

*Communauté française de Belgique*

**FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE  
GEMBLoux**

**Étude 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  
(Posttranscriptional gene silencing)**

Travail de fin d'études

Année académique 2005-2006

Présenté par : Parisi Olivier

Promoteur: Professeur Dr. M.H. Jijakli.

Co-Promoteur: Dr. S. Massart

En vue de l'obtention du grade de  
Bio-ingénieur

Orientation: Protection des végétaux

*"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**

**Étude 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  
(Posttranscriptional gene silencing)**

Travail de fin d'études

Année académique 2005-2006

Présenté par : Parisi Olivier

Promoteur: Professeur Dr. M.H. Jijali.

En vue de l'obtention du grade de  
Bio-ingénieur

Orientation: Protection des végétaux

Unité de Phyttopathologie.

### **Remerciements.**

**Je remercie tout d'abord le Professeur M.H. Jijakli pour m'avoir permis de travailler au sein de l'Unité de Phyttopathologie 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 ce travail de fin d'étude. Sa patience, sa rigueur et sa connaissance du sujet ont permis l'échange de nombreux points de vue rendant ces recherches enrichissantes et passionnantes.**

**Mes sincères remerciements à Mlle Fekih Hassen Imène doctorante à l'Unité de Phyttopathologie pour son attention, son soutien et la passion qu'elle m'a transmis pour l'étude des viroïdes et la recherche. Sa connaissance des viroïdes a été très enrichissante.**

**Je tiens également à remercier particulièrement les personnes suivantes:**

**Mme. Vandenbol Micheline de l'unité de biologie animale et microbienne pour ses nombreux conseils concernant le *Northern Blot***

**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 du *Northern Blot* dont il m'a fait profiter mais aussi pour le temps qu'il m'a consacré.**

**M. Friel Damien et Falmagne Nicolas de l'Unité de Phyttopathologie pour leurs nombreux conseils au laboratoire.**

**M. Dresen F. Technicien à l'unité de Phyttopathologie pour avoir pris soin des pêchers avec tant d'attention.**

**Van Steen F. Technicien à l'unité de Phyttopathologie pour l'aide qu'il m'a apportée dans la réalisation et la finalisation des manipulations.**

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

**Merci également à Catherine et à Ellen pour les agréables moments de détente que nous avons partagés lors de la réalisation de nos mémoires respectifs mais aussi pour leur écoute et leur relativisme.**

**Enfin je tiens à remercier tous les re-lecteurs attentifs de ce travail et en particulier Amélie pour ses nombreuses corrections et sa patience au cours des huit derniers mois.**

## **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 dans le cadre d'une collaboration internationale avec le laboratoire de génétique moléculaire, d'immunologie et de biotechnologie de la Faculté des Sciences de Tunis. Ces études ont notamment débouché sur la mise en évidence de l'existence de deux groupes de structures dans lesquels les variants du PLMVd peuvent être classés. Le premier objectif de ce travail a donc été d'établir un lien entre cette classification et la pathogénicité sur les plantes indicatrices GF-305. Les premiers résultats de tests de pathogénicité menés sur 32 variants n'ont pas montré de relation entre l'appartenance à un groupe de structure et la pathogénicité. Par contre des différences importantes de pathogénicité ont été observées entre les variants. Le second objectif consistait à mettre au point une technique de détection fiable du phénomène de *gene silencing*. Ce phénomène est en effet connu pour être impliqué dans la défense des plantes contre les virus et probablement contre les viroïdes. La technique mise au point a permis d'observer un signal d'hybridation entre la sonde correspondant au PLMVd (de 338 nucléotides) et des oligonucléotides de 20 à 25 nucléotides utilisés comme témoins positifs. De plus, la molécule complète de PLMVd a été détectée pour les échantillons de feuilles prélevées. Enfin, un faible signal d'hybridation a été observé à la taille des siRNA pour ces mêmes échantillons. Cependant, ce résultat doit encore être confirmé par la réalisation de manipulations complémentaires.

## **Abstract.**

Since several years, Plant Pathology Unit collaborates with the molecular genetic, immunology and biotechnology laboratory of the Faculty of the Sciences of Tunis to study peach latent mosaic viroid (PLMVd) and other viroids from fruit trees. A large sequencing and phylogenetic study allowed the classification of PLMVd variants into two groups. The first goal of this work was to evaluate the pathogenicity of variants belonging to these two groups by bioassays on GF-305 plantlet. First results of these bioassays made on 32 variants did not show any correlation between the predefined structural groups and the pathogenic phenotypes. Nevertheless, differences in pathogenicity were observed between variants. The second goal of this work was to set up a reliable method for the detection of the gene silencing phenomenon. This phenomenon is known to be involved in the plant defense system against virus and, likely, against viroid. The method allowed the detection of small DNA oligonucleotides (20-25nt) in the positive control and of the entire PLMVd molecule in the analysed samples. Finally we were able to detect a low hybridization signal in the 21-25nt area for the analysed samples. However this result should be confirm on further tests.

# Table des matières

Résumé.....	5
Abstract.....	5
Liste des abréviations.....	8
Introduction.....	10
Synthèse bibliographique.....	11
1.Découverte des viroïdes.....	11
2.Classification.....	11
2.1.Les Pospiviroidae.....	12
2.2.Les Avsunviroidae.....	13
3.Propriétés biophysiques (structure secondaire).....	15
4.Réplication des viroïdes.....	15
5.Le ribozyme et l'auto-clivage.....	17
6.Le pouvoir pathogène.....	19
7.Le déplacement dans la plante.....	22
8.Méthodes de lutte contre les viroïdes.....	23
9.Le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd).....	24
9.1.Gamme d'hôtes.....	25
9.2.Distribution géographique du PLMVd.....	25
9.3.Symptômes.....	25
En serre sur plante indicatrice GF-305.....	25
Situation naturelle.....	26
9.4.Réplication du Peach latent mosaic viroid.....	26
9.5.Transmission.....	28
9.6.Méthodes de détection du PLMVd.....	28
9.6.1.Les méthodes biologiques.....	28
9.6.2.Les méthodes moléculaires.....	28
9.7.Méthodes de lutte vis-à-vis du PLMVd.....	29
9.8.Caractérisation moléculaire du PLMVd.....	30
10.Le « gene silencing ».....	33
10.1.Définition générale.....	33
10.2.Mise en évidence du gene silencing chez les viroïdes.....	34
10.3.Les virus et le gene silencing.....	35
10.4.Les viroïdes et le gene silencing.....	36
10.5.Le gene silencing et le PLMVd.....	38
Objectifs.....	39
Matériel et Méthodes.....	40
1.Matériel biologique.....	40
1.1.Matériel végétal.....	40
1.2.Source des variants inoculés.....	40
1.3.Témoins positifs.....	41
1.4.Témoins négatifs.....	41
1.5.Souche bactérienne.....	41
2.Méthodes.....	41
2.1.Préambule.....	41
2.2.Extraction de jus brut de plantes infectées.....	41
2.3.Extraction d'ARN.....	42
Méthode 1.....	42
Méthode 2.....	42
2.4.La réaction d'amplification.....	42

Les amorces utilisées.....	42
Méthode.....	42
2.5.Electrophorèse sur gel d'agarose.....	43
Méthode.....	43
2.6.Purification des produits d'amplification.....	44
Principe.....	44
Méthode.....	44
2.7.Quantification des acides nucléiques avec le NanoDrop®.....	44
Principe.....	44
Méthode.....	45
2.8.Clonage des produits de la RT-PCR dans le vecteur pCR®2.1 (TA cloning).....	45
Principe.....	45
2.9.Vérification de la présence de l'insert.....	45
2.10.Purification de l'ADN plasmidique d'E. Coli en utilisant le kit « ULTRAPrep®PLASMID DNA mini prep Kit ».....	46
2.11.Transcription in vitro.....	47
2.12.Migration sur gel de polyacrylamide.....	48
Principe.....	48
Méthode.....	48
2.13.Synthèse de sondes radioactives .....	49
Principe.....	49
Méthode.....	49
2.14.Mise en évidence des siRNA par la technique de la Northern Blot.....	50
Résultats et discussion.....	53
1.Évaluation de l'influence de la structure des variants inoculés sur la pathogénicité.....	53
1.1.Première campagne de détection.....	53
1.2.Seconde campagne de détection.....	54
1.3.Discussion.....	56
2.Mise au point d'une technique de détection fiable du phénomène de gene silencing.....	60
2.1.Optimisation de l'extraction d'ARN totaux.....	60
2.2.Mise au point de la synthèse de la sonde radioactive.....	62
2.3.Mise au point des conditions d'hybridation.....	63
Hybridation avec le protocole 1.....	63
Hybridation avec le protocole 2.....	63
2.4.Discussion.....	66
Conclusions et perspectives.....	69
Annexes.....	71
1.Protocoles utilisés.....	71
1.1.Protocole du Rneasy plant mini kit.....	71
1.2.Protocole du QIAEX II® gel extraction kit.....	73
1.3.Protocole du TA cloning.....	75
1.4.ULTRAPrep®PLASMID DNA mini prep Kit.....	77
1.5.QIAquick PCR purification kit.....	78
1.6.Rneasy®minElute Cleanup (QIAGEN).....	79
2.Alignements de séquences.....	80
2.1.Alignement des séquences des variants 151.1 et 151.3.....	80
3.Tableau récapitulatif des variants inoculés.....	81
Bibliographie.....	82

## **Liste des abréviations.**

abRNA = *aberrant RNA* (ARN aberrant)

ASBVd = *Avocado SunBlotch Viroid*

ASSVd = *Apple Scar Skin Viroid*

BEt = Bromure d'éthidium

CChMVd = *Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid*

CCR = *Central Conserved Region* (région centrale conservée)

CEVd = *Citrus Exocortis Viroid*

CSVd = *Chrysanthemum Stunt Viroid*

CRA-W = Centre de Recherche Agronomique – Wallonie

DEPC = Diéthylpyrocarbonate

DTT = Dithiothreitol

HC-Pro = *Helper component protéinase*

mRNA = ARN messenger

NEP = *Nuclear Encoded Polymerase* (polymérase nucléaire)

PCR = *Polymerase Chain Reaction*

PEP = *Plasted Encoded Polymerase* (polymérase d'origine chloroplastique)

PLMVd = *Peach Latent Mosaic Viroid*

PSTVd = *Potato Spindle Tuber Viroid*

PTGS = *PostTranscriptional gene silencing* (extinction post-transcriptionnelle de gènes)

PVX = *Potato Virus X*

RDM = *RNA-directed DNA Methylation*

RdRP = *RNA-dependant RNA Polymerase* (RNA polymérase RNA-dépendante)

RISC = *RNA-Induced Silencing Complex*

RT-PCR = *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SDS = Sodium Dodécyl Sulfate

siRNA = *Short interfering RNA*

TCH = *Terminal Conserved Hairpin* (domaine terminal conservé en épingle à cheveux)

TCR = *Terminal Conserved Region* (région terminale conservée)

TGS = *Transcriptional Gene Silencing* (extinction transcriptionnelle de gènes)

TL = *Terminal Left* (domaine terminal gauche)

TR = *Terminal Right* (domaine terminal droit)

VIGS = *Virus-Induced Gene Silencing* (extinction de gènes induite par les virus)

## ***Introduction.***

Les viroïdes sont d'importants agents phytopathogènes responsables de maladies sur différentes espèces cultivées herbacées et ligneuses. Il s'agit de petites molécules d'ARN monocaténaire circulaire formées de 246 à 401 nucléotides, qui ne codent pour aucune protéine et qui ne sont pas encapsidées. Malgré leur étonnante simplicité, les viroïdes peuvent causer d'importants dégâts sur de nombreuses cultures.

Depuis plusieurs années, dans le cadre d'un programme de collaboration internationale, l'Unité de Phytopathologie mène des travaux de recherche sur les viroïdes infectant les arbres fruitiers en Tunisie. Des études épidémiologiques ont montré que le *Peach latent mosaic viroid* PLMVd était le viroïde le plus répandu dans les vergers Tunisiens (Fekih Hassen 2005). Le PLMVd a de plus une distribution mondiale et est par ailleurs considéré comme organisme de qualité en Europe.

Le PLMVd peut induire une mosaïque (mais aussi des chloroses et une diminution de qualité des fruits chez les plantes infectées). Il est cependant souvent latent en verger ce qui ne facilite pas sa détection. Ce viroïde a une taille de 338 à 351 nucléotides, il possède une structure secondaire très branchée et sa séquence nucléotidique possède une grande variabilité. De plus, les isolats constitués 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 mise en relation avec l'observation de symptômes appelés *peach calico* et correspondant à une forme extrême de chlorose.

Le séquençage de 119 variants de PLMVd présent en Tunisie a été réalisé au sein de l'unité de Phytopathologie. La comparaison des séquences obtenues a permis d'identifier différents groupes de variants (Fekih Hassen *et al.*, soumis à publication). Le premier objectif du travail était de déterminer si cette classification phylogénétique correspondait à une différence de pathogénicité chez la plante indicatrice GF 305.

D'autre part, le phénomène d'extinction post-transcriptionnelle de gènes a été mis en évidence chez des plantes de pêchers infectées par certains variants de PLMVd (Martinez de Alba *et al.*, 2002). Ce phénomène connu sous le terme de *virus-induced gene silencing* (VIGS) intervient dans les mécanismes de défense de la plante face à l'agent pathogène (Voinnet *et al.*, 1999). Plusieurs auteurs ont suggérés que le VIGS intervenait dans l'expression des symptômes liés à l'infection de l'agent pathogène (Baulcombe *et al.*, 1999; Vaucheret *et al.*, 2001).

Le second objectif de ce travail était de mettre au point une technique de détection du phénomène de *gene silencing* dans les plants infectés par le PLMVd.

# **Synthèse bibliographique.**

## **1. Découverte des viroïdes.**

Durant la fin des années 1960, des études ont été menées sur des maladies provoquant de lourdes pertes dans les cultures de pommes de terre, d'agrumes et de chrysanthèmes (Elleuch 2004). Ces maladies, d'origine virale, ne semblaient pas être dues à des virus conventionnels. Il faudra attendre 1967 pour que Diener démontre que la maladie des tubercules en fuseau de la pomme de terre était due à un acide nucléique non encapsidé. Il s'agit d'une molécule d'ARN de faible poids moléculaire se répliquant dans les cellules infectées. Ce type d'agent pathogène sera appelé viroïde par Diener en 1971 afin de permettre leur distinction par rapport aux virus conventionnels (Elleuch 2004).

Par la suite, de nombreuses maladies des plantes causées par des viroïdes ont été identifiées, aussi bien chez les Monocotylédones que chez les Dicotylédones. Certaines de ces maladies ont provoqué et provoquent toujours des pertes économiques importantes (Elleuch 2004).

## **2. Classification.**

Les viroïdes ont été classés en deux familles sur base de l'analyse de plusieurs critères: l'analyse de séquences conservées, des formes présentes lors de la réplication et de leur évolution, de motifs structuraux et d'une analyse phylogénétique. Il s'agit des familles des *Pospiviroidae* et des *Avsunviroidae* dont les principaux représentants sont respectivement le *Potato spindle tuber viroid* et l'*Avocado sunblotch viroid* (Flores *et al.*, 2001). Ainsi, les viroïdes possédant une CCR mais dépourvus des structures d'autoclivage appartiennent à la famille des *Pospiviroidae* tandis que ceux capables d'autoclivage et dépourvus de CCR appartiennent à la famille des *Avsunviroidae* (Flores *et al.*, 1998).

Les genres auxquels appartiennent les viroïdes ont été établis sur base des caractéristiques de la région centrale conservée (CCR) et de la présence (ou l'absence) de deux autres domaines qui ne sont jamais présents simultanément sur une molécule viroïdale: la région terminale conservée (TCR) ou la structure en épingle à cheveux conservée (TCH) (Koltunow et Rezaian 1998 et Flores *et al.*, 1997 cités par Jamar 2005) pour les *Pospiviroidae*. Chez les *Avsunviroidae*, la classification des genres se base sur le contenu en G-C, sur la structure secondaire prédite par informatique, sur la morphologie des ribozymes en tête de marteau, ainsi que sur l'insolubilité dans le LiCl 2M. Ces critères ont permis de distinguer cinq genres chez les *Pospiviroidae*: *Pospiviroides*, *Hostuviroides*,

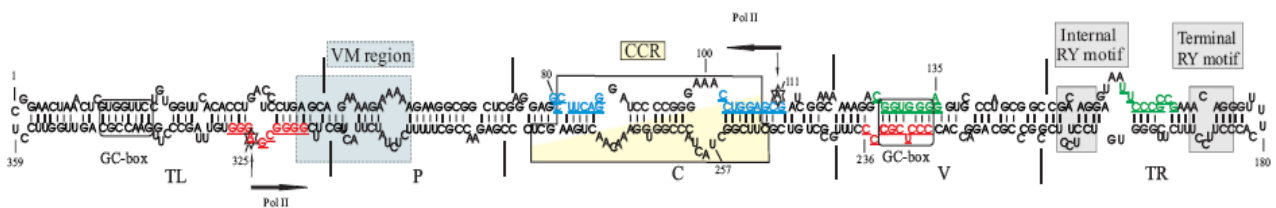
*Cocadviroïdes*, *Apscaviroïdes* et *Coleviroïdes* tandis que deux genres sont distingués chez les *Avsunviroïdes*: *Avsunviroïdes* et *Pelamoviroïdes* (Flores *et al.*, 1998).

La limite permettant de distinguer les espèces des variants a été arbitrairement fixée à un niveau de 90% d'homologie de séquence (Flores *et al.*, 1998).

## 2.1. Les Pospiviroidae.

La famille des *Pospiviroidae*, dont les représentants (25 espèces) se multiplient et s'accumulent dans le noyau des cellules infectées, est caractérisée par une structure secondaire en bâtonnet et par la présence de cinq domaines structuraux et fonctionnels (figure 1) (Keese and Symons 1985 cités par Flores 2001).

**Figure 1:** Représentation des 5 domaines du PSTVd (CCR, P, V, TL et TR)



### 1. Le domaine central contenant la région centrale conservée (CCR).

La région centrale conservée correspond à une structure hélicoïdale flanquée des deux côtés par une répétition inversée. Elle est susceptible de former une épingle à cheveux capable de stabiliser les structures intermédiaires lors de la réplication. Il faut de plus noter que la région centrale conservée est présente aussi bien sur le brin supérieur que sur le brin inférieur de la molécule. La présence et les caractéristiques de la région centrale conservée sont des critères importants de classification (Flores *et al.*, 2001; Gora-Sochacka, 2004). La région centrale conservée semble impliquée dans la détermination des hôtes, dans la réplication mais aussi dans la pathogénicité (Yijun Qi *et al.*, 2003).

### 2. Le domaine de pathogénicité (P).

Ce domaine, impliqué dans la pathogénicité des *Pospiviroidae*, comprend une séquence de 15 à 17 nucléotides composée essentiellement d'adénines dans le brin supérieur et d'uraciles dans le brin inférieur donnant à cette structure une faible stabilité (les appariements A-U sont en effet moins stables que les paires G-C). De plus, il semblerait que des mutations dans ce domaine affectent la pathogénicité des viroïdes (Steger et Riesner 2003).

### 3. Le domaine variable (V).

Il s'agit du domaine le plus variable. Il est situé à droite de la région centrale conservée. Le seul point commun de cette région entre tous les viroïdes semble être la présence d'une hélice avec un minimum de 3 paires G-C (Gora-Sochacka, 2004).

4. Le domaine terminal gauche (TL).

Le domaine terminal gauche consiste en une boucle terminale du côté gauche de la molécule. Il est caractérisé par une séquence 5'-CCUC-3' strictement conservée.

5. Le domaine terminal droit (TR).

Le domaine terminal droit est quant à lui caractérisé par une séquence conservée 5'-CCUUC-3'.

Ces deux derniers domaines sont interchangeables entre viroïdes. Ils peuvent donc avoir un rôle dans les phénomènes de réarrangement (Gora-Sochacka, 2004). De plus, ils peuvent également être impliqués dans les phénomènes de pathogénicité.

## **2.2. Les Avsunviroidae.**

A la différence des *Pospiviroidae* s'accumulant dans le noyau, les viroïdes appartenant à la famille des *Avsunviroidae* s'accumulent dans les chloroplastes. D'autre part, cette famille possède des caractères discriminants tels que: une structure secondaire relativement branchée, l'absence de région centrale conservée et une capacité d'auto-clivage liée à la présence d'une structure secondaire de ribozyme en tête de marteau (Bussière *et al.*, 1999, Flores *et al.*, 2001; Gora-Sochacka 2004).

Cette famille comprend deux genres:

- 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,
- les *Pelamoviroïdes*: regroupant 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).

