

Communauté française de Belgique

**FACULTE UNIVERSITAIRE
DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DE GEMBLoux**

**Caractérisation de la pathogénicité et de la
réplication de variants mutés du PLMVd inoculés
sur plants de pêcher GF-305**

Travail de fin d'études

Année académique 2008-2009

Présenté par : **DEWALQUE Adrien**

Promoteur : **Professeur JIJAKLI Haïssam**

Co-Promoteur : **PARISI Olivier**

En vue de l'obtention du
grade de Bioingénieur

Orientation : Protection des végétaux

"Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de la Faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux."

"Le présent document n'engage que son auteur."

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le promoteur membre du personnel enseignant de la FUSAGx

Communauté française de Belgique

**FACULTE UNIVERSITAIRE
DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DE GEMBLoux**

**Caractérisation de la pathogénicité et de la
réplication de variants mutés du PLMVd inoculés
sur plants de pêcher GF-305**

Travail de fin d'études

Année académique 2008-2009

Présenté par : **DEWALQUE Adrien**

Promoteur : **Professeur JIJAKLI Haïssam**

Co-Promoteur : **PARISI Olivier**

En vue de l'obtention du
grade de Bioingénieur

Orientation : Protection des végétaux

Remerciements

Je voudrais ici remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur aide et leurs conseils pour la réalisation de ce travail de fin d'études.

Tout d'abord je remercie le Professeur P. Lepoivre pour son enseignement, pour m'avoir accueilli au sein de l'Unité de Phytopathologie et avoir mis à ma disposition le matériel et la documentation nécessaire à mon travail.

Ensuite ma gratitude va au Professeur H. Jijakli pour les connaissances qu'il m'a enseignées et qui ont été la base de mon travail et pour m'avoir permis d'intégrer son projet de recherche.

Je remercie aussi plus particulièrement Olivier Parisi qui m'a guidé et soutenu tout au long de la réalisation de ce travail, pour sa rigueur, ses relectures et pour sa patience.

Mes sincères remerciements vont aussi aux membres de l'Unité de Phytopathologie pour leurs conseils, le bon fonctionnement du laboratoire qu'ils assurent, le soin apporté aux pêcheurs ainsi que pour leur sympathie.

Enfin mes derniers remerciements sont adressés à ma famille et plus particulièrement à mes parents grâce à qui j'ai eu la possibilité de faire ces études, qui m'ont soutenu et encouragé.

Résumé

Le *Peach latent mosaïc viroïd* (PLMVd) est étudié depuis plusieurs années à l'Unité de Phytopathologie. Ces recherches ont permis, entre autres, le développement de techniques moléculaires de détection (RT-PCR) et de quantification (rétro-transcription suivie de PCR en temps réel) de ce viroïde. Elles ont été utilisées ici pour caractériser la réplication de variants mutés par rapport à un variant de référence non muté. Les mutations réalisées concernent le pseudo-nœud P8 (variant P8) et le domaine ribozyme du viroïde (variant 6A). Ces variants mutés et non mutés ont été inoculés sur des plants de pêcher de la variété GF-305. Les résultats obtenus par quantification absolue du PLMVd au cours des neuf derniers mois ont montré que ces mutations ont eu un impact négatif sur la réplication du viroïde. En moyenne, les titres en PLMVd mesurés ont été respectivement 80 fois inférieurs et 320 fois inférieurs après inoculation par les variants 6A et P8 par rapport aux titres rencontrés dans les plants inoculés par le variant de référence. Ces deux variants mutés ont induit des symptômes de mosaïque sévère dans un premier temps et de mosaïque légère par la suite. Les mutations introduites ont pu amener à la réduction du taux de réplication ou d'auto-clivage de ces variants, favoriser leur dégradation via la *RNA silencing* et/ou affecter la relation hôte-pathogène. Il est également probable que les variants mutés aient été incapables de se maintenir ou de se répliquer dans les plants mais que des mutations compensatoires soient apparues *in vivo* et aient restauré leur activité.

Abstract

Peach latent mosaïc viroïd (PLMVd) is studied for several years in the Plant Pathology Unit. These researches allowed, among others, development of detection (RT-PCR) and quantification (retro-transcription followed by real-time PCR) methods for this viroid. They were used here to characterize the replication of mutant variants in comparison with the non mutated variant. The mutations concern the P8 pseudoknot and the ribozyme domain of the viroid. These mutated and wild type variants were inoculated on GF-305 cultivar peach tree seedlings. Results of the PLMVd absolute quantification in the last nine months showed that these mutations had a negative impact on the viroid replication. PLMVd mean titers measured were respectively 80 fold and 320 fold lower after inoculation by 6A and P8 variants in comparison with the non mutated variant. Both mutant variants induced severe mosaic symptoms at first and mild mosaic later. Mutations may have led to the lowering of the replication rate or the auto-cleavage rate of these variants, they may have favoured their degradation by RNA silencing and/or affected the host-pathogen relationship. Mutant variants were likely unable to maintain or replicate in the plants as well but compensatory mutations may have appeared *in vivo* and restored their activity.

Table des matières

LISTE DES ABRÉVIATIONS	1
INTRODUCTION	3
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. LES VIROÏDES	5
1.1. GÉNÉRALITÉS	5
1.2. PHYLOGÉNIE ET CLASSIFICATION	5
1.2.1. <i>Les Pospiviroidae</i>	6
1.2.2. <i>Les Avsunviroidae</i>	6
1.3. STRUCTURE	6
1.4. RÉPLICATION	7
1.4.1. <i>Mécanisme global chez les Avsunviroidae</i>	7
1.4.2. <i>Initiation et élongation</i>	8
1.4.3. <i>Clivage et ligation</i>	10
1.5. TRANSMISSION	11
1.6. MOUVEMENT DANS LA PLANTE	11
2. LE VIROÏDE DE LA MOSAÏQUE LATENTE DU PÊCHER.....	12
2.1. GÉNÉRALITÉS	12
2.2. CARACTÉRISTIQUES MOLÉCULAIRES	13
2.2.1. <i>Structure primaire</i>	13
2.2.2. <i>Structure secondaire</i>	13
2.2.3. <i>Structure tertiaire</i>	15
2.3. GAMME D'HÔTES ET DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE	16
2.4. SYMPTOMATOLOGIE.....	16
2.5. PATHOGENÈSE.....	19
2.5.1. <i>Différentes hypothèses</i>	19
2.5.2. <i>Extinction post-transcriptionnelle de gène</i>	21
2.5.3. <i>Insertion</i>	25
2.6. PROTECTION CROISÉE.....	27
2.7. POLYMORPHISME ET VARIANTS	27
2.7.1. <i>Recombinaison</i>	29
2.7.2. <i>Théorie des quasi-espèces</i>	30
2.7.3. <i>Variabilité en relation avec la structure secondaire</i>	30
2.8. MÉTHODES DE DÉTECTION	30
2.8.1. <i>Méthodes biologiques</i>	30
2.8.2. <i>Méthodes biochimiques et moléculaires</i>	30
2.9. MÉTHODES DE LUTTE	32
3. LES TECHNIQUES MOLÉCULAIRES DE DÉTECTION ET DE QUANTIFICATION	33
3.1. RT-PCR.....	33
3.2. PCR EN TEMPS RÉEL.....	34
3.2.1. <i>Principe</i>	34
3.2.2. <i>Interprétation des résultats</i>	35
3.3. APPLICATION À LA PHYTOPATHOLOGIE ET À LA VIROLOGIE	35
OBJECTIFS.....	37
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	38
1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	38
1.1. MATÉRIEL VÉGÉTAL.....	38

1.2.	VARIANTS DU PLMVd INOCULÉS	38
2.	AMORCES UTILISÉES	39
3.	MÉTHODES	40
3.1.	PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	40
3.1.1.	<i>Environnement RNase free</i>	40
3.1.2.	<i>Quantification des acides nucléiques par le NanoDrop® ND-1000.....</i>	40
3.1.3.	<i>Prélèvement et extraction du jus brut à partir de plants de pêcher.....</i>	40
3.2.	PCR CLASSIQUE	41
3.3.	RT-PCR	41
3.4.	MIGRATION D'ADN PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE.....	42
3.5.	RÉTRO-TRANSCRIPTION.....	42
3.6.	PCR EN TEMPS RÉEL.....	42
	RÉSULTATS ET DISCUSSION	45
1.	MODELES DE COMPARAISON	45
2.	CARACTERISATION DE LA REPLICATION DU PLMVd.....	45
2.1.	DETECTION DU PLMVd SUR PLANTS INOCULES.....	45
2.2.	QUANTIFICATION ABSOLUE DU PLMVd SUR PLANTS INOCULES	46
2.2.1.	<i>Optimisation de la PCR en temps réel.....</i>	46
2.2.2.	<i>Test de sensibilité</i>	47
2.2.3.	<i>Application de la PCR en temps réel à la quantification absolue du PLMVd dans les plants inoculés par les variants 151.1, 6A et P8.....</i>	47
2.3.	DISCUSSION.....	54
2.3.1.	<i>Variant 151.1.....</i>	54
2.3.2.	<i>Variants mutés.....</i>	55
2.3.3.	<i>Feuilles symptomatiques et asymptomatiques</i>	56
3.	CARACTERISATION DE LA PATHOGENICITE	58
3.1.	OBSERVATION DU PHENOTYPE DES FEUILLES	58
3.2.	DISCUSSION.....	59
4.	DISCUSSION CONCERNANT LES MUTATIONS.....	60
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	66
	ANNEXES	68
1.	SÉQUENCES.....	68
1.1.	SÉQUENCE DE L'OLIGONUCLÉOTIDE D'ADN HOMOLOGUE UTILISÉ COMME STANDARD DE PCR EN TEMPS RÉEL.....	68
1.2.	SÉQUENCE DE L'OLIGONUCLÉOTIDE D'ADN COMPLÉMENTAIRE UTILISÉ COMME STANDARD DE PCR EN TEMPS RÉEL.....	68
2.	MÉTHODES	68
2.1.	SUPERScript™ III FIRST-STRAND SYNTHESIS SYSTEM FOR RT-PCR (INVITROGEN)	68
3.	ANALYSES STATISTIQUES.....	69
3.1.	ANALYSE DES RÉSULTATS DE QUANTIFICATION EN NOMBRE DE MOLÉCULES DE PLMVd PAR RÉACTION POUR LES PLANTS INOCULÉS PAR LE VARIANT 151.1	69
3.1.1.	<i>Test d'égalité des variances : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	69
3.1.2.	<i>Analyse de la variance (AVI) : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	69
3.1.3.	<i>Comparaison des moyennes par la méthode de Fisher</i>	69

3.2.	ANALYSE DES RÉSULTATS DE QUANTIFICATION EN NOMBRE DE MOLÉCULES DE PLMVd PAR RÉACTION POUR LES PLANTS INOCULÉS PAR LE VARIANT 6A.....	70
3.2.1.	<i>Test d'égalité des variances : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	70
3.2.2.	<i>Analyse de la variance (AV1) pour les plants inoculés par le variant 6A et le jus brut de référence (151.1) : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	70
3.2.3.	<i>Comparaison des moyennes des quantités pour les plants inoculés par le variant 6A par rapport au titre du jus brut de référence (151.1) par la méthode de Dunnett :</i>	71
3.2.4.	<i>Analyse de la variance des quantités pour les plants inoculés par le variant 6A entre eux : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	71
3.2.5.	<i>Comparaison des moyennes des quantités pour les plants inoculés par le variant 6A entre eux par la méthode de Fisher</i>	72
3.3.	ANALYSE DES RÉSULTATS DE QUANTIFICATION EN NOMBRE DE MOLÉCULES DE PLMVd PAR RÉACTION POUR LES PLANTS INOCULÉS PAR LE VARIANT P8	72
3.3.1.	<i>Test d'égalité des variances : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	72
3.3.2.	<i>Analyse de la variance (AV1) pour les plants inoculés par le variant P8 et le jus brut de référence (151.1) : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	72
3.3.3.	<i>Comparaison des moyennes des quantités pour les plants inoculés par le variant P8 par rapport au titre du jus brut de référence (151.1) par la méthode de Dunnett :</i>	73
3.3.4.	<i>Analyse de la variance des quantités pour les plants inoculés par le variant P8 entre eux : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	73
3.3.5.	<i>Comparaison des moyennes des quantités pour les plants inoculés par le variant P8 entre eux par la méthode de Fisher</i>	74
3.4.	ANALYSE DES RÉSULTATS DE QUANTIFICATION EN NOMBRE DE MOLÉCULES DE PLMVd PAR RÉACTION POUR LES FEUILLES SYMPTOMATIQUES ET ASYMPTOMATIQUES RÉCOLTÉES SUR PLANTS INOCULÉS PAR LE VARIANT 151.1 .	74
3.4.1.	<i>Test d'égalité des variances : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement</i>	74
3.4.2.	<i>Analyse de la variance (AV2 GLM) pour les feuilles symptomatiques et asymptomatiques récoltées sur plants inoculés par le variant 151.1 : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement-n° plant; Phénotype</i>	75
3.4.3.	<i>Test T de Student pour les valeurs mesurées le 24/11/2008 sur le plant n°5 : log₁₀ Quantité versus Phénotype</i>	75
3.4.4.	<i>Test T de Student pour les valeurs mesurées le 09/01/2009 sur le plant n°5 : log₁₀ Quantité versus Phénotype</i>	75
3.4.5.	<i>Test T de Student pour les valeurs mesurées le 24/11/2008 sur le plant n°1 : log₁₀ Quantité versus Phénotype</i>	75
	BIBLIOGRAPHIE	76

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNc ou cDNA : ADN complémentaire ou complementary DNA
ARN ou RNA : Acide RiboNucléique ou RiboNucleic acid
ARNm ou mRNA : ARN messenger ou messenger RNA
ARNr ou rRNA : ARN ribosomique ou ribosomic RNA
ARNt ou tRNA : ARN de transfert ou transfert RNA
ASBVd : Avocado SunBlotch Viroid
BEt : Bromure d’Ethidium
CChMVd : Chrysanthemum Chlorotic Mottled Viroid
CCR : Central Conserved Region (région centrale conservée)
cDNA-AFLP : complementary DNA - Amplified Fragment Length Polymorphism
CLBV : Citrus Leaf Blotch Virus
CRA-W : Centre de Recherche Agronomique-Wallonie
Ct : Cycle threshold (cycle seuil)
DCL : DiCer Like (de type dicer)
DEPC : DiEthylPyroCarbonate
dNTP : deoxyriboNucleotide TriPhosphate
DTT : DiThioThreitol
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
mi-RNA : micro-RNA
NEP : Nuclear Encoded RNA Polymerase (ARN polymérase codée dans le noyau)
OGM : Organisme Génétiquement Modifié
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PC : Peach Calico
PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PEP : Plast Encoded RNA Polymerase (ARN polymérase codée dans le plaste)
PLMVd : Peach Latent Mosaic Viroid
PSTVd : Potato Spindle Tuber Viroid
PR : Pathogenesis-Related
PTGS : PostTranscriptionnal Gene Silencing (extinction post-transcriptionnelle de gène)
RdRp : RNA dependant RNA polymerase (ARN polymérase ARN-dépendante)
RISC : RNA Induced Silencing Complex
RLM-RACE : RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends
RNAP : RNA Polymerase
RNase : RiboNuclease
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR
siRNA : small interfering RNA
snRNA : small nuclear RNA
SAR : Systemic Acquired Resistance (résistance systémique acquise)
SRP : Signal Recognition Particle
SSC : Saline-Sodium Citrate
TAE : Tris-Acétate-EDTA

T_m : melting Temperature

VIRP1 : Viroid RNA-Binding Protein 1 (protéine de liaison à l'ARN de viroïde 1)

INTRODUCTION

Les viroïdes sont des agents pathogènes constitués uniquement d'un brin d'ARN monocaténaire circulaire de 240 à 460 nucléotides. Ils infectent les plantes supérieures et induisent des symptômes (entraînant des dommages importants dans des cultures d'intérêt économique) alors même qu'ils ne codent pour aucune protéine. Ces entités sont fort étudiées car elles permettent de caractériser la réplication d'une molécule d'ARN sans que ce mécanisme soit en concurrence avec des phénomènes de transcription et de traduction (DELGADO *et al.*, 2005).

L'ARN de ces entités se réplique, se déplace et interfère avec le métabolisme de l'hôte, de plus l'ARN de certains viroïdes est catalytique. Chaque espèce de viroïde contient de nombreux variants qui diffèrent par leur séquence. Leurs séquences et leurs structures sont étudiées depuis plus de 20 ans mais le centre d'attention de la recherche se déplace maintenant de la molécule elle-même vers son interaction avec l'hôte (TABLER *et al.*, 2004).

Le *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd) fait partie de la famille des *Avsunviroidae*. Il est étudié depuis plusieurs années à l'Unité de Phytopathologie dans le cadre d'une collaboration internationale. Ce viroïde est répandu mondialement et est considéré comme un organisme de qualité en Europe (BARBA *et al.*, 2003). Son hôte principal est le pêcher, sur lequel il peut induire une large gamme de symptômes (mosaïque, chlorose, retard de croissance, etc). Les pertes économiques résultent surtout de la réduction de la qualité des fruits et de la moindre durée de vie des arbres atteints. Le viroïde est présent à l'état latent lors des premières années d'infection en verger, les symptômes ne sont pas visibles et les mesures de contrôles (l'éradication, principalement) ne peuvent pas être appliquées. En conséquence, des outils de diagnostic rapides et sensibles ont été développés (FLORES *et al.*, 2006a).

La molécule d'ARN du PLMVd comporte entre 335 et 351 nucléotides et adopte une structure secondaire branchée présentant des pseudo-nœuds. BUSSIÈRE *et al.* (2000) ont étudié la formation du pseudo-nœud P8 dans la molécule du PLMVd et réalisé des mutations pour empêcher l'apparition de cette structure tertiaire *in vitro*.

La pathogénicité de différents variants du PLMVd a été caractérisée et des techniques moléculaires de détection et quantification du viroïde ont été développées au cours des recherches menées par PARISI (2006), FEKIH HASSEN (2007b) et GONNÉ (2007) au sein de l'Unité de Phytopathologie. De plus, des travaux concernant la relation hôte-pathogène sont en cours.

Le présent travail utilise ces techniques moléculaires (en particulier la PCR en temps réel) afin de caractériser la réplication *in vivo* d'un variant sévère du PLMVd portant soit les mutations utilisées par BUSSIÈRE *et al.* (2000) soit des mutations dans le domaine ribozyme du viroïde. Ces variants ont été inoculés sur plants de pêcher de la variété GF-305. Les analyses ont été réalisées sur des extraits de jus brut issus de feuilles de pêcher récoltées sur une période de plusieurs mois.

