3) ADNc de pêcheur et (4) Témoin positif.





## **2.2 Choix du modèle de comparaison.**

### **2.2.1 Introduction.**

La cDNA-AFLP permet d'identifier des gènes sans aucune connaissance génétique préalable. Cette identification reste cependant limitée à des gènes montrant une expression différentielle dans les conditions de l'étude. Le choix d'un modèle de comparaison revêt donc une très grande importance dans la pertinence des résultats obtenus.

### **2.2.2 Les différents modèles de comparaisons.**

Différents modèles peuvent être envisagés lors de l'étude de l'expression différentielle de gènes d'une plante infectée par un viroïde: ainsi, on peut réaliser les observations (i) au niveau de plantes infectées par des variants de pathogénicité différente, (ii) au niveau de plants de variétés différentes inoculées par un même variant, (iii) au niveau d'une plante saine et d'une plante infectée ou encore (iv) au niveau de feuilles symptomatiques et asymptomatiques d'une même plante infectée par un variant précis.

A notre connaissance, les deux études d'expression différentielle des gènes menées chez les viroïdes utilisent un modèle de comparaison dans lequel l'expression des gènes d'une plante hôte est comparée après l'inoculation de variants de pathogénicité différente. Ainsi, L'équipe de Yijun Qi (2006) a étudié l'expression de gènes de plants de tomates infectés par un variant sévère et un variant intermédiaire. De même, l'équipe d'Itaya (2002) a mis en évidence la modification de l'expression de 55 gènes de plants de tomates infectés par des variants de pathogénicité différentes.

De plus, les études menées sur des variétés différentes s'avèrent beaucoup plus complexes en raison du manque de données disponibles quant à la pathogénicité du PLMVd vis-à-vis de ces dernières ou quant à la résistance (totale ou partielle) de certaines variétés vis-à-vis du viroïde. En effet, les études de pathogénicité menées sur le PLMVd sont essentiellement menées sur les plants de la variété indicatrice GF-305. Cette dernière est extrêmement sensible et permet le développement rapide de symptômes (Llacer, 1998). Enfin, le délai entre l'inoculation et l'apparition de symptômes peut varier de quelques mois à une année en fonction des variants et des variétés utilisées (Flores et al., 2006; Parisi, 2006). Il nous était donc difficile d'envisager un modèle de comparaison incluant différentes variétés.

Par ailleurs, la plupart des études de l'expression différentielle de gènes réalisées sur des plantes infectées par des virus comparent l'expression des gènes entre une plante saine et une plante infectée ou entre une plante sensible et une plante résistante. Ceci a déjà permis de mettre en évidence un certain nombre de gènes impliqués dans les relations hôte-pathogène (Schurdi-Levraud Escalettes *et al.*, 2006; Birch *et al.*, 2000). Cependant, à notre connaissance, il n'existe pas de plants

de pêcheurs résistants au PLMVd. Ce dernier type de modèle de comparaison ne peut donc être envisagé dans nos conditions.

En outre, nous disposions, à l'Unité de Phytopathologie, de plants de pêcher GF-305 inoculés depuis plus d'un an par des variants dont la pathogénicité avait été caractérisée dans des travaux précédents (Parisi, 2006). D'autres plants inoculés à la même époque ont également développé des symptômes allant de la mosaïque à la chlorose au cours de cette année. Ils ont bien évidemment été retenus pour la réalisation d'extractions d'ARN total préalables à la réalisation de la cDNA-AFLP.

Nous disposions, parmi ces plantes inoculées, de plants montrant une distribution spatiale hétérogène de leurs symptômes: certaines feuilles étant symptomatiques, d'autres non. Des études menées sur le ASBVd et le PLMVd (Marakarian *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006) ont montré que les symptômes n'étaient pas présents de façon uniforme sur les plantes infectées alors que les infections sont systémiques. Globalement, les viroïdes se retrouvent dans la totalité de la plante sans pour autant provoquer l'expression de symptômes de façon uniforme. L'étude de l'expression différentielle de gènes entre des feuilles infectées non symptomatiques et des feuilles infectées symptomatiques s'avère donc importante pour la caractérisation des relations hôte-pathogène.

Au vu de ces disponibilités techniques et des opportunités qui se présentaient, nous avons opté pour une comparaison incluant une plante saine, une plante asymptomatique et une plante symptomatique. Cependant, d'autres objets ont été sélectionnés afin, si le temps le permet, de tester les autres modèles de comparaisons. Dans ce cadre, l'étude de l'expression différentielle de gènes au niveau de parties symptomatiques et asymptomatiques d'une même plante serait privilégiée en raison de sa plus grande originalité.

## **2.3 Extraction de l'ARN total des objets choisis pour la cDNA-AFLP.**

### **2.3.1 Choix des objets.**

Conformément aux modèles de comparaisons choisis dans l'étude de l'expression différentielle de gènes, différents objets ont été sélectionnés et leur ARN total a été extrait.

Ainsi, les variants retenus ont été les suivants: (i) 377.1.2 qui présente une chlorose généralisée du feuillage, (ii et iii) 240.4.1 dont la plante inoculée par ce variant présente des régions symptomatiques et des régions asymptomatiques. Chacune des zones a été prélevée et constitue un objet à part entière, (iv) 369.3.3.3 qui induit une mosaïque faible et 210.1.2.4 qui provoque une infection asymptomatique. Enfin, l'ARN total d'une plante saine a également été extrait.

Afin de s'assurer de la présence du PLMVd dans les objets sélectionnés, un test de détection spécifique par RT-PCR a été réalisé comme décrit précédemment (Parisi, 2006).

### 2.3.2 Extractions.

Le tableau 10 présente les résultats des extractions d'ARN de ces objets. Il est important de signaler que les aliquotes utilisées pour cette lecture spectrophotométrique n'ont pas été purifiées à l'aide du *Rneasy MinElute Cleanup kit* (Qiagen).

*Tableau 10: Résultats des extractions d'ARN des objets qui seront utilisés pour réaliser la cDNA-AFLP. La pureté des extractions est donnée par le rapport D.O.260nm/D.O.280nm*

<b>Echantillons</b>	<b>Quantité d'ARN extrait (µg/éch.)</b>	<b>260/280</b>
Plante saine	153,7	1,82
210.1.2.4	398,1	1,34
369.3.3.3	510	1,97
240.4.1 Asymptomatique	805,3	2,01
240.4.1 Symptomatique	260,3	2,08
377.1.2	1139	2,00

Comme on peut le voir, des quantités d'ARN suffisantes ont été extraites. La pureté des extractions est globalement satisfaisante (les rapports de densité optique D.O.260nm/D.O.280nm étant compris entre 1,8 et 2) excepté pour l'échantillon 210.1.2.4 qui présente un rapport de densité optique inférieure aux valeurs optimales.

### 2.4 Discussion.

L'extraction au Qiazol a nécessité une purification sur colonne avant d'être utilisée pour réaliser la rétrotranscription afin d'éliminer les contaminations dues au phénol. Les rapports de densité optiques (D.O.260nm/D.O.280nm) obtenus suite à cette purification sont compris entre les valeurs optimales soit entre 1,8 et 2,2.

Après la digestion des ADNc et la ligation des adaptateurs, ces derniers ont servi de sites d'hybridation pour les amorces EcoRI et MseI. Ceci a permis d'amplifier les fragments obtenus par digestion sans nécessité de disposer d'informations sur leur séquence. Ainsi, tous les fragments possédant les deux adaptateurs peuvent être pré-amplifiés. Ensuite, ils pourront être amplifiés en utilisant tous les couples d'amorces sélectives possibles.

Un premier protocole de pré-amplification a été testé. Ce dernier comprenait 20 cycles PCR. Aucun produit n'était visible sur le gel après migration sur gel d'agarose. L'expérience a cependant déjà montré que les produits de pré-amplification ne sont pas toujours visibles sur gel d'agarose après 20 cycles (Aldaghi M, 2007 Lassois L, 2007 communications personnelles). Toutefois, afin

de vérifier que cette « absence » de produits pré-amplifiés ne soit pas due à une erreur de manipulation, deux nouvelles pré-amplifications ont été réalisées avec 20 et 40 cycles PCR. Un profil a été obtenu après 40 cycles. Néanmoins, l'utilisation de 40 cycles augmente le risque d'arriver en phase plateau de la PCR et donc de créer des modifications dans les quantités relatives des différentes cibles. Ainsi, il sera nécessaire de déterminer le nombre de cycles adéquat lors des manipulations ultérieures. Les échantillons ayant été pré-amplifiés avec 20 et 40 cycles ont été utilisés pour réaliser l'amplification sélective.