**Tableau 1:** Classification des viroïdes selon Flores 1998

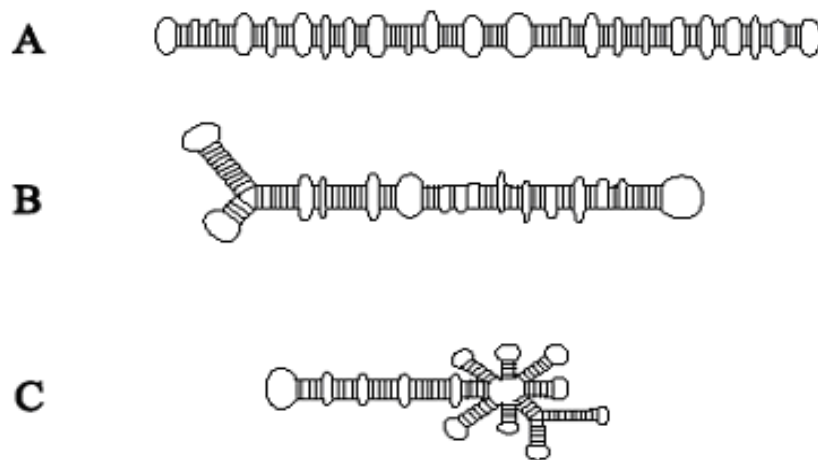
Classification des viroïdes					
Familles	Genres	Espèces			
<b>Avsunviroidae</b>	<b>Avsunviroid</b>	Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd)			
	<b>Pelamoviroid</b>	Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd) Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid (CChMVd)			
<b>Pospiviroidae</b>	<b>Pospiviroid</b>	Chrysanthemum stunt 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>	Hop stunt viroid (HSVd) (Citrus cachexia viroid) (Cucumber pale fruit viroid) (Peach dapple viroid) (Plum dapple viroid)		
			<b>Cocadviroid</b>	Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd) Citrus viroid IV (Cvd-IV) Coconut tinangaja viroid (CtiVd) Hop latent viroid (HLVd)	
				<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>

### **3. Propriétés biophysiques (structure secondaire).**

L'ARN des viroïdes possède une structure secondaire avec de nombreux appariements induisant une structure compacte composée de régions bicaténaires protectrices séparées par des boucles monocaténaire. Les bases puriques et pyrimidiques sont présentes dans un rapport 1 : 1. Cependant, les paires G-C sont deux fois plus abondantes que les paires A-U rendant ainsi la conformation viroïdale très stable. Il faut également noter l'existence d'appariements non canoniques G-U (Bussière *et al.*, 1999).

Du point de vue de leur structure secondaire, les viroïdes adoptent fréquemment une structure en bâtonnet. Cependant, les membres de la famille des *Avsunviroidae* possèdent généralement une structure en branche. Cette structure a été vérifiée par les tests de précipitation au chlorure de lithium exception faite du ASBVd qui adopte une structure intermédiaire (Navarro et Flores, 1997; Gora-Sochacka, 2004).

**Figure 2:** Structure secondaire de différents viroïdes: (A) Structure secondaire en forme de bâtonnet proposée pour le PSTVd, membre type de la famille des *Pospoviroidae*. (B) Structure secondaire proposée pour le ASBVd, membre type de la famille des *Avsunviroidae*. (C) Conformation en branches complexes proposée pour le PLMVd. (Gora-Sochacka, 2004)



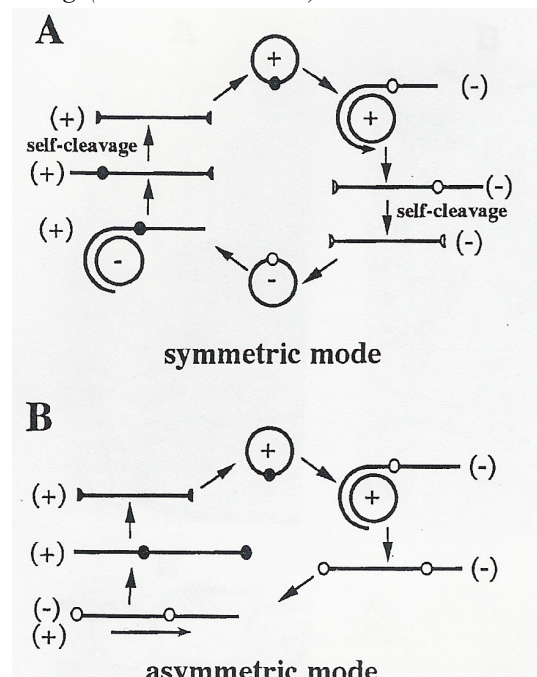
### **4. Réplication des viroïdes.**

Le génome des viroïdes ne code pour aucune protéine, ils n'utilisent donc pas le système de traduction cellulaire comme le font les virus (Flores *et al.*, 2001; Tabler *et al.*, 2004). Par contre, ils sont entièrement dépendants des cellules qu'ils infectent pour l'accomplissement de leur réplication en y mobilisant les systèmes de transcription (Flores *et al.*, 2001).

Le mode de réplication des viroïdes dépend de la famille à laquelle ils appartiennent:

- Les *Pospiviroidae* se répliquent suivant un mode asymétrique: l'ARN circulaire monomérique, conventionnellement de polarité positive, infectant les cellules sert de modèle de réplication (sous forme du cercle roulant) pour l'ARN polymérase II du noyau qui produit des oligomères linéaires de polarité négative après plusieurs tours de transcription. Ces oligomères servent à leur tour de modèle et sont transcrits (par la même enzyme) en oligomères de polarité positive qui sont alors clivés et circularisés par des enzymes (respectivement une RNase et une ligase) de l'hôte pour donner des monomères (Flores *et al.*, 2001; Gora-Sochacka, 2004; Tabler *et al.*, 2004).
- Les *Avsunviroidae* quant à eux se répliquent suivant un mode symétrique: L'ARN circulaire de polarité positive est ici aussi transcrit sous forme d'oligomères d'ARN linéaires de polarité négative. Ces oligomères sont alors clivés par l'action du ribozyme et circularisés en cours de transcription donnant ainsi des monomères de polarité négative qui subiront eux aussi un même cycle de transcription-circularisation pour donner la descendance de polarité positive. Des recherches sont en cours, et deux écoles s'affrontent, pour déterminer l'origine de la polymérase intervenant dans les réactions de transcription: il s'agirait soit d'une polymérase d'origine chloroplastique (PEP), soit d'une polymérase nucléaire (NEP) (Buisnière *et al.*, 1999; Flores *et al.*, 2001; Gora-Sochacka, 2004; Tabler *et al.*, 2004).

**Figure 3:** Réplication des viroïdes: (A) réplication suivant le mode symétrique, (B) réplication suivant le mode asymétrique. Les cercles pleins et vides sur les brins représentent le site d'auto-clivage (Buisnière *et al.* 1999).



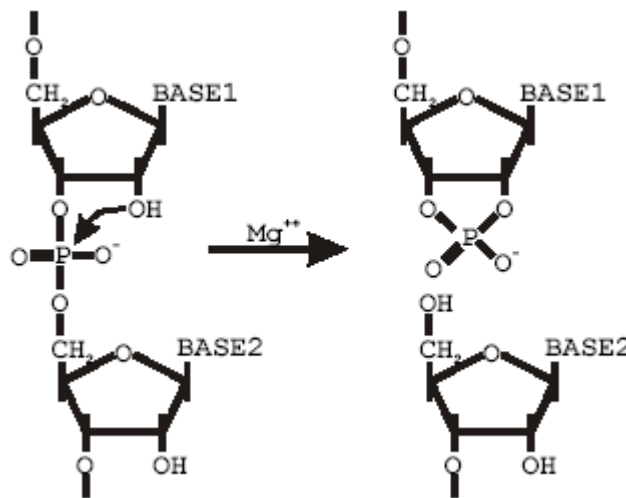
## 5. Le ribozyme et l'auto-clivage.

Bien qu'une ribonucléase de l'hôte soit nécessaire au clivage des formes multimériques des membres de la famille des *Pospiviroidae*, ceci n'est pas le cas pour la famille des *Avsunviroidae*.

Chez les *Avsunviroidae*, cette étape est en effet auto-catalytique et sous l'influence des ribozymes en tête de marteau (hammerhead). Tous les membres des *Avsunviroidae* peuvent potentiellement adopter des structures en tête de marteau. Cette structure basée sur des prédictions informatiques et sur des covariations de séquences est conservée chez tous les viroïdes de cette famille et ce, sur les brins des deux polarités (ce qui renforce l'hypothèse d'une réplication suivant un mode symétrique) (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 (le magnésium) entraîne l'auto-clivage de l'ARN au niveau d'un lien phosphodiester particulier produisant ainsi des extrémités 2',3'-phosphate cyclique et 5'-hydroxyle (Côté *et al.*, 2003).

Figure 4: Réaction d'autoclivage



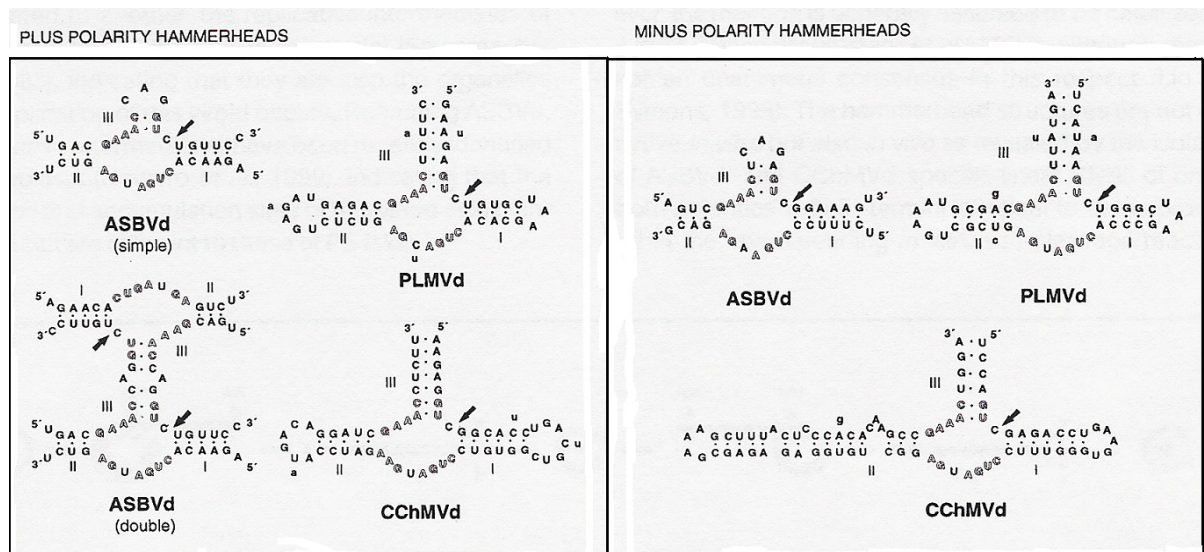
Chez le ASBVd, les séquences<sup>1</sup> impliquées dans la formation des structures en tête de marteau des deux polarités se trouvent dans les brins supérieur et inférieur du domaine central proposé pour ce viroïde. De plus, les séquences formant le noyau central conservé ne sont pas contiguës mais sont séparées dans deux sous domaines. A l'opposé, les séquences formant les structures en tête de marteau chez le PLMVd et le CChMVd sont contiguës et localisées dans un bras de la molécule viroïdale (Côté *et al.*, 2003).

On distingue deux classes de structures en tête de marteau suivant leur morphologie. Ainsi, les

<sup>1</sup> Les séquences non impliquées sont dites extra-catalytiques

brins monomériques de PLMVd et de CChMVd adoptent une structure en tête de marteau stable dont les hélices I et II possèdent cinq ou six paires de bases fermées par une courte boucle (exception faite du brin de polarité négative du CChMVd dont l'hélice II est longue et imparfaite) tandis que l'hélice III comprend entre 6 et 8 paires de bases (figure 5) (Côté *et al.*, 2003). A l'opposé, les structures en tête de marteau formées par le ASBVd sont instables surtout au niveau du brin de polarité positive dont l'hélice III ne comprend que 2 paires de bases et est fermée par une boucle de trois résidus. Cette architecture particulière a d'ailleurs un impact négatif sur l'efficacité de l'auto-clivage *in vitro* de ce viroïde. Il faut cependant noter la présence de caractéristiques particulières au niveau des ribozymes des *Avsunviroidae*. Celles-ci consistent en des modifications (n'affectant pas l'auto-clivage), de type transition, au niveau des séquences conservées, ou en la présence d'un nucléotide supplémentaire dans la même région (Côté *et al.*, 2003). La conservation des séquences formant les structures en tête de marteau chez les *Avsunviroidae* dépasse donc la simple nécessité fonctionnelle. D'autres pressions de sélection, dont l'identité n'est pas encore connue, doivent agir sur ces séquences (Côté *et al.*, 2003).

**Figure 5:** Structures des ribozymes de polarité positive et négative chez les *Avsunviroidae*. Les flèches représentent le site de clivage; les chiffres romains se rapportent aux descriptions des hélices.



Les séquences des deux domaines en tête de marteau chez le PLMVd et le CChMVd sont très complémentaires. Cette complémentarité permet la formation de grandes régions doubles-brin séparées par des boucles monocaténaire retrouvées dans les prédictions des structures secondaires les plus stables de la molécule complète du PLMVd. Cette superposition des séquences ribozymes des deux polarités empêcherait l'adoption de la structure active. L'auto-clivage serait alors empêché permettant ainsi l'accumulation des monomères circulaires. De plus la structure obtenue étant plus compacte, elle garantirait une plus grande stabilité du viroïde dans l'environnement intra- ou extra-

cellulaire (Navarro *et al.*, 1997; Côté *et al.*, 2003).

L'auto-clivage *in vitro* semble favorisé par la présence de cations bivalents tels que le  $Mg^{2+}$  et par des conditions ralentissant le travail de la RNA-polymérase favorisant la formation des structures en tête de marteau actives (Côté *et al.*, 2003).

Bien que toutes les observations décrites ci-dessus aient été faites *in vitro*, de nombreuses constatations réalisées *in vivo* confirment la présence et l'activité des séquences ribozymes *in vivo*. Il s'agit par exemple de l'observation d'extrémités 5'-hydroxyle identiques à celles générées lors d'auto-clivage *in vitro* et de la présence de fréquentes mutations compensatoires chez le PLMVd et le CChMVd permettant le maintien des structures ribozymes. Enfin, il existe une corrélation entre la capacité d'auto-clivage *in vitro* et l'infektivité de différents variants de PLMVd et de CChMVd (Navarro *et al.*, 1997; Côté *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006).

L'auto-clivage *in vivo* semble être sous la régulation de deux mécanismes. Tout d'abord, dans le cas du PLMVd et du CChMVd la structure secondaire la plus stable est perdue lors de la transcription ce qui permet l'adoption d'une structure ribozyme simple active (Bussière *et al.*, 1999). Celle-ci permet l'auto-clivage avant la fin de la transcription et le retour d'une structure secondaire stable. Chez le ASBVd la situation est légèrement différente. En effet, les formes répliquatives multimériques peuvent adopter des doubles structures en tête de marteau stables permettant l'auto-clivage en formes monomériques (Côté *et al.*, 2003). Ensuite, dans le cas du PLMVd et du CChMVd, la formation des monomères semble très efficace étant donné que la quasi totalité du brin multimérique est clivée en unités monomériques (on remarque en effet *in vivo* une accumulation de formes monomériques linéaires des deux polarités). Cette efficacité est probablement le résultat d'un travail lent de la polymérase. A l'inverse, dans le cas du ASBVd, le ribozyme simple de polarité positive est moins stable induisant l'accumulation de formes multimériques (1- à 8-mères) de polarité positive dans les cellules infectées (Bussière *et al.*, 1999).

## **6. Le pouvoir pathogène.**

Le pouvoir pathogène des viroïdes dépend de leur séquence nucléotidique ainsi que de leur conformation structurale. Pour un même viroïde, on peut donc distinguer des variants latents, peu sévères et sévères suivant l'importance des symptômes qu'ils induisent alors que la séquence de ces différents variants ne diffère que de quelques nucléotides (Flores *et al.*, 2001).

Le domaine P est déterminant dans l'expression de la pathogénicité chez les *Pospiviroidae*: une modification d'un seul nucléotide peut entraîner une modification de la pathogénicité et de la sévérité des symptômes (Semancik., 2003). Ce domaine ne semble cependant pas le seul à jouer un rôle dans l'expression des symptômes. Il semblerait en effet que les domaines CCR, TL, V et TR soient également impliqués dans ce mécanisme (Yijnu Qi *et al.*, 2003, Sano *et al.*, 1992). L'équipe

de Sano avait démontré en 1992 que tous les domaines des *Pospiviroidae*, exception faite de la région centrale conservée, jouaient un rôle dans la pathogénicité du PSTVd et plus généralement chez tous les *Pospiviroidae*. Cependant l'équipe de Yijun Qi *et al.* (2003) a mis en cause la CCR dans l'expression de la pathogénicité du PSTVd infectant des plants de tomates.

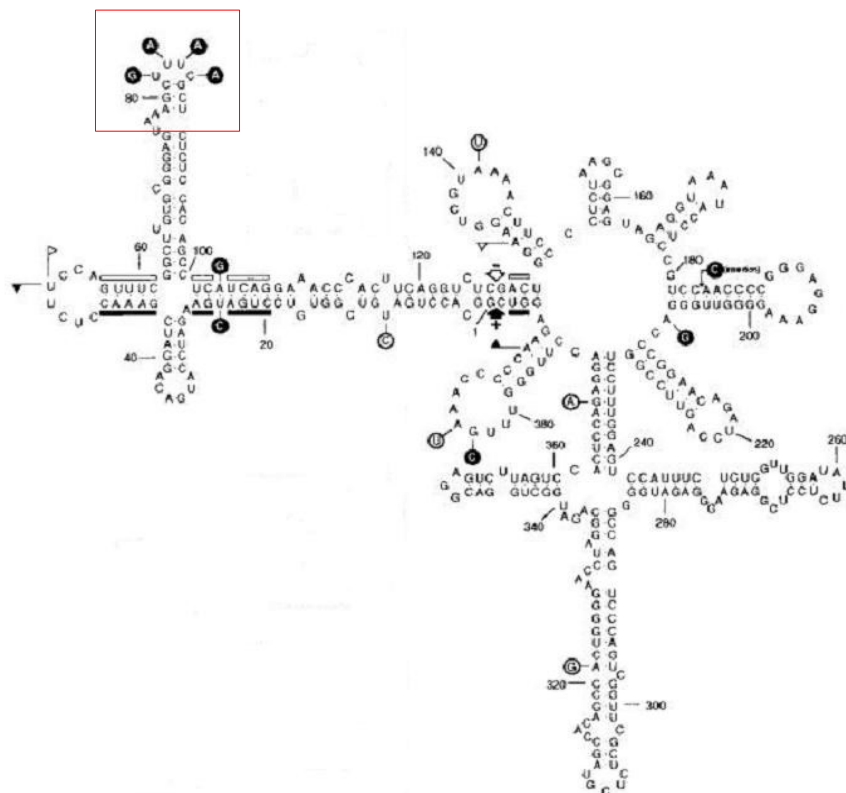
L'action des viroïdes sur les plantes serait principalement liée à la phosphorylation de certaines protéines, à l'activation d'un gène codant pour une protéine kinase et à l'altération de l'expression de différents gènes (Hammond et Zhao, 2000). Ainsi des études menées sur le PSTVd ont montré que ce dernier pouvait induire l'auto-phosphorylation d'une protéine (PKV) ayant des similitudes avec une protéine kinase de mammifère. L'activation *in vitro* de cette protéine était d'ailleurs d'autant plus importante que les souches de PSTVd en présence étaient sévères. De plus, les souches sévères et intermédiaires du PSTVd sont connues pour activer le gène *pkv* chez les tomates. Ce gène codant pour la protéine kinase dont il est question ci-dessus est activé efficacement en présence de souches sévères du viroïde alors que le transcrite de ce gène était peu abondant lorsque la plante était infectée par une souche peu sévère (Hammond *et al.*, 2000; Itaya *et al.*, 2002). Le gène *pkv* n'est cependant pas le seul à être affecté par la présence du PSTVd: 55 gènes dont l'expression est altérée ont en effet été détectés (Itaya *et al.*, 2002). Certains de ces gènes codent pour des fonctions très diverses connues telles que la défense de la plante (ou la réponse aux stress), le métabolisme protéique, la structure des parois cellulaires, l'activité chloroplastique alors que d'autres codent pour des fonctions non encore connues (Itaya *et al.*, 2002). La façon avec laquelle les viroïdes, et en particulier le PSTVd, arrivent à modifier l'expression des gènes chez une plante n'est pas encore bien connue. Il peut s'agir d'interférence avec l'épissage des ARN messagers, l'exportation des ARN hors du noyau, l'activation de kinases phosphorylant des protéines ou d'autres mécanismes d'activation directe ou indirecte de l'expression des gènes (Itaya *et al.*, 2002).

Chez les *Avsunviroidae*, la situation est quelque peu différente. A l'exception des ribozymes, les connaissances actuelles sur ces viroïdes ne permettent pas encore de mettre en évidence différents domaines structuraux, comme chez les *Pospiviroidae*. Les régions de la molécule impliquées dans l'expression de la pathogénicité sont donc encore très mal connues. Cependant, certains motifs structuraux ont pu, chez le PLMVd et le CChMVd, être mis en relation avec l'expression de symptômes produits lors d'une infection par ces viroïdes (De la Penã *et al.*, 1999).