L'observation des symptômes a également permis la caractérisation de la pathogénicité des variants mutés par rapport au variant sévère servant de référence. A partir des

informations récoltées, des hypothèses ont pu être émises quant à l'impact des mutations sur la réplication et le pouvoir pathogène du PLMVd et quant à la fonction biologique de certaines de ses structures.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les viroïdes

1.1. Généralités

La première maladie qui a révélé l'existence des viroïdes et leur effet pathogène a été le « *potato spindle tuber* ». Les plantes affectées par cette maladie sont plus petites et leurs feuilles plus étroites et plus pointues que les feuilles typiques. Les tubercules sont longs, étroits, lisses et comportent des yeux en plus grand nombre. Ce n'est qu'en 1971 que les propriétés moléculaires de l'agent causal de cette maladie ont pu être différenciées de celles des virus conventionnels (GORA-SOCHACKA, 2004 ; OWENS, 2008).

Les propriétés remarquables rencontrées chez les viroïdes sont la petite taille de leur génome d'ARN monocaténaire (240 à 460 nucléotides), l'absence de capsid, la nature non codante de leur ARN et leur structure circulaire. Ils utilisent les enzymes de leur hôte pour mener à bien leur cycle de réplication dans le noyau pour certains ou dans le chloroplaste pour d'autres (FLORES *et al.*, 2006b ; OWENS, 2008).

Les viroïdes infectent des plantes supérieures et peuvent causer des pertes économiques importantes en agriculture (MOTARD *et al.*, 2008). Les séquences de la plupart d'entre eux sont disponibles en ligne dans la « *Subviral RNA Database* » (<http://subviral.med.uottawa.ca>) (OWENS, 2008).

1.2. Phylogénie et classification

En 1989, DIENER a proposé que les viroïdes soient considérés comme des fossiles vivants, reliques de l'hypothétique « *RNA-world* » pré-cellulaire. Les molécules d'ARN libres auraient été les acteurs principaux de cette période, jouant en même temps le rôle de phénotype et de génotype et permettant l'évolution en l'absence de protéines. Certains viroïdes possèdent même des structures qui leur permettent de mener à bien les étapes de clivage et de ligation nécessaires à la réplication sans l'aide d'enzymes (MOTARD *et al.*, 2008 ; OWENS, 2008).

Selon une autre hypothèse, les viroïdes seraient apparus à partir d'éléments transposables ou d'introns, ils proviendraient donc d'organismes plus complexes (FLORES *et al.*, 2006b). Les viroïdes et un groupe d'ARN satellites qui leur sont similaires semblent d'ailleurs avoir une origine monophylétique (HERNÁNDEZ *et al.*, 1992).

L'évolution des viroïdes pourrait être liée à des recombinaisons qui ont pu avoir lieu avec les molécules d'ARN appartenant à l'hôte ou à d'autres viroïdes. Des délétions spontanées ont aussi vraisemblablement eu lieu (OWENS, 2008).

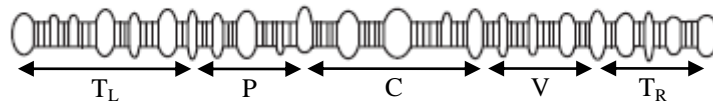
Les viroïdes peuvent être perçus comme une forme de parasite moderne qui se passe des « extravagances » des pathogènes viraux (telles la synthèse de protéines) pour utiliser l'hôte de la manière la plus sophistiquée (TABLER *et al.*, 2004).

Jusqu'à présent, 29 espèces de viroïdes ont été reconnues et classées en deux familles divisées en sept genres. Il s'agit des familles des *Pospiviroidae* et des *Avsunviroidae*. Les critères qui ont été utilisés pour différencier les espèces de viroïdes sont d'une part un niveau de similarité de séquences inférieur à 90% entre ces espèces (critère arbitraire) et d'autre part des différences dans au moins une de leurs propriétés biologiques (OWENS, 2008).

1.2.1. Les *Pospiviroidae*

Les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae*, dont le *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd) est le représentant principal, possèdent une structure secondaire en bâtonnet qui comporte cinq domaines structuraux ou fonctionnels appelés : central (C), pathogénicité (P), variable (V), terminal droit (T_R) et terminal gauche (T_L). Le domaine C contient une région centrale conservée (CCR) (Figure 1). Ces viroïdes se répliquent et s'accumulent à l'intérieur du noyau de leur hôte via un mode de réplication en cercle roulant asymétrique. La majorité des viroïdes connus appartiennent à cette famille (FLORES *et al.*, 2006b ; OWENS, 2008).

Figure 1. Modèle schématique de la structure en bâtonnet du *Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd). Les cinq domaines structuraux ou fonctionnels (T_L, P, C, V et T_R) sont représentés (GÓRA-SOCHACKA, 2004).



1.2.2. Les *Avsunviroidae*

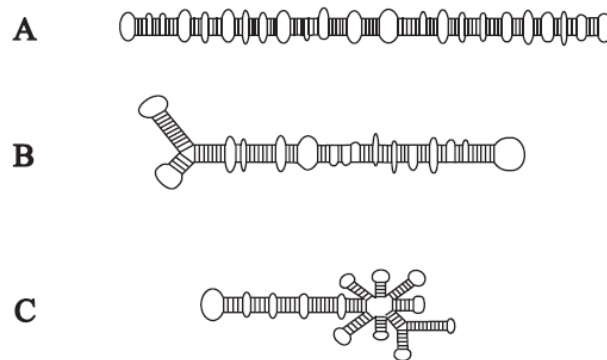
Contrairement aux *Pospiviroidae*, les *Avsunviroidae* se répliquent et s'accumulent dans les chloroplastes suivant le modèle en cercle roulant symétrique. L'espèce type de cette famille est l'*Avocado sunblotch viroid* (ASBVd). La structure secondaire de la plupart d'entre eux est branchée. Leur molécule d'ARN contient un domaine ribozyme (catalytique) en « tête de marteau » (*hammerhead*) mais pas de région centrale conservée. L'activité ribozyme permet l'auto-clivage du viroïde au cours de sa réplication ainsi que la création d'extrémités 2',3'-phosphate cyclique et 5'-hydroxyle qui permettent l'auto-circularisation de la molécule. D'un point de vue phylogénétique, la famille des *Avsunviroidae* se situe à une position intermédiaire entre les *Pospiviroidae* et certains ARN satellites qui leur sont similaires (FLORES *et al.*, 2006b ; OWENS, 2008).

Ce travail de fin d'étude est centré sur une espèce : le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd) qui fait partie de la famille des *Avsunviroidae*.

1.3. Structure

La structure des viroïdes est compacte vu leur haut niveau d'auto-complémentarité. Cette structure est composée de boucles monocaténares séparées par des régions bicaténaires et comprend des appariements non canoniques G-U. La molécule monocaténaire circulaire des viroïdes est refermée par une liaison covalente. La structure secondaire des viroïdes est fortement conservée, elle est caractéristique pour chaque espèce de viroïde. Celle des *Avsunviroidae* est plus fragile que celle des *Pospiviroidae* (Figure 2) (TABLER *et al.*, 2004 ; FLORES *et al.*, 2006b ; OWENS, 2008).

Figure 2. Modèles schématiques de la structure des viroïdes. (A) Structure secondaire en bâtonnet proposée pour le PSTVd (*Pospiviroidae*). (B) Structure secondaire quasi en bâtonnet proposée pour l'ASBVd (*Avsunviroidae*). (C) Conformation branchée complexe proposée pour le PLMVd (*Avsunviroidae*) (GÓRA-SOCHACKA, 2004).



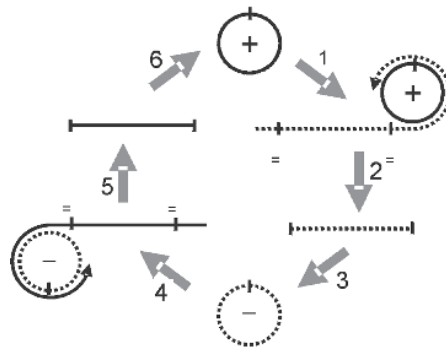
Ce type de structure permet probablement aux viroïdes d'éviter d'être dégradés par les nucléases cellulaires. Par contre, la réplication et le mouvement des viroïdes reposent vraisemblablement sur leur interaction avec les protéines de l'hôte : leur séquence et leur structure leur permettraient d'utiliser la machinerie cellulaire de l'hôte (FLORES *et al.*, 2006b).

1.4. Réplication

1.4.1. Mécanisme global chez les *Avsunviroidae*

Les viroïdes se répliquent via un mécanisme en cercle roulant grâce à des ARN polymérase ADN dépendantes produites par l'hôte. Les tissus végétaux infectés par les *Avsunviroidae* contiennent des molécules d'ARN circulaires infectieuses de polarité positive (+, dénomination arbitraire) et négative (-). Les molécules circulaires de polarité positive servent de modèle et sont transcrites en molécules multimériques linéaires de polarité négative (Figure 3). Contrairement à ce qui est observé dans la famille des *Pospiviroidae* et chez d'autres entités utilisant le mécanisme de réplication en cercle roulant, ces brins complémentaires linéaires de polarité négative sont clivés en monomères et circularisés. En effet, les *Avsunviroidae* possèdent des structures ribozymes en tête de marteau dans leurs brins des deux polarités qui permettent le clivage des ARN multimériques et la libération de monomères linéaires capables de s'auto-circulariser. Après circularisation, les monomères de polarité négative servent de modèles pour la production de brins positifs par polymérisation, clivage et auto-circularisation. Ainsi, le mode de réplication en cercle roulant des *Avsunviroidae* est dit symétrique. (MOTARD *et al.*, 2008).

Figure 3. Mécanisme de réplication en cercle roulant des *Avsunviroidae*. Les *Avsunviroidae* se répliquent via un mécanisme symétrique où les ribozymes induisent le clivage des brins d'ARN de polarité (+) et (-). Les monomères d'ARN (-) sont circularisés avant que ne débute la synthèse des brins d'ARN (+) (OWENS, 2008).



Les formes de polarités positive et négative ne sont pas forcément présentes en quantités identiques dans les plantes infectées. Ainsi, dans les extraits issus de plants infectés par le PLMVd, les concentrations mesurées en monomères d'ARN circulaire de polarité positive et négative sont semblables alors que le ratio de (+) sur (-) est bien plus élevé chez les autres membres de la famille des *Avsunviroidae*. De plus, les ARN monomériques linéaires sont plus abondants que leurs homologues circulaires chez le PLMVd (et le CChMVd), contrairement à ce qui est observé chez les autres viroïdes. Enfin, les plants infectés par le PLMVd ne renferment pas de brins d'ARN de viroïde multimériques ou seulement en très faible concentration. Cette particularité semble découler de la grande efficacité du ribozyme du PLMVd et de sa localisation particulière dans la molécule (FLORES *et al.*, 2006a).

L'importance en nombre de molécules d'ARN présentes dans la plante infectée est bien moindre pour le PLMVd par rapport à ce qui est observé pour d'autres viroïdes tels que l'ASBVd. En général la réplication du PLMVd est donc plus lente, pourtant elle peut être très active dans le cas particulier du *peach calico* (PC, chlorose extrême du PLMVd) dont nous reparlerons (FLORES *et al.*, 2006a).

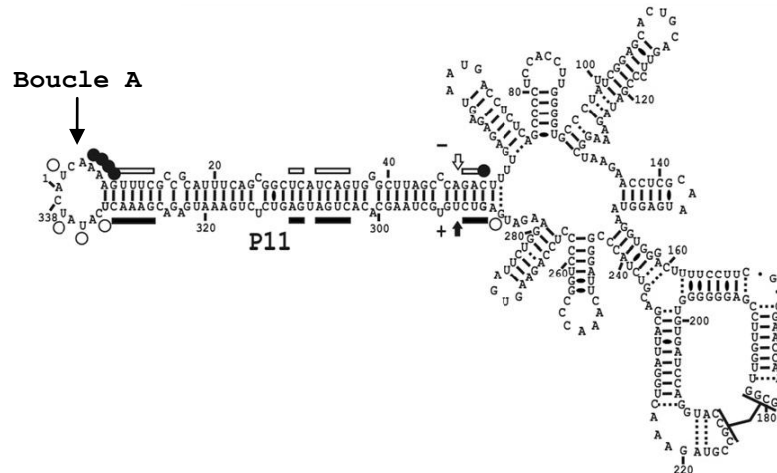
1.4.2. Initiation et élongation

Au premier abord, la structure circulaire du PLMVd amène à penser que l'initiation de sa réplication pourrait avoir lieu n'importe où sur la molécule. En réalité ce n'est pas le cas vu que la séquence du viroïde doit aussi jouer le rôle de promoteur vis-à-vis d'une ARN polymérase de l'hôte (MOTARD *et al.*, 2008).

Une partie des ARN linéaires monomériques du PLMVd présents dans les tissus infectés possèdent une extrémité 5' caractéristique qui résulte de l'auto-clivage. Les brins des deux polarités présentent cette caractéristique. Par essais d'extension d'amorces à partir d'un modèle de polarité positive, six longueurs différentes de fragments terminés par des extrémités 5' sont obtenues. Ces positions correspondraient à des sites sensibles à la dégradation dans les ARN circulaires monomériques de polarité positive ou à des sites spécifiques où débute la transcription de l'ARN (+) du PLMVd. La RLM-RACE (*RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends*) a révélé que le site d'initiation de la réplication semble se trouver à la position 51, juste à côté du site d'auto-clivage (Figure 4). De la même

manière, c'est à la position 286 qui semble être le site d'initiation de la molécule de polarité négative (DELGADO *et al.*, 2005).

Figure 4. Séquence et structure secondaire du PLMVd (variant Siberian C) déterminée par BUSSIERE *et al.* (2000). Les résidus conservés qui forment les motifs de la tête de marteau sont indiqués par des barres et les flèches désignent les sites d'auto-clivage. Les cercles correspondent aux sites d'initiation proposés. Les symboles en noir ou blanc se rapportent aux brins de polarités positive ou négative, respectivement (MOTARD *et al.*, 2008).



La transcription des brins pourrait donc débuter à des positions presque symétriques pour les deux polarités, à la base du bras à tête de marteau (dans la partie droite de la tige P11). En conséquence, les séquences de la structure en tête de marteau du brin naissant sont synthétisées avant celles qui forment la structure en tête de marteau dans la polarité complémentaire. Donc, les brins naissants des deux polarités peuvent être auto-clivés au cours de la transcription (DELGADO *et al.*, 2005).

Au voisinage de ces sites d'initiation hypothétiques se trouve une séquence *CAGACG box* hautement conservée. Cette séquence contribue à délimiter le site d'initiation, d'où la présence d'un site d'initiation universel spécifique. Elle fait partie d'un domaine double-brin, ce qui facilite l'action de l'ARN polymérase, et est entourée de domaines simple-brin qui favorisent l'initiation de la synthèse (FLORES *et al.*, 2006a ; MOTARD *et al.*, 2008).

En outre, un triplet AAG situé à la jonction entre la tige P11 et la boucle A (positions 6 à 8) est capable de déclencher *in vitro* l'initiation de transcription du PLMVd de polarité positive par l'ARN polymérase d'*Escherichia coli*. C'est aussi le cas concernant la molécule de polarité négative pour d'autres nucléotides situés dans la boucle A (Figure 4). En conséquence, des fragments de 280 nucléotides des deux polarités sont détectés parmi les intermédiaires de réplication. Ils proviennent certainement du premier cycle de réplication et s'étendent du site d'initiation au site d'auto-clivage. L'action *in vivo* de ces sites alternatifs d'initiation n'a pas été démontrée. De plus, l'auto-clivage n'y est pas favorisé car l'adoption de la structure en tête de marteau par le brin naissant est en compétition avec le repliement en épingle à cheveux dans cette région. La structure en épingle à cheveux est plus stable et catalytiquement inactive (PELCHAT *et al.*, 2001 ; MALFITANO *et al.*, 2003 ; DELGADO *et al.*, 2005).

Etant donné que leur ARN ne code pour aucune protéine, les viroïdes reposent sur les enzymes de l'hôte pour se répliquer. L'ARN polymérase II ADN-dépendante (RNAP II) de

l'hôte utilisée à cette fin par les *Pospiviroidae* est incapable de mener à bien la réplication des *Avsunviroidae* (PELCHAT *et al.*, 2001).

Deux complexes transcriptionnels ARN polymérase ADN-dépendant sont présents dans les chloroplastes et sont impliqués dans la réplication des *Avsunviroidae* : une polymérase codée dans le plaste lui-même (PEP) et une autre codée dans le noyau (NEP). C'est d'abord la NEP qui a été proposée comme responsable de la transcription de ces viroïdes, la PEP était alors peu connue (PELCHAT *et al.*, 2001).

L'ARN polymérase d'*Escherichia coli* est un bon modèle, *in vitro*, pour étudier les étapes de polymérisation de la réplication du PLMVd. La RNAP chloroplastique (PEP), étant semblable à la RNAP de bactérie, pourrait être responsable de la réplication du PLMVd. La NEP pourrait aussi y jouer un rôle (PELCHAT *et al.*, 2001). Selon MOTARD *et al.*, en 2008 l'identification de la polymérase du pêcher responsable de la réplication du PLMVd reste encore ambiguë.

1.4.3. Clivage et ligation

Il existe une corrélation positive entre l'importance de l'auto-clivage *in vitro* et la capacité infectieuse de certains variants du PLMVd. L'auto-clivage est facilité par la stabilité thermodynamique élevée des structures en tête de marteau et la localisation spécifique des deux sites d'initiation à la base de l'épingle à cheveux (qui est fort stable). Le rendement de l'auto-clivage *in vitro* atteint d'ailleurs presque les 100% pour le PLMVd. Cette efficacité explique les faibles concentrations en multimères de polarité positive et négative dans les plants infectés (BUSSIÈRE *et al.*, 1999 ; FLORES *et al.*, 2006a).

Au sein des ribozymes en tête de marteau, il y a interaction entre les boucles I et II, ce qui permet l'auto-clivage à de faibles concentrations en magnésium (rencontrées *in vivo*). L'auto-clivage de l'ARN au niveau d'un lien phosphodiester particulier produit des extrémités 2',3'-phosphate cyclique et 5'-hydroxyle. Les structures en tête de marteau des viroïdes rencontrés dans la nature opèrent en *cis* (elles clivent les ARN dont elles font partie) pourtant il est possible d'apparier deux fragments d'ARN différents en *trans* de façon à ce que le ribozyme de l'un clive des séquences de l'autre. Si elle est dissociée après clivage, une seule molécule de ribozyme peut alors cliver plusieurs autres substrats (à la façon d'un enzyme) (CÔTÉ *et al.*, 2003 ; FLORES *et al.*, 2006a). Le ribozyme en tête de marteau sera décrit plus en détail dans le point 2.2.2.