La figure 24 correspond à la révélation de la radioactivité après migration des échantillons amplifiés sélectivement avec un couple d'amorces décrit précédemment. Le nombre de bandes obtenues est relativement faible pour les échantillons pré-amplifiés avec 20 cycles PCR (tableau 9). On peut supposer que seuls les fragments prédominants ont été révélés suite à cette manipulation. Par contre, un nombre plus important de bandes a été observé pour les échantillons pré-amplifiés avec 40 cycles PCR. La figure 24 nous permet d'observer 24 bandes (après une pré-amplification de 20 cycles PCR) Ces mêmes bandes sont également visibles, avec 5 bandes supplémentaires, pour les échantillons pré-amplifiés par 40 cycles PCR. Suivant la littérature, le nombre moyen de fragments amplifiés sélectivement est de 50. Cependant, ce dernier peut être compris entre 10 et 100 (Bachem *et al.*, 1998) suivant le nombre de nucléotides ajoutés aux amorces sélectives et suivant la complexité du génome.

Le nombre de cycles de pré-amplification doit encore être optimisé afin de ne pas saturer les échantillons et compromettre les résultats de la cDNA-AFLP. Pour ce faire, les résultats de pré-amplification comportant un nombre de cycles PCR différents, compris entre 20 et 40 seront analysés sur gel d'agarose. Le nombre de cycles PCR le plus élevé permettant une amplification sans saturation sera sélectionné pour réaliser les pré-amplifications ultérieures. Le nombre de 40 cycles sera considéré comme un maximum en raison du profil saturé qu'il a déjà montré (figure 23).

La reproductibilité de la manipulation devra être étudiée par la suite de façon rigoureuse. Seules deux répétitions d'un échantillon traité dans les mêmes conditions pourront nous apporter la certitude de la reproductibilité. Une fois cette reproductibilité acquise, nous pourrions tester d'autres couples d'amorces.

Différents couples d'amorces seront en effet utilisés dans les manipulations ultérieures. Ceci permettra de sélectionner les couples susceptibles de donner les profils d'AFLP les plus intéressants pour les futures analyses.

Les objets choisis pour réaliser la cDNA-AFLP correspondent à des plantes infectées par des variants de pathogénicité différentes provoquant des mosaïques, des chloroses plus ou moins sévères sur tout ou une partie du feuillage, un des objets correspond à une plante infectée par un

variant asymptomatique et un des objets est une plante saine. Ces objets vont nous permettre d'éprouver les différents modèles de comparaison sélectionnés.

Nous pensons ainsi pouvoir apporter davantage d'informations en ce qui concerne les relations hôte-pathogène entre le PLMVd et les plants de pêcher.

## Conclusion et perspectives.

Les travaux menés par Fekih Hassen *et al.* (2006 et 2007) à l'Unité ont permis de mettre en évidence l'existence de différents groupes phylogénétiques permettant de classer les différents variants du PLMVd. Ces études ont également mis en évidence l'existence de structures secondaires en pseudo-noeuds potentiellement impliquées dans la pathogénicité ou la réplication du PLMVd. D'autre part, l'analyse des séquences de 119 nouveaux variants menée durant ces études semble indiquer que des phénomènes de recombinaisons entre les variants des groupes II-A et II-C et entre les variants Hd6 et Hd8 auraient mené respectivement à la formation du groupe II-B et du groupe I.

Enfin, la caractérisation de la pathogénicité de différents variants du PLMVd a également été réalisée à l'Unité (Parisi, 2006).

La vérification de l'hypothèse de recombinaison pourrait nous en apprendre davantage sur les mécanismes d'évolution de ce viroïde. De même, la déstabilisation des structures en pseudo-noeud du PLMVd nous apportera probablement des informations concernant leur importance ou leur(s) rôle(s) dans la détermination de la pathogénicité (encore très mal connue chez ce viroïde) et/ou la réplication.

Ainsi, dans la continuité de ces travaux, nous avons décidé d'une part de créer différents variants afin de vérifier ces hypothèses de recombinaison et de déterminer l'importance des pseudo-noeuds dans la réplication et/ou la pathogénicité des viroïdes et d'autre part, nous avons sélectionné des amorces utiles à ces travaux. De plus, la mise au point de la cDNA-AFLP a été effectuée afin de pouvoir caractériser les relations hôte-pathogène entre le PLMVd et le pêcher.

Les variants 151.1 (sévère) et 124.4 (latent) ont été dimérisés avec succès. En effet, les taux de mutations des portions de séquences qui seront effectivement utilisées durant la mutagenèse dirigée ayant été préalablement jugés acceptables par Fekih Hassen *et al.* (2007), nous pourrions donc utiliser ces dimères dans la suite des manipulations.

Dès que nous aurons vérifié la taille exacte des dimères des variants choisis pour vérifier les hypothèses de recombinaisons, les variants manquants ou incomplets et fortement mutés seront dimérisés avec de nouvelles amorces. L'obtention de ces nouveaux variants nous permettra d'effectuer la transcription *in vitro* et les inoculations nécessaires à la vérification de ces hypothèses.

La seconde partie de ce travail visait à mettre au point la cDNA-AFLP afin d'être en mesure de caractériser les relations hôte-pathogène existant entre le PLMVd et le pêcher. Les résultats de la cDNA-AFLP seront comparés à l'étude des profils de miRNA réalisée (sur les mêmes extraits de pêcher) par l'équipe du Pr Perreault à l'Université de Sherbrooke. A cette fin, des extraits d'ARN

d'une plante saine, d'une plante infectée asymptomatique, d'une plante infectée symptomatique ont été réalisés et envoyés au Canada. Cette collaboration nous permettra très certainement de mettre en évidence des relations hôte-pathogène entre le PLMVd et le pêcher. Cette caractérisation sera effectuée sur des plants inoculés par des variants dont la pathogénicité a été caractérisée précédemment (Parisi, 2006).

Le principal modèle de comparaison retenu en collaboration avec l'équipe du Prof. Perreault vise à comparer l'expression différentielle de gènes entre une plante infectée symptomatique, une plante infectée asymptomatique et une plante saine. D'autres modèles pourront cependant être testés si le temps le permet.

Une étape cruciale dans la réalisation de la cDNA-AFLP est l'extraction de l'ARN total des objets. Une méthode d'extraction rapide utilisant du tampon Qiazol a été adaptée avec succès à nos conditions. Une purification sur colonne des extraits a cependant été nécessaire afin d'éliminer toutes les impuretés présentes avec l'ARN extrait.

Après l'obtention de cet ARN de bonne qualité, nous avons réalisé les différentes étapes de la cDNA-AFLP. Ceci nous a permis d'obtenir un premier profil d'AFLP pour un témoin positif composé d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* et pour un échantillon d'ADNc de pêcher. La pré-amplification devra encore être optimisée et la reproductibilité de la manipulation devra être vérifiée. Ensuite, d'autres couples d'amorces seront testés et les profils les plus intéressants seront utilisés pour réaliser l'analyse de l'AFLP.

L'étude de l'importance des interactions en pseudo-noeud sur la pathogénicité et/ou la réplication du PLMVd n'a pas encore été réalisée. Ceci pourra probablement nous permettre d'en savoir davantage sur l'importance de la structure des *Avsunviroidae*. De plus, l'étude des recombinaisons est, à l'heure actuelle, très développée dans le monde des virus. Ceci a déjà permis de mettre en évidence l'importance de ce phénomène dans l'évolution des populations virales. Du point de vue des viroïdes, il apparaît aujourd'hui, grâce au nombre croissant de séquences répertoriées, que les recombinaisons semblent jouer un rôle au moins aussi important que les mutations dans l'évolution de ces pathogènes.