L'étude des différences moléculaires existant entre des variants symptomatiques et asymptomatiques du CChMVd a permis de mettre en évidence une structure impliquée dans l'expression des symptômes de cette maladie (De la Penã *et al.*, 1999). Il s'agit des nucléotides 82→85 formant une boucle de quatre nucléotides située à gauche de la molécule au niveau des régions ribozyme (Figure 6 encadré rouge). Une substitution de type UUUC82-85→GAAA82-85 au niveau de cette boucle induit le passage d'un variant symptomatique à un variant parfaitement

asymptomatique (De la Penã *et al.*,1999; De la Penã *et al.*, 2002). Il a également été montré (De la Penã *et al.*, 2002) que la mutation de cette boucle n'affectait pas la quantité de viroïdes dans les tissus végétaux, confirmant ainsi la seule action de la mutation sur l'expression des symptômes. Cependant, on a remarqué que les variants symptomatiques possédaient une meilleure fitness que les variants asymptomatiques: lors de co-inoculations de variants symptomatiques et asymptomatiques en quantité égale, on observe un titre 3 fois plus élevé en variant symptomatique chez toutes les plantes inoculées et les symptômes sont peu sévères. Par contre, lorsque la quantité de variant symptomatique inoculée est dix fois plus élevée (par rapport au variant asymptomatique) seul le variant symptomatique est détecté et les symptômes sont sévères. Enfin lorsque c'est le variant asymptomatique qui est inoculé en excès, la moitié des plantes présentent des symptômes peu sévères et le variant symptomatique est présent en plus grande quantité dans ces plantes tandis que l'autre moitié des plantes inoculées ne présentent pas de symptôme et le variant asymptomatique est majoritaire. Les essais ont également montré que le variant asymptomatique dominait le variant symptomatique dans toutes les plantes s'il était inoculé en quantité 100X plus importante. Ceci tend à montrer que l'expression des symptômes dépend de la proportion des types de variants dans la descendance mais aussi qu'il y a une corrélation positive entre la sévérité des variants et leur fitness (De la Pena *et al.*, 2002).

**Figure 6:** Structure secondaire du CChMVd montrant la mutation responsable de l'expression des symptômes (De la Penã *et al.*,1999)



La situation est pour l'instant moins claire en ce qui concerne le PLMVd. Les différentes recherches menées jusqu'à présent n'ont permis de mettre à jour qu'une seule structure impliquée dans l'expression de la pathogénicité du PLMVd (Flores *et al.*, 2006). Il s'agit ici d'une insertion de 12 à 14 nucléotides au niveau de la boucle A ( fermant la tige portant les ribozymes à gauche de la molécule de PLMVd), portant la taille du PLMVd à 351 nucléotides. Les variants possédant ce type d'insertion produisent des symptômes de *peach calico* (une forme extrême de chlorose) (Malfitano *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006). Il faut toutefois noter que la présence d'une insertion au niveau de la boucle A n'induit pas systématiquement les symptômes de *peach calico*. Deux types d'insertion ont été mis en évidence à cet endroit: le premier type induisant les symptômes correspond à une insertion de type tige-boucle dont la boucle est riche en uracile tandis que la boucle du second type d'insertion (asymptomatique) contient deux adénines et deux guanines. Ceci n'est pas sans rappeler la structure responsable de l'expression des symptômes chez le CChMVd (Flores *et al.*, 2006). Il faut également noter que le mécanisme d'acquisition ou d'élimination des insertions n'est pas encore connu. Ces dernières peuvent en effet apparaître ou disparaître durant l'infection conduisant les variants latents à devenir pathogéniques et vice versa (Flores *et al.*, 2006). Malgré la connaissance de ces données concernant le CChMVd et le PLMVd on ne connaît pas encore à l'heure actuelle quel(s) motif(s) ou quelle(s) structure(s) est (sont) impliqué(s) dans l'expression de la mosaïque induite par les variants sans insertion (Flores *et al.*, 2006). Enfin, il ne faut pas oublier, bien que la démonstration n'ait pas encore été faite, que l'expression de ces symptômes est peut-être le fait du *gene silencing* (Flores *et al.*, 2006).

## **7. Le déplacement dans la plante.**

Contrairement aux virus, les viroïdes ne produisent pas de protéines de mouvement. Ils doivent donc utiliser une autre stratégie pour se déplacer.

Il semble que le mouvement à courte distance s'effectue à travers les plasmodesmes. Il nécessite l'intervention de séquences et de structures spécifiques contenues dans le viroïde (Flores *et al.*, 2001; Ding *et al.*, 2003).

Le mouvement à longue distance s'effectue via le phloème: les viroïdes paraissent suivre les produits de la photosynthèse. Cependant, il semble que d'autres facteurs encore mal connus influencent le déplacement des viroïdes (Flores *et al.*, 2001). En effet, le PSTVd est connu pour se diriger vers les feuilles supérieures (puits) d'une plante lorsqu'il est injecté dans la tige. Cependant, il ne pénètre pas dans les méristèmes apicaux. De même, il semble présent dans les sépales de fleurs mais pas dans les pétales, les étamines et les ovaires. Enfin, il faut noter que la question du déplacement à longue distance des viroïdes se répliquant dans les chloroplastes reste posée étant donné leur absence dans le phloème (Ding *et al.*, 2003).

Des tests d'inoculation sur arbre ont montré qu'il faut entre trois et quatre années pour que le PLMVd se propage dans l'ensemble de la plante. Sa répartition est uniforme au sein des tiges, des racines, des feuilles, des fruits et de l'écorce. Il faut également noter que contrairement au PSTVd, le PLMVd pénètre les apex des tiges.

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

Différentes méthodes de lutte existent afin de limiter les infections dues à ces pathogènes. Cependant, leur efficacité est relative.

On peut notamment citer:

- L'assainissement de plants.

La culture de méristèmes en combinaison avec la thermothérapie n'a pas montré son efficacité sur le PSTVd où deux cycles de traitements thermiques à 33-35°C suivis de culture de méristèmes ne donnaient que 2 à 6% de plantes saines après régénération (Singh *et al.*, 2003a). Cependant, cette technique semble efficace sur le ASSVd et sur le PLMVd. Dans le cas du PLMVd, l'expérimentation menée consistait en une thermothérapie de 2 mois à 38°C; des fragments de tiges ont ensuite été remis en propagation sur des plants sains. Tous les plants régénérés testés se sont alors montrés sains. Dans le même temps, un second test consistant en une thérapie par le froid a été mis en place. Les plants infectés ont été placés à 4°C pour 110 et 273 jours. Après cette période, des fragments de tiges ont été greffés sur un pied sain. Les tests de détection du PLMVd dans ce cas se sont tous montrés positifs (Howell *et al.*, 1999).

Par contre, la thérapie par le froid a montré son efficacité sur le PSTVd, le CChMVd et le CSVd (Singh *et al.*, 2003a): 5 à 6 mois de traitement par le froid (à 4°C), suivis d'une culture de méristèmes, permettent d'éradiquer le PSTVd à partir de tubercules de pomme de terre (Singh *et al.*, 2003a). Certains viroïdes comme le *Hop latent viroid* peuvent également être éliminés par simple culture de méristèmes sans passage par la thermothérapie (Singh *et al.*, 2003a).

- La protection croisée.

Cette technique consiste à infecter des plantes saines par un variant latent afin de les protéger contre les variants sévères. En effet lors d'une infection ultérieure par un variant sévère, la plante ne développera pas les symptômes qui lui sont associés (Flores *et al.*, 2001). Cette technique a été testée notamment avec le PLMVd sur pêchers, avec le CChMVd sur chrysanthèmes (De la Penã *et al.*, 2002; Flores *et al.*, 2006). L'atténuation des symptômes (ou leur absence) est cependant incertaine dans le temps (De la Penã *et al.*, 2002). Il faut donc rester vigilant face à une telle méthode. Deux modes d'actions peuvent être envisagés pour expliquer le phénomène de protection croisée. Le premier est basé sur la compétition, pour un facteur limitant, entre le variant asymptomatique normalement présent en grande quantité vu son inoculation précoce et le variant

symptomatique (De la Penã *et al.*, 2002). Le second mode d'action pourrait faire intervenir le phénomène de *gene silencing* (Flores *et al.*, 2006): lors de l'inoculation du variant latent, des siRNA correspondant à ce dernier seraient produits en guise de réaction de défense de la plante hôte. Ensuite, lors d'une infection ultérieure par un variant sévère, ces siRNA pourraient entraîner la dégradation de ce dernier (Flores *et al.*, 2006).

- Méthodes utilisant le génie génétique.

Les mécanismes de résistance des plantes face aux viroïdes sont encore à l'heure actuelle peu connus. Il est donc très difficile de développer des plantes résistantes vis-à-vis de ces pathogènes (Singh *et al.*, 2003a). On sait cependant qu'il n'existe pas de variétés de pommes de terre résistantes au PSTVd: toutes les variétés testées finissent par développer des symptômes (Singh *et al.*, 2003a).

Cependant quelques pistes semblent se dégager:

Des plantules produisant un ARN antisens visant l'ARN de polarité négative du CEVd ont permis de limiter l'accumulation du pathogène. A l'opposé des plantules produisant un ARN visant l'ARN positif du CEVd ont renforcé l'action du viroïde (Singh *et al.*, 2003a).

Il est apparu récemment que certains mécanismes de défense des plantes infectées par des viroïdes feraient appel au phénomène de « Gene Silencing » c'est-à-dire l'inhibition de l'expression d'un gène. Deux phénomènes ont été mis au jour: le premier concerne le blocage de la transcription de l'ADN, il s'agit du « transcriptional gene silencing » (TGS). Le second consiste en une dégradation des ARN: il s'agit de l'extinction post-transcriptionnelle de gène (PTGS: *Post-transcriptional gene silencing*) (Conejero, 2003).

Ce dernier mécanisme a été mis en évidence pour des plantes infectées par des viroïdes (notamment le PLMVd, le CChMVd et le PSTVd). Dans ce cas, l'ARN viroïdal a été dégradé sous forme de petits fragments d'ARN d'une vingtaine de nucléotides de long. Ces petits fragments complémentaires du génome viroïdal n'ont jamais été détectés sur des plantes saines et sont d'ailleurs considérés comme un marqueur de PTGS. Un chapitre leur sera consacré dans la suite de ce travail.

## **9. Le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd).**

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 la maladie de la mosaïque latente du pêcher provient principalement de la perte de qualité des fruits, de la diminution de longévité des arbres et d'une sensibilité accrue aux autres stress biotiques et abiotiques (Flores *et al.*, 2006).

### 9.1. Gamme d'hôtes.

Le PLMVd infeste naturellement les plants de pêchers. Cependant, il est possible de le transmettre par greffe à d'autres hybrides tels que l'amandier x pêcher et amandier x prunier. Les essais de transmission du PLMVd à d'autres espèces de *Prunus* sont restés sans succès (Flores *et al.*, 2003). Cependant, ce viroïde a également été détecté sur poirier, cerisier, abricotier, nectarines et prunier (Flores *et al.*, 2003), amandier (Fekih Hassen , 2006).

### 9.2. Distribution géographique du PLMVd.

Le PLMVd a été détecté aux États-Unis, en Amérique du Sud, en Chine, au Japon, dans le bassin méditerranéen et en Australie (Flores *et al.*, 2003). Les échanges de matériel végétal infecté (plants de pêchers et nectarines) sont considérés comme les facteurs principaux de cette extension géographique du PLMVd (Flores *et al.*, 2003).

### 9.3. Symptômes.

#### ***En serre sur plante indicatrice GF-305.***

Les plants de pêcher GF-305 sont très sensibles au PLMVd et développent facilement des symptômes. Cette variété est ainsi considérée comme indicateur de référence pour les tests d'incidence biologique (Llacer, 1998).

Lorsqu'il n'est pas latent, le PLMVd induit des symptômes sur les feuilles. La maladie se traduit par la présence de marbrures jaunâtres, d'une mosaïque diffuse, de taches chlorotiques floues ou de plages jaune vif ou crème (calico). La variété des symptômes induits par le PLMVd est présentée dans la figure 7.

**Figure 7:** Symptômes provoqués par le PLMVd sur cultivar GF-305. (1-3) taches chlorotiques floues et mosaïque, (4) taches chlorotiques de couleur crème, chlorose et (5) nécroses marginales avec déformation



Les isolats les plus sévères induisent une mosaïque complète du feuillage, les feuilles peuvent également se recourber et se nécroser dans les cas extrêmes.

### ***Situation naturelle.***

Sur plants de pêcher, la maladie est souvent latente: la plupart des infections dues au PLMVd ont lieu sans apparition de symptômes foliaires (Flores *et al.*, 2006). De plus, même s'ils apparaissent (souvent après deux années de culture), les symptômes foliaires disparaissent fréquemment avec le temps (Flores *et al.*, 2006). On observe cependant un retard de croissance de 4 à 6 jours (végétation, floraison et maturité des fruits) (Ambros *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2006).

Dans le cas contraire, les pêches malades sont aplaties, d'apparence terne et décolorées. Les fruits sont également moins savoureux. On observe également une plus forte propension des noyaux, plus aplatis, à éclater. Les symptômes les plus déterminants restent l'apparition de stries roses sur les pétales des fleurs et la présence sur les fruits d'une suture liégeuse et craquelée. Des cannelures peuvent également apparaître sur le tronc des arbres, les bourgeons sont nécrosés et une moindre vigueur est généralement observée durant les quatre premières années (Ambros *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2003).

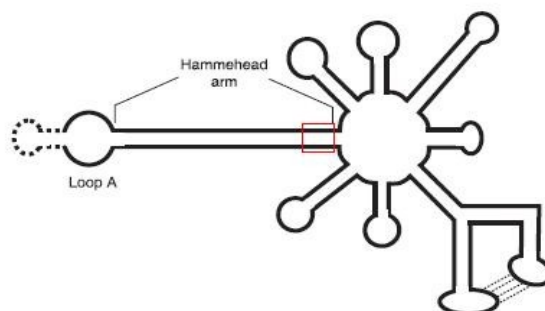
Cinq ans après la plantation de matériel infecté, les arbres vieillissent prématurément, la production chute aussi bien en quantité qu'en qualité. Les arbres deviennent sensibles aux parasites tel que *Pseudomonas syringae* pv . *persicae* et aux aléas climatiques (Flores *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006).

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

Le mode réplication et le fonctionnement des ribozymes ayant déjà été abordés de manière générale pour les *Avsunviroidae*, les constatations qui suivent concerneront exclusivement le PLMVd.

Pour le PLMVd, les monomères de polarité positive et négative se trouvent en proportion identique dans les tissus infectés alors que le ratio « polarité positive/polarité négative » est plus élevé chez les autres membres des *Avsunviroidae*. Il faut de plus noter que les monomères linéaires constituent la forme la plus abondante dans les tissus infectés alors que les oligomères ne sont quasiment pas détectés, ce qui montre ainsi l'efficacité des ribozymes (Flores *et al.*, 2006).

**Figure 8:** Position de la boucle A et des nouveaux sites d'initiation de la transcription (dans l'encadré rouge)



Le site d'initiation de la transcription a longtemps été localisé au niveau de la boucle A (figure 8). Une nouvelle méthodologie plus sensible permettrait actuellement de mieux le situer (Flores *et al.*, 2006). Le nouveau site d'initiation de la transcription (pour les deux polarités) serait en effet situé à la base du bras constituant le ribozyme en tête de marteau au niveau d'une région bicaténaire de 6 à 7 paires de bases contenant le motif conservé GUC précédant le site d'auto-clivage (Delgado *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). Cette région contient d'ailleurs probablement les promoteurs qui seuls ou par l'intermédiaire de facteurs de transcription, non encore connus, recrutent la RNA polymérase chloroplastique. Au moins deux polymérases coexistent dans les chloroplastes: la NEP et la PEP (Delgado *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). Cependant, des données récentes indiqueraient que l'accumulation et la synthèse du PLMVd est très active dans les feuilles montrant une symptomatologie de *peach calico*. Dans ces feuilles, le développement des protoplastes en chloroplastes et le processing de certains précurseurs d'ARNr (et donc la traduction des protéines plastidiques) sont compromis (Delgado *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). Ceci rend donc l'implication de la NEP ou d'une polymérase appartenant à la même classe plus probable durant la transcription du viroïde. La NEP semble en effet très flexible et capable d'endosser ce rôle étant donné que son implication dans la transcription de gènes plastidiques a été démontrée dans du tabac déficient en PEP (Delgado *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006).

Enfin il est intéressant de noter que la nouvelle localisation du site de réplication implique que les structures ribozymes du brin naissant sont synthétisées avant celles provoquant le clivage permettant ainsi un auto-clivage en cours de transcription sans interaction entre les ribozymes (Delgado *et al.*, 2005).

## 9.5. Transmission.

Le PLMVd est facilement transmissible mécaniquement notamment par les outils servant à la taille et à l'entretien du verger. Leur rôle est donc important dans la propagation de la maladie. La transmission par la graine et par le pollen est inexistante mais le viroïde peut, à un taux faible, être transmis par *Myzus persicae* (Flores *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2006).

## 9.6. Méthodes de détection du PLMVd.

### 9.6.1. Les méthodes biologiques.

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

### 9.6.2. Les méthodes moléculaires.

Les techniques moléculaires assurent une détection fiable et rapide des agents pathogènes et en particulier des viroïdes. De plus contrairement aux méthodes biologiques, elles permettent de manipuler simultanément un grand nombre d'échantillons à moindre coût.

- Hybridation et marquage moléculaire.

Le PLMVd peut être détecté par migration sur gel de polyacrylamide d'extrait d'ARN de feuilles et de fruits et marquage à l'argent. Cependant, cette technique est à déconseiller vu la faible quantité de viroïde présent dans les tissus infectés (Flores *et al.*, 2003).

Différentes techniques simplifiées d'hybridation du PLMVd par *dot-blot* avec des sondes ARN radioactives ou non ont également été mises au point. Les acides nucléiques extraits peuvent être mis soit directement en contact avec la membrane de nylon, soit après dénaturation dans du formaldéhyde (Flores *et al.*, 2003).

- La RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*).

La technique de polymérisation en chaîne (PCR) a été mise au point au milieu des années 80 par Kary Mullis (Hadidi *et al.*, 2003). Le principe de la PCR repose sur l'utilisation d'un couple d'oligonucléotides (amorces) et d'une ADN polymérase thermostable dans un procédé consistant à enchaîner de façon cyclique les trois étapes suivantes: la dénaturation des acides nucléiques

(bicaténaire), l'hybridation des amorces sur chaque brin monocaténaire et l'extension enzymatique d'ADN complémentaire à partir des amorces. Ce procédé conduit à la production exponentielle d'un fragment d'ADN rendant ainsi possible sa détection par différentes techniques de révélation. Il s'agit donc d'une amplification moléculaire *in vitro* à partir de séquences cibles contenues dans l'échantillon de départ.

La RT-PCR utilise le même principe d'amplification de séquences cibles d'acides nucléiques, mais l'échantillon à analyser est composé d'ARN. Cet ARN cible doit donc être préalablement rétro-transcrit en ADN complémentaire monobrin. Cette étape est réalisée par la 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.

### **9.7. Méthodes de lutte vis-à-vis du PLMVd.**

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).

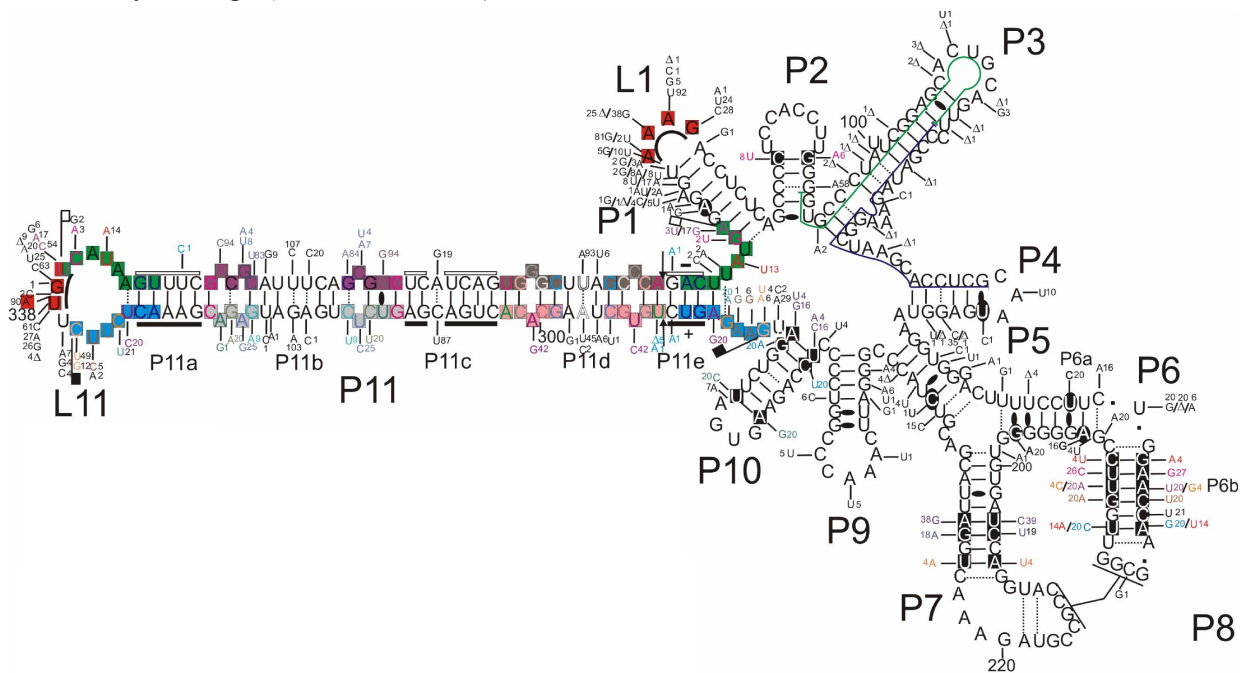
La stratégie de lutte la plus efficace serait l'identification de variétés résistantes. Malheureusement, peu de données sont disponibles à ce sujet dans la littérature. On sait cependant que le viroïde induit chez les plantes infectées un phénomène de *PostTranscriptional Gene Silencing* (PTGS) se traduisant 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: le renforcement du phénomène de *gene silencing* par production d'un ARN antisens à l'un des brin du PLMVd (formant un complexe stable avec le PLMVd) ou 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).