La ligation des monomères du PLMVd pourrait aussi bien avoir lieu avec ou sans l'aide d'une ligase de l'hôte. Dans les deux cas, la molécule passe probablement de la conformation qui contient la structure en tête de marteau vers la conformation branchée. En effet, cette dernière place les extrémités qui doivent être liguées à proximité l'une de l'autre (FLORES *et al.*, 2006a).

Les hypothèses d'auto-ligation ou d'utilisation d'une ligase de l'hôte ont des arguments en leur faveur et en leur défaveur. Dans l'hypothèse où une ARN-ligase est requise, celle-ci devrait être codée dans le noyau. En effet, la synthèse et l'accumulation du PLMVd sont très actives dans les tissus présentant les symptômes de *peach calico* alors même que, dans cette

situation, la traduction des protéines est fortement affectée dans les plastes (FLORES *et al.*, 2006a).

In vitro, l'auto-ligation a été observée chez le PLMVd. Elle repose sur la formation de liens 2',5'-phosphodiester plutôt que des liens 3',5' (rencontrés couramment dans l'ARN). Ces liens 2',5'-phosphodiester ont aussi été rencontrés aux sites de ligation *in vivo*. En plus de circulariser les ARN linéaires, ces liens 2',5'-phosphodiester stabilisent les modèles circulaires de réplication (GORA-SOCHACKA, 2004).

Un mécanisme de ligation peu efficace (constaté *in vitro*) pourrait expliquer la faible proportion de monomères circulaires de PLMVd rencontrés (environ 10% des monomères). Cette différence de proportion n'est probablement pas la conséquence d'une différence de stabilité vu que les deux formes monomériques semble être aussi stables l'une que l'autre (BUSSIÈRE *et al.*, 1999).

1.5. Transmission

Les viroïdes sont transmis mécaniquement d'une plante à l'autre via les outils de taille contaminés. Cette transmission peut avoir lieu entre plantes d'une même espèce ou entre différentes espèces hôtes (OWENS, 2008).

Le PLMVd n'est pas transmis verticalement via la graine, il semble ne pas entrer dans l'embryon bien qu'il puisse être présent dans les téguments de la graine. Pourtant, le PLMVd est présent à l'intérieur et à l'extérieur des grains de pollen produits par les plants infectés. Une partie des pêcheurs qui reçoivent ce pollen sont à leur tour infectés. La transmission par contact racinaire, quand à elle, n'a pas lieu. Le plus couramment, ce viroïde se transmet par la propagation de bourgeons infectés. C'est de cette façon qu'il a été répandu dans le monde entier. La transmission du PLMVd par puceron (*Myzus persicae*) a été réalisée expérimentalement avec un faible taux de réussite. Par contre, la transmission naturelle par puceron n'a jamais été documentée (FLORES *et al.*, 2006a ; BARBA *et al.*, 2007).

1.6. Mouvement dans la plante

L'ARN de la plante transite au sein de la cellule (afin de remplir les fonctions cellulaires de base) mais aussi d'une cellule à l'autre (pour réguler les processus de développement et les processus physiologiques) grâce notamment à l'interaction avec des protéines de l'hôte. Les mêmes types de mécanismes rendent probablement possible l'infection systémique par les viroïdes et l'ARN viral qui imitent probablement les motifs d'ARN endogène de la plante afin d'être reconnus par les facteurs de transit cellulaires. Pourtant, ces mécanismes permettent aussi à la plante de se défendre contre ce type d'infection par des signaux d'extinction post-transcriptionnelle de gène. L'infection systémique par le viroïde opère via des déplacements intracellulaires et extracellulaires (GORA-SOCHACKA, 2004 ; DING *et al.*, 2005).

Au niveau intracellulaire, le viroïde est importé dans le noyau (pour les *Pospiviroidae*) ou dans la membrane thylakoïdale des chloroplastes (pour les *Avsunviroidae*). Il est répliqué et exporté hors de ces organites. Les ARN de polarité négative du PSTVd sont localisés uniquement dans le nucléoplasme alors que les ARN de polarité positive sont localisés surtout dans le nucléole. Il semble donc qu'il y ait un transit sélectif des ARN de polarité positive à

partir du nucléoplasme et synthèse dans le nucléole. A l'heure actuelle, le mécanisme global qui régule la localisation des molécules d'ARN dans les cellules d'eucaryotes n'est pas encore élucidé (DING *et al.*, 2005 ; FLORES *et al.*, 2006b).

Les viroïdes empruntent les plasmodesmes pour se déplacer de cellule en cellule. Des mécanismes sophistiqués pourraient permettre ou empêcher la traversée des frontières qui séparent les différentes cellules par l'ARN de certains viroïdes. Une protéine de transport se lie probablement au viroïde pour le faire transiter. Il semble qu'un motif particulier de la séquence du viroïde soit reconnu par des facteurs spécifiques à certaines cellules de l'hôte, cependant ce motif n'a pas encore été identifié (DING *et al.*, 2005). Par exemple, BUSSIÈRE *et al.* (1999) ont montré que le PLMVd se réplique majoritairement dans les cellules du parenchyme palissadique.

Si certaines mutations affectent le domaine terminal droit du PSTVd, son caractère infectieux lors d'une inoculation mécanique sur tomate est annulé, vraisemblablement en raison de sa capacité de mouvement qui est ainsi inhibée. Cette immobilisation provient du fait qu'il ne peut plus interagir avec la protéine de liaison à l'ARN de viroïde 1 (VIRP1) qui contient un signal de localisation nucléaire (GORA-SOCHACKA, 2004 ; DING *et al.*, 2005).

Le transport phloémien des viroïdes s'effectue globalement d'une source vers un puits par diffusion mais il y a sûrement d'autres mécanismes qui entrent en compte dans ce phénomène et qui ne sont pas encore connus. Le PSTVd, par exemple, est transité spécifiquement vers les sépales mais pas vers les autres organes floraux. Un tri actif s'effectue donc dans le phloème (DING *et al.*, 2005).

Contrairement au PSTVd, le PLMVd peut se déplacer vers les extrémités apicales (où a lieu la transformation de pro-plastes en chloroplastes). Les mécanismes et les caractéristiques moléculaires qui régissent le transit de ce viroïde au sein de la plante ne sont pas encore identifiés. On observe une répartition égalitaire du PLMVd entre les feuilles, l'écorce, les bourgeons, les racines et les fruits. Pourtant sa concentration dans ces différents organes est faible par rapport à celle des autres viroïdes. De plus, trois à quatre années sont nécessaires pour qu'il envahisse toutes les branches d'un arbre. Les jeunes fruits en croissance semblent être la meilleure source pour obtenir des préparations enrichies en viroïdes, vraisemblablement parce qu'il s'agit de puits importants (FLORES *et al.*, 2006a).

2. Le viroïde de la mosaïque latente du pêcher

2.1. Généralités

Le *Peach Latent Mosaic Viroïd* (PLMVd) appartient à la famille des *Avsunviroidae* et fait partie du genre des *Pelamoviroides*. Il s'agit du viroïde responsable de la maladie de la mosaïque latente du pêcher. La taille des différents variants du PLMVd (qui sont actuellement au nombre de 168) peut aller de 335 à 351 nucléotides. Le viroïde qui présente le plus de similarités avec le PLMVd est le CChMVd (*Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroïd*) qui appartient aussi au genre des *Pelamoviroides* (DE LA PEÑA *et al.*, 2002 ; OWENS, 2008).

Contrairement à l'ASBVd qui possède une structure native de type bâtonnet à l'exception d'une extrémité terminale en Y, le PLMVd adopte une structure branchée complexe qui est stabilisée par un pseudo-nœud dans sa partie droite (tige P8). En conséquence, il est insoluble dans LiCl 2M. Très récemment, il est apparu que seule sa molécule d'ARN de polarité négative est soluble dans LiCl 2M (PERREAULT J.-P., Communication orale). Les multimères du PLMVd forment des structures en tête de marteau thermodynamiquement stables qui entraînent leur auto-clivage (CÔTÉ *et al.*, 2003 ; FLORES *et al.*, 2006a).

Ce viroïde interfère avec le métabolisme de l'hôte, induit des symptômes et déclenche une réponse défensive par *RNA silencing* (extinction d'ARN), ces sujets seront développés au point 2.5). La conséquence de cette interaction est l'apparition de symptômes tels des décolorations sur feuille et sur fruit, des retards de foliation, de floraison et de mûrissement (FLORES *et al.*, 2006a).

En Europe, le PLMVd doit être exclu du matériel de propagation végétative, il fait partie de la certification phytosanitaire mais n'est pas un organisme de quarantaine. Aux Etats-Unis, par contre, la plupart des programmes de certification ne réclament pas d'effectuer un test de détection du PLMVd étant donné que ce viroïde est largement répandu dans les accessions de pêcher dans ce pays (BARBA *et al.*, 2003).

2.2. Caractéristiques moléculaires

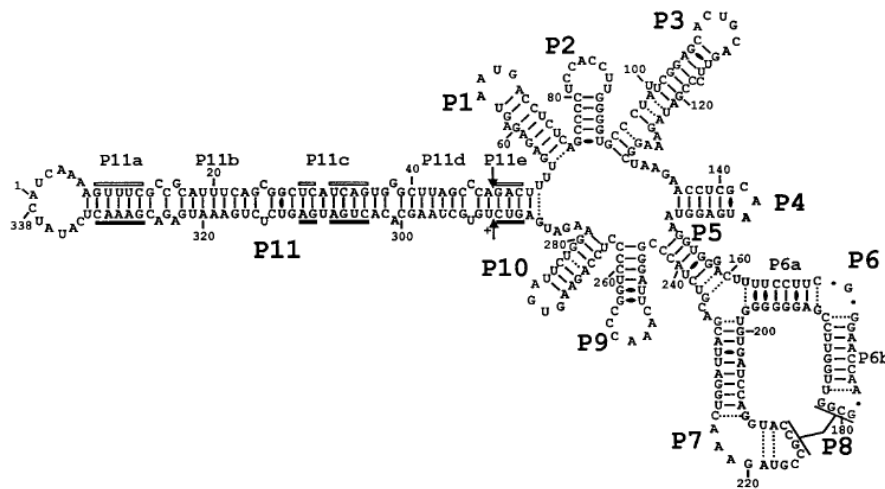
2.2.1. Structure primaire

En 1992, HERNÁNDEZ *et al.* ont montré que la structure primaire du PLMVd consiste en un brin d'ARN de 335 à 351 résidus dont le contenu en G+C est de 52,5% (ce qui est inférieur à celui de la plupart des viroïdes). Ce viroïde possède des séquences homologues avec les autres viroïdes. En particulier, des homologues sont rencontrées, avec l'ASBVd, au niveau des nucléotides des tiges I et II des structures en tête de marteau de polarité positive. Il ne porte pas les séquences hautement conservées qui caractérisent les régions centrales conservées des *Pospiviroidae* (CCR) mais bien les séquences conservées des structures en tête de marteau présentes dans l'ARN auto-catalytique des *Avsunviroidae* et dans certains ARN satellites (HERNÁNDEZ *et al.*, 1992).

2.2.2. Structure secondaire

Comme celle des autres viroïdes, la structure secondaire qu'adopte le PLMVd (afin de minimiser son énergie libre) est compacte vu son haut niveau d'auto-complémentarité. Il s'agit d'une conformation branchée (comme pour la plupart des *Avsunviroidae*) qui comporte 11 tiges (Figure 5). Une liaison covalente referme la molécule monocaténaire sur elle-même et la rend circulaire (HERNÁNDEZ *et al.*, 1992 ; TABLET *et al.*, 2004).

Figure 5. Séquence et structure secondaire proposée pour le PLMVd. La numérotation des tiges est arbitraire et suit leur ordre d'apparition si la molécule d'ARN circulaire est synthétisée à partir de la position 1. Les paires de bases GU sont représentées par des formes ovales noires alors que les paires de bases de Watson et Crick qui semblent être instables ou pour lesquelles la coexistence de simple- et double-brin est proposée dans les conditions utilisées sont illustrées par des lignes pointillées. Les paires de bases du pseudo-nœud P8 ne sont pas représentées de façon à simplifier l'illustration (BUSSIÈRE *et al.*, 2000).

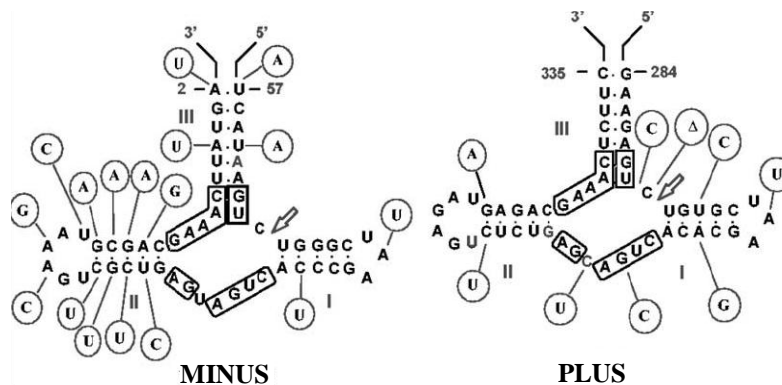


Le PLMVd possède une longue tige P11 qui est bicaténaire sur presque toute sa longueur, il s'agit du bras ribozyme en tête de marteau, coiffé de la boucle A. La structure ribozyme est présente aussi bien sur l'ARN de polarité positive que sur celui de polarité négative et peut se replier de manière cruciforme. Un ribozyme 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 d'un lien phosphodiester particulier et crée des extrémités 2',3'-phosphate cyclique et 5'-hydroxyle. *In vitro*, l'auto-clivage au cours de la transcription a lieu aussi bien sur des fragments partiels que sur les transcrits complets du PLMVd et pour les ARN des deux polarités (HERNÁNDEZ *et al.*, 1992 ; CÔTÉ *et al.*, 2003 ; FLORES *et al.*, 2006a).

Etant donné que les séquences en tête de marteau des deux polarités sont complémentaires, la tige P11 est bien plus stable que la structure en tête de marteau en terme d'énergie et est rencontrée bien plus fréquemment. En conséquence, l'auto-clivage est inhibé et l'accumulation de monomères circulaires est possible, le ribozyme n'étant actif que lors de la réplication (BUSSIÈRE *et al.*, 2000 ; CÔTÉ *et al.*, 2003). Les particularités de la structure secondaire du PLMVd se reflètent dans différentes étapes de sa réplication comme discuté précédemment (voir point 1.4).

Un certain nombre de mutations peuvent survenir dans les séquences de ce motif mais très rarement dans son cœur catalytique. Il doit toujours pouvoir former trois hélices (I, II et III) pour être actif (Figure 6). Il a été observé que la substitution du nucléotide U291 (adjacent au site d'auto-clivage) par une adénine réduit de 81% le taux d'auto-clivage du variant 52.4. On observe de la covariation dans quasi toutes les bases appariées des tiges de la région du ribozyme. Certaines délétions ponctuelles peuvent également être compensées par les nucléotides qui les entourent (FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).

Figure 6. Structures en tête de marteau de polarité négative (minus) et positive (plus) du PLMVd. Les flèches indiquent les sites d'auto-clivage prédits. Les résidus encadrés constituent le cœur catalytique conservé dans toutes les structures en tête de marteau et dans des positions similaires. Les mutations rencontrées dans les variants des isolats du *peach calico* sont indiquées dans des cercles et ont lieu de façon à ce que la stabilité thermodynamique des hélices soit préservée (MALFITANO *et al.*, 2003).



2.2.3. Structure tertiaire

Entre les différentes structures secondaires de la partie droite du PLMVd se forme un pseudo-nœud appelé tige P8 (Figure 5). Il englobe deux tiges en épingle à cheveux dans une région ramifiée de la molécule. Les séquences $_{179}\text{GCGG}_{182}$ (dans la boucle 6b) et $_{209}\text{GUACCGCCGUAGAAA}_{223}$ (dans la boucle 7) semblent correspondre à des régions monocaténares. Les nucléotides $_{179}\text{GCGG}_{182}$ et $_{212}\text{CCGC}_{215}$ semblent s'apparier pour former le pseudo-nœud P8. Ce résultat découle de la cartographie par nucléase de la molécule du PLMVd : une nucléase qui dégrade l'ARN bicaténaire génère plusieurs produits de clivage dans ces régions alors que les nucléases spécifiques de l'ARN simple brin sont presque incapables d'hydrolyser les liens phosphodiester. En outre, il a été proposé que les nucléotides $_{210}\text{UA}_{211}$ et $_{218}\text{UA}_{219}$ s'apparient aussi, ce qui fait de la boucle 7 un domaine très structuré (BUSSIÈRE *et al.*, 2000).

BUSSIÈRE *et al.* (2000) ont synthétisé un mutant du PLMVd pour le cartographier par nucléases. Les mutations consistent en un remplacement des nucléotides $_{212}\text{CCGC}_{215}$ par $_{212}\text{AAAA}_{215}$ (dans la boucle 7). L'introduction d'adénines permet d'obtenir un motif d'hydrolyse clair à l'aide d'une RNase. Dès lors, au cours de la cartographie par nucléase, c'est la nucléase qui s'attaque à l'ARN bicaténaire qui ne parvient à hydrolyser ni les nucléotides $_{179}\text{GCGG}_{182}$ ni $_{212}\text{AAAA}_{215}$ contrairement aux nucléases spécifiques de l'ARN monocaténaire. L'appariement entre $_{210}\text{UA}_{211}$ et $_{218}\text{UA}_{219}$ apparaît comme renforcé, probablement grâce à une réduction de la contrainte sur la boucle 7 qui a découlé de la disparition du pseudo-nœud. Le motif de digestion du mutant est similaire à celui de la séquence originelle, excepté pour la région du pseudo-nœud P8.

Les quatre paires de bases impliquées dans le pseudo-nœud P8 sont parfaitement conservées chez l'ensemble des variants du PLMVd. Les tiges qui le portent peuvent subir des variations mais leur longueur semble rester constante. La conservation de la séquence qui constitue le pseudo-nœud pourrait être nécessaire à la formation d'une hélice dans cette région tendue et/ou elle pourrait avoir une importance biologique. Ce pseudo-nœud pourrait, par exemple, être impliqué dans la liaison à une macromolécule de l'hôte (BUSSIÈRE *et al.*, 2000).