Ainsi, nous espérons que l'étude des structures en pseudo-noeud, des recombinaisons et de l'expression différentielle de gènes nous permettront de caractériser les mécanismes, inconnus à l'heure actuelle, impliqués dans la pathogénicité des *Avsunviroidae* ou en tout cas du PLMVd.

# Annexes

## 1 *Protocoles utilisés.*

### 1.1 Protocole du Genejet Plasmid miniprep kit (Fermentas).

- All purification steps should be carried out at room temperature.
- All centrifugations should be carried out in a table-top microcentrifuge at  $>12000 \times g$  (10 000-14 000rpm, depending on the rotor type).

Use 1-5ml of E. coli culture in LB media for purification of high-copy plasmids.

For low-copy plasmids use up to 10ml of culture.

#### Step Procedure

1 Resuspend the pelleted cells in 250 $\mu$ l of the Resuspension Solution.

Transfer the cell suspension to a microcentrifuge tube. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

2 Add 250 $\mu$ l of the Lysis Solution and mix thoroughly by inverting the tube 4-6 times until the solution becomes viscous and slightly clear.

Note: Do not vortex to avoid shearing of chromosomal DNA. Do not incubate for more than 5min to avoid denaturation of supercoiled plasmid DNA.

3 Add 350 $\mu$ l of the Neutralization Solution and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4-6 times.

Note: It is important to mix thoroughly and gently after the addition of the Neutralization Solution to avoid localized precipitation of bacterial cell debris. The neutralized bacterial lysate is cloudy and viscous.

4 Centrifuge for 5min to pellet cell debris and chromosomal DNA.

5 Transfer the supernatant to the supplied GeneJET™ spin column by decanting or pipetting. Avoid disturbing or transferring the white precipitate.

6 Centrifuge for 1min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.

Note: Do not add bleach to the flow-through, see p.3 for Safety Information.

7 Add 500 $\mu$ l of the Wash Solution (diluted with ethanol prior to first use as described on p.3) to the GeneJET™ spin column. Centrifuge for 30-60 seconds and discard the flow-through. Place the column back into the same collection tube.

8 Repeat the wash procedure (step 7) using 500 $\mu$ l of the Wash Solution.



9 Discard the flow-through and centrifuge for an additional 1min to remove residual Wash Solution. This step is essential to avoid residual ethanol in plasmid preps.

10 Transfer the GeneJET™ spin column into a fresh 1.5ml microcentrifuge tube (not included). Add 50µl of the Elution Buffer to the center of GeneJET™ spin column membrane to elute the plasmid DNA. Take care not to contact the membrane with the pipette tip. Incubate for 2min at room temperature and centrifuge for 2min.

Note: An additional elution step (optional) with Elution Buffer or water will recover residual DNA from the membrane and increase the overall yield by 10-20%.

11 Discard the column and store the purified plasmid DNA at -20°C.

## 1.2 Protocole du QIAEXII Gel extraction kit (QIAGEN)

This protocol is designed for the extraction of 40-bp to 50-kb DNA fragments from 0.3–2% standard or low-melt agarose gels in TAE or TBE buffers.

Notes: • The yellow color of Buffer QX1 indicates a pH  $\leq 7.5$ .

- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- A heating block or water bath at 50°C is required.
- 3M sodium acetate, pH 5.0, may be necessary.
- All centrifugation steps are at maximum speed ( $\geq 10,000 \times g$ ,  $\sim 13,000$  rpm) in a conventional, table-top microcentrifuge.
- For DNA fragments larger than 10 kb, mix by gently flicking the tube to avoid shearing the DNA.

Do not vortex the tube.

1. Excise the DNA band from the agarose gel with a clean, sharp scalpel.

Minimize the size of the gel slice by removing excess agarose. Use a 1.5-ml microfuge tube for processing up to 250 mg agarose.

2. Weigh the gel slice in a colorless tube. Add 3 volumes of Buffer QX1 to 1 volume of gel for DNA fragments 100 bp – 4 kb; otherwise, follow the table below.

For example, add 300 µl of Buffer QX1 to each 100 mg of gel.

DNA fragments <100 bp Add 6 volumes of Buffer QX1

DNA fragments >4 kb Add 3 volumes of Buffer QX1 plus 2 volumes of H<sub>2</sub>O

>2% or Metaphor agarose gels Add 6 volumes of Buffer QX1

3. Resuspend QIAEX II by vortexing for 30 sec. Add QIAEX II to the sample according to the table below and mix.

$\leq 2$  µg DNA Add 10 µl of QIAEX II

2–10 µg DNA Add 30 µl of QIAEX II

Each additional 10 µg DNA Add additional 30 µl of QIAEX II

4. Incubate at 50°C for 10 min to solubilize the agarose and bind the DNA. Mix by vortexing\* every 2 min to keep QIAEX II in suspension. Check that the color of the mixture is yellow.

If the color of the mixture is orange or purple, add 10 µl 3M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color should turn to yellow. The incubation should then be continued for an additional 5 min at least.

The adsorption of DNA to QIAEX II particles is only efficient at  $\text{pH} \leq 7.5$ . Buffer QX1 now contains a pH indicator which is yellow at  $\text{pH} \leq 7.5$ , and orange or violet at higher pH, allowing easy determination of the optimal pH for DNA binding.

5. Centrifuge the sample for 30 sec and carefully remove supernatant with a pipet.

6. Wash the pellet with 500 µl of Buffer QX1.

Resuspend the pellet by vortexing\*. Centrifuge the sample for 30 sec and remove all traces of supernatant with a pipet. This wash step removes residual agarose contaminants.

7. Wash the pellet twice with 500 µl of Buffer PE.

Resuspend the pellet by vortexing\*. Centrifuge the sample for 30 sec and carefully remove all traces of supernatant with a pipet. These washing steps remove residual salt contaminants.

8. Air-dry the pellet for 10–15 min or until the pellet becomes white.

If 30 µl of QIAEX II suspension is used, air-dry the pellet for approximately 30 min. Do not vacuum dry, as this may cause overdrying. Overdrying the QIAEX II pellet may result in decreased elution efficiency.

9. To elute DNA, add 20 µl of 10 mM Tris·Cl, pH 8.5 or H<sub>2</sub>O and resuspend the pellet by vortexing\*. Incubate according to the table below.

DNA fragments  $\leq 4$  kb Incubate at room temp. for 5 min

DNA fragments 4–10 kb Incubate at 50°C for 5 min

DNA fragments  $> 10$  kb Incubate at 50°C for 10 min

Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water for elution, make sure that the pH is within this range, and store DNA at –20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0) but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

10. Centrifuge for 30 sec. Carefully pipet the supernatant into a clean tube.

The supernatant now contains the purified DNA.

11. Optional: repeat steps 9 and 10 and combine the eluates.

A second elution step will increase the yield by approximately 10–15%.

*\* For fragments larger than 10 kb, resuspend the pellet by inverting and flicking the tube.*

*Vortexing can cause shearing of large DNA fragments.*

### **1.3 Protocole du QIAquick PCR Purification kit**

using a microcentrifuge

This protocol is designed to purify single- or double-stranded DNA fragments from PCR and other enzymatic reactions (see page 8). For cleanup of other enzymatic reactions, follow the protocol as described for PCR samples or use the MinElute Reaction Cleanup Kit. Fragments ranging from 100 bp to 10 kb are purified from primers, nucleotides, polymerases, and salts using QIAquick spin columns in a microcentrifuge. Important points before starting

- The yellow color of Buffer PBI indicates a pH  $\leq 7.5$ .
- Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).
- All centrifugation steps are carried out at 17,900 x g (13,000 rpm) in a conventional tabletop microcentrifuge at room temperature.
- If the purified PCR product is to be used in sensitive microarray applications, it may be beneficial to use Buffer PB instead of Buffer PBI, please contact QIAGEN

#### Procedure

1. Add 5 volumes of Buffer PBI to 1 volume of the PCR sample and mix. It is not necessary to remove mineral oil or kerosene. For example, add 500  $\mu$ l of Buffer PBI to 100  $\mu$ l PCR sample (not including oil).
2. Check that the color of the mixture is yellow (similar to Buffer PBI without the PCR sample). If the color of the mixture is orange or violet, add 10  $\mu$ l of 3 M sodium acetate, pH 5.0, and mix. The color of the mixture will turn to yellow.
3. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.
4. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.
5. Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube. Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.
6. To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.
7. Discard flow-through and place the QIAquick column back in the same tube. Centrifuge the column for an additional 1 min.