## 9.8. Caractérisation moléculaire du PLMVd.

La séquence de référence du PLMVd (Accession GenBank n° M83545) comporte 338 nucléotides répartis en 91G (26,9%), 87C (25,7%), 80A (23,6%) et 80U (23,6%) (Flores *et al.*, 2003). D'après des prédictions informatiques et des essais *in vitro*, la molécule de PLMVd adopte une structure extrêmement branchée (Hernandez et Flores 1992; Bussière *et al.*, 2000). De plus, l'analyse de variabilité de séquence, des covariations de nucléotides et des prédictions informatiques (réalisées avec le logiciel MFOLD) montrent que la structure secondaire en branche du PLMVd est conservée. C'est cette structure qui pourrait être responsable de l'insolubilité du viroïde dans le LiCl 2M (Fekih Hassen *et al.*, 2006 soumis à publication). Seul le CChMVd adopte également une structure aussi branchée (Bussière *et al.*, 1999).

**Figure 9:** Structure secondaire prédite pour la séquence de référence du PLMVd.. Les ribozymes sont délimités par des drapeaux et leurs séquences conservées sont marquées par des barres, les sites d'autoclivage sont notés par des flèches. Les positions polymorphiques et le nombre de variants possédant ces mutations sont indiquées le long de la molécule. Les appariements de bases non Watson et Crick sont indiqués par des ovales noirs. Les nucléotides avec des fonds rectangulaires noirs indiquent les covariations; ceux avec un aval noir indiquent les mutations préservant la paire de base. Les nucléotides formant les tiges I, II et III de la structure Hammerhead + sont en fond rose, gris et bleu respectivement. Ceux formant les tiges I, II et III de la structure Hammerhead négative sont en fond brun, violet et vert respectivement. Les nucléotides impliqués dans l'interaction potentielle en pseudo-noeud entre les boucles L1-L11 sont en fond rouge. (Ambros *et al.*, 1998)



Il n'existe pas encore de réelle démonstration prouvant l'existence d'une structure aussi branchée *in vivo*. Cependant outre les faits énoncés plus haut, tendant à supposer qu'une telle structure est maintenue, une autre caractéristique partagée à la fois par le PLMVd et le CChMVd renforce

l'existence de cette structure secondaire particulière (Gago *et al.*, 2005). Il s'agit d'une interaction en pseudo-noeud entre deux épingles à cheveux P7 et P8 de la structure (Cf. figure 9). Il a été démontré qu'une telle interaction est vitale pour le CChMVd car elle facilite le repliement du brin de polarité positive. Ceci suggère donc indirectement qu'une telle interaction entre les boucles GCGG178-181 et CCGC211-214 ne serait pas sans importance pour le PLMVd (Gago *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006). La conservation d'une structure commune entre deux viroïdes ne possédant que peu de similitudes de séquence suggère donc que l'augmentation de stabilité apportée par l'interaction est nécessaire aux viroïdes possédant une structure secondaire complexe (Gago *et al.*, 2005; Flores *et al.*, 2006).

Différentes analyses de séquences menées sur des centaines d'isolats différents de PLMVd indiquent l'existence de nombreuses mutations ponctuelles, et d'un grand polymorphisme. Des travaux récents ont d'ailleurs montré que 41% de la molécule de PLMVd possède des positions polymorphes (Fekih Hassen *et al.*, soumis à publication). La molécule de PLMVd peut être divisée en deux parties 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.*, soumis à publication). 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 2006 soumis à publication). 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, 2006 soumis à publication). 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 de la structure 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 et la fonction chez le PLMVd.

Une étude de la phylogénie et des homologies de séquence menée sur 119 variants de PLMVd a permis de les classer en deux groupes possédant 85% d'homologie entre eux (Fekih Hassen *et al.*, soumis à publication). Les variants appartenant au groupe I montrent des homologies de 93-100% entre eux tandis que ceux appartenant au groupe II montrent des homologies de 92%-100% entre eux (Fekih Hassen *et al.*, soumis à publication). Ensuite, une analyse plus fine de la phylogénie et de la structure primaire des variants des groupes I et II a été entreprise au sein de chaque groupe. Il en est ressorti que les variants du groupe I peuvent être subdivisés en trois sous groupes distingués par 7 positions polymorphes informatives. Les variants du groupe II peuvent quant à eux être regroupés, par le même biais, en deux sous-groupes distingués par 18 positions polymorphes informatives (Fekih Hassen *et al.*, soumis à publication).

Les viroïdes obéissent au modèle de quasi-espèce de Eigen selon lequel une quasi espèce est composée d'un ensemble de souches (variants) d'une même espèce en équilibre dynamique dans un hôte infecté et en constante évolution (Ambros *et al.*, 1998).

## **10. Le « gene silencing ».**

### **10.1. Définition générale.**

Le *gene silencing* existe naturellement chez différents organismes et notamment chez les protozoaires, les champignons, les plantes et les mammifères (Landry *et al.*, 2004). Ce phénomène dont la compréhension s'améliore d'année en année, est largement utilisé en biologie moléculaire pour réaliser, entre autres, des inactivations ciblées de gènes.

Le *gene silencing* joue un rôle important dans le développement des végétaux, dans leur défense contre les virus et dans le maintien de l'intégrité de leur génome (Landry *et al.*, 2004).

L'extinction de gène peut être divisée en deux phénomènes distincts: l'extinction transcriptionnelle de gène médiée par l'ARN (phénomène nucléaire) et l'extinction post-transcriptionnelle de gène (phénomène cytoplasmique) (Landry *et al.*, 2004; Snehasis *et al.*, 2004). Les différentes voies impliquées dans l'extinction des gènes sont présentées à la figure 10.

La première voie de *silencing* a lieu lorsqu'il y a production d'ARN double brin, exogène (provenant de virus, d'un transgène ou de viroïdes) ou non, possédant une homologie avec une séquence promotrice. Ceci mène à une méthylation *de novo* de l'ADN de la séquence promotrice (inactivant le gène) aussi appelée *RNA-directed DNA methylation* (RDM) (Wasseneger 2004 cité par Landry *et al.*, 2004; Snehasis *et al.*, 2004). Les séquences d'ADN potentiellement touchées par ce phénomène peuvent être très petites: des régions de 30 paires de bases peuvent être modifiées ce qui ouvrirait également la porte à une interaction de type siRNA-ADN (Snehasis *et al.*, 2004).

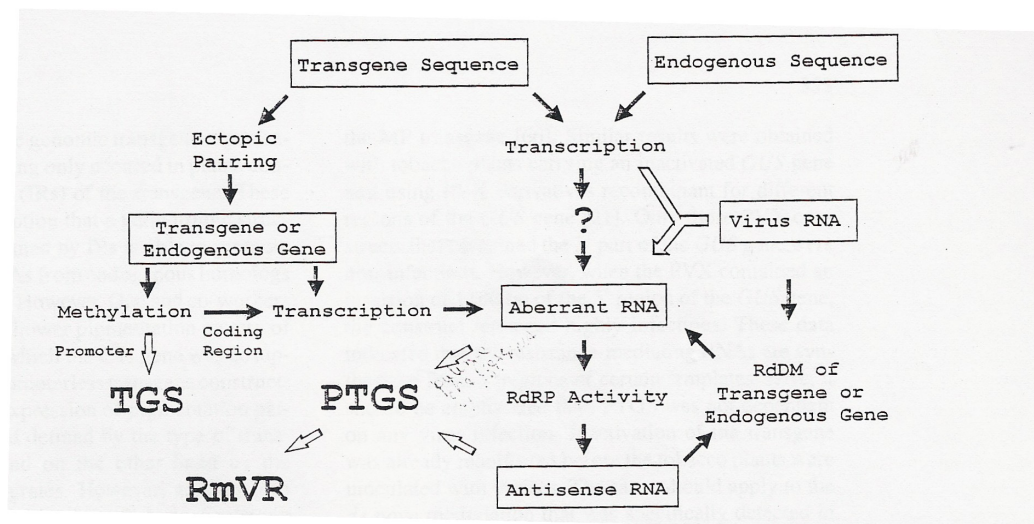
Dans la seconde voie (Figure 11), l'ARN bicaténaire endogène ou exogène est clivé dans le cytoplasme par une ribonucléase de la famille des Rnase III appelée Dicer. Le résultat de ce clivage est la production de fragments d'ARN de 21 à 25 nucléotides des deux polarités appelés short interfering RNA (siRNA) (Landry *et al.*, 2004). Une fois produits, ces siRNA peuvent se fixer sur un complexe protéique appelé RISC (*RNA induced silencing complex*). Le complexe ainsi formé est capable de reconnaître une séquence cible (complémentaire du siRNA fixé sur le RISC) sur un brin d'ARN (Landry *et al.*, 2004). A partir de ce moment deux voies peuvent être empruntées. Dans la première, le complexe fixé sur la séquence cible sert d'amorce pour la RNA polymérase RNA-dépendante (RdRP) qui en synthétise alors le brin complémentaire. L'ARN bicaténaire ainsi formé pourra alors être clivé par le Dicer ce qui permet en définitive d'amplifier le *gene silencing* (Landry *et al.*, 2004). Dans la seconde voie, après la fixation du complexe, le brin d'ARN cible va être clivé en deux fragments au niveau de la zone d'hybridation du complexe. Les deux fragments résultants sont ensuite dégradés par des exonucléases cellulaires (Landry *et al.*, 2004).

L'ARN bicaténaire impliqué dans le phénomène de *gene silencing* peut avoir différentes

origines. Il peut tout d'abord provenir d'un ARN aberrant (abRNA) monocaténaire servant de modèle à la RNA polymérase RNA-dépendante qui en synthétise le brin complémentaire (Wasseneger *et al.*, 1998). Il faut voir ces abRNA comme des ARN messagers auxquels il manque une caractéristique de mRNA. Différents processus peuvent mener à leur production. Les abRNA sont notamment formés lorsque la dégradation des ARN est supérieure à leur traduction (Wasseneger *et al.*, 1998), des erreurs en fin de transcription, un processing défectueux ou leur dégradation peuvent mener à la formation des ARN aberrants (Wasseneger *et al.*, 1998). Ensuite, les ARN bicaténaires peuvent également provenir de virus, de viroïdes et de transgènes.

Il faut de plus noter que *gene silencing* peut se propager de cellule en cellule sous forme d'un signal systémique. Cependant, les composants de ce signal de transmission ne sont pas encore connus (Snehasis *et al.*, 2004).

**Figure 10:** Schématisation des voies de silencing. TGS (Transcriptional gene silencing); PTGS (Posttranscriptional gene silencing); RmVR (RNA-mediated Virus Resistance); RdRP (RNA dependant RNA polymerase); RdM (RNA-directed Methylation (Wasseneger *et al.* 1998)

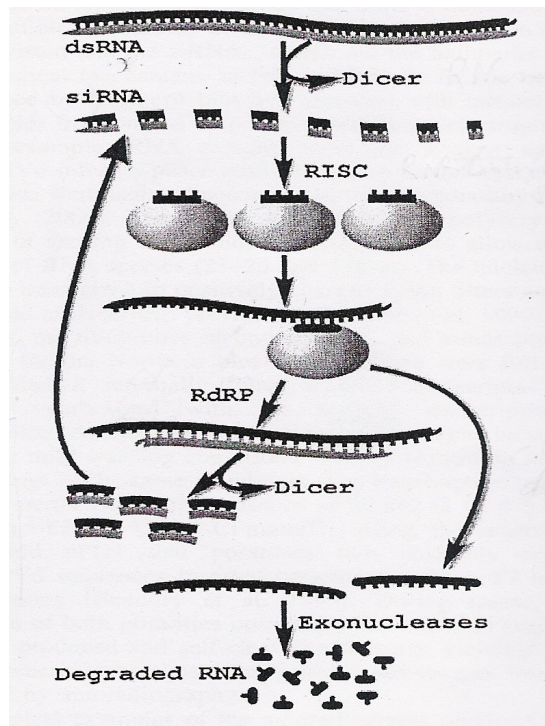


## 10.2. Mise en évidence du gene silencing chez les viroïdes.

La principale façon de mettre en évidence la présence de l'extinction post-transcriptionnelle de gènes est de détecter simultanément le viroïde et les siRNA qui l'accompagnent. Ceux-ci sont en effet un marqueur incontestable de la présence de *gene silencing* (Landry *et al.*, 2004). La technique la plus sensible pour détecter les siRNA est sans conteste le *Northern Blot*. Cette technique consiste à extraire l'ARN total des feuilles pour le faire migrer sur un gel de polyacrylamide très concentré (minimum 12% d'acrylamide). Cette migration en conditions dénaturantes permet d'isoler efficacement les siRNA (Martinez de Alba *et al.*, 2002). Ensuite, un transfert des acides nucléiques est réalisé sur une membrane de nylon chargée positivement. Cette membrane est alors hybridée

avec une sonde spécifique marquée radioactivement et correspondant soit à une fraction du viroïde recherché soit à la séquence complète du viroïde. Les sondes sont marquées (intérieurement) à l'aide de  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$  lors de la transcription. Les sondes ainsi obtenues peuvent être de polarité positive, négative ou les deux simultanément suivant le procédé de transcription utilisé. Dans le cas du PLMVd, la polarité de la sonde a peu d'importance étant donné la présence de siRNA correspondant aux deux polarités des viroïdes (Martinez de Alba *et al.*, 2002; Landry *et al.*, 2004).

**Figure 11:** 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.



### 10.3. Les virus et le gene silencing.

Chez les végétaux, le phénomène de *gene silencing* a très vite été associé avec la défense contre les virus. En effet, ce phénomène ciblant spécifiquement l'ARN bicaténaire semble bien adapté pour combattre les séquences ARN d'origine parasite (Snehasis *et al.*, 2004). De leur côté, les virus ne sont pas dépourvus de stratégies leur permettant de contourner le *gene silencing* qu'ils induisent chez les plantes. Ainsi, par exemple, les potyvirus produisent le *Helper Component Proteinase* (HC-Pro) tandis que le PVX produit la protéine P25 afin d'éviter le *silencing* (Snehasis *et al.*, 2004).

Les virus à ARN produisent de l'ARN double brin, durant leur multiplication, grâce à une RNA polymérase RNA-dépendante d'origine virale. Sans mécanisme d'évitement, ces ARN pourraient être facilement dégradés sous l'action du *gene silencing*. L'action du HC-Pro produit par les potyvirus permet cependant d'améliorer l'accumulation d'une large gamme de virus végétaux. Le HC-Pro prévient en effet le *gene silencing* induit par les virus (VIGS). Le HC-Pro agit probablement en activant un inhibiteur endogène du *silencing* (Snehasis *et al.*, 2004). Cependant, il est incapable d'agir contre le signal de propagation du *silencing* (Snehasis *et al.*, 2004). Le rôle de la P25 codée par le PVX est quant à lui différent de celui joué par le HC-Pro. La P25 est en effet efficace pour bloquer le signal de transmission systémique du *silencing* mais cette protéine ne permet cependant pas au virus d'éviter efficacement l'accumulation de siRNA dans les cellules végétales (Snehasis *et al.*, 2004). Ce blocage du signal de *silencing* limite donc la réaction de la plante et augmente les chances d'infection par inoculation répétées (Padmanabhan Chellappan *et al.*, 2004). Une troisième méthode de « défense » des virus face au *silencing* peut encore être décrite. Il s'agit de la technique utilisée par le *Cybidium ringspot virus* (Snehasis *et al.*, 2004). Ce virus code pour la protéine P19 qui inhibe le *gene silencing* grâce à son interaction avec les siRNA. La P19, *in vivo*, est en effet capable de se lier aux siRNA les rendant ainsi inaccessibles au complexe RISC (Snehasis *et al.*, 2004). Les siRNA ainsi fixés ne peuvent donc pas jouer leur rôle d'inducteur de *gene silencing* laissant une part des virus capable de poursuivre l'infection. Ces premiers exemples illustrent brièvement la variabilité des mécanismes de défense utilisés par les virus sans constituer une synthèse des mécanismes mis à jour.

Enfin il paraît important de constater que le phénomène de *gene silencing* a également été observé chez un virus à ADN (Padmanabhan *et al.*, 2004). Dans ce cas, seules certaines séquences virales spécifiques ont été clivées en siRNA. L'origine de ce phénomène résiderait dans l'hybridation partielle de séquences transcrites à partir de l'ADN viral (Padmanabhan *et al.*, 2004).

#### **10.4. Les viroïdes et le *gene silencing*.**

Le phénomène de *gene silencing* (post-transcriptionnel) a été proposé depuis peu comme un moyen de défense des plantes infectées par des viroïdes (Itaya *et al.*, 2002, Martinez de Alba *et al.*, 2002, Papaefthimiou *et al.*, 2001). En effet, la mise en évidence de siRNA représentant différents domaines du génome viroïdal (des deux polarités) dans des plantes infectées par des viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* et des *Avsunviroidae* a suggéré que ces derniers étaient en mesure d'induire ce phénomène. Cependant, bien que l'existence de ce phénomène ait été démontrée (Itaya *et al.*, 2002; Martinez de Alba *et al.*, 2002; Papaefthimiou *et al.*, 2001), il est encore difficile, aujourd'hui, d'expliquer comment les viroïdes peuvent l'induire. En effet, la localisation du Dicer dans le cytoplasme et le développement des *Avsunviroidae* dans les chloroplastes d'une part et celui

des *Pospiviroidae* dans le noyau d'autre part ne jouent pas en faveur de l'établissement de ce phénomène. Il apparaît cependant que les viroïdes pourraient devenir des cibles pour le Dicer lors de leur déplacement de cellules en cellules.

L'infection des plantes par les viroïdes suggère que ces derniers peuvent échapper au phénomène de *gene silencing*. Différentes hypothèses permettent d'expliquer comment les viroïdes contournent ce moyen de défense des plantes (Landry *et al.*, 2004). La première hypothèse concerne la compartimentation des cycles de réplication des deux familles de viroïdes. En effet, les *Pospiviroidae* et les *Avsunviroidae* se répliquent respectivement dans le noyau et dans les chloroplastes des cellules végétales où on les retrouve majoritairement (Bussière *et al.*, 1999). A l'opposé, le Dicer possède avant tout une localisation cytoplasmique (Des analogue de cet enzyme ont cependant été découverts dans le noyau) (Flores *et al.*, 2006). Les viroïdes ne sont donc que peu de temps en présence de l'enzyme (lorsqu'ils se déplacent de cellules en cellules). La seconde hypothèse permettant d'expliquer le contournement du *gene silencing* fait intervenir la structure des viroïdes: ils consistent en une molécule d'ARN simple brin adoptant une structure secondaire très stable possédant peu de régions pouvant servir de substrat pour le Dicer (Landry *et al.*, 2004 et 2005). Une troisième hypothèse propose que les viroïdes peuvent également se lier à des protéines cellulaires pouvant les soustraire de l'action du Dicer (Landry *et al.*, 2004). Malheureusement, très peu de données existent quant à la nature des protéines se fixant aux viroïdes: il peut s'agir notamment de protéines impliquées dans le mouvement (Yali Zu *et al.*, 2002) ou de polymérases mais leur rôle dans la protection contre le *gene silencing* n'est pas encore connu. Enfin une dernière possibilité est que les viroïdes pourraient supprimer activement le *gene silencing* soit en activant des protéines de l'hôte dont le rôle est d'inhiber le phénomène, soit en provoquant eux-mêmes une extinction des gènes de l'hôte (Landry *et al.*, 2004). De tels mécanismes ont déjà été décrits chez les virus. Par exemple, une protéine de la capsid du *Turnip crinckle virus* est connue pour provoquer l'inhibition du *silencing* chez *Nicotiana benthamianai*. De même, le virus de la mosaïque de la tomate code pour une protéine impliquée dans sa réplication et possédant la même activité (Landry *et al.*, 2004). Cependant, les viroïdes ne codent pour aucune protéine, le moyen par lequel ils arrivent à inhiber ou à induire (du point de vue de la pathogénicité) le phénomène de *gene silencing* n'est pas encore connu. Il est possible qu'ils interagissent avec des facteurs cellulaires ou qu'ils modulent l'expression de certains gènes entraînant de ce fait la suppression du *silencing* (Landry *et al.*, 2004). Enfin, on peut également envisager que des siRNA, issus du viroïde infectant la plante et fixés sur un complexe RISC, puissent trouver une séquence complémentaire au niveau des ARN messagers de l'hôte induisant leur dégradation (Flores *et al.*, 2006). Ceci entraînerait une régulation des gènes de l'hôte et peut-être aussi l'expression des symptômes. Cependant, cette hypothèse est intrigante car, dans le cas de la protection croisée, ce même mécanisme pourrait induire la

pathogénicité; or aucun symptôme n'est visible (Flores *et al.*, 2006). Il faut cependant rester prudent et ne pas oublier qu'il s'agit ici d'hypothèses et non de faits démontrés.