L'étude des covariations des séquences de nombreux variants du PLMVd a révélé qu'un pseudo-nœud est susceptible de se former entre les nucléotides $_{337}\text{UCAU}_2$ et $_{65}\text{AUGA}_{68}$ des boucles terminales des tiges 1 et 11. La formation de ce pseudo-nœud aurait comme effet d'enfermer le domaine de réplication que porte la tige P11. Il augmenterait la stabilité de la structure du PLMVd en lui donnant une forme compacte. Cette structure tertiaire n'a pas pu être reproduite *in vitro*, il est possible que des protéines de l'hôte soient impliquées dans sa stabilisation. Il n'est cependant pas certain que le PLMVd adopte cette structure *in vivo* (BUSSIÈRE *et al.*, 2000 ; FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a ; OWENS, 2008).

Deux hypothèses ont été proposées concernant l'impact de l'insert du *peach calico* (qui sera présenté au point 2.5.3) sur la structure tertiaire du PLMVd. Selon FEKIH HASSEN *et al.* (2007a), lorsque l'insert responsable du PC est présent dans la boucle A, le pseudo-nœud a peu de chance d'être capable de se former. Par contre, pour OWENS (2008), il semble que cet insert, lorsqu'il est présent, n'interfère pas avec la formation du pseudo-nœud dans cette partie de la molécule. A l'heure actuelle, aucune de ces hypothèses n'a pu être démontrée.

2.3. Gamme d'hôtes et distribution géographique

Le PLMVd semble n'induire des symptômes que sur le pêcher (*Prunus persica* (L.) Batsch.) mais d'autres espèces hôtes sont connues dont notamment l'abricotier (*Prunus armeniaca* L.), le prunier (*Prunus domestica* L.), le merisier (*Prunus avium* (L.) L.) et le poirier commun (*Pyrus communis* L.) (FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a). Des cas d'infection du pêcher par le PLMVd sont connus dans le bassin méditerranéen, en Afrique, Asie et Amérique du Nord et du Sud (FLORES *et al.*, 2006a ; FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a). La maladie est connue sous le nom de « *Peach blotch* » aux Etats-Unis depuis plus de 50 ans et en tant que « *Peach yellow mosaic* » au Japon (MALFITANO *et al.*, 2003). Cette dispersion géographique provient probablement en grande partie de l'échange international de matériel infecté contenant l'agent pathogène à l'état latent.

Une étude de détection du PLMVd à grande échelle sur des variétés de pêches et de nectarines commerciales a été menée dans cinq états des Etats-Unis. Il en est ressorti qu'environ 50% des arbres étaient infectés par le PLMVd. Il est aussi apparu que certains retards de floraison et de mûrissement des fruits qui étaient vu comme des caractéristiques variétales ou le résultat de pratiques agronomiques résultent en réalité de l'infection par le PLMVd (FLORES *et al.*, 2006a).

La gamme d'hôte d'une espèce de viroïdes est déterminée par des caractéristiques moléculaires qui restent encore inconnues pour l'instant. C'est probablement des interactions entre l'ARN du viroïde et les protéines de l'hôte que provient cette spécificité (FLORES *et al.*, 2006b).

2.4. Symptomatologie

Le postulat de Koch a permis d'établir un lien de cause à effet entre un viroïde et la maladie de la mosaïque latente du pêcher. Cette démonstration a consisté à isoler le viroïde de plants infectés et à le purifier par électrophorèse pour ensuite inoculer cette préparation à des

plants de pêcher de la variété « GF-305 » sains. Cet isolat de PLMVd a pu être isolé à nouveau sur les plants qui ont développé les symptômes de la maladie (FLORES *et al.*, 2006a).

Les variants de PLMVd naturellement présents sur pêchers peuvent être qualifiés soit de sévères soit de latents. Un variant sévère entraîne l'apparition de symptômes foliaires sur des plants de pêcher indicateur (GF-305) en culture sous serre contrairement à un variant latent (OWENS, 2008).

Dans la plupart des cas d'infection naturelle, les symptômes ne sont pas visibles ou sont instables et disparaissent avec le temps (sauf dans le cas du *peach calico*, PC). Ils peuvent être confondus avec des caractéristiques variétales ou des troubles physiologiques. Certains d'entre eux ne sont pas spécifiques au PLMVd, ils peuvent aussi être causés par des virus. En champ, deux années sont nécessaires pour que les symptômes apparaissent, même lorsque le matériel de plantation est déjà infecté. C'est pour ces raisons que cette maladie et certains variants du viroïde sont qualifiés de « latents » (MALFITANO *et al.*, 2003 ; FLORES *et al.*, 2006a ; FEKIH HASSEN *et al.*, 2006).

Une large gamme de symptômes peut être induite par différents isolats du PLMVd :

- **Sur feuilles** : taches chlorotiques, mosaïques ou albinisme (dans le cas extrême du *peach calico*, PC, la feuille est presque entièrement blanche) (Figure 7), retards de foliation (FLORES *et al.*, 2006a).

Figure 7. Symptômes de mosaïque latente du pêcher : variabilité des symptômes foliaires induits par le PLMVd sur la variété de pêcher GF-305 : de gauche à droite : taches chlorotiques et mosaïques sur les feuilles 1 à 3, calico crémeux chlorotique sur la feuille 4 et chlorose avec nécrose en bordure sur la feuille 5 (FLORES *et al.*, 1998).



- **Sur les organes reproducteurs** : stries roses sur les pétales des fleurs, retards de floraison ou de mûrissement, déformation et décoloration des fruits. Les fruits présentent une suture liégeuse et craquelée (Figure 8), ils peuvent être moins savoureux. Le noyau qu'ils contiennent est aplati et peut éclater (FLORES *et al.*, 2006a).

Figure 8. Symptômes de mosaïque latente du pêcher : (gauche) stries roses sur les pétales des fleurs et (droite) suture liégeuse, déformation et décoloration des fruits (FLORES *et al.*, 1998).



- **Sur l'arbre** : nécrose des bourgeons, cannelures sur le tronc et vieillissement prématuré de l'arbre. L'arbre adopte aussi un mode de croissance particulier où il forme peu de nouvelles branches (port ouvert) (Figure 9) (FLORES *et al.*, 2006a).

Figure 9. Symptômes de mosaïque latente du pêcher : port ouvert d'un plant en verger (FLORES *et al.*, 1998).



Le PLMVd induit des pertes économiques surtout liées à l'altération des fruits, à la longévité réduite des arbres et à la susceptibilité accrue vis-à-vis d'autres stress biotiques (parasites tels *Pseudomonas syringae* pv. *persicae*) ou abiotiques (aléas climatiques) (FLORES *et al.*, 2006a).

On peut encore citer des symptômes observés au niveau de la cellule tels le dérangement de la structure du chloroplaste ou l'apparition de structures membraneuses. Les viroïdes déclenchent des mécanismes généraux de réponse aux pathogènes dans leurs plantes hôtes. Le niveau d'expression des protéines reliées à la pathogénèse (*pathogenesis-related*, PR) et de métabolites secondaires peut être altéré (FLORES *et al.*, 2006b).

Parmi tous ces symptômes, les plus évidents en champ sont les retards de foliation, floraison et mûrissement, la déformation des fruits, le vieillissement prématuré de l'arbre et la nécrose des bourgeons mais rarement la mosaïque ou la décoloration des feuilles.

2.5. Pathogénèse

2.5.1. Différentes hypothèses

Les mécanismes moléculaires à travers lesquels les viroïdes induisent leurs effets pathogènes restent largement inconnus. Il semble cependant qu'ils modifient l'expression des gènes de l'hôte (via leur structure et leur séquence) et interfèrent ainsi dans son développement normal (FLORES *et al.*, 2006a).

2.5.1.1. Interaction avec les protéines de l'hôte

Dans un premier temps, la possibilité d'interaction entre l'ARN du viroïde et les protéines de l'hôte a été envisagée. Si cette hypothèse s'avère exacte, les différences structurales, biologiques et biochimiques qui existent entre les *Pospiviroidae* et les *Avsunviroidae* doivent mener à des interactions différentes avec l'hôte (FLORES *et al.*, 2006a). Le PSTVd, par exemple, se lie à une protéine de 43 kDa présente dans les noyaux de plants de tomate. Pourtant la signification biologique de ce phénomène n'a pas encore été explicitée (GORA-SOCHACKA, 2004). En outre, des protéines semblent être impliquées dans le transport des viroïdes, comme décrit au point 1.6.

2.5.1.2. Interaction avec l'ARN de l'hôte

La molécule du viroïde pourrait s'apparier à des molécules d'ARN de l'hôte possédant des séquences complémentaires et altérer son métabolisme cellulaire. D'autres molécules d'ARN de l'hôte pourraient présenter des homologies avec le viroïde, être reconnues et subir un clivage en *trans* par le ribozyme en tête de marteau (tel que décrit au point 2.2.2). Pourtant l'efficacité de clivage d'un substrat court par des molécules du PLMVd contenant le ribozyme est très faible voire nulle. Il est peu probable que le ribozyme soit libéré intact (pour cliver un substrat) lors d'une hydrolyse du viroïde ou lors de la transcription ou qu'une molécule de l'hôte ouvre la structure du viroïde et favorise la reconnaissance et le clivage de l'ARN de l'hôte. Cette hypothèse semble donc peu plausible (CÔTÉ *et al.*, 2003 ; FLORES *et al.*, 2006b).

Des similarités de séquence ont été découvertes entre les molécules de viroïdes et certains petits ARN nucléaires (snRNAs). Les viroïdes pourraient interférer avec l'épissage des ARNm ou le traitement du pré-rARN. Il y a une similarité entre le domaine P du PSTVd et le *signal recognition particle* (SRP) de la tomate. Ces deux entités pourraient potentiellement s'hybrider, ce qui interférerait avec le transport des protéines intracellulaire SRP-dépendant (GORA-SOCHACKA, 2004).

2.5.1.3. Altération de l'expression des gènes

Une altération d'expression suite à l'infection par le PSTVd a été observée pour 52 gènes de l'hôte parmi lesquels des gènes de réponse au stress ou de défense. Cette altération est plus marquée pour les variants sévères du viroïde et est corrélée avec l'apparition des symptômes de la maladie. Les variants qui induisent des symptômes différents présentent un polymorphisme dans la séquence de leur domaine P (GORA-SOCHACKA, 2004).

Les relations hôtes-pathogènes entre le pêcher et le PLMVd ont été caractérisées à l'aide de la cDNA-AFLP. Cette technique a mis en évidence la modification d'expression de dix gènes d'intérêts, cette expression différentielle a été confirmée par PCR en temps réel pour trois d'entre eux. Parmi eux, on rencontre le gène codant pour le *thiazole biosynthetic enzyme*, le précurseur de la thiamine qui est impliquée dans l'induction de résistance systémique acquise (SAR) (LEPAIR, 2008). Il s'agit d'un signal d'hypersensibilité induit lors de l'infection et propagé dans la plante. La conséquence de ce signal peut être la synthèse de protéines *pathogenesis-related* (PR) dans toute la plante ou l'induction de nécroses. L'ampleur de l'infection pourrait ainsi être limitée (LEPOIVRE, 2003). Il s'avère en effet que, dans le cas de l'infection par le PLMVd, le gène codant pour le *thiazole biosynthetic enzyme* est surexprimé dans les feuilles asymptomatiques. Une modification d'expression de gènes se rapportant à des mécanismes physiologiques de l'hôte a aussi été rapportée. Il y a par exemple sous-expression du gène codant pour le PsaO (une sous-unité du photosystème I) dans les feuilles symptomatiques. Le dysfonctionnement du complexe collecteur de lumière (LHCH) qui en résulte est peut-être responsable des dommages rencontrés au niveau des chloroplastes et des symptômes de chlorose (PARISI, 2006 ; LEPAIR, 2008).

2.5.1.4. Réflexion générale concernant les déterminants de pathogénicité

Il est difficile d'étudier les déterminants de la pathogénèse du PLMVd vu la nécessité d'utiliser du matériel végétal ligneux qui ne présente des symptômes que plusieurs mois après l'inoculation et vu la forte variabilité du viroïde. Le CChMVd se prête mieux à ce type d'essais vu la rapidité d'apparition des symptômes sur son hôte. Ainsi, DE LA PEÑA *et al.* (2002) ont pu isoler le déterminant de pathogénicité de ce viroïde qui semble être une tétraboucle.

DE LA PEÑA *et al.* (2002) ont rendu des variants du CChMVd asymptomatiques par mutagenèse dirigée dans la tétraboucle. Ils ont constaté que les phénotypes symptomatiques et asymptomatiques présentent la même capacité d'infection et la même concentration en viroïdes dans les tissus infectés à l'exception des mutations qui annulent la capacité d'infection. Il n'y a donc pas de relation entre la concentration en viroïde dans la plante et la sévérité des symptômes. Dans ces situations, la sélection semble agir sur la séquence plutôt que sur la structure. Une partie de la descendance des variants qui avaient été rendus asymptomatiques devient souvent à nouveau symptomatique et une forte pression de sélection en faveur de cette descendance symptomatique a lieu. La proportion en variants symptomatiques devient rapidement plus élevée que celle en variants asymptomatiques. On peut donc supposer que les phénotypes symptomatiques possèdent un *fitness* biologique supérieur à celui des phénotypes asymptomatiques. Malgré cela, un inoculum de variants asymptomatiques en large excès par rapport aux variants symptomatiques peut amener à un phénomène de protection croisée (DE LA PEÑA *et al.*, 2002).

Concernant le PLMVd, une étude a tenté de mettre en relation les groupes de structures de variants avec les symptômes provoqués par ces variants. Malgré le suivi de 32 variants, aucune relation particulière entre ces groupes et la pathogénicité des variants n'a été mise en évidence. Le seul déterminant de pathogénicité connu est l'insertion responsable du *peach calico* (qui sera présentée au point 2.5.3). Aucune mutation ponctuelle jouant un rôle dans la

pathogénicité n'a été rencontrée si ce n'est la substitution du nucléotide U291 (adjacent au site d'auto-clivage) par une adénine qui réduit de 81% le taux d'auto-clivage et pourrait avoir un effet sur la pathogénicité des variants concernés. En étudiant la descendance d'un variant latent et de deux variants sévères, on constate d'une part qu'il y a apparition *de novo* de ces déterminants de pathogénicité dans la descendance et d'autre part qu'au moins 12 variations de nucléotides sont nécessaires pour passer d'un variant asymptomatique à un variant symptomatique. Des déterminants de pathogénicité pourraient être répartis dans plusieurs régions de la molécule du viroïde et correspondre à différents aspects des symptômes. La réponse de l'hôte suite à l'inoculation d'un variant unique découle probablement de chaque variant particulier généré *de novo*. Il semble que les variants appartenant au groupe IIA expriment plus rapidement des symptômes que ceux des groupes IA et IC (ces groupes se différencient par les caractéristiques structurales particulières des variants qu'ils englobent). Il semble aussi que la stabilité du pseudo-nœud qui peut se former entre les tiges 1 et 11 soit liée à la pathogénicité du variant. Enfin il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'accumulation du PLMVd et le phénotype observé (présence ou absence de symptômes sur la plante) pour différents pêchers (AMBRÓS *et al.*, 1998 ; PARISI, 2006 ; FEKIH HASSEN, 2007b).

2.5.1.5. Autres hypothèses

BUSSIÈRE *et al.* (1999) ont montré que le PLMVd n'est jamais intégré dans le génome de l'hôte. Ce mode d'infection employé par les virus oncogènes n'est pas utilisé par le viroïde et son caractère latent ne correspond pas à un état de conservation sous une autre forme inactive. La pathogénèse observée ne s'explique donc pas par une altération de l'ADN génomique de l'hôte.

Dans une autre hypothèse proposée, des symptômes de la maladie résulteraient d'une régulation négative de l'expression de certains gènes causée par le mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle de gène (FLORES *et al.*, 2006a). Cette hypothèse, présentant une importance et un intérêt croissant dans les recherches actuelles, est développée ci-après.

2.5.2. Extinction post-transcriptionnelle de gène

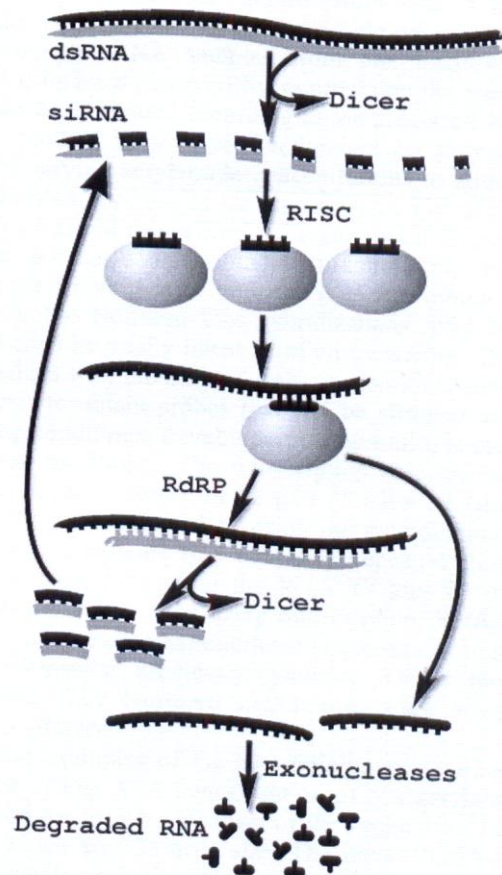
2.5.2.1. Généralités

Les plantes disposent d'un mécanisme adaptatif pour se protéger des ARN exogènes. Il s'agit de l'extinction post-transcriptionnelle de gène (*PostTranscriptional Gene Silencing*, PTGS). Via ce mécanisme, des molécules d'ARN simple brin ou double-brin sont clivées par un enzyme du type *dicer* (DCL) en petits ARN interférents (*small interfering RNAs*, siRNAs) de 21 à 26 nucléotides. Cet enzyme fait partie du groupe des RNases III (ST-PIERRE *et al.*, 2009). Ce *dicer* clive préférentiellement l'ARN parfaitement double-brin mais tolère la présence de nucléotides non appariés et ne se préoccupe pas de la séquence de la molécule. Celle-ci doit seulement comporter au moins 21 paires de bases (LANDRY *et al.*, 2005).

Un brin d'ARN issu d'un siRNA peut être incorporé dans le complexe de *silencing* induit par l'ARN (*RNA-Induced Silencing Complex*, RISC) et utilisé comme modèle pour la reconnaissance d'un ARNm cible complémentaire. Si ce dernier est rencontré, une RNase est activée pour le cliver. Les siRNAs peuvent aussi jouer le rôle d'amorces pour une ARN

polymérase ARN-dépendante (RdRp). Cet enzyme pourrait amener à la production d'ARN double-brin disponible pour l'activité du *Dicer*, la RdRp mènerait donc à l'amplification du phénomène du *RNA silencing* (Figure 10) (ST-PIERRE *et al.*, 2009).