**IMPORTANT:** Residual ethanol from Buffer PE will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation.

8. Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.
9. To elute DNA, add 50 µl Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or water (pH 7.0–8.5) to the center of the QIAquick membrane and centrifuge the column for 1 min. Alternatively, for increased DNA concentration, add 30 µl elution buffer to the center of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge.

**IMPORTANT:** Ensure that the elution buffer is dispensed directly onto the QIAquick membrane for complete elution of bound DNA. The average eluate volume is 48 µl from 50 µl elution buffer volume, and 28 µl from 30 µl elution buffer. Elution efficiency is dependent on pH. The maximum elution efficiency is achieved between pH 7.0 and 8.5. When using water, make sure that the pH value is within this range, and store DNA at –20°C as DNA may degrade in the absence of a buffering agent. The purified DNA can also be eluted in TE buffer (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

10. If the purified DNA is to be analyzed on a gel, add 1 volume of Loading Dye to 5 volumes of purified DNA. Mix the solution by pipetting up and down before loading the gel. Loading dye contains 3 marker dyes (bromophenol blue, xylene cyanol, and orange G) that facilitate estimation of DNA migration distance and optimization of agarose gel run time. Refer to Table 2 (page 15) to identify the dyes according to migration distance and agarose gel percentage and type.

## **1.4 Protocole du TA Cloning**

For optimal ligation efficiencies, we recommend using fresh (less than 1 day old) PCR products. The single 3' A-overhangs on the PCR products will be degraded over time, reducing ligation efficiency. Take care when handling the pCR®2.1 vector as loss of the 3' T-overhangs will cause a blunt-end self-ligation of the vector and subsequent decrease in ligation efficiency.

### **Calculating Amount of PCR Product to Use**

Use the formula below to estimate the amount of PCR product needed to ligate with 50 ng (20 fmoles) of pCR®2.1 vector:

$$[(Y \text{ bp PCR product})(50 \text{ ng pCR®2.1 vector}) / (\text{size of the vector: } \sim 3900)] = X \text{ ng PCR product}$$

where X ng is the amount of PCR product of Y base pairs to be ligated for a 1:1 (vector:insert) molar ratio.

In general, 0.5 to 1.0 µl of a typical PCR sample with an average insert length (400- 700 bp) will give the proper ratio of 1:1 (vector:insert). The ratio of 1:1 (vector:insert) gives the best efficiency of ligation. You may wish to do a second ligation reaction at a ratio of 1:3 (vector:insert), if you are

concerned about the accuracy of your DNA concentrations. Do not use more than 2-3  $\mu\text{l}$  of the PCR sample in the ligation reaction as salts in the PCR sample may inhibit the T4 DNA Ligase. Ligation at higher or lower temperatures than 14°C may reduce the ligation efficiency.

Procedure:

1. Centrifuge one vial of pCR®2.1 to collect all the liquid in the bottom of the vial.
2. Determine the volume of PCR sample needed to reach the required amount of PCR product (see above). Use sterile water to dilute your PCR sample if necessary.
3. Set up the 10  $\mu\text{l}$  ligation reaction as follows:
4. Incubate the ligation reaction at 14°C for a minimum of 4 hours (preferably overnight). Proceed to

Transforming Competent Cells

Fresh PCR product X  $\mu\text{l}$

10X Ligation Buffer 1  $\mu\text{l}$

pCR®2.1 vector (25 ng/ $\mu\text{l}$ ) 2  $\mu\text{l}$

Water to a total volume of 9  $\mu\text{l}$

T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units) 1  $\mu\text{l}$

Final volume 10  $\mu\text{l}$

Once you have a ligated your insert into pCR®2.1, you are ready to transform the construct into competent E. coli. One Shot® cells are provided with Catalog nos. K2000-01, K2000-40, K2030-01, K2030-40, K2040-01, K2040-40, K2040-01, and K2040-40 to facilitate transformation. A INV $\alpha$ F' and TOP10 E. coli do not express the lac repressor. You may express your product from pCR®2.1 in the absence of IPTG due to the presence of the lac promoter. IPTG will not have any affect on INV $\alpha$ F' or TOP10 cells. TOP10F' does express the lac repressor (lacIq), which will repress transcription from the lac promoter. To perform blue-white screening for inserts, you must add IPTG to your plates to express LacZ $\alpha$ .

E. coli Host Strain

You may use any recA, endA E. coli strain including TOP10, TOP10F', INV $\alpha$ F', DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>, or equivalent for transformation. Other strains are suitable. If you amplified the PCR product from an ampicillin-resistant plasmid, use kanamycin to select for transformants containing your pCR®2.1 construct. Selecting with kanamycin will prevent contamination of the transformation reaction by the original ampicillin-resistant plasmid.

Equilibrate a water bath to 42°C.

- Bring the S.O.C. medium to room temperature.
- If you are using INV $\alpha$ F' or TOP10 cells, take LB plates containing antibiotic and equilibrate at 37°C for 30 minutes. Spread each plate with 40  $\mu\text{l}$  of 40 mg/ml X-Gal. Let the liquid soak into the

plates.

- If you are using TOP10F' cells, take LB plates containing antibiotic and equilibrate at 37°C for 30 minutes. Spread 40 µl each of 100 mM IPTG and 40 mg/ml X-Gal onto the plates. Let the liquid soak into the plates.

#### One Shot® Transformation Protocol

Follow the protocol below to transform One Shot® Competent Cells. To transform another strain, refer to the manufacturer's instructions.

1. Centrifuge vials containing the ligation reactions briefly and place them on ice.
2. Thaw on ice one 50 µl vial of frozen One Shot® Competent Cells for each transformation.
3. Pipette 2 µl of each ligation reaction directly into the vial of competent cells and mix by stirring gently with the pipette tip.
4. Incubate the vials on ice for 30 minutes. Store the remaining ligation mixtures at -20°C.
5. Heat shock the cells for 30 seconds at 42°C without shaking. Immediately transfer the vials to ice.
6. Add 250 µl of room temperature S.O.C. medium to each vial.
7. Shake the vials horizontally at 37°C for 1 hour at 225 rpm in a shaking incubator.
8. Spread 10 µl to 200 µl from each transformation vial on LB agar plates containing X-Gal and 50 µg/ml of kanamycin or 100 µg/ml ampicillin. Be sure to also include IPTG if you are using TOP10F' cells. We recommend plating 10-50 µl for TOP10F' or TOP10 cells and 50-200 µl for INVαF' cells.

Note: Be sure to plate two different volumes to ensure that at least one plate has wellspaced colonies. For plating small volumes, add 20 µl of S.O.C. to allow even spreading.

9. Incubate plates overnight at 37°C. Shift plates to +4°C for 2-3 hours to allow for proper color development.

## 1.5 Protocole du RNeasy MinElute Cleanup

**This protocol is designed to clean up RNA from enzymatic reactions, for desalting RNA samples,**

and for concentration of RNA isolated by various methods. For concentration of total cellular RNA purified using the PAXgene Blood RNA Kit, see the RNA cleanup protocol on page 13.

#### **Important points before starting**

- A maximum of 45 µg RNA in a maximum starting volume of 200 µl can be used. This amount corresponds to the binding capacity of the RNeasy MinElute Spin Columns. Do not overload the

column. Overloading will significantly reduce yield and purity.