### **10.5. Le gene silencing et le PLMVd.**

Le phénomène de *gene silencing* vis-à-vis du PLMVd a été récemment mis en évidence par la détection simultanée de siRNA et du viroïde (Landry *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2006). Ce phénomène pourrait être impliqué directement dans la réaction de défense de la plante mais aussi dans la pathogénicité (Landry *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2006).

Ce n'est que très récemment qu'il a été découvert comment ce viroïde était capable d'induire le *gene silencing*. En effet, lorsqu'on observe la structure secondaire du PLMVd prédite par ordinateur, on remarque l'absence de régions bicaténaires de 21 paires de bases. Or sans ces régions, le Dicer ne peut théoriquement pas agir. Landry *et al.* (2005) ont cependant mis en évidence que le Dicer pouvait supporter des boucles de faible taille dans les régions bicaténaires. Ceci permet d'expliquer comment le PLMVd initie le *gene silencing*: la prédiction de la structure secondaire du PLMVd montre la présence d'une région tige boucle (P11) de grande taille à gauche de la molécule. Cette région bicaténaire est entre-coupée de petites boucles. La plus grande région située entre deux boucles a une taille de 12 paires de bases. Différentes constructions moléculaires correspondant à des molécules incomplètes de PLMVd ont cependant permis de mettre en évidence, *in vitro*, l'implication de la région tige boucle P11 dans le déclenchement du *gene silencing* et son clivage en siRNA par le Dicer. Ces auteurs ont également montré que le Dicer, bien que clivant plus efficacement un fragment d'ARN bicaténaire parfait, pouvait aussi cliver des fragments d'ARN bicaténaires comportant quelques nucléotides non appariés. Cependant, les régions pouvant être clivées doivent avoir une taille minimale de 21 paires de bases. A notre connaissance, ces observations *in vitro* n'ont pas été confirmées *in vivo*. De plus, aucune donnée n'existe quant à la transmission du *silencing* dans toute la plante.

## **Objectifs.**

Dans la continuité des travaux réalisés Fekhi Hassen, des tests de pathogénicités ont été effectués sur 32 variants de PLMVd afin de déterminer si la classification des variants de ce viroïdes en deux groupes de structures reflétait également une pathogénicité différentielle. Ces tests ont été menés sur des plants de pêchers GF-305 inoculés 8 à 10 mois auparavant avec les 32 variants à étudier. Ils ont consisté en la détection des variants dans le jus brut provenant des feuilles des plantes inoculées. Les plantes ayant répondu positivement ont ensuite fait l'objet d'une analyse visuelle des symptômes. Ces données ont été mises en relation avec les groupes structuraux.

Le second objectif de ce travail consistait à mettre au point une technique de détection du phénomène de *gene silencing*, phénomène de défense des plantes impliqués dans la protection contre les virus et les viroïdes. Cette mise au point a été réalisée à partir d'extrait d'ARN totaux de plante ayant répondu positivement lors des tests de pathogénicité. Les différents variants étudiés dans cette partie ont été choisis en raison de leur pathogénicité différentielle.

# Matériel et Méthodes.

## 1. Matériel biologique.

### 1.1. Matériel végétal.

Les plants de pêcher utilisés appartiennent à la variété GF-305. Ils ont été fournis par le département de Lutte Biologique et de Ressources Phytogénétiques du CRA-W de Gembloux. C'est la variété généralement utilisée comme plante indicatrice.

### 1.2. Source des variants inoculés.

Le tableau n°2 reprend les caractéristiques des plants à partir desquels les variants inoculés en serre ont été isolés.

*Tableau 2: Caractéristiques des plants à partir desquels les variants inoculés en serre ont été isolés.*

N° variants	Région/Gouvernorat	Origine du porte greffe	Origine du greffon	Variété
Variants n° 88.1/88.2/ 88.3	Jdaïda Chouate	Espagne	Tunisie	Séville
Variant n° 94.1/94.2/ 94.3	Jdaïda Chouate	Espagne	Tunisie	Spirlady
Variant n° 124.4	Mehrine/Tebourba	Espagne	Californie	Early may crest
Variant n° 143.1/143.4	GOVPF Moneg	Espagne	Tunisie	Early may crest
Variant n° 151.1/151.3/ 151.4	Nord/Morneg	Espagne	Californie	Alberta
Variant n° 162.1/162.2/ 162.3	Morneg/GOVPF	Espagne	Tunisie	Early may crest
Variant n° 210.1/210.2/ 210.3/210.4	Morneg/GOVPF	Espagne	Tunisie	Carnival
Variant n° 235.1/235.2	GOVPF Grimbélia	Espagne	Tunisie	O'henry
Variant n° 240.3/240.4/	Grimbélia/GOVPF	Espagne	Tunisie	Royal glory
Variant n° 287.1/287.2	Kairouane	Espagne	Tunisie	Early may crest
Variant n° 369.3	Nord/Bizerte	Autochtone	Tunisie	Mygold
Variant n° 377.1/377.2/ 377.3/377.4	Bizerte	Autochtone	Tunisie	Red top
Variant n° 387.1/387.2	El Alaligua/Morneg	Pépinière oued mlize/Espagne	Tunisie	Swanier

### **1.3. 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 pêcheurs.

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

### **1.4. Témoins négatifs.**

Il s'agit d'un plant sain de la variété GF305, également fourni par le CRA-W de Gembloux.

### **1.5. Souche bactérienne.**

La souche bactérienne INV $\alpha$ F' appartenant à *Escherichia coli* a été utilisée dans les réactions de clonage.

## **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. Le matériel d'électrophorèse et d'une manière générale tout le matériel ne supportant pas les hautes températures a été traité au sodium dodécyl sulfate (SDS) 1% durant une nuit.

### **2.2. Extraction de jus brut de plantes infectées.**

Huit feuilles par plant de pêcher testé ont été prélevées. Une pesée a été réalisée afin de conserver 1 à 1,5g.

L'extraction a été réalisée par broyage dans du tampon SSC 20X (175,3g NaCl/l, 88,2g/l Citrate tri-sodique, pH7) en présence de sulfite de sodium 1%. Ce tampon est ajouté à raison de 1 millilitre par 0,2 gramme de feuille (soit en moyenne 5ml de tampon par échantillon).

Le jus brut récupéré a été centrifugé 30 minutes à 4°C à 13200rpm. Le surnageant a été prélevé et stocké à -20°C. Pour les tests de RT-PCR, une dilution 100X de l'extrait brut a été réalisée avant l'amplification afin de limiter la quantité d'inhibiteurs de PCR.

### 2.3. Extraction d'ARN.

#### *Méthode 1.*

Des extractions d'ARN totaux ont été réalisées avec le Rneasy plant mini kit de QIAGEN. Le protocole utilisé est fourni en annexe 1.1.

#### *Méthode 2.*

Un gramme de feuilles a été broyé dans de l'azote liquide. Le broyat a été mis en suspension dans 3 millilitres de tampon TEMS (100mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM 2-Mercaptoéthanol avant usage). Quatre millilitres de phénol d'extraction (1kg phénol, 300ml TEMS, 1g 8-hydroxyquilonine, 250ml chloroforme) ont également été ajoutés. Après vortexage, l'échantillon a été centrifugé à 6000rpm durant 10 minutes. La phase aqueuse a été récupérée et purifiée par mélange avec un volume identique de phénol d'extraction. Après récupération de la phase aqueuse, une dernière purification au chloroforme –alcool isoamylique (24 :1) a été réalisée.

La concentration en sodium de la solution a alors été ajustée à 200mM par l'ajout d'un dixième de volume d'acétate de sodium 1M (pH 5.6). Les acides nucléiques ont été précipités 1h 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 70%. Après séchage du culot contenant l'ARN, 200µl d'eau DEPC ont été ajoutés afin de mettre l'ARN en solution.

### 2.4. La réaction d'amplification.

#### *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 quant à elle aux nucléotides 116 à 140 du PLMVd et de séquence : (5'CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG3'). Ces amorces ont été commandées auprès d'Eurogentec (Liège, Belgique).

#### *Méthode.*

La RT-PCR en une seule étape a été réalisée avec le kit *Titan One tube RT-PCR system* (Roche diagnostics, Penzberg, Germany) selon les conditions spécifiées par le fournisseur, dans un volume réactionnel de composition suivante :

Composants	Concentrations ou Volumes
Amorce sens	0,4µM
Amorce anti-sens	0,4µM
Tampon	5µl
Dithiothreitol DTT (100 mM)	1,25µl
dNTP (10 mM)	0,5µl
Enzyme mix (AMV reverse transcriptase et High fidelity Taq-polymérase),	0,5µl
Extrait d'ARN	200ng
Eau DEPC stérile	Porter à 25µl

Le programme RT-PCR utilisé pour amplifier le génome du viroïde est le suivant :

- une première étape de rétro-transcription de l'ARN à 50°C pendant 1 heure,
- une dénaturation à 95°C pendant 3 minutes,
- 30 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 étape finale d'élongation de 7 minutes à 72°C.

Il faut toutefois noter la nécessité de réaliser une dénaturation préalable du viroïde pendant 5 minutes à 95°C afin de dénaturer sa structure secondaire.

## **2.5. Electrophorèse sur gel d'agarose.**

### ***Méthode.***

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

Les produits d'amplification obtenus lors de la RT-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 d'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%, TAE1X, 0,25% de 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 BET qui émet une fluorescence lorsqu'il est soumis aux rayons ultra-violetts d'une longueur d'onde de 320nm.

### Migration d'ARN.

La préparation du gel et la migration d'ARN sur gel d'agarose en condition non dénaturante et Rnase free a eu lieu dans du tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  10mM pH7). La migration a été réalisée sur glace afin de limiter la dégradation de l'ARN et de travailler toute l'année à une température constante.

## 2.6. Purification des produits d'amplification.

### *Principe.*

La purification des produits de la RT-PCR est réalisée après leur migration sur gel d'agarose. La portion de gel contenant le fragment d'intérêt est excisée et dissoute dans une solution chaotrope contenant des particules de silice qui vont adsorber l'ADN. Les sels chaotropes et les impuretés seront ensuite lavés des particules de silices sur lesquelles l'ADN est adsorbé.

### *Méthode.*

La partie de gel contenant le fragment d'intérêt a été excisée et placée dans un tube eppendorf de 1,5 ml. Le volume approximatif de gel prélevé a été estimé par pesée (1g = 1ml). Ensuite le protocole du « DNA extraction kit » de Fermentas ou du « QIAEX II® gel extraction kit » de Qiagen., tels que décrits en annexe 1.2 a été suivi.

## 2.7. Quantification des acides nucléiques avec le NanoDrop®.

### *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. Contrairement 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 1,8 et 2 pour une bonne qualité) ainsi que par le rapport des absorbances mesurées à 260 et 230 nm.

### ***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.

## **2.8. Clonage des produits de la RT-PCR dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 (TA cloning).**

### ***Principe.***

Le système du *TA cloning* permet le clonage direct des produits PCR dans le vecteur pCR<sup>®</sup>2.1 sans digestion préalable par une enzyme de restriction. Le clonage s'effectue 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 du produit de ligation dans des bactéries compétentes *Escherichia coli* (*Ultra Comp<sup>™</sup> INVαF'*, Invitrogen). Cette expérimentation a été réalisée en suivant le protocole de la firme fourni en annexe 1.3.

## **2.9. Vérification de la présence de l'insert.**

Afin d'être certain que les colonies choisies pour la réalisation de minipréparation d'ADN plasmidique contenaient bien le plasmide recombinant, une PCR sur colonie a été réalisé avec les amorces T7 et M13 (amorces plasmidiques) ou avec des amorces spécifiques du viroïde.

Le mélange réactionnel comprend :

Composants	Concentrations ou Volumes
Amorce sens	0,2 $\mu$ M
Amorce anti-sens	0,2 $\mu$ M
Tampon PCR 10X	5 $\mu$ l
DNTPs (10mM)	1 $\mu$ l
Taq DNA polymérase (5U/ $\mu$ l)	1U
Eau stérile	Porter à 50 $\mu$ l
Plasmide recombinant	100ng

Le programme de PCR comprend :

- une dénaturation pendant 5 min à 95°C,
- 45 cycles comportant chacun :
  - une phase de dénaturation à 95°C pendant 30s,
  - une phase d'hybridation des amorces à 60°C pendant 45s,
  - une phase d'élongation à 72°C pendant 45s,
- une étape finale d'élongation à 72°C pendant 7min.

### 2.10. Purification de l'ADN plasmidique d'E. Coli en utilisant le kit « ULTRAPrep®PLASMID DNA mini prep Kit ».

La réalisation d'une « mini prep » a pour objectif de purifier l'ADN plasmidique présent dans les cellules bactériennes transformées.

La purification est basée sur la lyse des cellules suivie d'une précipitation de l'ADN chromosomique et des protéines des bactéries. Différents lavages permettent 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 100 $\mu$ g/ml d'ampicilline, la purification de l'ADN plasmidique a été réalisée en suivant le protocole du kit tel que décrit en annexe n°1.4.

## 2.11. Transcription in vitro.

### A. Digestion enzymatique.

La transcription du variant nécessite la linéarisation du plasmide. Le plasmide a été digéré par l'endonucléase BamHI selon le protocole fourni par la firme (Fermentas):

Le plasmide a été digéré par incubation à 37°C durant une nuit dans un milieu réactionnel contenant: 4µl de plasmide, 2µl de Tampon BamHI (10X), 0,5µl de BamHI et 13,5µl d'eau DEPC stérile.

### B. Purification du produit de digestion.

Le produit de digestion a été purifié à l'aide du kit « QIAquick PCR purification kit » de QIAGEN selon les recommandations de la firme le protocole est fourni en annexe 1.5.

### C. Concentration du produit purifié.

Le produit purifié a été précipité dans 2.5 volumes d'éthanol froid en présence de 10% d'acétate d'ammonium (3M pH 5.2) pendant 2 heures à -20°C. Une centrifugation de 15 minutes à 13200rpm permet 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 que le culot prenne une coloration blanchâtre. Ensuite il a été resuspendu dans 10µl d'eau DEPC stérile.

### D. Transcription in vitro.

Le milieu réactionnel nécessaire à la transcription *in vitro* est le suivant :

Composants	Concentrations ou Volumes
Plasmide linéarisé	1µg
Tampon de transcription 5X	10µl
Inhibiteur de ribonucléase (25U/µl)	50U
NTP 40mM	10µl
T7 ARN polymérase (20U/µl)	30U
Eau DEPC stérile	Porter à 50µl

Le mélange a été incubé pendant 2 heures à 37°C. La réaction a été arrêtée par refroidissement à -20°C.

## E. Traitement Dnase.

Par échantillon, 0,5µl de DNase RNase-free ont été ajoutés. Le mix a ensuite été incubé 15 minutes à 37°C. Après cette incubation, les tubes ont été placés sur glace et 50µl d'eau DEPC ont été ajoutés afin de porter le volume à 100 µl. Ensuite, 100µl de phénol-chloroforme (1:1) ont été ajoutés. Après vortexage, une centrifugation 5 minutes à 13000rpm a permis de séparer les phases aqueuses et non aqueuses. La phase aqueuse a été récupérée. Les acides nucléiques présents dans cette phase ont été précipités par ajout de 0,1 volumes d'acétate de sodium (3M, pH 5.2) et 2,5 volumes d'éthanol et incubé 1 heure à -20°C.

Après centrifugation et lavage à l'éthanol 70%, le culot a été séché puis mis en solution dans 10µl d'eau DEPC.

## 2.12. Migration sur gel de polyacrylamide.

### *Principe.*

Le gel de polyacrylamide permet une séparation plus fine des petits fragments d'acides nucléiques. Le principe de la migration sur ce type de gel est quasiment identique à celui de la migration sur gel d'agarose.

La concentration du gel en acrylamide-bisacrylamide (dont le rapport entre les deux est souvent de 20 pour 1) varie en fonction de la taille des fragments à séparer. Ainsi, un gel peu concentré (1-5% d'acrylamide) permettra de mettre en évidence des fragments de grande taille alors qu'un gel beaucoup plus concentré (12% par exemple) permettra de séparer efficacement des fragments de petite taille tels que les siRNA. Ceci s'explique par le fait que les fragments de grande taille ont plus de difficultés à migrer sur un gel fortement concentré. De plus, les migrations ont été réalisées en condition dénaturante pour éliminer toute structure secondaire des fragments à séparer. Ces conditions ont été obtenues par l'ajout d'urée et de formamide.

### *Méthode.*

#### Composition du gel.

La migration des ARN totaux a été réalisée dans un gel composé de 12% d'Acrylamide, 0,6% de Bis-acrylamide, 2,6 ml TBE (500mM Tris, 415mM Acide borique, 5mM EDTA, Eau DEPC porter à 1L), 11,83gd'Urée (7M), 10,6ml Formamide. Le volume a ensuite été porté à 26,6ml avec de l'eau DEPC avant l'ajout de 15µl de TEMED et 270µl d'Ammonium persulfate (10%).

Un gel identique mais composé de 15% d'acrylamide-0,75% de Bis-acrylamide et de 12,8 g d'urée (8M) a été utilisé.

## Migration.

La polymérisation terminée, les plaques de verre ont été installées dans la cuve d'électrophorèse et recouvertes de tampon TBE 50mM. Les échantillons ont alors été chargés en présence de quelques microlitres (5 $\mu$ l) d'un mélange de glycérol et de TBE 50mM (50:50). La migration a ensuite été réalisée à 50 mA pendant au moins 30 minutes.

## 2.13. Synthèse de sondes radioactives.

### *Principe.*

En vue de mettre en évidence des siRNA, une sonde à ARN radioactive a été synthétisée. Cette sonde a été hybridée avec l'ARN total extrait de feuilles de pêchers migré sur gel de polyacrylamide et fixé sur membrane de nylon (Hybond N+).

La synthèse de la sonde ARN radioactive a été réalisée en suivant le protocole de transcription préalablement décrit (cf point 8) mais avec certaines modifications de composition du mélange réactionnel afin d'incorporer un nucléotide radioactif. La sonde obtenue est ensuite purifiée à l'aide du *Rneasy® minEluteCleanup* (QIAGEN) qui permet également une concentration de la sonde purifiée.

### *Méthode.*

#### A. Transcription radioactive.

Le mix suivant a été utilisé:

- 4 $\mu$ l de Tampon de transcription 5X,
- 0,8 $\mu$ l d'inhibiteur de ribonucléase (20U)
- 1 $\mu$ l d'un mix de GTP,ATP,UTP 10 $\mu$ M
- 2,4 $\mu$ l CTP 100 $\mu$ M
- 5 $\mu$ l 5'-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP (50 $\mu$ Ci)
- 4 $\mu$ l Plasmide linéarisé (1 $\mu$ g)
- 1,8 $\mu$ l Eau DEPC
- 1 $\mu$ l T7 RNA polymérase (20U)

La transcription a été effectuée par incubation pendant 2h à 37°C. Cette transcription a été suivie d'un traitement DNase suivant les modalités décrites au paragraphe 2.11.

## B. Purification de la sonde radioactive.

Afin d'éliminer les nucléotides non incorporés ainsi que tous les réactifs nécessaires à la réaction de transcription le kit *Rneasy®minElute Cleanup* (QIAGEN) a été utilisé en suivant le protocole fourni par la firme tel que fourni en annexe 1.6.

## 2.14. Mise en évidence des siRNA par la technique de la Northern Blot.

La mise en évidence des siRNA a été réalisée par la technique du Northern Blot.

### A. Electrophorèse et transfert des acides nucléiques.

#### Méthode.

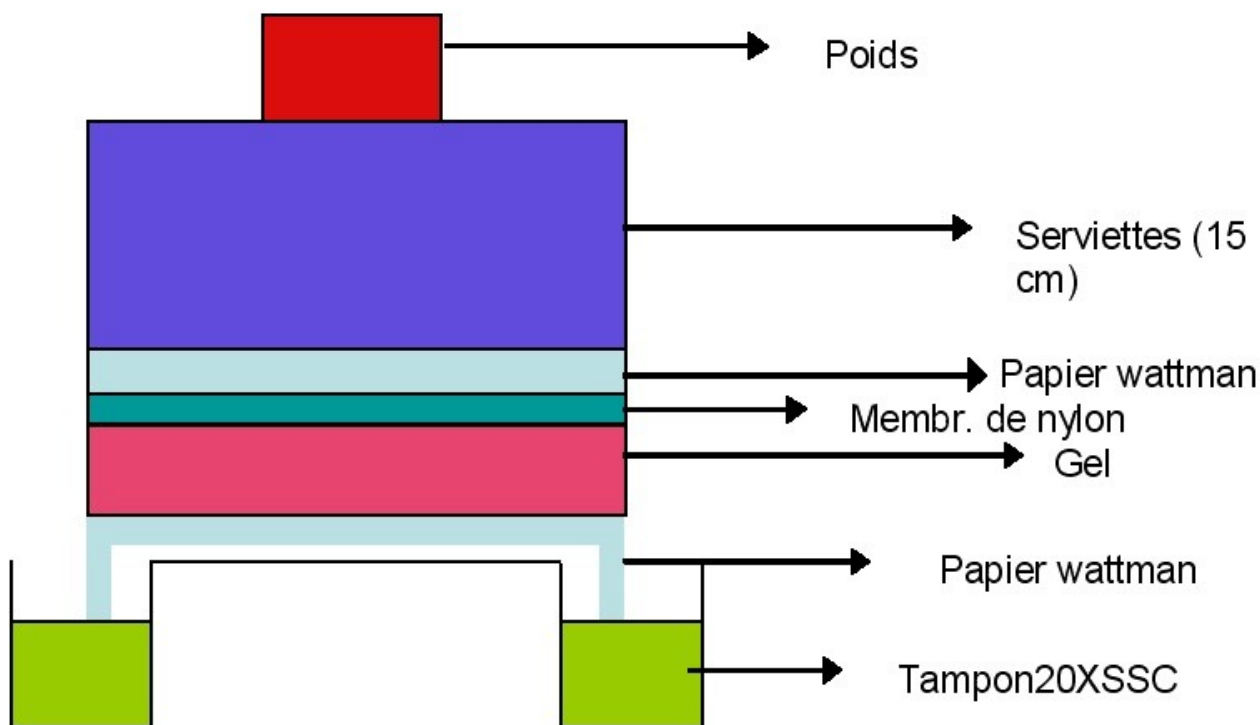
Vingt microlitres d'ARN total ont été dénaturés par une incubation de 5 minutes à 95°C.