Figure 10. Mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle de gène. Les ARN double brin (dsRNAs) sont clivés par le *dicer* en petits ARN interférents (siRNAs) de 21 à 25 nucléotides qui sont incorporés dans les complexes de *silencing* induit par l'ARN (RISC). Grâce à ces siRNAs, le RISC peut s'hybrider à une molécule d'ARN cible et entraîner son clivage, les fragments obtenus seront dégradés par des exonucléases. Une autre possibilité est la synthèse d'une copie de l'ARN cible par une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) utilisant le siRNA comme amorce. Les ARN double brin obtenus ainsi génèrent la production de siRNAs supplémentaires, ce qui amplifie le phénomène (LANDRY *et al.*, 2004).



La première détection du viroïde sur un plant est presque simultanée avec la détection des siRNAs de séquences correspondantes. Par la suite, on observe une corrélation inverse entre le niveau d'accumulation des formes mûres de viroïdes et la quantité de siRNAs de séquences correspondantes dans les tissus de la plante. Il semble donc que la concentration en viroïde soit réduite via l'action du *dicer* et du RISC. Pour comprendre ce mécanisme du *silencing*, il faut aussi prendre en compte le fait qu'il peut s'étendre de cellule en cellule et sur une longue distance (notamment via les plasmodesmes) (MARKARIAN *et al.*, 2004 ; TABLER *et al.*, 2004 ; FLORES *et al.*, 2006a).

Dans le cas du PSTVd, des variants de différents pouvoirs pathogènes amènent à des concentrations semblables en siRNAs (TABLER *et al.*, 2004). Dans une même feuille infectée par un variant sévère de l'ASBVd, le titre en viroïde est plus élevé dans les tissus décolorés (symptomatiques) que dans les tissus verts (asymptomatiques) alors que l'infection est systémique. Des siRNAs de 22 nucléotides sont rencontrés dans les parties décolorées de cette

feuille mais pas dans les parties vertes. Ces observations suggèrent qu'une quantité élevée de viroïde génère une production de siRNAs plus importante, c'est-à-dire une stimulation plus forte et plus rapide du PTGS (MARKARIAN *et al.*, 2004).

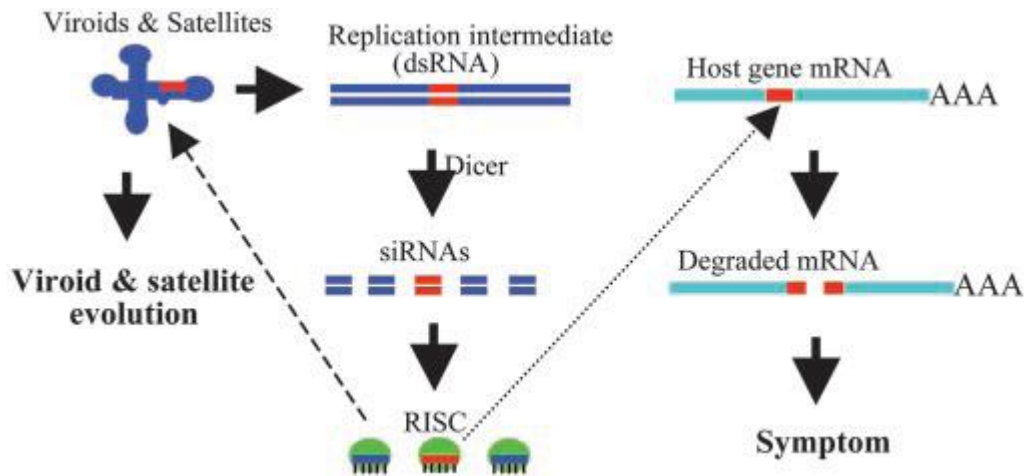
Si l'on compare des feuilles infectées par l'ASBVd qui sont légèrement symptomatiques à des feuilles asymptomatiques, aussi bien le titre en viroïde que le titre en siRNAs ne varie pas. Pourtant, la variation de titre en siRNAs entre différentes feuilles asymptomatiques est importante (dans certains échantillons les siRNAs ne sont pas détectables). Ce phénomène pourrait s'expliquer par un changement de quasi-espèce prédominante dans l'infection ou une répartition irrégulière du viroïde. L'hypothèse de l'évolution de l'infection par l'ASBVd d'un état aigu vers un état chronique a été suggérée, ce qui découlerait de la dominance progressive du variant asymptomatique. De cette façon, certains tissus échapperaient ou se remettraient de l'infection. Pour que cette hypothèse soit plausible malgré le fait que l'infection est systémique, une interaction différentielle devrait prédominer entre l'hôte et certains variants, il pourrait s'agir du PTGS. En ce qui concerne le CEVd, le taux de siRNAs dans les tissus augmente avec la sévérité des symptômes alors que le titre en viroïde reste constant, ce qui suggère que les siRNAs jouent un rôle dans l'expression des symptômes. Comme dans le cas de l'ASBVd, une ségrégation importante des niveaux de siRNAs peut avoir lieu entre différents tissus d'une même feuille (MARKARIAN *et al.*, 2004).

Le phénomène de protection croisée (décrit au point 2.6) pourrait découler de la présence de siRNAs dérivés d'un variant de viroïde peu sévère dans les tissus de la plante qui entraînerait la dégradation de l'ARN du variant sévère inoculé par la suite. La raison pour laquelle les viroïdes parviennent à surmonter le *RNA silencing* n'a pas encore été déterminée mais des hypothèses ont été émises. Les molécules mûres du viroïde pourraient échapper au *RNA silencing* grâce à leur localisation subcellulaire (dans le noyau ou le chloroplaste les siRNAs sont absents). Les viroïdes pourraient aussi se lier à des protéines de l'hôte qui les protégeraient de l'hydrolyse par le *dicer* ou encore supprimer activement le phénomène du *silencing* en activant les suppresseurs de l'hôte ou en amenant à l'extinction de certains gènes de l'hôte (LANDRY *et al.*, 2004 ; FLORES *et al.*, 2006a).

Outre cet effet protecteur, les siRNAs pourraient être les éliciteurs des symptômes observés sur la plante en guidant le complexe RISC vers des ARN messagers de l'hôte. Pour cela, il faut que certaines séquences du viroïde et de l'hôte soient homologues (Figure 11) (FLORES *et al.*, 2006a). Si cette hypothèse se révèle exacte, une plante dont le PTGS serait déficient ne présenterait pas les symptômes de la maladie malgré qu'elle n'oppose pas de résistance à la prolifération du viroïde. Le pouvoir pathogène plus élevé des variants sévères découlerait de la présence de séquences particulières qui amèneraient à la production de siRNAs capables de s'hybrider à certains gènes cibles de l'hôte. Dans l'éventualité où les variants symptomatiques présenteraient un meilleur *fitness* biologique, une pression de sélection pourrait favoriser les homologues avec les séquences des ARN de l'hôte (DE LA PEÑA *et al.*, 2002 ; TABLER *et al.*, 2004). Par contre, selon le point de vue d'AMBRÓS *et al.* (1998), les isolats du PLMVd tendent à évoluer vers une moindre virulence. En effet, ils ont constaté que les isolats latents conservent leur phénotype asymptomatique au cours du temps alors que le phénotype des isolats sévères a tendance à fluctuer pour finir par devenir latent.

Les variants latents possèderaient donc un avantage évolutif, peut-être parce qu'ils préservent la santé de la plante hôte et augmentent la probabilité de transmission.

Figure 11. Modèle expliquant le rôle du RNA silencing dans la pathogénicité et l'évolution des ARN subviraux (viroïdes et ARN satellites). Des intermédiaires ARN double brin sont générés au cours de la réplication des ARN subviraux et sont clivés par le *dicer* en siRNAs de 21 à 25 nucléotides. Ces derniers sont incorporés dans le RISC. Lorsqu'il y a identité entre ces siRNAs portés par le RISC et une région d'un ARNm de l'hôte (en rouge), ce dernier est dégradé par le RISC, amenant à un développement de symptômes. Le RISC peut aussi prendre pour cible l'ARN subviral et entraîner sa dégradation, ce qui le soumet à une pression de sélection qui le pousse à évoluer et à adopter et maintenir une structure secondaire résistante au RNA silencing (WANG *et al.*, 2004).

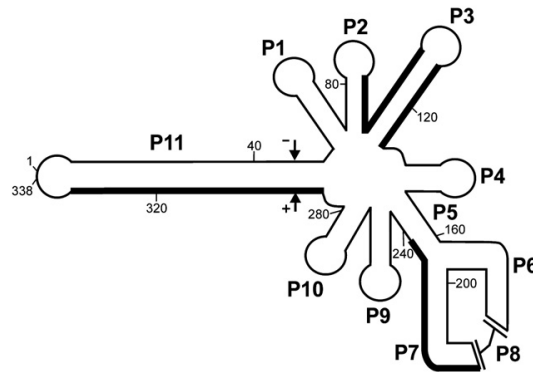


2.5.2.2. Le cas du PLMVd

Pour ce qui est du PLMVd, la tige P11 est capable de déclencher les activités enzymatiques du *dicer in vitro* et probablement *in vivo*. La structure du PLMVd ne comporte pourtant pas de région double brin de plus de 12 paires de bases consécutives. Des régions double brin suffisamment longues sont obtenues lorsque des complexes d'ARN double-brin se forment à partir des appariements de bases intermoléculaires qui ont lieu entre molécules de PLMVd des deux polarités différentes mais aussi à partir d'appariements intramoléculaires. Dans les deux cas il y a production de siRNAs, dont les profils varient selon que le substrat est de polarité positive ou négative (LANDRY *et al.*, 2004 ; LANDRY *et al.*, 2005 ; ST-PIERRE *et al.*, 2009).

Les siRNAs rencontrés sont surtout spécifiques des tiges P2-P3, P5-P7 et du brin inférieur de la tige P11 du PLMVd car il s'agit de régions double-brin et fortement structurées (Figure 12). Certains siRNAs dérivent donc de la région d'auto-clivage en tête de marteau du viroïde (ST-PIERRE *et al.*, 2009).

Figure 12. Localisation sur la molécule du PLMVd des séquences siRNAs qui lui sont associés. Les lignes épaisses indiquent des séquences couvertes par au moins 7 siRNAs. Le nom des différentes tiges qui forment la structure du PLMVd sont indiqués en gras (ST-PIERRE *et al.*, 2009).



La RdRp mènerait à l'amplification du phénomène du *RNA silencing* et à la propagation des petits ARN dérivés du PLMVd. Dans les échantillons de plantes infectées, 20,5% des séquences d'ARN non codant sont homologues à celles du PLMVd. Ceci confirme bien que c'est l'infection du viroïde qui a amené au *RNA silencing* (ST-PIERRE *et al.*, 2009).

Il n'y a pas d'enzyme *dicer* dans le chloroplaste et la synthèse des siRNAs correspondant au PLMVd a sûrement lieu dans le cytoplasme au moment où le viroïde mûre est transité de cellule en cellule (FLORES *et al.*, 2006a; ST-PIERRE *et al.*, 2009). La localisation chloroplastique des *Avsunviroidae* tout comme la structure secondaire compacte des viroïdes en général pourraient être le résultat d'une adaptation leur permettant respectivement d'échapper ou de résister au PTGS (TABLER *et al.*, 2004; FLORES *et al.*, 2006a).

La structure de la tige P11 est semblable à celle des pré-micro-ARN (pre-miRNA) qui sont des épingles à cheveux clivées par DCL1 pour donner des miRNA. Ces derniers interagissent avec les ARNm et régulent leur traduction. La pathogenèse du viroïde pourrait également découler de ce phénomène (LANDRY *et al.*, 2005).

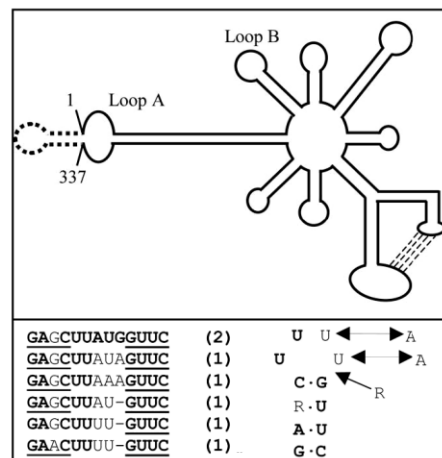
Enfin, aucune corrélation n'a pu être établie pour l'instant entre l'intensité de répllication du PLMVd dans les tissus et les titres en siRNAs qui y sont mesurés, ce qui n'exclut pas une corrélation possible entre *RNA silencing* et pathogenèse (LANDRY *et al.*, 2004). Des homologies entre les séquences des siRNAs générés par le PLMVd et les gènes sous-exprimés dans les tissus de pêcheurs infectés par le PLMVd n'ont pas pu être mises en évidence (PARISI O., Communication orale). Ceci n'exclut pas la possibilité que d'autres gènes intermédiaires soient affectés directement par les siRNAs générés par le PLMVd.

2.5.3. Insertion

Certains variants du PLMVd possèdent une insertion de 12 à 13 nucléotides entre les positions 1 et 337 dans leur boucle en épingle à cheveux (boucle A qui coiffe le bras portant les structures en tête de marteau). L'insertion en elle-même se replie en épingle à cheveux et ne modifie pas la structure globale de la molécule (Figure 13). La présence de ce motif peut avoir pour conséquence l'apparition de symptômes de chlorose extrême sur les feuilles des plantes infectées (*peach calico*, PC). Lorsque des tissus symptomatiques ou asymptomatiques sont prélevés sur un plant qui présente des symptômes de PC et qu'ils sont utilisés pour inoculer différents plants de la variété GF-305, le phénotype de la source d'inoculum est

reproduit. Ce phénomène indique que des variants qui diffèrent en pathogénicité sont répartis de façon irrégulière au sein d'un même plant (MALFITANO *et al.*, 2003 ; FLORES *et al.*, 2006a ; OWENS, 2008).

Figure 13. (Partie supérieure) Représentation schématique de la structure secondaire de plus faible énergie libre prédite pour le variant de référence du PLMVd. Dans les variants du PC (*peach calico*), un insert de 12 à 13 nucléotides est présent entre les positions 1 et 337 du variant de référence, au sein de la boucle A (représenté en pointillés). (Partie inférieure) Alignement des séquences d'inserts rencontrés chez différents variants d'isolat du PC. Les nucléotides conservés sont en gras et ceux qui constituent la tige de l'épingle à cheveux sont soulignés. Les tirets correspondent à des délétions, les nombres de clones indépendants qui contiennent l'insert sont marqués entre parenthèses. (A droite) Structure en épingle à cheveux prédite pour l'insert (les insertions et les substitutions sont indiquées par des flèches simples ou doubles respectivement, R peut correspondre à A ou G) (MALFITANO *et al.*, 2003).



Les variants du PC pourraient interférer dans une étape de l'évolution des pro-plastes en chloroplastes (en altérant le *processing* de certains précurseurs d'ARN ribosomique) et/ou altérer la signalisation entre le plaste et le noyau. Une synthèse et une accumulation plus importantes du viroïde ont été observées dans les tissus présentant les symptômes du PC (FLORES *et al.*, 2006a).

Cette structure peut être acquise ou perdue de façon sporadique au cours de l'infection. La conservation de la longueur de la molécule n'est donc pas essentielle pour le PLMVd. Cet insert est situé entre les positions 1 et 337 du variant de référence Ar1 et sa variabilité de séquence est relativement faible. Deux types d'insertion sont rencontrés : soit l'insert contient deux adénines et deux guanines, ce qui rend le variant symptomatique, soit il est riche en uracile et le variant n'induit pas de symptômes. Dans un plant qui présente les symptômes du PC, il a été démontré que des variants de pathogénicité différente ne sont pas uniformément répartis entre parties symptomatiques et asymptomatiques de la plante (RODIO *et al.*, 2006 ; FLORES *et al.*, 2006a ; FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).

Des exemples d'insertions différents sont rencontrés chez d'autres viroïdes. Certains variants de l'ASBVd possèdent une boucle poly-A terminale droite élargie par l'insertion d'un nucléotide U qui est à l'origine de symptômes de chlorose intense. Dans le cas du CChMVd, le principal déterminant du pouvoir pathogène est une modification de tétraboucle dans la conformation branchée. Ainsi, la substitution des quatre nucléotides $_{82}UUUC_{85}$ par $_{82}GAAA_{85}$ converti un variant symptomatique en un variant asymptomatique sans altérer le niveau final d'accumulation du viroïde. Ces quatre nucléotides forment la tétraboucle qui referme la tige d'une épingle à cheveux. Cette séquence est pourtant très instable et il y a

réversion vers la séquence typique (symptomatique) après un mois (MALFITANO *et al.*, 2003 ; GÓRA-SOCHACKA, 2004). Ces deux exemples d'insertions sont semblables à l'insert du PC si ce n'est que les substitutions ou insertions d'uracile augmentent la pathogénicité du variant concerné. Il pourrait s'agir d'un trait commun aux *Avsunviroidae*.

2.6. Protection croisée

Comme entre souches de virus apparentées, le phénomène de protection croisée de l'hôte existe aussi dans le cas d'infections viroïdales. Lorsque la plante a été précédemment infectée par un variant peu sévère, l'infection ultérieure par un variant sévère ne provoque pas l'apparition des symptômes attendus (ou alors les symptômes sont atténués). De plus, le taux de réplication du second variant s'en trouve réduit pour une période indéterminée. Ces deux variants doivent appartenir au même viroïde ou à des viroïdes phylogénétiquement proches pour que la protection croisée ait lieu (FLORES *et al.*, 2006b).

Cette résistance dérivée du pathogène n'est pas encore bien comprise. Son origine pourrait résider dans la compétition entre les ARN pour un facteur limitant présent dans les cellules de l'hôte. Selon une autre hypothèse, la protection croisée induite par l'ARN et l'extinction post-transcriptionnelle de gène décrite précédemment consistent en un seul et même phénomène (FLORES *et al.*, 2006a ; FLORES *et al.*, 2006b).

2.7. Polymorphisme et variants

Pour beaucoup d'espèces de viroïdes, les variants de différente pathogénicité ne diffèrent que par un nombre de nucléotides très réduit. De plus, on observe une grande variabilité au sein même d'une catégorie de variants de même pouvoir pathogène. Ainsi, lorsque les viroïdes sont isolés de leurs plantes hôtes, c'est un mélange complexe de variants qui est obtenu. Cette diversité naturelle découle probablement de la dérive des séquences, de recombinaisons et de réinfections (OWENS, 2008).