- If working with RNA for the first time, read Appendix A (page 18).
- Generally, DNase digestion is not required since the RNeasy MinElute silicamembrane technology efficiently removes most of the DNA without DNase treatment. However, further DNA removal may be necessary for certain RNA applications that are sensitive to very small amounts of DNA (e.g., TaqMan® or LightCycler® RT-PCR analysis with a low-abundance target). We recommend a DNase digest of the reaction mixture before starting the procedure. The DNase is then removed during the cleanup procedure. (Note: On-column DNase digestion using the RNase-Free DNase Set requires an additional buffer and is not possible with the RNeasy MinElute Cleanup Kit. For RNA cleanup and concentration with integrated on-column DNase digestion, the RNeasy Micro Kit is recommended. See page 28 for ordering information.)
- Buffer RLT may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature.
- Buffer RLT contains a guanidine salt and is therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 6 for safety information. Take appropriate safety measures and wear gloves when handling.
- All steps of the protocol, including centrifugation, should be performed at room temperature. During the procedure, work quickly.
- **Blue** (marked with a ▲ ) denotes amounts for starting volumes  $\leq 100 \mu\text{l}$ ; **red** (marked with a ● ) denotes amounts for starting volumes of 100–200  $\mu\text{l}$ .

### Things to do before starting

- Buffer RPE is supplied as a concentrate. Before using for the first time, add 4 volumes of ethanol (96–100%), as indicated on the bottle, to obtain a working solution.
- Optional: Adding  $\beta$ -ME to Buffer RLT may be helpful when cleaning up crude preps of RNA (e.g., after salting-out methods) or samples that contain large amounts of RNases. Add 10  $\mu\text{l}$  of  $\beta$ -ME per 1 ml of Buffer RLT. Dispense in a fume hood and wear appropriate protective clothing. The solution is stable for 1 month after the addition of  $\beta$ -ME.

### Procedure

- 1. Adjust sample to a volume of ▲ 100  $\mu\text{l}$  or ● 200  $\mu\text{l}$  with RNase-free water. Add ▲ 350  $\mu\text{l}$  or ● 700  $\mu\text{l}$  Buffer RLT, and mix thoroughly.**

If starting with an RNA pellet, be sure that the pellet is dissolved in the Rnase-free water (supplied) before adding Buffer RLT.

**Optional:** Add  $\beta$ -ME to Buffer RLT before use (see “Things to do before starting”).

- 2. Add ▲ 250  $\mu\text{l}$  or ● 500  $\mu\text{l}$  of 96–100% ethanol to the diluted RNA, and mix thoroughly by**

**pipetting. Do not centrifuge. Continue immediately with step 3.**

**3. Apply 700  $\mu$ l of the sample to an RNeasy MinElute Spin Column in a 2 ml collection tube (supplied). Close the tube gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm). Discard the flow-through.**

**For  $\bullet$  samples  $>700 \mu$ l, apply the remaining sample (up to 700  $\mu$ l) and repeat the centrifugation. Discard the flow-through and collection tube.\***

**4. Transfer the spin column into a new 2 ml collection tube (supplied). Pipet 500  $\mu$ l Buffer RPE onto the spin column. Close the tube gently, and centrifuge for 15 s at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to wash the column. Discard the flow-through.**

Reuse the collection tube in step 5.

**Note:** Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see “Things to do before starting”).

**5. Add 500  $\mu$ l of 80% ethanol to the RNeasy MinElute Spin Column. Close the tube gently, and centrifuge for 2 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to dry the silica-gel membrane. Discard the flow-through and collection tube.**

**Note:** Following the centrifugation, remove the RNeasy MinElute Spin Column from the collection tube carefully so the column does not come into contact with the flow-through as this will result in carryover of ethanol.

**6. Transfer the RNeasy MinElute Spin Column into a new 2 ml collection tube (supplied). Open the cap of the spin column, and centrifuge in a microcentrifuge at full speed for 5 min. Discard the flow-through and collection tube.**

To avoid damage to the caps, place the columns into the centrifuge with at least one empty position between each column. Place the caps so that they point in the opposite direction to the rotation of the rotor (i.e., if the rotor rotates in a clockwise direction, orient the caps in a counter-clockwise direction).

It is important to dry the silica-gel membrane since residual ethanol may interfere with downstream reactions. Centrifuging with the caps open ensures that no ethanol is carried over during elution.

**7. To elute, transfer the spin column to a new 1.5 ml collection tube (supplied). Pipet 14  $\mu$ l RNase-free water directly onto the center of the silica-gel membrane. Close the tube gently, and centrifuge for 1 min at maximum speed to elute.**

Smaller volumes of RNase-free water can be used to obtain a higher total RNA concentration, but this will reduce the overall yield. The yield will be approximately 20% less when using 10  $\mu$ l RNase-free water for elution. Elution with less than 10  $\mu$ l may not be enough to sufficiently hydrate the silica-gel membrane and is therefore not recommended.



The dead volume of the RNeasy MinElute Spin Column is 2  $\mu$ l; elution with 14  $\mu$ l of RNase-free water results in an eluate with a volume of 12  $\mu$ l.

**Note:** When performing RT-PCR with RNA isolated using this procedure we recommend using the QIAGEN OneStep RT-PCR Kit. This kit contains a specially formulated blend of Omniscript™ Reverse Transcriptase, designed for RNA amounts greater than 50 ng, and Sensiscript® Reverse Transcriptase, for very small amounts of RNA (<50 ng). See page 30 for ordering information. For quantitative real-time RT-PCR we recommend QIAGEN QuantiTect™ RT-PCR Kits.



## 2.2 Variant 151.1 et les amorces de mutagenèse de P8.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
(oparisi)F7      CWYRYTATWRRRKSKAAWTGGSMYCTCTAGATGCVTGCYCKWRGCGCCGCCAGTGWGATGGATAGAGGGTTCCGGCTCCTCGCAATGAC
151.1_DIMERE      CCC.....AA..C.AA..A.....
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
(oparisi)F7      GTAAGGTGGGACTAAAMSSKRGRKMWGAGCCGTCGAACCCAGGGGGAGTGTGATCCAGGTACCGCGGTAGAAACTGGATTACGACGAAT
151.1_DIMERE      .....TTT.....T.....CC.....
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
(oparisi)F7      ACCCGGGATTCAAACCCGGTCCCCCTCAGCGGTGACTCTGAGTGAAGGTCTGTGCTTAGCACAATGACGAGTTCCTGAAATGGAACGAA
151.1_DIMERE      .....A.....
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
(oparisi)F7      ACCTTTCTAACCCATAAGTTTCGTGCGATCCAGCGACTCGTCAGTGGGCTAAGCCGAGACTTATGAGAGAGTGGTTACCTCTCAGCCCC
151.1_DIMERE
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
(oparisi)F7      TCCACCTGGGGTGCCTATTCCGAGCACTGCGATTCCCGATAGAAAGGCTAAGCACTCGCAATGACGTAAAGGTGGGATTTTCCCTAG
151.1_DIMERE
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
(oparisi)F7      GGTTTGAGCGGTCAAACCAAGGGGAGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAKAAACTGGATTACGACGCCTACCCGGKATTCAAACCCGGTCC
151.1_DIMERE
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
(oparisi)F7      CCCTCAGAGGTGACTCTGAGTGAAGGTCTGTGCTTARCACACTGACGAGTYCCTGAAATGGAACGAAACCTTTCTAAACCCATAWGTTTT
151.1_DIMERE
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
(oparisi)F7      CGTCGATYCCAGCGACTCGTCACTGGGCTAAGYCCAGACTTTAWGAGAGAKTGGTTACCGCTCTCAGCCCTCCACCTTGGGGTGCCC
151.1_DIMERE
Mutagenese Amorce 151.1FP8
Mutagenese Amorce 151.1RP8

```

## 2.3 Variant 124.4.3 et les amorces de mutation L1

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
(oparisi)F5  GMYRRRRRRGSKAWTGGGSCCTTAGATGCAYGWRWRMGGYCCGAGTGWGTTGGATGGGGGGCW---CGGATSGGAAYTAGMGG
124.4      .....GA.....A.G...GC.CC...A...CG.A.G.T...A..TTTC.TTC.....
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
(oparisi)F5  TAGGTTCCGAGGGGGGGGGGGRRRARRTACCGCCCTAGAAACTGGATTACGACGCTACCCGGGATTCAAACCCGGTCYCCCTCCWYWHYT
124.4      .....T.T.AT.C.....G..G.
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
(oparisi)F5  GAWTCTGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCACACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTGACTCATAAGTTTCGCCGTATCTCA
124.4      .....
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
(oparisi)F5  ACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCASACTTATGAGAGAGTAGTCACCTCTCASCCTCCACCTTGGGGTGCCTATTCCGAGCACTGCA
124.4      .....TC.....
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
(oparisi)F5  GTTCCGATAGAAAGGATAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACTAGCGGTAGCTCCGAGGGGGTGTGA
124.4      .....C.....
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

      460     470     480     490     500     510     520     530     540
(oparisi)F5  TCCAGTACCGCGGTAGAAACTGGATTACGACGCTACCCGGGATTCAAACCCGGTCCCTCCAGAAATGATTTGGATGAGAGTCTGT
124.4      .....
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
(oparisi)F5  GCTTAGCACACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAAACTCTTTTGACTCATAAGTTTCGCCGTATCTCAACGGCTCATCAGTGGGCTAAG
124.4      .....
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

      640     650     660     670     680     690     700     710     720
(oparisi)F5  CCCCAGCTTATGAGAGAGTAGTCACCTCTCACCCTCCWCCTTGGGGGTGCCCTATTCCAGCACTGYAGTTWAGCCGAAWTTTCYAGCA
124.4      .....A.....G.....
Mutagenese Amorce 124.4FL1
Mutagenese Amorce 124.4RL1