Après cette étape une migration a été réalisée sur gel de polyacrylamide 12% ou 15% (Cf§ 2.12).

Après migration, les acides nucléiques ont été transférés par capillarité sur une membrane de nylon. Du tampon SSC 20X et deux feuilles de papier Wattman ont été placés dans une cuve d'électrophorèse. Le gel de polyacrylamide, suivi de la membrane « Hybond N+ » (Amersham), de deux autres papiers wattman et d'une épaisseur de 10 à 15 cm de serviettes y ont ensuite été déposés. Toutes ces couches ont été découpées aux dimensions du gel et correctement alignées sur celui-ci (Figure 12).

Le transfert a eu lieu durant toute une nuit. Le lendemain, la membrane a été incubée à 80°C durant 10 à 15 minutes afin de la sécher. Elle a ensuite été exposée aux UV pendant 30 secondes afin de fixer définitivement les acides nucléiques sur la membrane.

Figure 12: Montage utilisé durant le transfert des acides nucléiques sur membrane



#### B. Pré-hybridation et hybridation de la membrane.

- Protocole 1.

L'hybridiser® a été utilisé pour réaliser la pré-hybridation et l'hybridation. Les solutions de pré-hybridation et d'hybridation étaient composées de: 13,2 ml de SSC 20X, 2ml de Denhardt 5X, 200µl de SDS1%, de 400µl (4mg) de sperme de saumon et de 4,2ml d'eau DEPC.

La solution de pré-hybridation a été dénaturée durant 10 minutes à 100°C avant d'être placée sur glace. La pré-hybridation a été réalisée en incubant la membrane dans la solution à 65°C durant 2 à 3 heures. Pour la réaction d'hybridation, la sonde radioactive a été incubée à 100°C durant 10 minutes avant d'être placée sur glace. Après refroidissement, la sonde radioactive a été ajoutée à la solution d'hybridation. L'hybridation a été réalisée à 65°C durant 24 heures.

- Protocole 2.

Par rapport au protocole 1, la composition des solutions de pré-hybridation et d'hybridation a été modifiée pour obtenir la composition suivante: 50% formamide, Denhardt's reagent 5X, SDS 0,01%, 400µg de sperme de saumon et 5X SPPE (SSPE 1X: 0,15mM NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 1mM EDTA[pH 7,7]).

De plus, les solutions de pré-hybridation et d'hybridation n'ont pas été dénaturées avant

utilisation. Finalement, la préhybridation a été réalisée en incubant la membrane à 45°C durant deux heures. Une fois la sonde purifiée, elle a été ajoutée à la solution d'hybridation. L'hybridation a ensuite été réalisée durant 16h à 50°C.

### C. Lavage de la membrane.

Après la réaction d'hybridation, la membrane a été lavée deux fois avec du SSC2X pendant 5 minutes à température ambiante. Ces deux lavages ont été suivis par deux lavages avec du SSC2X avec du SDS à 0,5% pendant 30 minutes à 58°C.

La révélation de la radioactivité a été réalisée avec le PhosphoImager au centre de Biotechnologie du CRA de Grand-Manil.

## ***Résultats et discussion.***

### **1. Évaluation de l'influence de la structure des variants inoculés sur la pathogénicité.**

En vue d'évaluer l'influence de l'appartenance des variants aux différents groupes de structure déterminés par Fekih Hassen et al. (soumis à publication) sur leur pathogénicité et leur multiplication dans la plante, 32 variants différents dont 15 appartiennent au groupe II et 17 au groupe I ont été inoculés sous forme d'ARN dimérique et d'ADNc durant l'été 2005. Un total de 114 plants de pêcher ont été inoculés (cf chapitre 1 matériel et méthodes et annexe 3).

Tout d'abord, 29 variants ont été inoculés sous forme d'ADNc à raison de deux répétitions par variant. Dans un deuxième temps, 14 variants ont été inoculés sous forme d'ARN dimérique à raison de quatre répétitions par variant excepté pour un variant qui ne possède que deux répétitions.

Deux campagnes de détection des viroïdes ont été réalisées: la première entre février et mars et la seconde de mai à juillet. Pour chaque campagne, des échantillons de feuilles ont été prélevés sur 114 plantes, le jus brut a été préparé et l'amplification PCR réalisée. La révélation sur gel d'agarose d'une amplification est donnée à la figure 13.

#### **1.1. Première campagne de détection.**

Les tests menés de février à mars ont donné les résultats suivants (synthésisés dans le tableau 3):

Le variant 151.1, appartenant au groupe II-A, a été détecté dans 50% des plantes inoculées aussi bien pour l'inoculation sous forme de dimères d'ARN que sous forme d'ADNc. De plus, les symptômes observés sur ces plantes consistaient en une mosaïque sévère (figure 14). Le deuxième variant détecté (143.1), appartenant lui aussi au groupe II-A, a provoqué l'apparition d'une chlorose (figure 15). Pour ce variant, 50% des plantes inoculées par les dimères d'ARN ont été diagnostiqués comme positifs. Enfin, le dernier variant détecté au cours de cette campagne est le variant 124.4 appartenant au groupe de structure I-A. Il n'a pas provoqué de symptôme sur plante indicatrice (figure 16) et a été détecté pour une des quatre plantes inoculées par de l'ARN dimérique (25%).

En ce qui concerne les variants 143.1 et 124.4, les inoculations sous forme d'ADNc n'ont pas donné de plantes positives lors de cette première campagne de détection.

*Tableau 3.: Résultats globaux de la première campagne de détection*

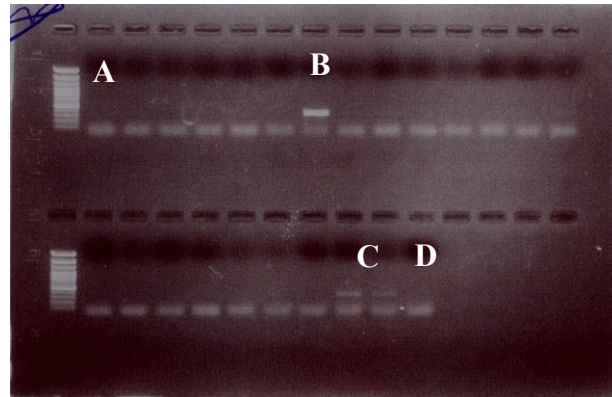
<i>Variants détectés</i>	<i>Nombre de plantes positives</i>	<i>Pourcentage de détection</i>	<i>Symptômes</i>	<i>Groupe de structure</i>	<i>Forme inoculée</i>
124.4	1	25%	Asymptomatique	I-A	ARN
143.1	2	50%	Chlorose	II-A	ARN
151.1	2	50%	Mosaïque sévère	II-A	ARN
151.1	1	50%	Mosaïque sévère	II-A	ADNc

## **1.2. Seconde campagne de détection.**

Les tests de détection du PLMVd menés durant les mois de mai à juillet ont donné les résultats suivants (synthétisés dans le tableau 4):

Un seul nouveau variant du groupe II-A, le 151.3, a été détecté lors de cette campagne pour une des quatre plantes inoculées par des dimères d'ARN. De plus, les variants 94.1, 94.3 et 387.2, appartenant au groupe I-B (les deux premiers) et I-C et inoculés sous forme de dimères d'ARN, ont également été détectés dans 25% des répétitions pour les deux premiers tandis que le troisième variant a été retrouvé dans 50% des répétitions. Les symptômes observés correspondaient à un arrêt de croissance des feuilles pour le premier variant, à la présence de quelques taches nécrotiques diffuses pour le second et à une légère mosaïque pour le variant 387.2. Parmi les plantes inoculée par de l'ADNc, deux nouveaux variants ont été détectés: les variants 162.1 et 151.3. Ces deux variants sont présents dans 25% des répétitions inoculées. Une mosaïque légère a été observée sur la plante infectée par le premier variant. Une attaque sévère d'acariens a empêché l'observation de symptômes pour le variant 151.3. Enfin une troisième répétition positive du variant 151.1 a également été détectée portant la proportion de répétitions infectées par ce variant à 75%. Les symptômes observés sur cette dernière plante consistaient également en une mosaïque sévère.

**Figure 13:** Révélation des produits d'amplification sur gel d'agarose. (A) échantillon négatif; (B) échantillon positif; (C) Témoins positifs; (D) Témoin négatif



**Tableau 4.:** Résultats globaux de la deuxième campagne de détection

<i>Variants détectés</i>	<i>Nombre de plantes positives</i>	<i>Pourcentage de détection cumulés</i>	<i>Symptômes</i>	<i>Groupe de structure</i>	<i>Forme inoculée</i>
94.1	1	25%	Stunting foliaire	I-B	ARN
94.3	1	25%	Taches nécrotiques	I-B	ARN
124.4	1	25%	Asymptomatique	I-A	ARN
143.1	2	50%	Chlorose	II-A	ARN
151.1	3	75%	Mosaïque	II-A	ARN
151.1	1	50%	Mosaïque	II-A	ADNc
151.3	1	25%	Non déterminé	II-A	ARN
151.3	1	50%	Aucun <sup>2</sup>	II-A	ADNc
162.1	1	50%	Mosaïque légère	II-A	ADNc
387.2	2	50%	Mosaïque légère	I-C	ARN

<sup>2</sup>Symptômes masqués par une attaque d'acariens

**Figure 14:** Mosaïque provoquée par le variant 151.1



**Figure 15:** Chlorose provoquée par le variant 143.1



**Figure 16:** Plante asymptomatique inoculée par le variant 124.4



### 1.3. Discussion.

La première campagne de détection a été menée 6 mois après l'inoculation des plants de pêchers par des dimères d'ARN et 10 mois après l'inoculation des viroïdes sous forme d'ADNc. Ce laps de temps est inférieur à la période d'un an généralement recommandée dans la littérature pour observer la présence du viroïde dans les plants (Ambros *et al.*, 1998). Cette campagne a néanmoins été utile car elle a permis de vérifier que la méthode d'inoculation utilisée avait fonctionné correctement du moins pour certains variants. De plus, elle a permis de sélectionner des plants infectés par le PLMVd comme matériel végétal pour la seconde partie du travail.

Dès lors, il apparaissait normal de n'observer que 6 plantes positives lors de cette première campagne. Une seconde campagne menée une année après l'inoculation des plants par de l'ADNc et

10-11 mois après celle des dimères d'ARN a donc été réalisée.

Le premier variant (151.1) détecté après inoculation de l'ADNc semble être le plus sévère: il était le seul à provoquer l'infection de 75% de plantes et à induire les symptômes les plus sévères quelque soit le forme inoculée. En ce qui concerne les deux autres variants détectés (151.3 et 162.1), il est intéressant de remarquer que, d'une part, le premier provient du même isolat que le variant 151.1 et que, d'autre part, le second variant est le seul de son isolat à avoir été détecté.

Les pourcentages de détection obtenus (*cf* tableaux 3 et 4) ont cependant été inférieurs à ceux couramment observés dans la littérature. En effet, seules 3 plantes sur 58 (5,2%) ont répondu positivement pour les inoculation avec de l'ADNc et au total, 11 plantes sur 56 (20%) inoculées par des dimères d'ARN se sont avérées positives. Les réussites d'inoculation obtenues dans la littérature se situaient aux environs de 80% pour les variants inoculés sous forme d'ADNc à bout cohésifs et de 93% des plantes inoculées avec des dimères d'ARN développent généralement l'infection (Ambros *et al.*, 1998). D'autres auteurs (Flores, communication personnelle) n'inoculent que très rarement des ADNc car le taux de réussite de l'infection est beaucoup plus faible que les 80% cités. En effet, l'ADNc doit tout d'abord être reconnu par une ARN polymérase cellulaire. Ces polymérases reconnaissent des promoteurs eucaryotes qui sont différents des promoteurs procaryotes existant sur le plasmide. Ceci implique donc une transcription moins efficace pouvant expliquer ces faibles pourcentages. Pour l'inoculation des ARN dimériques, quatre pistes peuvent être envisagées afin d'expliquer ces résultats: (1) nos résultats ont été obtenus moins d'un an après les inoculations, laissant de ce fait peu de temps aux viroïdes pour se répliquer et envahir la plante; (2) les conditions de cultures rencontrées durant ce travail n'étaient pas optimales: les plants ont été soumis à des températures variables, certains ont été affaiblis par des attaques d'acariens. Ces facteurs doivent être pris en compte étant donné que les viroïdes se répliquent plus efficacement à une température supérieure à 20°C et dans des plants où la croissance est particulièrement active (Singh *et al.*, 2003b); (3) le nombre de répétitions sur lequel nous avons travaillé (2-4) est inférieur à ce qui est généralement réalisé dans la littérature (10-15 répétitions) (Ambros *et al.*, 1998) et (4) les variants sur lesquels nous avons travaillé n'ont jamais été testés dans la littérature, il n'est donc pas impossible que certains d'entre eux soient difficiles à inoculer ou qu'ils présentent un faible taux de multiplication, rendant ainsi difficile leur détection après 10 mois.

Néanmoins, l'inoculation sous forme de dimères d'ARN paraît plus efficace que l'inoculation sous forme d'ADNc. On remarque en effet que 78% des plantes diagnostiquées positives ont été inoculées à l'aide d'ARN dimériques. La suite des analyses s'est donc rapportée exclusivement aux variants inoculés sous forme de dimères d'ARN.

Des travaux précédents comprenant une analyse phylogénétique et structurale du PLMVd (Fekih Hassen *et al.*, 2006 soumis à publication) ont permis de mettre au jour la présence de deux groupes

structuraux, eux-même divisés en sous groupes. Au total, 15 variants inoculés appartiennent au groupe II tandis que les autres (17) appartiennent au groupe I. Dès lors, nous avons analysés les résultats de manière à déterminer si une relation existait entre l'infectivité ou la pathogénicité du variant et le groupe auquel il appartient. Nous avons ainsi observé que certains variants du groupe II-A ont été plus pathogéniques, entraînant des symptômes sévères et une détection plus précoce (sauf le variant 151.3 qui est plus tardif). A l'opposé, les variants appartenant aux groupe I-A, I-B et I-C ont provoqué moins voire pas de symptômes. En effet, les variants 151.1 et 143.1 induisent respectivement une mosaïque sévère et une chlorose tandis que le variant 124.4 est asymptomatique (Figures 13, 14 et 15). Enfin, aucun variant du groupe II-B n'a été détecté au cours de ces tests de pathogénicité. Afin d'obtenir une vue globale, tous les résultats ont été synthétisés dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Pourcentage de détection et de symptômes observés avec le groupe structural. Le % de détection des variants correspond à :  $(\text{Nombre de variants détectés appartenant à un groupe}) / (\text{nombre de variants du groupe}) \times 100$

<b>Groupe structural</b>	<b>% de détection des variants</b>	<b>Plantes détectées</b>	<b>% de symptômes</b>
I	23,5%	5	75%
II	26%	9	75%

Le tableau 5 ne montre pas de grandes différences en ce qui concerne le pourcentage de détection en fonction du groupe de structure. En effet, seuls 4 variants différents ont été détectés dans chaque groupe. Il est dès lors difficile de conclure l'existence ou la non existence d'une relation entre l'appartenance à un groupe de structure et la pathogénicité.

Par contre et en considérant toujours les résultats obtenus lors des deux campagnes de détection, il semble intéressant de réaliser la même analyse en considérant non pas le groupe de structure mais le variant lui-même.

**Tableau 6:** Pourcentage de plantes infectées et présence de symptômes par variants

<i>Variants détectés</i>	<i>% de plantes positives</i>	<i>% de symptômes sur plante positives</i>
94.1	25%	100%
94.3	25%	100%
124.4	25%	0%
143.1	50%	100%
151.1	75%	100%
151.3	25%	0% <sup>3</sup>
387.2	50%	100%

L'analyse du tableau 6 indique que les variants 151.1 et 143.1 ont été les plus pathogéniques: ils ont provoqués des symptômes sévères sur respectivement 3 et 2 plantes. De plus, la majorité des répétitions positives de ces variants ont été détectées lors de la première campagne de détection. Ceci suppose donc une multiplication plus rapide de ces variants. Par ailleurs, le variant 387.2 a présenté une pathogénicité modérée de part les faibles symptômes enregistrés et sa détection tardive. Il est intéressant de noter les différences de pathogénicité observées entre les variants 151.1 (induisant une mosaïque sévère) et 151.3 (provoquant une mosaïque légère) provenant tous deux d'un même isolat de départ. L'alignement des séquences (fournit en annexe 2.1) de ces deux variants ne montre cependant que très peu de différences. Il n'est cependant pas possible, à ce stade, de préciser l'implication de ces variations de séquences sur la pathogénicité de ces variants. En effet, lors de la multiplication des viroïdes dans l'hôte, une variabilité importante est créée (Ambros *et al.*, 1998). Cette variabilité pourrait ainsi expliquer la différence de pathogénicité observée entre deux variants très proches si on considère que l'expression des symptômes est le fruit des interactions provoquées par la descendance du variant inoculé. Ces descendances pourraient être suffisamment différentes pour provoquer l'expression de pathogénicités distinctes.

Par contre, aucune relation précise entre la structure primaire et la pathogénicité n'a pu être mise en évidence au cours de nos essais. Ce type de relation a cependant déjà été mis en évidence chez les variants induisant des symptômes de *peach calico* (Malfitano *et al.*, 2003). En effet, les variants induisant ce type de symptômes sont caractérisés par la présence d'une insertion de 12 à 13 nucléotides de type tige-boucle au niveau de la boucle A. Ces variants possèdent donc une taille allant de 348 à 351 nucléotides au lieu de 336-338 nucléotides. Ce type d'insertion possède de plus

<sup>3</sup> Symptômes non déterminés

une variabilité de séquence très limitée et ne perturbe pas la stabilité thermodynamique de la molécule (Malfitano *et al.*, 2003). Cependant, la présence d'une insertion n'est pas toujours synonyme de *peach calico* (Flores *et al.*, 2006). D'ailleurs, les variants 94.1, 94.3 et 88.1 possèdent des insertions connues pour être en relation avec les symptômes de *peach calico* alors qu'ils n'en n'ont pas provoqué.

## **2. Mise au point d'une technique de détection fiable du phénomène de gene silencing.**

Le développement d'une technique de détection fiable du phénomène de *gene silencing* nécessite l'optimisation de plusieurs étapes: (1) extraction de l'ARN total, (2) migration de cet ARN sur un gel de polyacrylamide concentré et dénaturant, (3) synthèse d'une sonde spécifique marquée au phosphore 32, (4) transfert de l'ARN sur une membrane de nylon, (5) hybridation de cette membrane à l'aide de la sonde marquée et (6) révélation.

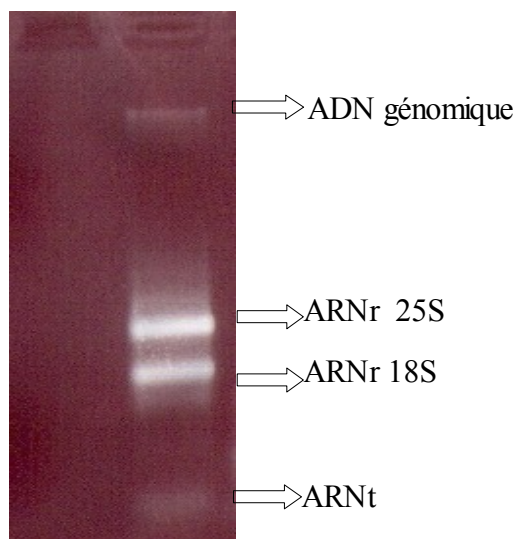
Ceci a été réalisé dans le but de mettre en évidence de siRNA provenant d'une dégradation du viroïde par un mécanisme de protection des pêchers reposant sur le *Posttranscriptional gene silencing*. Dans ce cadre, l'étude de la symptomatologie revêt une importance particulière. Deux conditions sont nécessaires pour pouvoir mettre en évidence de façon certaine la présence de *gene silencing*: il faut pouvoir détecter le viroïde et les siRNA simultanément à partir d'un même matériel végétal.

La technique a été mise au point à partir de plants de pêcher inoculés par le variant 151.1, qui semble être le plus sévère, ou par le variant 124.4 qui est quasi-asymptomatique.