Dans le cas particulier du PLMVd, la variabilité de séquences entre les différents variants d'un même isolat est très importante. Cette hétérogénéité est peut-être responsable de la grande variabilité de symptômes induits par les différents variants du PLMVd. Elle pourrait s'expliquer par deux facteurs principaux :

- Les mêmes arbres en champ auraient été inoculés à plusieurs reprises au cours de leur vie.
- L'ARN du viroïde pourrait avoir tendance à évoluer rapidement.

C'est surtout ce deuxième facteur qui semble prédominer (FLORES *et al.*, 2006a).

AMBRÓS *et al.* (1999) ont mis en évidence la grande variabilité qui apparaît dans la descendance d'un variant sévère du PLMVd. La localisation des zones à polymorphisme plus ou moins important n'est pas due au hasard. Des tests ont d'abord été réalisés par inoculation d'un variant particulier du PLMVd sur pêcher. Il en a résulté qu'une partie des plantes infectées présentaient des symptômes et que d'autres étaient asymptomatiques. Les clones cDNA issus de ces hôtes ont été caractérisés : il s'agissait de nouveaux variants du PLMVd, différents du variant inoculé. C'est la descendance qui est restée symptomatique qui présente la plus grande similarité avec ce variant.

Dans une autre expérience, quatre variants de PLMVd de pathogénicité différente ont été inoculés et la descendance analysée. La descendance obtenue contenait 33 séquences de variants différents du variant inoculé. La fréquence de variation pour le PLMVd est donc bien plus élevée que pour d'autres viroïdes tels le PSTVd. Il s'agit le plus souvent de substitutions de nucléotides (OWENS, 2008).

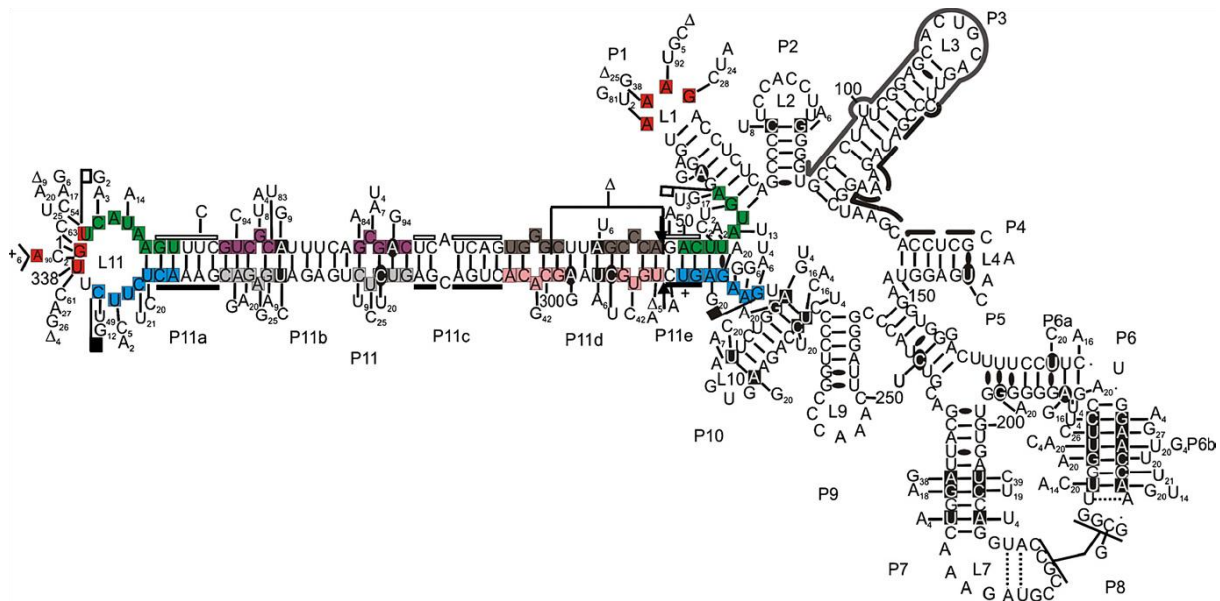
L'ARN polymérase chloroplastique utilisée par le PLMVd, dont le taux d'erreur est élevé, pourrait être la cause de ce polymorphisme plus important. La fluctuation du pouvoir pathogène chez les variants sévères du PLMVd découlerait, en partie, de cette particularité de l'ARN polymérase (OWENS, 2008). L'apparition de nouveaux variants pourrait aussi être favorisée par le fait que l'ARN polymérase ADN dépendante est forcée à transcrire des modèles d'ARN, ce qui réduirait sa processivité, la pousserait à effectuer des sauts et amènerait à l'apparition fréquente de variants recombinants. Enfin, le PLMVd est flexible et semble s'accommoder de ces nombreuses positions polymorphiques (FLORES *et al.*, 2006a).

Malgré tout, l'activité ribozyme et certains autres éléments structurels et fonctionnels doivent être conservés pour que le viroïde parvienne à se répliquer. Il semble que la nécessité de conservation des séquences de la structure en tête de marteau s'étende au-delà de la fonction d'auto-clivage et que d'autres pressions de sélection entrent en jeu mais celles-ci n'ont pas encore été identifiées (CÔTÉ *et al.*, 2003 ; OWENS, 2008).

En 2007, FEKIH HASSEN *et al.* ont effectué des prélèvements sur 34 arbres hôtes du PLMVd. Ils ont révélé 119 variants dont la séquence différait de tous les autres variants qui existaient dans les bases de données à ce moment-là. Ces 119 variants correspondaient à la totalité des variants isolés sur ces arbres. Un polymorphisme pour 127 positions parmi les 345 nucléotides du PLMVd a été constaté. 46 mutations parmi ces 127 n'avaient jamais été décrites. Les variations ont surtout lieu entre les résidus 1 à 70 (dans les régions P1 et P11) et 170 à 345 (régions P6, P7, P10 et P11). Si l'on compare des variants isolés sur pêcher, poirier ou amandier, aucune spécificité de séquence liée à l'hôte n'a été constatée (FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).

Selon FEKIH HASSEN *et al.* (2007a), le domaine gauche (tiges P1, P6, P7, P10 et P11) du PLMVd est essentiel pour la réplication (et peut-être aussi dans le cadre d'interactions avec des protéines de l'hôte permettant le transit du viroïde), sa structure secondaire est fort conservée malgré sa séquence relativement variable. A l'inverse, la séquence du domaine droit (tiges P2 à P5) est relativement fixe alors que sa structure peu varier (Figure 14). L'hypothèse selon laquelle des fonctions non vitales (telle la pathogénicité) seraient associées à ce domaine a été émise.

Figure 14. Structure secondaire proposée pour le PLMVd et distribution des positions polymorphiques le long de la séquence de référence (Ar1). La plupart des mutations sont indiquées ainsi que leur fréquence (si elles sont rencontrées plus d'une fois). Les paires de bases identifiées par covariation sont encadrées alors que les paires de bases identifiées à l'aide d'une mutation sont en ovale. Le symbole Δ indique une délétion. Le symbole + à gauche de la molécule d'ARN indique la position des insertions de 11 à 14 nucléotides retrouvées dans 6 variants. Les domaines ribozymes impliqués dans la structure en tête de marteau sont flanqués de drapeaux et les résidus conservés y sont indiqués par des barres. Les sites d'auto-clivage sont marqués par des flèches. Les tiges I, II et III de la structure en tête de marteau de polarité positive sont en rose, gris et bleu respectivement alors que celles de la structure en tête de marteau de polarité négative sont en brun, mauve et gris respectivement. Les lignes continues et discontinues le long des tiges P3 et P4 correspondent aux positions des amorces anti-sens et sens, respectivement. Les sigles noirs et blancs se rapportent aux structures de polarité positive et négative respectivement. La numérotation de la séquence de référence est marquée tous les 50 résidus (FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).



2.7.1. Recombinaison

A l'heure actuelle, les variants de PLMVd sont classés dans deux groupes qui partagent 85% de séquences identiques. Il est encore possible de distinguer les sous-groupes IA et IB au sein du groupe I. Le groupe II peut être subdivisé en trois sous-groupes qui possèdent chacun des caractéristiques structurales particulières. Le sous-groupe IIB est vraisemblablement apparu lors d'une co-infection par des membres des sous-groupes IIA et IIC, entre lesquels une recombinaison aurait eu lieu. Le site de recombinaison pourrait se situer au niveau de la paire de bases U₄₂-A₂₉₉, la partie gauche du viroïde proviendrait du sous-groupe IIA et la partie droite du sous-groupe IIB. Ce site de recombinaison se trouve à proximité des sites d'auto-clivage et d'initiation (supposés), une région où ce genre d'évènement pourrait être favorisé (FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).

Quant au groupe I, il comprend d'un côté les variants Hd6 et Hd8 fort éloignés phylogénétiquement et de l'autre côté des variants intermédiaires qui possèdent certaines tiges de Hd6 et certaines de Hd8. Ils pourraient aussi résulter de recombinaisons entre Hd6 et Hd8 qui sont d'ailleurs souvent présents ensemble dans le même arbre.

Les évènements de recombinaison semblent avoir participé à l'évolution du PLMVd. Ce viroïde est un bon modèle pour retracer l'évolution d'un génome d'ARN. En plus de ces

recombinaisons, des réarrangements intramoléculaires pourraient aussi avoir lieu (FLORES *et al.*, 2006b ; FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).

2.7.2. Théorie des quasi-espèces

Selon la théorie des quasi-espèces, les différents variants qui composent un isolat du PLMVd peuvent se compléter entre eux. La population obtenue se comporte alors comme un variant possédant de nombreuses séquences différentes pour chaque domaine de la molécule. La population n'est pas uniforme même si généralement un ou un petit nombre de variants prédomine (FLORES *et al.*, 2003 ; OWENS, 2008).

2.7.3. Variabilité en relation avec la structure secondaire

La tendance à la disruption (interruption d'une séquence par introduction d'une autre séquence) est plus marquée pour une structure secondaire branchée comme celle du PLMVd que pour une conformation en bâtonnet comme chez les *Pospiviroidae* (OWENS, 2008).

Les tiges P1, P6, P7, P9, P10 et P11 renferment le plus de variabilité de séquence alors que les tiges P2, P5 et P8 sont les plus conservées. Les tiges de la première série sont caractérisées par une haute stabilité thermodynamique. Dans les tiges P6a, P6b, P7, P10 et P11, on détecte une covariation de résidus appariés ou des mutations de nucléotides. Des nucléotides appariés ont été mis en évidence dans les tiges P2, P5 et P8. Pour ce qui est des tiges P3 et P4, étant donné que l'analyse de covariation ne soutient pas de structure spécifique, elles pourraient potentiellement se replier en structures alternatives. Pourtant, le peu de variation que l'on rencontre dans ces tiges pourrait provenir du fait que le PLMVd est amplifié à partir d'amorces qui se rapportent à ces régions (FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).

2.8. Méthodes de détection

Des méthodes de détection du PLMVd simples et rapides sont nécessaires pour l'obtention de matériel végétal sain.

2.8.1. Méthodes biologiques

La première méthode de détection du PLMVd développée reposait sur la protection croisée (ou prémunition), une forme indirecte d'indexage biologique. Afin de mettre en œuvre cette méthode, des plants de pêcher indicateur de la variété « GF-305 » sont cultivés en serre et inoculés via des greffes issues des arbres dont on veut vérifier l'innocuité. Deux mois plus tard, ces plants indicateurs sont ré-inoculés avec un variant sévère du PLMVd. Après un autre mois d'attente, les arbres testés peuvent être déclarés sains si le variant sévère est parvenu à induire des symptômes car il n'y a pas eu protection croisée suite à la pré-inoculation. Les méthodes biologiques nécessitent beaucoup d'espace et de temps. Pour la détection, les méthodes moléculaires leur sont donc préférées (FLORES *et al.*, 2006a).

2.8.2. Méthodes biochimiques et moléculaires

Les méthodes moléculaires de détection reposent sur la mise en évidence des séquences nucléiques de l'agent pathogène à l'aide de techniques de biologie moléculaire. C'est la seule alternative aux méthodes biologiques étant donné que la détection sérologique ne convient pas

pour les viroïdes (qui ne codent pour aucun peptide ni aucune protéine). De plus, les méthodes moléculaires permettent de caractériser un isolat de viroïde de façon plus fiable qu'en se basant sur la classification latent/sévère. En effet, l'isolat contient souvent un mélange de variants latents et sévères, des recombinaisons peuvent avoir lieu entre ces variants et de la variabilité peut être générée, entraînant des effets imprévisibles sur la pathogénicité de cet isolat (FEKIH HASSEN *et al.*, 2006 ; FEKIH HASSEN, 2007b).

Lors de la détection d'un viroïde inconnu, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) reste une technique essentielle. Elle permet d'isoler et de purifier l'ARN du viroïde (sans connaître sa séquence nucléotidique) pour ensuite le séquencer. Cet outil n'est pas assez sensible et ne convient pas pour un grand nombre d'échantillons. L'hybridation de sondes radioactives ou chimiques avec la séquence nucléique de la molécule du viroïde est aussi utilisée pour sa détection. La connaissance de la séquence recherchée est nécessaire sauf lorsque des amorces aléatoires sont utilisées. La meilleure méthode de détection en routine du PLMVd par *dot-blot* est la dénaturation alcaline d'extraits de jus brut, fixation sur un support solide suivie de l'hybridation de la molécule du viroïde à une sonde marquée. La technique du *Northern blot* a été utilisée pour démontrer la présence du PLMVd dans d'autres plantes hôtes que le pêcher. Les techniques d'hybridation conviennent bien pour des études à grande échelle où une forte sensibilité n'est pas nécessaire (HANOLD *et al.*, 2003 ; MÜHLBACH *et al.*, 2003 ; FEKIH HASSEN *et al.*, 2006).

A travers la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), des séquences qui sont spécifiques au viroïde peuvent être amplifiées. La détection et l'identification repose alors sur la présence de séquences amplifiées et de leur taille ou sur l'hybridation d'une sonde spécifique. Dans le cas des viroïdes comme dans celui des virus à ARN, une étape de rétro-transcription préalable à la PCR est nécessaire, on parle alors de RT-PCR.

Seuls 1 à 100pg d'acides nucléiques sont nécessaires pour mettre en évidence la présence d'un viroïde dans les tissus infectés et la sensibilité est généralement 10 à 100 fois supérieure à celle de la détection par hybridation (HADIDI *et al.*, 2003).

Les premiers tests par RT-PCR développés nécessitaient une extraction d'acides nucléiques exigeante en travail. En 2006, FEKIH HASSEN *et al.* ont développé un test qui s'effectue sur jus brut extrait de feuilles ou d'écorce en présence d'un tampon SSC contenant 1% de sulfite de sodium. Cette technique est relativement simple et peu coûteuse à mettre en application. Une dilution d'au moins 50X permet d'éviter les effets inhibiteurs sur la PCR qui découlent probablement des polysaccharides ou des composés phénoliques présents dans le jus brut. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus avec purification d'ARN (FEKIH HASSEN *et al.*, 2006).

La spécificité de cette méthode de détection dépend du choix des amorces. Celui-ci se base sur des études de séquençage et alignement. Les tiges P3 et P4 du PLMVd présentent une faible variation de séquence et conviennent bien pour le design d'amorces. Actuellement, les méthodes moléculaires prennent le pas sur les méthodes biologiques car elles sont plus fiables, plus rapides et moins coûteuses pour un nombre d'échantillons plus important. Ces tests en routine sont nécessaires pour mener à bien des programmes de certification d'arbres à fruits (FEKIH HASSEN *et al.*, 2006 ; FLORES *et al.*, 2006b ; FEKIH HASSEN *et al.*, 2007a).

2.9. Méthodes de lutte

La méthode de contrôle la plus efficace dans le cas d'une infection par un viroïde est l'éradication du matériel végétal infecté (SINGH *et al.*, 2003).

Il n'est pas possible de lutter de manière curative contre le PLMVd. Il est possible de réaliser un assainissement en ayant recours à la thermothérapie (en traitant les plants en croissance par de l'air chaud) suivie d'une propagation de méristèmes. Pourtant, ce traitement est difficile à réussir en plus d'être peu applicable en pratique. Il a été montré que le polymorphisme des séquences des viroïdes augmente après un traitement à la chaleur. Il y a accumulation de mutations au cours des cycles de réplication qui suivent ce traitement. Pourtant la résistance du PLMVd face à la chaleur semble relativement haute (MALFITANO *et al.*, 2003 ; FLORES *et al.*, 2006b ; OWENS, 2008).

La lutte contre la mosaïque latente du pêcher repose donc sur des mesures prophylactiques. Il est nécessaire d'employer du matériel de propagation sain et de désinfecter régulièrement les outils de taille. Ce n'est que récemment que le PLMVd a été inclus dans les programmes de certification (FLORES *et al.*, 2006a ; FLORES *et al.*, 2006b). Il n'existe pas de données sur des variétés de plantes hôtes résistantes à des viroïdes dans la littérature. FEKIH HASSEN (2007b) a pourtant mis en évidence une incidence plus faible du PLMVd dans les variétés tardives de pêcher par rapport aux variétés précoces en champs. Ce phénomène pourrait découler d'un effet de seuil de détection, le viroïde se répliquant moins dans les plants dont l'activité physiologique est plus faible.

Le phénomène de protection croisée pourrait être utilisé comme moyen de lutte préventive mais le risque existerait alors de voir ultérieurement apparaître des variants sévères parmi la descendance des variants non sévères inoculés (l'insertion responsable du PC pouvant survenir spontanément et des mutations pouvant également apparaître). En effet, une étude menée chez le CChMVd a montré que le *fitness* biologique des variants symptomatiques semble plus élevé que celui des variants asymptomatiques. L'inoculation d'un large excès en variants asymptomatiques a ainsi permis de contourner ce problème. Toutes les plantes inoculées restent asymptomatiques après la ré-inoculation par un variant sévère (DE LA PEÑA *et al.*, 2002). Cependant, à notre connaissance, aucune donnée n'existe en ce qui concerne l'application de cette technique au couple PLMVd-pêcher.

Les mécanismes de *RNA silencing* pourraient être manipulés à des fins de lutte. Il s'agirait d'apporter préventivement à la plante certains siRNAs correspondants aux séquences du viroïde. Le danger d'une telle démarche serait la présence d'homologies entre les siRNAs et l'ARN de l'hôte, entraînant une extinction des gènes de la plante.