```

## 2.4 Variant 124.4.3 et les amorces de mutation P8

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
(oparisi)F5 | GMYRRRRRRGSKAWTGGGSCCTCTAGATGCAYGTYWRWRMGGYCGCCAGTGWGMTGGATGGGGGGCW---CGGATSGGAACTAGGG
124.4 | .....GA.....A.G...GC.CC...A...CG.A.G.T...A..TTTC.TTC.....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....CC
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

      100     110     120     130     140     150     160     170     180
(oparisi)F5 | TAGGTTCCGAGGGGGGGGGGGTCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGCTACCCGGGATTCAAAACCCGGTCCCTCCAGAAAT
124.4 | .....T.T.A.....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....T.....
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
(oparisi)F5 | GATTCGGATGAAGAGTCTGTGCTTAGCACACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACGAACTCTTTGACTCATAAGTTTCGCGTATCTCA
124.4 | .....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

      280     290     300     310     320     330     340     350     360
(oparisi)F5 | ACGGCTCATCAGTGGGCTAAGCCGACTTATGAGAGAGTAGTCACCTCTCAGCCCTCCACCTTGGGGTGCCATATTCGGAGCAGTGA
124.4 | .....C.....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

      370     380     390     400     410     420     430     440     450
(oparisi)F5 | GTTCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCTTCTGGAACTAKCGGTAGGTTCCGARGGGGTGTGA
124.4 | .....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

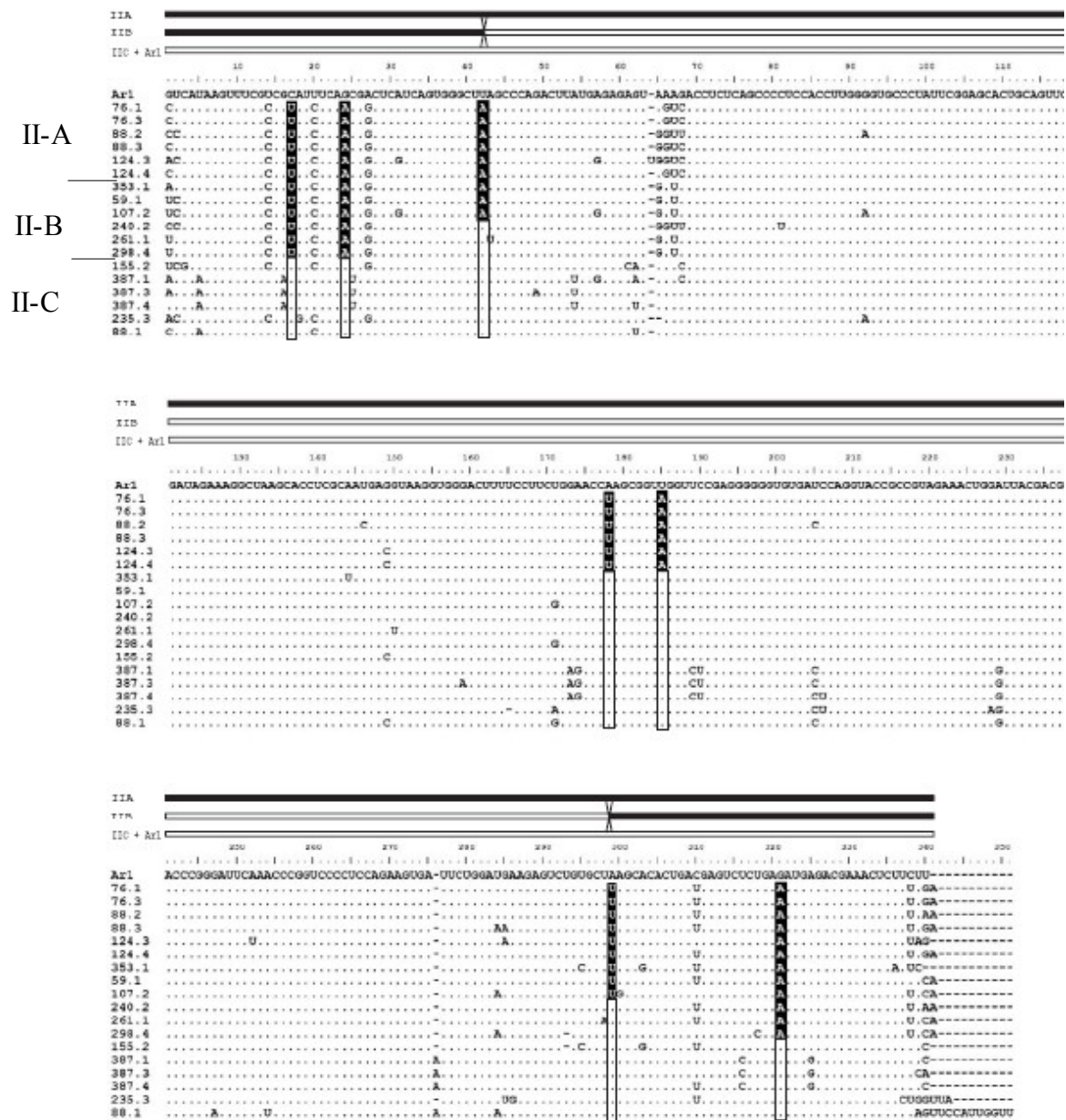
      460     470     480     490     500     510     520     530     540
(oparisi)F5 | TCCAGGTACCGCCTAKAAAAGTGGATTACGACKTCTACCCKGGATTCAAACCCGGTCCCTCCASAACTGATTGAGATGAAAGTCTGT
124.4 | .....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

      550     560     570     580     590     600     610     620     630
(oparisi)F5 | GCTTARCACTGATGAGTCTCTGAAATGAGACSAACCTCTTTGACTCATAWGTTCGCCGTATCTCAACGGCTCWTHRKTGGGCTAAG
124.4 | .....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