### **2.1. Optimisation de l'extraction d'ARN totaux.**

Le *Rneasy plant mini kit* (QIAGEN) a tout d'abord été privilégié afin d'extraire l'ARN total de bonne qualité à partir de feuilles de pêcher. Quatre échantillons ont été extraits, les résultats de deux extractions d'ARN de plants infectés par le variant 151.1 sont présentés au tableau 7. L'illustration 17 montre la qualité des extractions obtenues.

**Figure 17:** profil de migration de l'ARN extrait



**Tableau 7:** Extractions réalisées à l'aide du Rneasy plant mini kit

<b>Echantillon</b>	<b>Quantité extraite (µg/éch.)</b>	<b>260/280</b>
151.1	22,3	2,2
151.1	17,1	2,2

L'observation du tableau 7 et de la figure 17 montre qu'un extrait d'acide nucléiques de bonne qualité a été obtenu: les rapports de densité optique D.O.260nm/D.O.280nm sont proches de la fourchette optimale comprise entre 1,8 et 2 et les deux bandes d'ARNr sont clairement visibles sur un gel d'agarose non dénaturant. Cependant, la quantité maximale d'ARN par échantillon a été comprise entre 17,1 et 22,3 µg. Or, la littérature (Aravin *et al.*, 2006) recommande l'utilisation d'au moins 25µg par échantillon. Le rendement obtenu nécessitait donc l'extraction séparée de 2 échantillons par objet pour une seule migration sur gel. En pratique, un nombre important d'échantillons allait devoir être extrait. En plus du coût en réactifs cette multiplicité d'échantillons risquait de ralentir le rythme des expérimentations tout en compliquant la gestion des échantillons.

Afin d'être en mesure d'extraire les quantités d'ARN suffisantes pour la suite des manipulations, une technique d'extraction au phénol-chloroforme précédemment publiée dans la littérature (Papaefthimiou *et al.*, 2001) a été adaptée à nos conditions. Cette technique permet de travailler à partir d'une plus grande quantité de matériel végétal et d'obtenir une quantité élevée d'ARN extrait par échantillon. Les optimisations réalisées consistaient en une diminution de la quantité de feuilles utilisée pour l'extraction et une réduction des temps de centrifugation. La méthode a été testée sur 7 échantillons correspondant à un témoin positif, un témoin négatif, trois échantillons de plantes inoculées par trois variants différents (un variant sévère, un variant latent et un variant intermédiaire) ainsi que sur des feuilles symptomatiques et asymptomatiques d'un témoin positif. Les résultats sont donnés au tableau 8 et à la figure 18 pour les variants sévère, latent et intermédiaire.

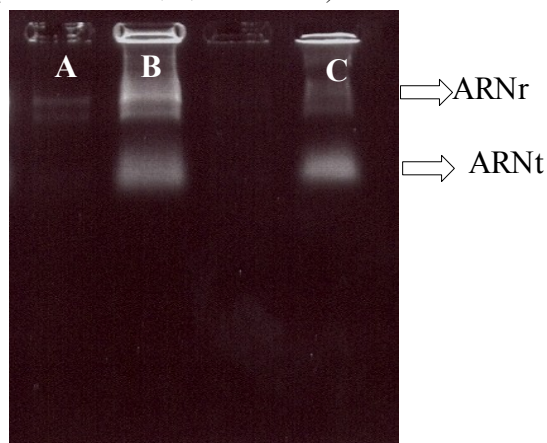
Le tableau 8 montre, pour trois échantillons, que la quantité d'ARN extraite est 10X à 20X plus élevée avec cette méthode. Quant à la qualité de l'extraction, le rapport des mesures de densités optiques à 260 et 280nm sont dans la gamme des valeurs acceptables. Il faut également noter que l'ARN total obtenu par cette méthode a été mis en suspension dans 200µl d'eau DEPC. Ceci signifie que la quantité d'ARN extraite au final dépasse les 400µg.

La figure 18, correspondant à la migration sur gel d'agarose d'une aliquote de chaque extraction, montre quant à elle que l'ARN extrait ne s'est pas dégradé (les bandes d'ARN ribosomique sont bien nettes).

**Tableau 8:** Résultats des extractions

<i>Echantillons</i>	<i>Quantité extraite<sup>4</sup> (µg/éech.)</i>	<i>260/280</i>
151.1 (A)	398	1,94
124.4 (B)	449,8	1,49
387.2 (C)	328,4	1,67

**Figure 18:** Qualité des extractions au Phénol-chloroforme-alcool isomaylique. On peut observer de haut en bas: l'ADN génomique, les bandes d'ARN ribosomique et l'ARN de transfert. (Echantillons A, B, C tableau 8)



## 2.2. Mise au point de la synthèse de la sonde radioactive.

La sonde utilisée dans ce travail correspondait à la totalité de la séquence de deux variants sélectionnés: le variant sévère 151.1 et le variant latent 124.4. La synthèse a été réalisée par la transcription de l'ADNc de PLMVd clonés par la T7 polymérase en présence de cytidine triphosphate marquée au phosphore 32.

Deux méthodes de purification de la sonde ont été testées. Dans un premier temps, les acides nucléiques ont été purifiés par le phénol-chloroforme et précipités dans de l'éthanol. Les premiers essais d'hybridation ont montré que des nucléotides radioactifs non incorporés étaient présents en grande quantité et provoquaient un bruit de fond très important masquant tout signal intéressant durant l'hybridation de la membrane. Dans un second temps, le kit *Rneasy®MinElute Cleanup* (QIAGEN) a été utilisé pour purifier la sonde et éliminer les nucléotides radioactifs non incorporés en plus des autres réactifs nécessaires à la transcription. La sonde obtenue s'est avérée très pure et

<sup>4</sup> Dilution 10X des extractions

bien concentrée ce qui nous a permis de réaliser une hybridation de meilleure qualité. La différence de résultat entre les deux protocoles peut être observée aux figures 18 et 19 (cf chapitre suivant).

### **2.3. Mise au point des conditions d'hybridation.**

#### ***Hybridation avec le protocole 1.***

Dans un premier lieu, l'hybridation a été réalisée sans utilisation de formamide et à une température de 65°C. Les résultats obtenus sont présentés à la figures 19.

L'observation de la figure 19 montre qu'un bruit de fond très important a été observé. Par contre, un signal d'hybridation (cercle rouge) a été observé dans le puits correspondant au contrôle positif du PLMVd (un produit PCR du variant 124.4).

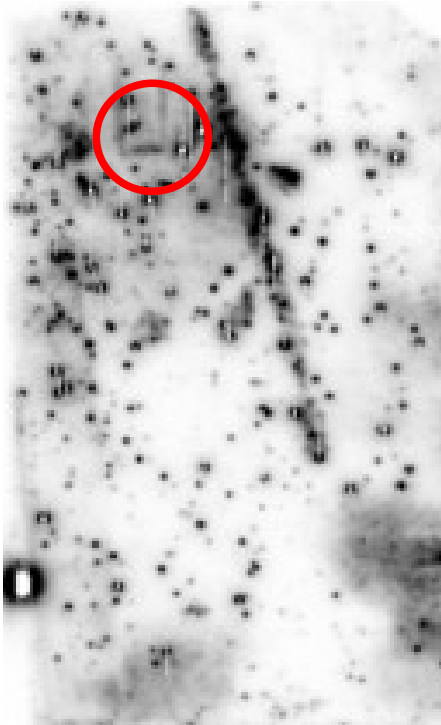
Il ressort donc clairement que la purification de la sonde ainsi que les conditions d'hybridation doivent être améliorées.

#### ***Hybridation avec le protocole 2.***

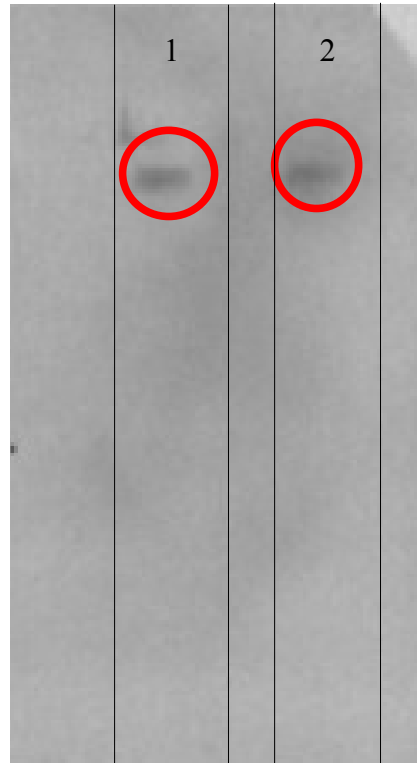
Le second tampon de pré-hybridation/hybridation utilisé contenait du formamide. La pré-hybridation et l'hybridation ont été réalisées aux températures de 45°C et 50°C respectivement. L'ajout de formamide a procuré deux avantages: (1) une diminution de la température d'hybridation facilitant potentiellement la fixation de la sonde sur les acides nucléiques recherchés, (2) la dénaturation de structures secondaires des ARN fixés sur la membrane facilitant ainsi l'hybridation de la sonde.

La figure 20 illustre les résultats obtenus après les optimisations réalisées.

**Figure 19:** Membrane avant purification de la sonde sur colonne. En rouge: le signal correspondant au PLMVd dans le puits témoin (produit PCR du variant 124.4). On remarque clairement le manque de pureté de la sonde



**Figure 20:** Membrane après purification de la sonde sur colonne et utilisation de formamide. Puits 1: extrait ARN 124.4; puits 2: extrait ARN 151.1. Le bruit de fond a considérablement diminué suite à la purification



Plusieurs observations intéressantes peuvent être tirées de la figure 20. Tout d'abord, les conditions d'hybridation et de lavage sélectionnées ont permis d'obtenir un signal spécifique à la taille approximative de la molécule complète des variants 151.1 et 124.4 du PLMVd. Ce signal révélait une hybridation spécifique entre la sonde et les molécules de PLMVd présentes dans les feuilles de pêcher. Ces deux signaux spécifiques et l'absence de bruit de fond confirmaient la bonne synthèse de la sonde ainsi que sa bonne purification. D'autre part, aucun signal d'hybridation n'a été observé dans la zone correspondant à la taille des siRNA.

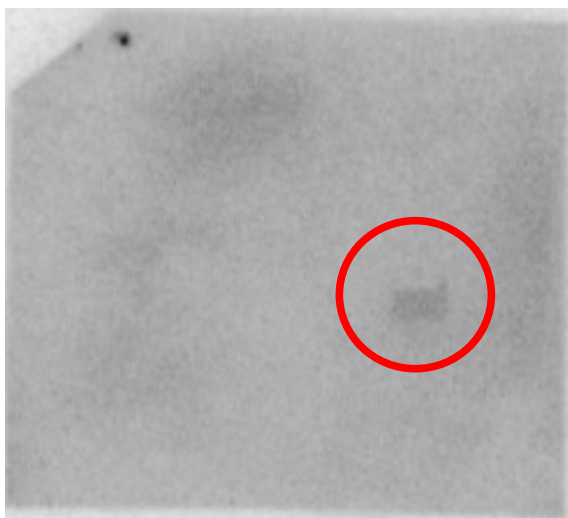
Une manipulation complémentaire a été réalisée en utilisant des gels de polyacrylamide 12 et 15%. Le gel de polyacrylamide de 15% a été utilisé afin d'améliorer la séparation des siRNA. Les échantillons migrés sur chaque gel ont été les suivants: ARN total de plantes inoculées par différents variants (sévère, intermédiaire et latent), de l'ARN total de feuilles symptomatiques ou asymptomatiques d'une même plante inoculée à partir d'un isolat, et des témoins positifs consistant en oligonucléotides de 21, 22 et 25 nucléotides correspondant à des régions conservées du PLMVd. Les mêmes sondes de PLMVd fraîchement marquées ont été utilisées lors de l'hybridation (fig 21 et 22).

Ces deux figures nous indiquent la présence d'un signal d'hybridation situé dans la région

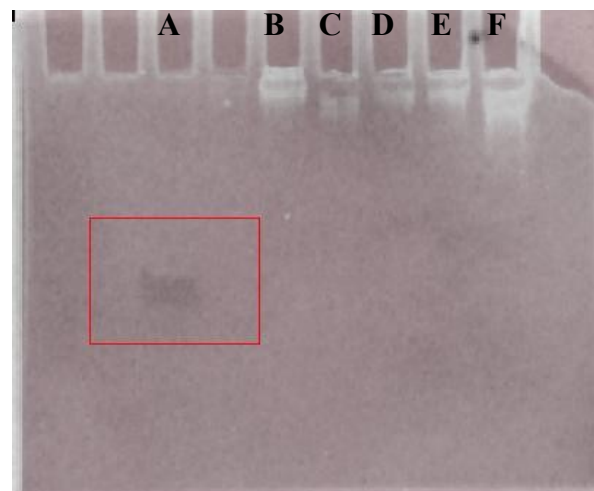
correspondant aux acides nucléiques de faible poids moléculaire à partir du gel de polyacrylamide 12%. La superposition du gel et de la membrane (figure 22) nous a permis d'identifier la nature du signal. Il s'agit d'une hybridation entre le témoin positif oligonucléotidique et la sonde marquée. Il faut également noter qu'une hybridation dans la zone correspondant au PLMVd était faiblement visible après deux jours d'exposition de la membrane.

Cette expérimentation a été répétée. Le résultat obtenu est présenté à la figure 23. Le temps d'exposition du film de révélation a été considérablement augmenté, passant de 2 à 5 jour d'exposition. L'exposition prolongée de la membrane a permis de mettre en évidence des signaux d'hybridation intéressants au mieux des siRNA. Ces signaux sont exposés à la figure 23. On peut remarquer la présence d'un signal d'hybridation important au niveau du marqueur oligonucléotidique (M). De même, de faibles signaux sont observés, au même niveau, pour les extraits d'ARN des échantillons 151.1, 124.4, 387.2 et d'un témoin positif inoculé avec un isolat. Ceci nous indique que le temps d'exposition du film de révélation aurait une grande importance pour la détection des siRNA.

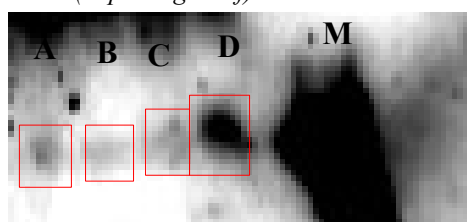
**Figure 21:** Signal d'hybridation observé dans la zone correspondant au T+ oligonucléotidique.



**Figure 22:** superposition de la membrane marquée et du gel ayant servi au transfert. (A) Témoin oligonucléotides; Variant: (B)151.1, (C) 124.4, (D) 387.2, (E) T+symptomatique, (F) T+ asymptotatique. Le cadre rouge montre le signal superposé au gel



**Figure 23:** Révélation d'une membrane après 4 jours d'exposition. 5 signaux y sont visibles( encadré). (M) Marqueur oligonucléotidique,(A) isolat symptomatique, (B) 387.2,(C) 124.4, (D) 151.1 (le plus agressif)



## 2.4. Discussion.

D'après l'observation des rapports de D.O. et du profil d'électrophorèse sur gel d'agarose, les deux méthodes d'extraction d'ARN total testées ont permis d'obtenir un extrait d'ARN total de bonne qualité. Un rendement au moins 20 fois plus élevé a été obtenu par la méthode basée sur l'extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique que par le *Rneasy plant mini kit*. Étant donné la quantité d'extrait d'ARN total nécessaire pour chaque puits (25µg) et le nombre d'échantillons à manipuler, la première méthode optimisée a été sélectionnée. En une seule extraction, elle fournissait suffisamment d'ARN total pour réaliser 8 à 10 migrations. D'après les profils obtenus sur gel d'agarose, l'ARN extrait semblait de bonne qualité et ce malgré des rapport de D.O parfois peu élevés.

La synthèse de la sonde en elle-même n'a pas posé de problème particulier. Par contre, des adaptations ont été réalisées pour l'étape de purification de la sonde. Dans la littérature traitant du phénomène de *silencing* pour les virus et les viroïdes phytopathogènes, les protocoles publiés ne donnaient pas d'information quant à la purification de la sonde. Après avoir testé sans succès un protocole fournit lors d'une communication personnelle du Dr Perreault, nous avons recherché un kit de purification de l'ARN permettant l'élimination de nucléotides radioactifs non incorporés. Le kit *Rneasy®MinElute Cleanup* a été sélectionné et a permis l'obtention de résultats satisfaisants.

Les résultats observés à la figure 23 suggèrent que des siRNA ont été hybridés au niveau des extrait d'ARN de plantes infectées. Cependant, étant donné la faible intensité du signal obtenu et l'absence de répétitions indépendantes dans le temps, ces résultats doivent encore être confirmés par la réalisation d'hybridations sur de nouvelles membranes en adaptant le temps d'exposition du film de révélation et en réalisant des lavages complémentaires. Si ces résultats venaient à ne pas être confirmés, la discussion qui suit fournirait des hypothèses permettant d'expliquer l'absence d'hybridation des siRNA.

Les premiers essais que nous avons réalisés ne nous ont pas permis d'identifier un signal d'hybridation correspondant aux siRNA alors que le PLMVd, lui, était hybridé par la sonde (figure 20). Cette absence de siRNA pouvait s'expliquer d'une part en raison d'une inadéquation des conditions de migrations, d'hybridation et de lavages, voire de révélation de la membrane ou, d'autre part, par l'absence de siRNA dans nos échantillons. Partant de là, les tests suivants ont été menés avec des gels de polyacrylamide 12 et 15% dans des conditions d'hybridation moins stringentes (et plus dénaturantes), afin de faciliter l'hybridation de la sonde. Dans ces nouvelles conditions de migration, d'hybridation et de lavage, un signal hybridation a été observé pour l'échantillon correspondant au témoin positif oligonucléotidique ayant migré sur le gel de 12% (figure 21). Ce

résultat a montré que le protocole mis au point permettait l'hybridation spécifique de la sonde de PLMVd (340nt) avec des oligonucléotides de 20 à 25 nucléotides fixés sur la membrane. Par contre, aucun signal d'hybridation n'était observable dans la zone correspondante pour les échantillons analysés alors que des signaux d'hybridations ont été observés dans la zone correspondant à la molécule de PLMVd sur les deux gels (pour les échantillons 124.4, 151.1 et pour les témoins). Ces observations indiquaient que les conditions de manipulation ainsi optimisées devenaient favorables à la détection de petits fragments d'acides nucléiques de 20 -25 nucléotides et du PLMVd. Il faut cependant noter que le témoin positif utilisé était constitué d'ADN. L'absence de signaux ou l'observation ultérieure de signaux de très faible intensité (figure 23) au niveau des ARN de 20 à 25 nucléotides pour les échantillons de plantes infectées pouvait provenir de plusieurs phénomènes non exclusifs: (1) Les lavages successifs de la membrane pourraient causer l'élimination d'une sonde trop faiblement fixée sur les siRNA. Il faut ainsi tenir compte de la différence de taille existant entre la sonde marquée et les fragments recherchés. Cette différence pourrait avoir une influence négative durant la fixation de la sonde sur ces petits fragments d'ARN. On peut en effet facilement imaginer que cette sonde est très faiblement fixée aux siRNA et qu'elle est éliminée, partiellement ou totalement, durant les lavages de la membrane. (2) L'observation du profil ARN des échantillons sur gel d'agarose a montré que les ARN ribosomiques n'étaient pas dégradés. Cependant, aucune indication ne pouvait être obtenue concernant la qualité et l'intégrité des siRNA. Malgré les précautions prises en cours de manipulation, il nous est impossible d'affirmer que les siRNA ne se soient pas dégradés durant tout le processus de la *Northern Blot*. De plus, cette dégradation n'est pas contradictoire avec le maintien de détection du PLMVd, celui-ci possédant une structure plus compacte moins facilement dégradable. Il faut toutefois rester prudent et mettre ceci en balance avec l'utilisation de formamide censée éviter la formation de telles structures. (3) Les quantités d'ARN totaux extraits ne nous donnaient aucune indication quant à la quantité de siRNA présente dans les échantillons. Cette quantité est peut-être encore insuffisante que pour être détectée par *Northern Blot*. (4) Le timing des expérimentations n'a peut être pas été adéquat. En effet, bien qu'à notre connaissance aucune donnée de ce type n'a été publiée pour le PLMVd, des expérimentations menées sur le PSTVd ont montré que le titre en siRNA variait au cours du temps (Papaefthimiou *et al.*, 2001). Ces auteurs ont ainsi remarqué que la quantité de siRNA était plus importante au début de l'infection quand le viroïde se réplique de manière très active et que les symptômes commencent à apparaître sur les plantes. Nous devons également considérer que nous avons réalisé nos expérimentations moins d'un an après les inoculations limitant ainsi le développement du viroïde. De plus, les dernières extractions d'ARN ont été réalisées durant le mois de juillet. Les conditions climatiques exceptionnelles que nous avons rencontrées à cette époque ont affaibli les plants de pêcher en serre, limitant ainsi probablement le développement du viroïde et du *silencing*. En effet,

l'intensité du *silencing* dépend de la quantité de viroïde dans la plante: différents auteurs ont en effet mis en évidence une corrélation inverse entre la quantité de viroïde et de siRNA dans la plante. Ces dernières varient au cours du temps (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martinez de Alba *et al.*, 2002). Les prélèvements pourraient donc avoir été réalisés trop tôt ou trop tard par rapport au développement du *gene silencing* dans la plante (5) Enfin, il paraît important de signaler d'une part qu'à notre connaissance les hôtes utilisés lors des expériences menant à la mise en évidence du *gene silencing* résultant d'une infection par le PLMVd ne sont pas mentionnés. Il est donc possible que la variété de pêcher GF-305, connue pour être particulièrement sensible au PLMVd, soit moins efficace dans la mise en place du *gene silencing*. Cette hypothèse doit bien entendu être vérifiée. D'autre part, les variants que nous avons testés (151.1, 124.4 et 387.2) n'ont jamais été décrits dans la littérature, il est donc possible que ces variants puissent échapper totalement ou partiellement au *silencing*.