Une nouvelle méthode de lutte potentielle est apparue avec les progrès de l'ingénierie génétique. Les structures en tête de marteau auto-clivent en position *cis* les molécules d'ARN de viroïde mais elles peuvent être modifiées pour agir en position *trans*. Une fois ce ribozyme modifié inséré dans une plante, il est exprimé et supprime les molécules de viroïdes (FLORES *et al.*, 2006b).

Une autre possibilité de transformation génétique permettrait l'expression d'une ribonucléase spécifique de l'ARN bicaténaire. Il a été observé une meilleure résistance à

l'infection au PSTVd après introduction du transgène dans une plante hôte. La cible de cette méthode de lutte est le stade intermédiaire de réplication double-brin du viroïde mais sa molécule mûre peut aussi être affectée. Cette transformation génétique pourrait amener à la résistance contre une large gamme de virus et viroïdes (FLORES *et al.*, 2006b).

Ces deux dernières solutions paraissent élégantes mais elles soulèvent le problème de l'acceptation des OGM en Europe et la difficulté de la transformation génétique sur ligneux. La preuve de l'absence d'effet négatif de ces transformations sur l'ARN de la plante risque aussi d'être difficile à apporter.

La compréhension approfondie des mécanismes de réplication des viroïdes et de leur relation avec l'hôte pourra probablement amener à de nouveaux moyens de lutte.

3. Les techniques moléculaires de détection et de quantification

3.1. RT-PCR

La Réaction de Polymérisation en Chaîne (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) est une technique de biologie moléculaire qui a commencé à être utilisée au milieu des années 80. Elle permet d'amplifier de manière exponentielle un fragment particulier d'ADN bicaténaire. Il faut tout d'abord choisir de manière spécifique ce fragment en connaissant les séquences qui le flanquent. En premier lieu, l'ADN est dénaturé à la chaleur (aux environs de 100°C) afin de permettre la séparation des deux brins. Après un retour à une température plus basse, une « amorce » peut s'apparier aux brins d'ADN. Cette amorce est un oligonucléotide complémentaire de la séquence située en 5' de la région d'intérêt sur la molécule d'ADN.

L'enzyme *Taq DNA polymerase* synthétise le brin d'ADN complémentaire du fragment d'intérêt à partir de l'amorce de 5' vers 3'. Après cette amplification, le produit de synthèse est dénaturé et le cycle est répété (à l'aide d'une amorce complémentaire à une séquence de ce produit). Les concentrations en amorces sont en excès par rapport aux fragments d'intérêt, ce qui permet d'effectuer un grand nombre de cycles d'amplifications.

La réaction a lieu dans des tubes Eppendorf et nécessite de faibles quantités en réactifs et en ADN. Le déroulement des cycles d'amplification est automatisé à l'aide d'un *PCR-cycler*.

La PCR peut aussi s'appliquer à l'information génétique sous forme d'ARN. Pour cela, l'ARN doit être rétro-transcrit préalablement à l'aide d'une transcriptase inverse (*Reverse Transcriptase*, RT) afin d'obtenir un brin d'ADN complémentaire. Cet ADNc est alors utilisé dans la PCR. La réaction dans son ensemble est appelée RT-PCR.

Ultérieurement, les produits PCR peuvent être révélés lors d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Soit une sonde marquée radioactive est hybridée au fragment amplifié. Soit ce gel contient du bromure d'éthidium qui s'intercale dans l'ADN double-brin et révèle les fragments sous UV. La taille des fragments amplifiés est alors comparée à un marqueur de poids moléculaire.

L'avènement de la PCR a permis de réaliser des tests moléculaires en routine et sans usage de radioactivité. Ces tests sont très sensibles. Leur spécificité dépend des amorces choisies et de la variabilité génétique de l'agent pathogène.

3.2. PCR en temps réel

3.2.1. Principe

La PCR peut être utilisée pour quantifier les fragments d'acide nucléiques. Il est possible de déterminer la quantité d'amplicons une fois la PCR arrivée à terme. Cette mesure n'est pourtant pas très reproductible. La PCR en temps réel (*real time PCR*), par contre, repose sur la mesure du nombre de produits amplifiés au cours des cycles de la PCR.

La quantification est réalisée via un signal fluorescent émis par les amplicons au cours de leur élongation. Cette fluorescence provient de l'ajout d'un colorant ou d'une sonde marquée à la réaction PCR. Le colorant *SYBR[®] Green I* s'intercale dans tout ADN double-brin, il n'est donc pas spécifique du fragment d'intérêt. La spécificité de la réaction repose alors sur l'appariement des amorces et les conditions de la PCR. Il est aussi possible d'utiliser des sondes spécifiques : *Molecular Beacon* ou *TaqMan* qui portent un quencher qui limite l'émission de fluorescence par un *reporter* tant que la sonde ne s'est pas appariée ou n'a pas été dégradée lors de l'élongation.

La normalisation de la fluorescence repose sur le *Passive Reference ROXTM Dye* présent dans la réaction. Une ligne de base (*baseline*) est définie, elle correspond à un intervalle de cycles d'amplification au cours duquel le signal de fluorescence n'est pas différenciable du bruit de fond. La fluorescence correspondant à cette ligne de base est soustraite à toutes les mesures (*baseline correction*).

L'accroissement de fluorescence au cours de la PCR passe par une phase exponentielle. Durant cette phase, la fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de produit PCR (ce n'est pas le cas pour le plateau d'amplification où la quantité d'amorces devient limitante). Pour déterminer cette quantité, une fluorescence seuil (*threshold fluorescence*) est fixée dans la phase exponentielle (ou au moins dans une phase où le taux d'accroissement est le même pour les différents échantillons). Le nombre de cycles d'amplification qui est nécessaire pour atteindre ce seuil (pour un échantillon) est appelé *Ct (cycle threshold)*. Vu que ce seuil est placé à la même valeur pour différents échantillons, leurs *Ct* peuvent être comparés. Plus la concentration initiale en la cible (fragment d'ADN d'intérêt) est faible dans un échantillon, plus il faudra de cycles d'amplification pour que le signal de fluorescence atteigne le seuil et plus le *Ct* sera élevé.

Il est possible de quantifier de manière absolue le nombre de fragments d'ADN grâce à un étalonnage. Une courbe standard est construite à partir de la mesure des *Ct* d'échantillons dont la concentration initiale en la cible est connue. Elle représente la décroissance du nombre de *Ct* en fonction du \log_{10} du nombre de copies ou de la concentration initiale en ADN cible. La détermination du *Ct* d'un échantillon inconnu (nombre de cycles pour atteindre le seuil) et son report sur cette courbe standard permet d'obtenir la concentration en le fragment d'intérêt. Pour que cette comparaison entre échantillons soit possible, la cinétique de réaction doit être

approximativement constante au cours des différents cycles et similaire entre les différents puits de la plaque qui contient les échantillons (STRATAGENE, 2007).

Lorsque le SYBR[®] Green I est utilisé, une mesure de fluorescence est effectuée tout au long de la phase de dissociation lors du dernier cycle PCR. La courbe de dissociation obtenue fait apparaître un ou plusieurs pics correspondant aux T_m des fragments d'ADN présents dans l'échantillon.

Le coût de la PCR en temps réel est relativement faible pour une grande précision de mesure (en plusieurs répétitions) et une forte sensibilité. De plus, l'absence de manipulations post-amplification réduit le risque de contamination et d'apparition de faux-positifs (BOONHAM *et al.*, 2004).

3.2.2. Interprétation des résultats

L'observation des courbes de dissociation permet de repérer la présence éventuelle d'autres fragments que la séquence d'intérêt qui auraient été amplifiés et qui peuvent gêner la quantification de la cible (la formation de dimères d'amorces peut être détectée).

La courbe standard tracée à partir des contrôles positifs doit être linéaire. Les Ct correspondant aux échantillons doivent faire partie de l'étendue de Ct couverte par la courbe standard pour pouvoir être quantifiés. L'efficacité d'amplification mesurée doit être proche de 100%, dans ce cas une amplification de 10 fois nécessite 3,32 cycles ($2^{3,32}=10$). La pente de la courbe standard dans un graphique des valeurs de Ct en fonction de la concentration initiale en modèle ADN est alors de -3,32 (STRATAGENE, 2007).

L'efficacité de la PCR dépend de la pente de cette courbe. La zone d'efficacité acceptable pour une PCR en temps réel se situe entre 90 et 110%. Le coefficient de détermination de la courbe standard (R²) doit être supérieur à 0,985. Si l'écart type entre les points d'un même standard est trop grand aux extrémités de la courbe, ces concentrations sont hors de la zone linéaire de détection pour cet essai (STRATAGENE, 2007).

Il est possible de réaliser une quantification relative (ou comparative) par rapport à un étalon dont la quantité est fixée aléatoirement à « 1 » (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).

3.3. Application à la phytopathologie et à la virologie

Comme décrit au point 2.8.2, la PCR peut être utilisée comme technique de détection d'organismes phytopathogènes. Parmi les méthodes de détection directe (sans passer par l'observation de symptômes), la PCR est incontournable pour la détection d'entités constituées uniquement d'acides nucléiques. La bonne connaissance du polymorphisme des séquences de ces organismes est nécessaire pour que la spécificité des tests de détection ne soit pas trop restrictive ou trop tolérante.

La PCR en temps réel permet une quantification de séquences spécifiques d'un agent pathogène. Cette quantification peut être absolue ou relative. Il devient possible d'évaluer l'ampleur d'une infection ou de comparer des vitesses de réplication.

Cette démarche a été utilisée par ZHONG *et al.* (2006) dans le cas du PSTVd. Des mutations ont été réalisées dans la boucle E du variant sauvage du viroïde et ces mutants ont

été inoculés sur *Nicotiana benthamiana*. Les mutations entraînant une formation anormale de la boucle E n'ont donné lieu à aucune accumulation visible du viroïde dans la plante (la réplication dans le noyau n'a pas eu lieu). Dans cette situation, la transcription de la molécule est inefficace, la boucle E possède d'ailleurs des motifs qui servent de site de liaison aux protéines. D'autres variants portant des mutations compensatoires (calculées via une matrice d'isostéricité) préservant la structure tertiaire de la boucle E se sont accumulés aussi bien que le variant sauvage. La PCR en temps réel a permis de constater que le niveau d'accumulation en molécules de polarité négative est 10 à 100 fois moindre pour les variants à mutations compensatoires et 1000 fois moindre pour les variants dont la structure tertiaire de la boucle E est affectée.

RUIZ-RUIZ *et al.* (2009) ont mené à bien la quantification du *Citrus leaf blotch virus* (CLBV) dans les tissus de la plante hôte à l'aide de la RT-PCR en temps réel en une étape. Cette technique s'est révélée 1000 fois plus sensible que le test de détection du virus par RT-PCR classique. Ils ont utilisé différentes dilutions d'un standard d'ARN correspondant à la séquence du virus et sont parvenus à détecter aussi peu que 100 copies du virus dans différents tissus (mais la quantification n'est pas fiable pour des titres aussi faibles). La préparation des échantillons a reposé sur l'extraction de l'ARN total à partir d'1 à 3g de tissus, sa quantification par NanoDrop® et l'ajustement approximatif de la concentration à 10 nanogrammes d'ARN total par microlitre d'échantillon. Les quantités mesurées ont pu être exprimées en copies de virus par nanogramme d'ARN total. Cette démarche de calcul n'est pas réalisable dans le cadre du présent travail car l'ARN total n'est pas conservé via la méthode d'extraction utilisée.

La PCR en temps réel donne aussi la possibilité d'étudier le niveau d'expression de certains gènes de l'hôte dans différentes situations et d'établir un éventuel lien avec la présence d'un pathogène.

OBJECTIFS

Afin de poursuivre l'étude des structures du PLMVd et de comprendre leurs fonctions biologiques, des plants de pêcher ont été inoculés par des variants mutés et un variant de référence. Ce dernier a été utilisé comme base de comparaison.

Le premier objectif de ce travail était de caractériser la pathogénicité des différents variants mutés sur les plants de pêcher en observant la présence et l'évolution des symptômes au cours du temps.

Le second objectif était de caractériser la réplication de ces variants. Pour cela, il fallait d'abord déterminer quels plants étaient infectés à l'aide de la RT-PCR. Certains plants pouvaient alors être sélectionnés pour y quantifier le PLMVd grâce à la PCR en temps réel.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel biologique

1.1. Matériel végétal

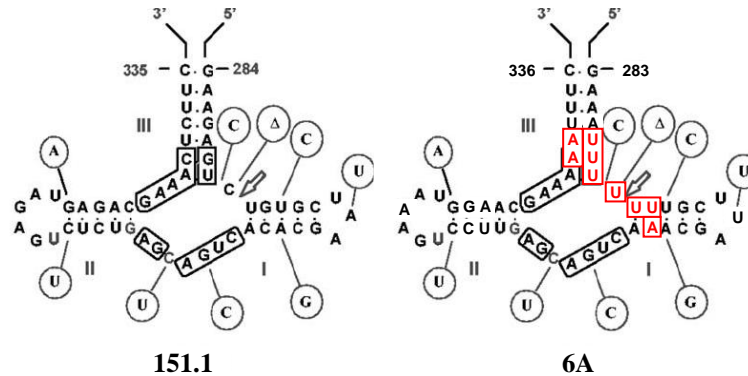
Le matériel végétal utilisé pour l'expérimentation a consisté en 60 plants de pêcher de variété GF-305 (variété généralement utilisée comme plante indicatrice). Ces plants sont disponibles dans les serres de l'Unité de Phytopathologie de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (FUSAGx, Belgique), ils ont été fournis par le département de Lutte Biologique et de Ressources Phytogénétiques du CRA-W de Gembloux. Ils ont été inoculés en juin 2008 à l'aide de différents variants du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd).

1.2. Variants du PLMVd inoculés

Les variants qui ont été inoculés étaient le 151.1, le P8, le 6A. Le variant 151.1 provient d'un isolat récolté en Tunisie sur un plant de la variété Alberta, dont le greffon est originaire de Californie et le porte-greffe d'Espagne. Ce variant de référence fait partie du groupe IIA et comporte 337 nucléotides, il a été choisi car il induit des symptômes sévères sur les plants de la variété GF-305.

Les variants mutés P8 et 6A dérivent du variant 151.1. Le variant P8 a été muté par mutagenèse dirigée au niveau de la tige P7 (${}_{212}\text{CCGC}_{215}$ remplacé par ${}_{212}\text{AAAA}_{215}$) afin d'empêcher la formation du pseudo-nœud P8 (voir point 2.2.3 de la Synthèse bibliographique). Par contre, le variant 6A a subi des mutations dans la partie supérieure de la tige P11 (de sa polarité positive) : ${}_{47}\text{CAGACG}_{52}$ remplacé par ${}_{47}\text{AAAAAA}_{52}$, ${}_{7}\text{AG}_8$ remplacé par ${}_{7}\text{UU}_8$ et G_{37} remplacé par U_{37} (droite). Des mutations homologues à ces premières mutations ont été obtenues dans la partie inférieure de la tige P11 : ${}_{287}\text{CGUCUG}_{292}$ remplacé par ${}_{287}\text{UUUUUU}_{292}$, ${}_{331}\text{CC}_{332}$ remplacé par ${}_{331}\text{AA}_{332}$ et C_{302} remplacé par A_{302} (Figure 15). Comme décrit au point 1.4.2 de la partie Synthèse bibliographique, la séquence de la *CAGACG box* est hautement conservée et contribue à délimiter le site d'initiation de la transcription. Chacun de ces variants a été inoculé sur 9 plants, sous forme d'ARN dimérique. Sept plants ont servi de témoins positifs (T+), ils ont été inoculés par un jus brut de plante infectée. Enfin, 26 plants sains ont été utilisés comme témoins négatifs.

Figure 15. Structure en tête de marteau de polarité positive (plus) du variant 151.1 du PLMVd (à gauche) et du variant 6A du PLMVd (à droite). Les nucléotides mutés sont marqués en rouge. Les flèches indiquent les sites d'auto-clivage prédits. Les résidus encadrés en noir constituent le cœur catalytique conservé dans toutes les structures en tête de marteau et dans des positions similaires. Les mutations rencontrées dans les variants des isolats du *peach calico* sont indiquées dans des cercles et ont lieu de façon à ce que la stabilité thermodynamique des hélices soit préservée (MALFITANO *et al.*, 2003).



Lors du prélèvement sur un plant de pêcher, entre cinq et huit feuilles sont détachées à l'aide d'une lame de scalpel. Ces feuilles ont été pesées de façon à constituer un échantillon de 0,4g.

2. Amorces utilisées

Le test de détection du PLMVd employé dans le présent travail est une RT-PCR mise au point en laboratoire. Les amorces spécifiques associées à ce test de détection ont été obtenues par alignement de séquences du PLMVd à l'aide du programme CLUSTALW (FEKIH HASSEN *et al.*, 2006). L'amorce hPLMVd est l'oligonucléotide sens qui correspond aux nucléotides 116 à 140 du PLMVd. Sa séquence est 5'-CCCGATAGAAAGGCTAAGCACCTCG-3'. L'amorce cPLMVd est l'oligonucléotide anti-sens complémentaire aux nucléotides 91 à 115 du PLMVd. Sa séquence est 5'-AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC-3'.

Les amorces hPLMVd et cPLMVd ont une forte tendance à former des dimères, ceux-ci peuvent fausser le résultat de la PCR en temps réel. D'autres amorces ont donc été utilisées pour la PCR en temps réel, elles découlent d'une sélection effectuée par alignement de 117 séquences du PLMVd et utilisation du logiciel Primer Express (ABI) (GONNÉ, 2007). L'amorce F-PLMVd est l'oligonucléotide sens qui correspond aux nucléotides 69 à 88 du PLMVd. Sa séquence est 5'-CCTCTCAGCCCCCTCCACCTT-3'. L'amorce R7-PLMVd est l'oligonucléotide anti-sens complémentaire aux nucléotides 161-143 du PLMVd. Sa séquence est 5'-CCCACCTTACGTCATTGCG-3'. Toutes ces amorces ont été produites par la société Eurogentec (Liège, Belgique).

3. Méthodes

3.1. Préparation des échantillons

3.1.1. Environnement RNase free

Lorsque l'ARN a été manipulé, des dispositions particulières ont été prises pour éviter sa dégradation. Cette dégradation a lieu lorsque l'échantillon subit des températures trop élevées ou se retrouve en présence de ribonucléases (RNases). Des Eppendorf RNase free ont été utilisés, ils ont été manipulés avec des gants. L'eau utilisée a été préalablement traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC) 0,1% et autoclavée afin d'éliminer les RNases. La verrerie a été chauffée pendant une nuit à 210°C.