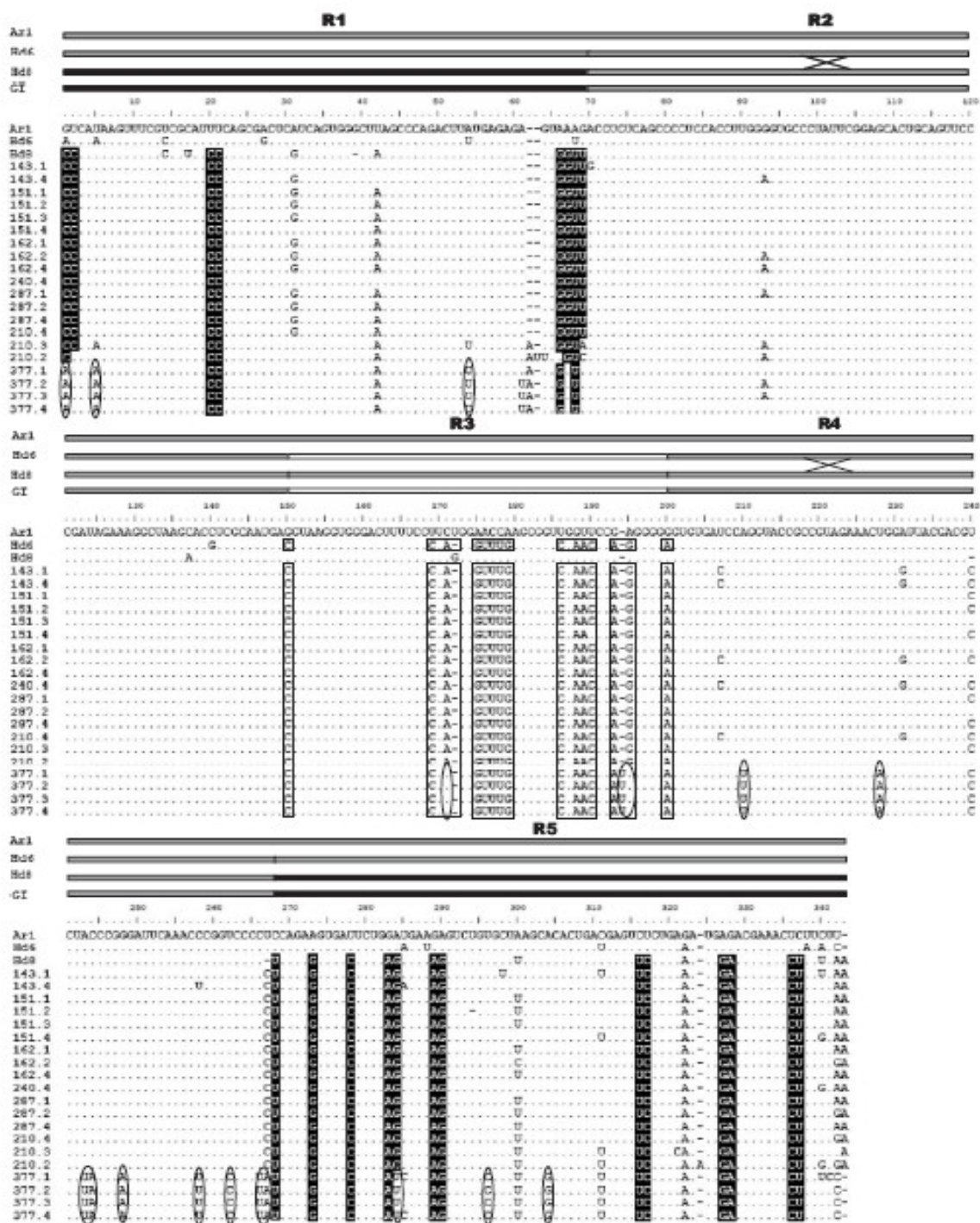
      640     650     660     670     680     690     700     710     720
(oparisi)F5 | CCCWGACTTATGASAKAGTAKTACCTCTCARCCCTCWCCTTGGGGGTGCCCTATTCGAGCACTGAGTTWAGCCGAAWTTTCYAGCA
124.4 | .....G.....
Mutagenese Amorce 124.4FP8 | .....
Mutagenese Amorce 124.4RP8 | .....

```

## 2.5 Alignement des séquences de variants des groupes II-A, II-B et II-C.



## 2.6 Alignement de séquence des variants Hd6-Hd8 et des variants du groupe I.





## **Bibliographie.**

Ambros S., Hernandez C., Desvignes J-C., Flores R., (1998). Genomic Structure of Three Phenotypically Different Isolates of Peach Latent Mosaic Viroid: Implications of the Existence of Constraints Limiting the Heterogeneity of Viroid Quasispecies. *Journal of Virology* 72(9): 7397-7406.

Bachem, Christian W.B.; van der Hoeven, Rutger S.; de Bruijn, Steef M.; Vreugdenhil, Dick; Zabeau, Marc; Visser, Richard G.F, (1996). Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *The Plant Journal*, 9(5):745-753

BACHEM CHRISTIAN W.B., OOMEN RONALD J.F.J. and VISSERRICHARD G.F. (1998). Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step Protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* **16**: 157–173, 1998.

Birch Paul R.J. and Kamoun Sophien, (2000). Studying interaction transcriptomes: coordinated analyses of gene expression during plant–microorganism interactions. *Trends in plant Sciences*. Décembre 2000 pp77-82.

Bonnet Julien, Fraile Aurora, Sacristana Soledad, Malpica Jose´ M., Garcia-Arenala Fernando (2005). Role of recombination in the evolution of natural populations of Cucumber mosaic virus, a tripartite RNA plant virus. *Journal of virology* 332:359-368.

M. Bousalem, E. J. P. Douzery and D. Fargette, (2000). High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus* : a contribution to understanding potyvirus evolution. *Journal of general virology* 81:243-255.

Breyne P, Zabeau M. (2001). Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current Opinion Plant Biology*, 4(2):136-42.

Bussièrè F., Lehoux. J., Thompson D.A., Skrzeczkowski L.J., Perreault J-P. (1999). Subcellular Localization and Rolling Circle Replication of Peach Latent Mosaic Viroid: Hallmarks of Group A Viroids. *Journal of virology* 70(8): 6353-6360.

Bussièrè F., Ouellet. J., Côté F., Lévesque D., Perreault J-P. (2000). Mapping in Solution Shows the Peach Latent Mosaic Viroid To Possess a New Pseudoknot in a complex,



Branched Secondary Structure. *Journal of Virology* 74(6): 2647-2654.

Campalans A, Pagès M, Messeguer R., (2001). Identification of differentially expressed genes by the cDNA-AFLP technique during dehydration of almond (*Prunus amygdalus*). *Tree Physiology*, 21(10):633-43.

Chellappan P., Vanitharani. R., Fauquet C.M., (2004). Short interfering RNA Accumulation Correlates with host Recovery in DNA virus-infected hosts, and gene silencing targets specific viral sequences. *journal of virology* 78(14): 7465-7477.

Conejero V., (2003). Viroids and gene silencing. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 67-70.

Cooper Bret (2001). Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor* *The Plant Journal* 26 (3): 339–349.

Côté F., De la Pena R., Flores R., Perreault J. P., (2003). Ribozyme reactions of viroids. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 350-356.

Daròs José-Antonio, Santiago F Elena, and Flores Ricardo, (2006). Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *European Molecular Biology Organization* 7(6): 593-598.

De la Pena M., Flores. R. (2002). Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid RNA: Dissection of the Pathogenicity Determinant and comparative Fitness of symptomatic and nonsymptomatic variants. *Journal of Molecular Biology* 321: 411-421.

De La Pena M., Navarro B., Flores R.(1999). Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop within the in vivo branched RNA conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences Plant Biology* 96: 9960-9965.

Delgado S., Martinez de Alba A. E., Hernandez C., Flores R. (2005). A short doublestranded RNA motif of Peach Latent Mosaic Viroid contains the initiation and the self cleavage sites of both polarity strands. *American society for Microbiology* 79(20): 12934- 12943.

Ding B., Owens R.A., (2003). Movement. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 49-54.

Donson Jonathan, Fang Yiwen, Espiritu-Santo Gregg, Xing Weimei, Salazar Andres, Miyamoto Susie, Armendarez Veronica and Volkmuth Wayne, (2002). Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Molecular Biology*, 48, (1-2):75-97

Eckey Christina, Korell Michael, Leib Katja, Biedenkopf Dagmar, Jansen Carin, Langen Gregor and Kogel Karl-Heinz, (2005). Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* 55(1): 1-15

Elleuch A., (2004). Détection et caractérisation moléculaire de différents viroïdes infectant les agrumes et la vigne en Tunisie. Tunis: Université El Manar Faculté des Sciences de Tunis, thèse de doctorat, inédit.

Fekih Hassen I., Roussel S., Kummert J., FakhFakh H., Marrakchi M., Jijakli M.H. (2006). Development of a rapid RT-PCR test for the detection of Peach Latent Mosaic Viroid, Pear Blister Canker Viroid, Hop Stunt Viroid and Apple Scar Skin Viroid in fruit trees from Tunisia. *J. Phytopathology* 154:217-223

Fekih Hassen I. (2007). Détection des viroïdes des arbres fruitiers et étude épidémiologique, moléculaire et biologique du viroïde de la mosaïque latente du pêcher en Tunisie. Tunis: université de Tunis El Manar, Faculté des sciences de Tunis, Département des sciences biologiques. Thèse de Doctorat. Inédit

Fekih Hassen I., *et al.*, (2007) Molecular characterization of new variants of Peach Latent Mosaic Viroid suggest that recombination may have contribute to the evolution of this infectious RNA.. *Virology*

Flores R., D. S., Rodio M.E., Ambros S., Hernandez C., Di Serio F., (2006). Peach latent mosaic viroid: not so latent. *Molecular Plant Pathology* 7(4): 209-221.

Flores R., Daros. J. A., Hernandez C., Di Serio F. (2001). Viroids. *Encyclopedia of life sciences Nature publishing group*.

Flores R., Hernandez C., Llacer G., Shamloul A.M., Giunchedi L., Hadidi A., (2003). Peach latent mosaic viroid in peach. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 156-160.

Flores R., Randles J. W., Bar-Joseph M., Diener T. O., (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archive of Virology* 143(3): 623-630.

Flores R., Randles J. W., Bar-Joseph M., Diener T. O., (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archive of Virology* 143(3): 623-630.

Franche C., Duhoux E. (2001). La transgénèse végétale. Col. Biocampus. Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Paris.