Les faibles hybridations observées pour le PLMVd lors des derniers tests semblent également indiquer une concentration peu importante de cette molécule dans les échantillons. Ceci est probablement dû aux conditions climatiques observées en juillet. Ces dernières ont en effet entraîné un affaiblissement généralisé des pêchers situés en serre (perte d'une partie du feuillage dû au manque d'eau, à la chaleur et au développement accru des acariens). Cette faible quantité de viroïde pourrait être la cause d'un *silencing* très difficilement détectable.

Quelques améliorations pourraient dès lors être envisagées afin d'infirmier ou de confirmer les hypothèses que nous avons énoncées. Il s'agit notamment (1) d'effectuer différents essais de lavages des membranes en adoptant par exemple une série croissante de stringence (des tampons de lavages) afin de cerner au mieux les conditions permettant d'éliminer la radioactivité résiduelle tout en conservant l'hybridation entre la sonde et les siRNA. (2) Des extractions d'ARN devraient être réalisées sur des plantes indicatrices à différents moments de façon à mieux cerner le déclenchement du *silencing*. (3) Ce dernier type de test devrait être combiné à des essais d'hybridations avec des sondes de plus petites tailles peut-être mieux adaptées à la détection de fragments de très faible poids moléculaire. Enfin, (4) différentes variétés devraient être inoculées et testées afin de vérifier l'influence de cette dernière sur le *silencing*. Dans la même optique, différents variants devraient être testés afin de mettre en évidence d'éventuelles différences de réponse au *silencing* par ceux-ci.

## ***Conclusions et perspectives.***

Fekhi Hassen *et al.* (soumis à publication) ont séquencés 119 variants de PLMVd et ont mis en évidence l'existence de groupe de variants par une analyse phylogénétique .

Dans la continuité du travail entamé par Fékhi Hassen *et al.* (2006), nous avons analysé dans ce travail la pathogénicité de 32 variants (inoculés sur plantes indicatrices) qui n'ont jamais été décrits dans la littérature. Les campagnes de détection menées au cours de ce travail ont permis de détecter plusieurs variants dans les plants de GF-305 inoculés moins d'un an auparavant. Les variants détectés lors de cette analyse ont présentés des pathogénicités différentes allant de la latence à des symptômes sévères. Nous avons analysé les résultats en comparant la structure prédite des variants et leur appartenance à un groupe avec leur pathogénicité. Aucune relation particulière entre les groupes structuraux préalablement définis et la pathogénicité des variants étudiés n'a été mise en évidence. Par contre, les résultats ont indiqués que des symptômes différents pouvaient être observés en fonction de la séquence en acides nucléiques du variant inoculé: des variants sévère, latent et intermédiaires ont ainsi été identifiés. Cependant, à l'heure actuelle, l'implication des variations de séquences observées entre des variants très proches mais entraînant l'expression de symptômes différents ne peut pas être précisée en raison de la grande variabilité de séquence apparaissant lors de la multiplication des viroïdes. En conséquence, l'étude de la descendance obtenue lors de l'inoculation, en conditions contrôlées, d'un variant connu pourrait constituer un atout dans le décryptage des motifs impliqués dans l'expression de la pathogénicité.

Les résultats obtenus par l'inoculation du PLMVd sous forme d'ADNc monomériques et d'ARN dimériques nous permettent de recommander l'utilisation de molécules d'ARN dimérique lors de prochaines campagnes d'inoculation.

Cette étude de la pathogénicité nous a finalement permis de choisir différents variants à tester dans la seconde partie de ce travail.

La seconde partie de ce travail consistait à optimiser une technique de détection des siRNA spécifiques au PLMVd et probablement impliqués dans le *posttranscriptional gene silencing*, un phénomène impliqué dans la défense de la plante ou dans la pathogénicité du viroïde. Les différents variants étudiés dans cette partie ont été choisis en raison de leur pathogénicité différentielle. Aucun signal de *silencing* n'a été détecté avec certitude, les faibles signaux obtenus (figure 23) devant être confirmés, dans les extraits d'ARN totaux de plantes infectées par des viroïdes de pathogénicité différente. Par contre, les témoins positifs, des oligonucléotides d'ADN correspondant à des

séquences conservées du PLMVd de 20 à 25nt, utilisés au cours de cette manipulation ont été détectés avec succès. Afin de confirmer les différentes hypothèses énoncées durant la discussion de ces résultats, des tests comprenant une exposition prolongée du film et des lavages complémentaires devraient être effectués. Si ces tests ne débouchent pas sur l'observation de siRNA alors, une modification des conditions de dénaturation ainsi qu'une modification de la stringence des tampons utilisés lors des lavages des membranes devraient être effectués. Enfin, si ces tests ne permettent toujours pas de détecter ce phénomène, une hybridation à l'aide de sondes plus petites (de l'ordre de 40 nucléotides) et correspondant à des régions conservées du PLMVd pourrait être envisagée.

L'étude des mécanismes responsables de la pathogénicité du PLMVd n'est à l'heure actuelle que très peu avancées. Le *gene silencing* semble faire partie de ces mécanismes. Une fois la détection simultanée des siRNA et du PLMVd totalement mise au point, il sera intéressant de pouvoir comparer la détection de siRNA sur des plants présentant des symptômes, sur des plants présentant une infection latente mais également sur différentes parties d'une plante possédant des symptômes: il est en effet fréquent que les symptômes ne couvrent pas toutes les feuilles de la plante bien que l'infection soit systémique. Cette différence d'expression des symptômes pourrait éventuellement trouver un corollaire dans la présence de siRNA. Par ailleurs, l'étude de l'expression des gènes de plantes saines et de plantes infectées par la technique de la cDNA-AFLP permettrait peut-être de mettre en évidence un polymorphisme d'expression des gènes suite à une infection par le PLMVd. Cette technique pourrait également être utilisée afin de comparer les profil d'expression des gènes chez des plantes subissant une infection latente et une infection symptomatique.

De plus une corrélation entre la présence de siRNA et l'intensité des symptômes a été mise en évidence chez les plantes infectées par des virus. Dans ce cas, la détection de siRNA est en effet souvent accompagnée d'une diminution des symptômes (Chellappan *et al.*, 2004). Ainsi, l'utilisation de variants de pathogénicités différentes permettrait d'étudier cette hypothèse jamais démontrée dans le cas des viroïdes.

Par ailleurs, la maîtrise technique de l'inoculation des plants de pêcher permettra de réaliser d'autres expérimentations. En effet d'autres perspectives peuvent également être envisagées en continuité avec le travail de Fekhi Hassen (2006). Ce travail émet l'hypothèse de l'existence d'un phénomène de recombinaison entre différents variants du PLMVd (Fekhi Hassen *et al.*, soumis à publication). La co-inoculation de variants connus et le suivi de leur descendance pourrait être réalisés à cette fin. Ensuite, une différence d'incidence de la maladie été observée entre différentes variétés de pêchers (Fekhi Hassen *et al.*, soumis à publication). Des inoculations simultanées de variants connus sur ces variétés (Early May Crest et Carnival) permettraient de confirmer ces différences.

# Annexes.

## **1. Protocoles utilisés.**

### **1.1. Protocole du Rneasy plant mini kit.**

1. Determine the amount of plant material. Do not use more than 100 mg.

2. Immediately place the weighed sample in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid nitrogen– cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw. Continue immediately with step 3.

RNA in plant material is not protected after harvesting until the sample is flash frozen in liquid nitrogen. Frozen tissue should not be allowed to thaw during handling. The relevant procedures should be carried out as quickly as possible.

3. Add 450 µl Buffer RLT or Buffer RLC (see “Important notes before starting”) to a maximum of 100 mg tissue powder. Vortex vigorously.

A short (1–3 min) incubation at 56°C may help to disrupt the tissue. However, for samples with a high starch content, incubation at elevated temperatures should be omitted in order to prevent swelling of the starting material.

Note: Ensure that β-ME is added to Buffer RLT before use (see “Important notes before starting”).

4. Pipet the lysate directly onto a QIAshredder spin column (lilac) placed in 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at maximum speed. Carefully transfer the supernatant of the flow-through fraction to a new microcentrifuge tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet in the collection tube. Use only this supernatant in subsequent steps.

It may be necessary to cut the end off the pipet tip in order to pipet the lysate onto the QIAshredder spin column. Centrifugation through the QIAshredder spin column removes cell debris and simultaneously homogenizes the lysate. While most of the cell debris is retained on the QIAshredder spin column, a very small amount of cell debris will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet when transferring the lysate to a new microcentrifuge tube (not supplied).

5. Add 0.5 volume (usually 225 µl) ethanol (96–100%) to the cleared lysate, and mix

immediately by pipetting. Do not centrifuge. Continue without delay with step 6.

If some lysate is lost during step 4, adjust volume of ethanol accordingly. A precipitate may form after the addition of ethanol, but this will not affect the RNeasy procedure.

6. Apply sample (usually 650  $\mu$ l), including any precipitate that may have formed, to an RNeasy mini column (pink) placed 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.

Reuse the collection tube in step 7. If the volume exceeds 700  $\mu$ l, load aliquots successively onto the RNeasy column, and centrifuge as above. Discard the flow-through after each centrifugation step.

Optional: QIAGEN offers the RNase-Free DNase Set (cat. no. 79254) for convenient on-column DNase digestion during RNA purification. Generally, DNase digestion is not required since the RNeasy silica-membrane 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 RT-PCR analysis with a low-abundant target). If using the RNase-Free DNase Set, follow the steps shown on pages 99–100 after performing this step.

7. Add 700  $\mu$ l Buffer RW1 to the RNeasy 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 and collection tube.

8. Transfer the RNeasy column into a new 2 ml collection tube (supplied). Pipet 500  $\mu$ l Buffer RPE onto the RNeasy 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 9.

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

9. Add another 500  $\mu$ l Buffer RPE to the RNeasy column. Close the tube gently, and centrifuge for 2 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to dry the RNeasy silica-gel membrane. Continue directly with step 10, or, to eliminate any chance of possible Buffer RPE carryover, continue first with step 9a.

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

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

9a. Optional: Place the RNeasy column in a new 2 ml collection tube (not supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Centrifuge in a microcentrifuge at full speed for 1 min.

10. To elute, transfer the RNeasy column to a new 1.5 ml collection tube (supplied). Pipet 30–50  $\mu$ l RNase-free water directly onto the RNeasy silica-gel membrane. Close the tube gently, and centrifuge for 1 min at  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10,000$  rpm) to elute.

11. If the expected RNA yield is  $>20 \mu\text{g}$ , repeat the elution step (step 10) as described with a second volume of RNase-free water. Elute into the same collection tube.

To obtain a higher total RNA concentration, this second elution step may be performed by using the first eluate (from step 10). The yield will be 15–30% less than the yield obtained using a second volume of RNase-free water, but the final concentration will be higher.

## 1.2. Protocole du QIAEX II® gel extraction kit.

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 buffer.

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.

For example, add 300  $\mu$ l 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

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.

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

$\leq 2 \mu\text{g}$  DNA Add 10  $\mu$ l of QIAEX II  
2–10  $\mu\text{g}$  DNA Add 30  $\mu$ l of QIAEX II  
Each additional 10  $\mu\text{g}$  DNA Add additional 30  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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 pH  $\leq$ 7.5. Buffer QX1 now contains a pH indicator which is yellow at 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $-20^{\circ}$ 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 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 µl 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 µl ligation reaction as follows:

Fresh PCR product X µl
10X Ligation Buffer 1 µl
pCR®2.1 vector (25 ng/µl) 2 µl
Water to a total volume of 9 µl
T4 DNA Ligase (4.0 Weiss units) 1 µl
Final volume 10 µl

4. Incubate the ligation reaction at 14°C for a minimum of 4 hours (preferably overnight).

Proceed to Transforming Competent Cells

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 $\alpha$ ™, 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  $\mu$ 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l vial of frozen One Shot® Competent Cells for each transformation.
3. Pipette 2  $\mu$ l 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  $\mu$ l 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  $\mu$ l to 200  $\mu$ l 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.

#### 1.4. ULTRAPrep®PLASMID DNA mini prep Kit.

1. Transfert 1-6 ml of stationary culture (*E. Coli* over night grown) to a 1,5 or 2,0 ml microcentrifuge tube. Centrifuge at  $\geq 13000$  rpm for 30-60s to sediment cells. For volume greater than 2 ml, decant supernatant add further culture to the same tube and centrifuge again. Finally, after decanting remove residual liquid by pipetting.

2. Resuspend cell pellet in 250µl buffer 1 including Rnase A by vigorous vortexing. Pipetting up and down may accelerate resuspension.

**Note:** Make sure that small cell pellets or clumps are resuspended totally.

3. Add 250µl buffer 2, close the tube and mix carefully by inverting 4-6 times.

**Note:** At this step cell lysis occurs. Do not extend reaction for more than 5 minutes, because otherwise plasmid DNA may denature irreversibly.

4. Add 350µl buffer 3, close the tube and mix mix carefully by inverting 4-6 times.

**Note:** During neutralization denatured chromosomal DNA and proteins are precipitated.

5. Centrifuge at  $\geq 13000$  rpm for 7 min. During this time, put a mini spin column into a 2 ml receiver tube.

6. Transfert (decant) the clarified supernatant into the mini spin column and close the tube. Centrifuge at  $\geq 13000$  rpm for 30s.

7. Add 700µl buffer 4. centrifuge at  $\geq 13000$  rpm for 30s.

8. Discard the filtrate (flow-through). Put the mini spin column back into the receiver tube, close lid and dry the filter by centrifugation at  $\geq 13000$  rpm for 30s.

9. Place the mini spin column into a supplied 1,5ml receiver tube and add 30-100µl buffer 5 (10mM Tris-HCl, pH 8,8) or deionized water directly in the center of the membrane. Incubate for 1 min. Finally, centrifuge at  $\geq 13000$  rpm for 1 min to elute the plasmid DNA.

### **1.5. QIAquick PCR purification kit.**

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 new 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.

Notes: • Add ethanol (96–100%) to Buffer PE before use (see bottle label for volume).

• All centrifuge steps are at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a conventional tabletop microcentrifuge.

1. Add 5 volumes of Buffer PB to 1 volume of the PCR sample and mix. It is not necessary to remove mineral oil or kerosene.

For example, add 500 µl of Buffer PB to 100 µl PCR sample (not including oil).

2. Place a QIAquick spin column in a provided 2 ml collection tube.

3. To bind DNA, apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.

4. Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube.

Collection tubes are re-used to reduce plastic waste.

5. To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30–60 s.

6. 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.

7. Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube.

8. To elute DNA, add 50 µl Buffer EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) or H<sub>2</sub>O 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 (10 mM Tris·Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0), but the EDTA may inhibit subsequent enzymatic reactions.

## 1.6. *Rneasy*<sup>®</sup>*minElute Cleanup* (QIAGEN).

Adjust sample to a volume of ▲ 100 µl or ● 200 µl with RNase-free water. Add ▲ 350 µl or ● 700 µl 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 β-ME to Buffer RLT before use (see “Things to do before starting”).

2. Add ▲ 250 µl or ● 500 µl of 96–100% ethanol to the diluted RNA, and mix thoroughly by pipetting. Do not centrifuge. Continue immediately with step 3.

3. Apply 700 µl 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 ● samples  $>700$  µl, apply the remaining sample (up to 700 µl) 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 µl 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 µl 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 µl 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 µl RNase-free water for elution. Elution with less than 10 µl 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 µl; elution with 14 µl of RNase-free water results in an eluate with a volume of 12 µl.

## **2. Alignements de séquences.**

### **2.1. Alignement des séquences des variants 151.1 et 151.3.**

```
151.1
~CCCATAAGTTTCGTGCGCATCCCAGCGACTCGTCAGTGGGCTAAGCCCAGACTTATGAGAGA~~GTGGTTACCTCTCAGC
CCCTCCACCTTGGGGTGCCC
151.3
~.....~
.....
151.1
TATTTCGGAGC~CTGCAGTTCCCGATAG~AAAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGGACTTTTCCCTA~GGGTTT
GAGCGGTCGAACCCA~GGGG
151.3
.....A.....~.....~
.....~
151.1
GAGTGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAAACTGGATTACGACGCCTACCCGGGATTCAAACCCGGTCCCCCTCAGAGGTGA~
CTCTGAGTGAAAGGTCTGTG
151.3
.....T.....~
.....
151.1 CTTAGCACACTGACGAGTTCCTGAAA~TGGAACGAAACCTTTCTAA
151.3 .....~.....
```

### **3. Tableau récapitulatif des variants inoculés.**

<i>Variants</i>	<i>Groupes</i>	<i>Formes inoculées</i>
88.1	I-C	ARN et ADNc
88.2	I-A	ADNc
88.3	I-A	ARN et ADNc
94.1	I-B	ARN et ADNc
94.2	I-B	ADNc et ARN
94.3	I-B	ARN
124.4	I-A	ARN
143.1	II-A	ARN et ADNc
143.4	II-A	ADNc
151.1	II-A	ARN et ADNc
151.3	II-A	ARN et ADNc
151.4	II-A	ADNc
162.1	II-A	ARN et ADNc
162.2	II-A	ADNc
162.3	I-B	ADNc
210.1	I-B	ARN et ADNc
210.2	II-A	ADNc
210.3	II-A	ADNc
210.4	II-A	ADNc
235.1	I-C	ADNc
235.2	I-C	ADNc
240.3	I-B	ADNc
240.4	II-A	ADNc
287.1	II-A	ADNc
287.2	II-A	ADNc
369.3	I-B	ARN
377.1	II-B	ADNc
377.2	II-B	ARN et ADNc
377.3	II-B	ARN
377.4	II-B	ADNc
387.1	I-C	ADNc
387.2	I-C	ARN

## ***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.

Aravin A., Tuschl T.. (2005). Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS letters*(5779): 5830-5840.

Bussière 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.

Bussière 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.

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.

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.

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.

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

Delgado S., Martinez de Alba A. E., Hernandez C., Flores R. (2005). A short double-stranded 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.

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., (2005). Detection and epidemiological characteristics of peach latent mosaic viroid in tunisia. *Comm. Appl. Biol. Sci*, (70/3): 115-128.

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

Fekih Hassen I., Roussel S., Kummert J., FakhFakh H., Marrakchi M., Jijakli M.H. (2006b). 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

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., Navarro. J.-A., de la Pena M., Navarro B., Ambros S., Vera A. (1999). Viroids with hammerhead ribozymes: some unique structural and fonctionnal aspect with respect to other members of the group. *Journal of Biological Chemistry* 380: 849-854.

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., 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.
- 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.
- Góra-Sochacka A. (2004). Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica* 51(3): 587-607.
- 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 self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences Biochemistry* 89: 3711-3715.
- 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). Caractérisation moléculaire du viroïde de la mosaïque latente du pêcher en Tunisie. Namur: Haute école Charleroi Europe, travail de fin d'étude, inédit.
- Landry P., Thompson D., Perreault J-P. (2004). The role of viroids in gene silencing: the model case of Peach Latent Mosaic Viroid. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26(1-8).
- Landry P., Perreault. J. P. (2005). Identification of a peach latent mosaic viroid hairpin able to act as a DICER-Like substrate. *Journal of Virology* 79(10): 6540-6543.
- Llacer G., (1998). General aspect of peach latent mosaic disease. *Acta horticultura* 472.
- 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.
- Martinez de Alba A.E., Flores R., Hernandez C. (2002). Two Chloroplastic Viroids Induce the Accumulation of Small RNAs Associated with Posttranscriptional Gene Silencing. *Journal of Virology* 76(24): 13094-13096.

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.

Papaefthimiou I., Hamilton. A. J., Denti M.A., Baulcombe D.C. ,Tsagris M., Tabler M. (2001). Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic acid Research* 29(11): 2395-2400.

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.

Sano T., Candresse T, Hammond R. W., Diener T.O., Owens R. A. (1992). Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences Biochemistry*. 89: 10104-10108.

Semancik J.S. (2003). Pathogenesis. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 61-66.

Singh R.P., Randles J.W., Hadidi A., (2003a). 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.

Singh R.P., Ready K.F.M., Nie X. (2003b). Biology. In A. Hadidi, R. Flores, J. Randles, J. Semancik (Eds.) Viroids, properties, detection, diseases and their control. (s.l.): Csiro publishing, 30-46.

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.

Voinnet O, Pinto. Y. M., Baulcombe D. C. (1999). Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Plant biology* 96(24).

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

Yali Zhu, Yijun Qi, Yan Xun, Owens R., Biao Ding. (2002). Movement of Potato Spindle Tuber Viroid Reveals Regulatory Points of Phloem-Mediated RNA Traffic. *Plant physiology* 130: 138-146.

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.