Froissart Remy, Denis Roze, Marilyne Uzest, Lionel Galibert, Stephane Blanc, Yannis Michalakis (2005) Recombination every day: Abundant recombination in a virus during a single multi-cellular host infection. *PLoS Biology* 3(3): 89.

Gago S., De la Pena. M., Flores R. (2005). A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its in vitro folding and in vivo viability. *RNA journal* 11(7): 1073-1083.

García-Andrés Susana , Paolo Accotto Gian , Navas-Castillo Jesús , Moriones Enrique (2006). Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. *Journal of virology* 359:302-312.

Góra-Sochacka A. (2004). Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica* 51(3): 587-607.

Hadidi A. And Candresse T., Polymerase chain reaction. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) *Viroids, properties, detection, diseases and their control*. (s.l.): Csiro publishing, 115-121.

Hammond, R., Smith, D. R. & Diener, T. O. (1989). Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea* latent viroid : a natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Research* 17, 10083-10094

Hammond R. W., Zhao Y. (2000). Characterization of a Tomato Protein Kinase Gene Induced by Infection by Potato spindle tuber viroid. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13(9): 903-910.

Hernandez C., F. R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid selfcleave in vitro via hammerhead structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences Biochemistry* 89: 3711-3715.

Hily J.-M., Scorza R., Webb K., Ravelonandro M. (2005). Accumulation of the long class of siRNA is associated with resistance to Plum Pox Virus in a transgenic woody perennial tree. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18(8):794-799

Itaya A., Matsuda Y., Gonzales R. A., Nelson R. S, Ding B. (2002). Potato spindle tuber viroid Strains of Different Pathogenicity Induces and Suppresses Expression of Common and Unique Genes in Infected Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15(10): 990-999.

Jamar M., (2005). C aractérisation m oléculaire du viroïde de la mosaïque latente du pêcher en Tunisie. Namur: Haute école Charleroi Europe, travail de fin d'étude, inédit.

KOLTUNOW A.M. et REZAIAN M.A., *Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. Nucleic Acids Research*, 1988, **16**, 849-864.

Kuhn, Ekkehard, (2001). From library screening to microarray technology: strategies to determine gene expression profiles and to identify differentially regulated genes in plants. *Annals of botany*. 87(2):139-155.

Llacer G., (1998). General aspect of peach latent mosaic disease. *Acta horticulturae* 472.

Lorkowski, S., Cullen, P., 2004. *High-throughput analysis of mRNA expression: 907 microarrays are not the whole story. Expert Opin. Ther. Pat.* 14, 377–403

Malfitano M., Di Serio. F., Covelli L., Ragozzino A., Hernandez C., Flores R. (2003). Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* 313: 492-501.

Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W. and Semancik, J.S. (2004) RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Archives of Virology*.149, 397–406.

Massart Sébastien, Jijakli Haissam M.,(2006). Use of molecular techniques to elucidate the mechanisms of action of fungal biocontrol agents: A review. *Journal of Microbiological Methods*.

Navarro B. Flores R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences Biochemistry* 94: 11262-11267.

Noël, L.; Thieme, F.; Nennstiel, D.; Bonas, U., (2001). cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. *Molecular Microbiology* 41(6):1271-1281.

Parisi O. (2006). Etude de la pathogénicité de différents variants du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVD) et mise au point d'une technique de détection du phénomène d'extinction post-transcriptionnelle de gènes (Posttranscriptionnal gene silencing). Gembloux, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux Travail de fin d'études. Inédit.

Pelchat M., Levesque D., Ouellet J., Laurendeau S., Levesque S., Lehoux J., Thompson D. A., Eastwell K. C., Skrzeczkowski L. J., Perreault J. P. (2000). Sequencing of Peach Latent Mosaic Viroid Variants from Nine North American Peach Cultivars Shows that This RNA Folds into a Complex Secondary Structure. *Virology*. 271: 37-45.

Podstolski Wojciech, Góra-Sochacka Anna and Zagórski Włodzimierz, (2005). Co-inoculation with two non-infectious cDNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTVd) leads to the appearance of novel fully infectious variants. *Acta Biochimica Polonica* 52(1):87-98.

Qin Ling, Overmars Hein, Helder Johannes, Popeijus Herman, Rouppe van der Voort Jeroen, Groenink Wouter, van Koert Paul, Schots Arjen, Bakker Jaap, and Smant Geert (2000) An Efficient cDNA-AFLP-Based Strategy for the Identification of Putative Pathogenicity Factors from the Potato Cyst Nematode *Globodera rostochiensis*. *Molecular Plant-Microbes Interactions* 13(8):830–836.

Reinhart Brenda J., Weinstein Earl G., Rhoades Matthew W., Bartel B., Bartel David P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes and Development*. 16:1616-1626.

Rhoades Matthew W. J., Bartel David P., Bartel B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of plant Biology* 57:19-53.

Schurdi-Levraud Escalettes Valérie, Hullot Clémence, Wawrzy'nczak Danuta, Mathieu Elodie, Eyquard Jean-Philippe, Le Gall Olivier, Decroocq Véronique, (2006). Plum pox virus induces differential gene expression in the partially resistant stone fruit tree *Prunus armeniaca* cv. Goldrich. *Gene* 374:96-103

Singh R.P., Randles J.W., Hadidi A., (2003). Strategies for the control of viroid diseases. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 295-302.

Snehasis Jana., Chiranjib. Chakraborty., Shyamsundar Nandi., (2004). Mechanisms and roles of the RNA-based gene silencing. *Electronic journal of biotechnology* 7(3): 324-335.

Steger G., Riesner D., (2003). Molecular characteristics. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 15-29.

Tabler M., Tsagris. M. (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *TRENDS in plant science* 9(7): 339-348.

Tang G., Reinhart Brenda J., Bartel David P., Zamore Phillip D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development* 17:49-63

Teemu Kivioja, Mikko Arvas , Markku Saloheimo , Merja Penttilä and Esko Ukkonen

(2005). Optimization of cDNA-AFLP experiments using genomic sequence data. *Bioinformatics*, 21(11):2573-2579.

Wang Ming-Bo, Waterhouse Peter M. *et al.*, (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(9):3275-3280

Wasseneger M., Pélissier. T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* 37: 349-362.

Wasseneger M., Pélissier. T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology* 37: 349-362.

Yijun QI., Biao Ding., (2003). Inhibition of Cell Growth and Shoot Development by a Specific Nucleotide Sequence in a Noncoding Viroid RNA. *The Plant Cell* 15: 1360-1374.