3.1.2. Quantification des acides nucléiques par le NanoDrop® ND-1000

Le NanoDrop® a permis de déterminer la concentration en ADN complémentaire du PLMVd dans les produits de clonage ou d'amplification. Il s'agit d'un spectrophotomètre à spectre complet (220-700nm) qui réalise des mesures d'absorbance dans 2µl de solution. Le NanoDrop® est capable d'effectuer des mesures sur des échantillons 50X plus concentrés que les spectrophotomètres à cuvette classiques.

L'appareil réalise des mesures d'absorbance à 230, 260 et 280nm. La quantification des acides nucléiques repose sur la mesure de l'absorbance à 260nm. La qualité de l'échantillon a été vérifiée par les rapports des absorbances à 260 et 280nm et celles à 260 et 230nm.

Les fibres optiques de l'appareil ont été rincées et essuyées. 2µl d'eau (blanco) ou d'échantillon ont été déposés sur la fibre optique réceptrice, la fibre optique émettrice a été mise en contact avec la goutte qui prend alors la forme d'une colonne. Une lampe à décharge à Xénon produit un flash lumineux qui traverse la colonne d'échantillon et est analysé.

3.1.3. Prélèvement et extraction du jus brut à partir de plants de pêcher

Cinq à huit feuilles ont été prélevées sur chaque pêcher et pesées. 0,4g de feuilles ont été placés dans chaque sachet de broyage avec 2ml de tampon d'extraction SSC 2X (SSC 20X : 175,3g de NaCl et 88,2g de citrate tri-sodique pour un litre d'eau, pH7) en présence de sulfite de sodium 1% (FEKIH HASSEN *et al.*, 2006). Lorsque la masse de feuilles récoltées était moins importante, le volume de tampon était ajusté pour maintenir un rapport masse/volume constant (l'extraction était réalisée de façon à ce que les jus bruts obtenus soient comparables d'un point de vue quantitatif). Le contenu des sachets a été broyé et récolté dans des tubes Eppendorf sur glace. Ces tubes ont été centrifugés à 4°C pendant 20min à 14000g. 0,5ml de surnageant ont ensuite été récoltés. Enfin, 2µl de ce jus brut ont été dilués dans 198µl d'eau DEPC pour obtenir un jus brut dilué 100X. Cette dilution a été réalisée avant toute réaction enzymatique afin de limiter la quantité d'inhibiteurs.

3.2. PCR classique

La PCR classique a été utilisée sur oligonucléotides ou clones cDNA du PLMVd ou sur jus brut après rétro-transcription. Le kit *Taq* DNA polymérase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) est utilisé afin de préparer le mélange réactionnel suivant :

Composant	Volume par réaction
dNTP (10mM, Fermentas)	0,5µl
amorce cPLMVd (20µM)	0,5µl
amorce hPLMVd (20µM)	0,5µl
tampon 10X	2,5µl
H ₂ O	18,75µl
Enzyme (<i>Taq</i> DNA polymérase)	0,25µl
Total	23µl

Pour chaque réaction, 2µl d'échantillon ont été ajoutés à ce mélange pour arriver à un volume final de 25µl. Le programme PCR appliqué a été le suivant :

- 5 minutes à 95°C (dénaturation)
- **45X** : 30 secondes à 95°C (dénaturation)
45 secondes à 60°C (hybridation des amorces)
45 secondes à 72°C (élongation)
- 7 minutes à 72°C (dernière phase d'élongation)

3.3. RT-PCR

La RT-PCR a été appliquée au jus brut extrait à l'aide du tampon SSC et dilué 100X. Elle a permis la détection du PLMVd dans ces échantillons en une seule étape. Le kit *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche diagnostics, Penzberg, Germany) a été utilisé. Les conditions spécifiées par le fournisseur ont été respectées. Lors des manipulations, tous les composants et échantillons sont conservés sur glace.

0,5µl d'amorce cPLMVd (20µM) ont été placés dans le fond de chaque tube Eppendorf. Ensuite, 2µl d'échantillon ont été ajoutés à ces tubes. Ce mélange a été soumis à une dénaturation à 95°C durant 5 minutes qui est nécessaire vu sa structure secondaire très stable (BOONHAM *et al.*, 2004). Après cela, les tubes ont été refroidis sur glace pendant 2 minutes puis brièvement centrifugés.

22,5µl du mélange réactionnel suivant ont été ajoutés au contenu des tubes :

Composant	Volume par réaction
dNTP (10mM, Fermentas)	0,5µl
amorce hPLMVd (20µM)	0,5µl
tampon pour RT-PCR 5X	5µl
DTT	1,25µl
H ₂ O DEPC	14,75µl
mélange d'enzymes (AMV reverse transcriptase et High fidelity <i>Taq</i> -polymérase)	0,5µl
Total	22,5µl

Dans la solution réactionnelle, la concentration en amorces sens et anti-sens était de 400nM. Le cycle de RT-PCR appliqué a été le suivant :

- 1 heure à 50°C (rétrotranscription)
- 3 minutes à 95°C (dénaturation)
- **35X :** 30 secondes à 95°C (dénaturation)
45 secondes à 60°C (hybridation des amorces)
45 secondes à 72°C (élongation)
- 7 minutes à 72°C (dernière phase d'élongation)

3.4. Migration d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'amplification obtenus par PCR classique ou par RT-PCR ont été détectés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (rapport poids/volume). Ce gel a été préparé par dissolution d'agarose dans un volume de tampon TAE 1X. Un litre de tampon TAE 50X contient 242g de Tris hydroxyaminométhane, 37,2g d'EDTA, 57,1ml d'acide acétique et est complété par de l'eau distillée.

La solution à 1% d'agarose a été légèrement refroidie, 10µl de bromure d'éthydiuim (BEt) y ont été ajoutés (10mg/ml). Elle a alors été coulée dans un support qui comporte un peigne afin de former des puits dans la solution qui se polymérise.

Le gel de migration a été déplacé avec son support dans une cuve d'électrophorèse qui contient du tampon TAE 1X. 15 µl de chaque produit d'amplification ont alors été mélangés à une goutte d'1µl de tampon de chargement et déposés dans le fond des puits du gel. 5ml de ce tampon de chargement comprend 12,5mg de bleu de bromophénol, 2,5ml de glycérol et 100µl d'une solution 0,5M d'EDTA. La migration a eu lieu à 120mA sur une période de 45 minutes à une heure. Au final, le gel a été analysé sous UV (à une longueur d'onde de 320nm) et le bromure d'éthydiuim émet une fluorescence, ce qui permet de visualiser l'ADN.

3.5. Rétro-transcription

La rétro-transcription a été réalisée sur du jus brut dilué 100X, préalablement à la PCR en temps réel. Elle a permis d'obtenir de l'ADN monocaténaire complémentaire du PLMVd à partir de son ARN présent dans le jus brut. Cette manipulation a suivi le protocole du kit *SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) (voir Annexe 2.1). 2µl de jus brut dilué 100X ont été utilisés. La molécule du PLMVd étant très structurée, la dénaturation initiale a été réalisée à 95°C pendant 5 minutes. Les tubes ont été ensuite refroidis 2 minutes sur glace.

3.6. PCR en temps réel

La PCR en temps réel a été réalisée après rétro-transcription sur jus brut afin de quantifier le PLMVd. Les amorces F-PLMVd et R7-PLMVd ont été utilisées. Les contrôles ont été préparés à partir d'oligonucléotides d'ADN de synthèse homologues à la séquence du viroïde amplifiée par les amorces F-PLMVd et R7-PLMVd (des nucléotides 68 à 158) mélangés aux oligonucléotides d'ADN complémentaires (séquences en Annexes n°1). Ces oligonucléotides ont été synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique) et ajoutés dans les mêmes proportions molaires, la concentration obtenue a été vérifiée à l'aide du NanoDrop®. Ce mélange a été

dilué de façon à obtenir un standard de 10^{-4} ng/réaction PCR qui a alors été dilué de 10 en 10 jusqu'à 10^{-8} ng/réaction PCR. Un volume de jus brut qui n'a pas subi la rétro-transcription a été ajouté à chacun de ces standards. Ce volume a été calculé de façon à ce que la concentration en jus brut dans les standards soit la même que dans les échantillons.

Le Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) a été utilisé pour préparer le mélange réactionnel suivant :

Composant	Volume par réaction
Master Mix 2X	12,5µl
forward primer (F) (300nM/réaction)	0,5µl
reverse primer (R7) (300nM/réaction)	0,5µl
H ₂ O	6,5µl
Total	20µl

Ce mélange a été déposé dans les puits d'une plaque à 48 puits pour PCR en temps réel. 5µl de blancs, standards et échantillons ont ensuite été déposés dans leurs puits respectifs en les mélangeant bien au mix. Les dépôts sur plaque se font de façon à éviter la formation de bulles qui gênent la lecture du signal de fluorescence.

La plaque a été scellée à l'aide d'un film optique adhésif et centrifugée brièvement. Elle a été déposée dans le tiroir de l'appareil StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Easta, USA). La programmation du contenu de la plaque, des températures à appliquer et des mesures à prendre a été définie à l'aide du programme StepOne Software v2.0 et entrée dans l'appareil.

Le cycle PCR en temps réel a été le suivant :

- 10 minutes à 95°C (dénaturation)
- **40X :** 15 secondes à 95°C (dénaturation)
1 minute à 60°C (hybridation et élongation avec mesure de fluorescence)
- **courbe de dissociation :** 15 secondes à 95°C (dénaturation)
1 minute à 60°C (hybridation et élongation avec mesure de fluorescence)
- 15 secondes à 95°C (dénaturation)

L'analyse des résultats reposait sur le logiciel StepOne Software v2.0. Ce logiciel associe le signal pour chaque puits au contenu du puits et détermine la fluorescence seuil. Le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que le signal de fluorescence dans un puits atteigne cette fluorescence seuil correspond au Ct (cycle seuil). Les Ct des standards de concentration connue ont permis de réaliser une courbe standard. Les échantillons ont été quantifiés sur cette courbe standard via leur Ct. Le caractère exponentiel de l'amplification a été vérifié à l'aide du pourcentage d'efficacité et de la pente de la courbe standard.

Les résultats obtenus par PCR en temps réel sont des nanogrammes d'ADN par réaction. La masse molaire des standards de PCR en temps réel est de $2,74388 \cdot 10^{13}$ ng/mol. Le rapport entre d'une part la concentration en nanogrammes d'ADN par réaction et d'autre part la masse molaire de la molécule correspond au nombre de moles par réaction. Ensuite, le

nombre de molécules de PLMVd par réaction est obtenu en multipliant cette valeur par le nombre de molécules qui composent une mole.

$$\frac{\ln d'ADN}{\text{réaction}} = \frac{3,64447 \times 10^{-14} \text{ moles de PLMVd}}{\text{réaction}} = \frac{2,19470 \times 10^{10} \text{ molécules de PLMVd}}{\text{réaction}}$$

Une réaction comprend 5µl de jus brut dilué 1000X, de plus 2000µl de jus brut non dilué proviennent du broyage de 400mg de feuilles. La concentration en nombre de molécules de PLMVd par milligramme de feuille s'obtient donc par :

$$\begin{aligned} \frac{1 \text{ molécule de PLMVd}}{\text{réaction}} &= \frac{0,2 \text{ molécules de PLMVd}}{\mu\text{l de jus dilué } 1000 \text{ X}} = \frac{200 \text{ molécules de PLMVd}}{\mu\text{l de jus non dilué}} \\ &= \frac{1000 \text{ molécules de PLMVd}}{\text{mg de feuille}} \end{aligned}$$

L'analyse statistique de ces valeurs a été réalisée à l'aide du logiciel Minitab® 15 (Minitab Inc.) et est présentée en Annexes n°3.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Modèles de comparaison

Les résultats obtenus au cours de ce travail ont pu être comparés entre eux selon différents modèles, le choix de ces modèles repose sur la disponibilité des techniques et du matériel. Tout d'abord, les résultats de quantification absolue du PLMVd qui correspondent à différents prélèvements sur des plants inoculés par les variants mutés ont été comparés à la quantité mesurée pour le dernier prélèvement sur un plant inoculé par le variant de référence (151.1). Ensuite, l'évolution du titre en viroïde mesuré pour un même plant au cours de plusieurs mois a été analysée. Enfin, nous avons comparé le titre en viroïde dans des feuilles symptomatiques et asymptomatiques d'un même plant. Cette démarche a permis de caractériser la réplication de ces variants. La caractérisation de leur pathogénicité a reposé sur le suivi de l'intensité des symptômes de tous les variants inoculés et la comparaison de ces observations entre différentes dates et pour des plants inoculés par différents variants.

L'étude a été réalisée sur la variété de pêcher GF-305 car elle est très sensible à l'infection par le PLMVd et que sa pathogénicité y a déjà été caractérisée. Ainsi les symptômes étaient rapidement observables et la réponse de la plante à l'infection par le variant 151.1 était connue. L'étude sur différentes variétés est intéressante lorsque des variétés résistantes au pathogène sont répertoriées, ce qui n'est pas le cas pour le PLMVd.

2. Caractérisation de la réplication du PLMVd

Au cours de ce travail, la capacité de réplication de différents variants du PLMVd a été caractérisée sur plants de pêcher à l'aide de techniques de biologie moléculaire par la mesure de leur accumulation dans les feuilles.

2.1. Détection du PLMVd sur plants inoculés

Dans un premier temps, la RT-PCR classique a été mise en œuvre pour détecter le PLMVd à partir de jus brut extrait de feuilles de pêcher. Ces feuilles provenaient de prélèvements menés entre février et mai 2009.

Parmi les neuf plants qui ont été inoculés par le variant 151.1, cinq ont été identifiés comme positifs (infectés) par cette technique (Figure 16). Aucun des neuf plants inoculés par le variant P8 n'a été signalé comme positif par la RT-PCR classique. Il n'y a pas non plus eu de plant identifié comme positif parmi les plants inoculés par le variant 6A (Tableau 1).

Figure 16. Révélation des produits d'amplification sur gel d'agarose lors d'un test de détection du variant 151.1. Pour les échantillons qui proviennent des plants 151.1 n°1, 4 et 8 et pour le témoin positif (T+, jus brut positif), un fragment d'environ 340pb correspondant à la longueur du PLMVd est visible. Aucun fragment d'environ 340pb n'est amplifié à partir du blanco (B, eau) ou du témoin négatif (T-, jus brut provenant d'un plant qui n'a pas été inoculé par le PLMVd).

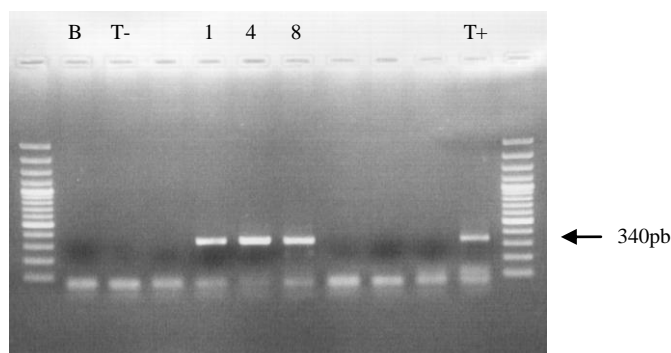


Tableau 1. Résultats globaux de la campagne de détection du PLMVd menée entre février et mai 2009 par RT-PCR classique sur les plants de pêcher inoculés par les variants 151.1, P8 et 6A.

Variant inoculé	Nombre de plantes positives	Taux de détection
151.1	5	55 %
P8	0	0 %
6A	0	0 %

2.2. Quantification absolue du PLMVd sur plants inoculés

Le protocole de RT-PCR classique utilisé est fiable mais il ne permet pas la quantification précise de l'ARN du viroïde. La PCR en temps réel (précédée d'une rétro-transcription) était plus adaptée à cette démarche. En effet, des oligonucléotides d'ADN correspondant à la séquence du PLMVd ont été utilisés comme standards de concentrations connues pour la quantification absolue du produit de rétro-transcription de l'ARN du PLMVd. De plus, la PCR en temps réel offre une réponse beaucoup plus sensible que la RT-PCR classique, ce qui a permis la détection du viroïde à des niveaux bien plus faibles. Nous avons optimisé et appliqué cette technique afin d'une part de confirmer ou d'infirmer l'absence du PLMVd dans les plants inoculés par les variants mutés et d'autre part de pouvoir quantifier le viroïde dans les feuilles infectées.

2.2.1. Optimisation de la PCR en temps réel

Le protocole développé par GONNE (2007) a été utilisé pour appliquer la PCR en temps réel à la quantification absolue du PLMVd après rétro-transcription de son ARN. Au vu des premiers résultats obtenus, il s'est avéré nécessaire d'optimiser certains paramètres afin d'améliorer l'efficacité de l'amplification et d'éviter la formation de dimères d'amorces. Pour ce faire, nous avons optimisé les concentrations en amorces, la dilution du jus brut, nous avons sélectionné le tampon d'extraction et l'intervalle de concentration des standards le plus approprié.

L'efficacité d'amplification la plus proche de 100% a été obtenue à l'aide de concentrations en amorces de 300nM par réaction. Nous avons constaté que lorsque les standards de PCR en temps réel contiennent 1% de jus brut, l'efficacité est affectée. Un retard de C_T a été observé et le plateau d'amplification a été rapidement atteint. Pour éviter ces

problèmes et pour des raisons pratiques, les échantillons de jus brut qui sont soumis à la rétro-transcription ont été préalablement dilués 100X (ils contiennent 1% de jus brut). Après la rétro-transcription, la concentration en jus brut des échantillons était de 0,1% (jus brut dilué 1000X). L'efficacité obtenue avec des standards contenant 0,1% de jus brut était de 97,22% malgré cet apport de jus brut, on peut donc supposer que l'amplification PCR des échantillons en présence de jus brut dilué 1000X n'en était que peu affectée. Une même proportion de jus brut a été ajoutée à chaque standard pour y refléter les effets inhibiteurs que des polysaccharides et des composés phénoliques pourraient avoir sur l'amplification PCR des échantillons.

De plus, la sélection du tampon utilisé pour broyer les échantillons destinés à l'amplification par PCR en temps réel a été affinée. Les deux tampons à disposition étaient le tampon SSC et le tampon KAJI. Les valeurs de C_T des standards pour ces deux tampons n'ont pas montré de différence significative et chacun des deux tampons a permis une bonne efficacité d'amplification PCR. Pour des raisons de coût et pour des raisons pratiques, le tampon SSC a été utilisé pour broyer les échantillons destinés à l'amplification par PCR en temps réel tout comme il est utilisé pour ceux analysés par RT-PCR classique.

L'utilisation du NanoDrop® a permis de vérifier la concentration du mélange d'oligonucléotides d'ADN homologue utilisé comme standard de PCR en temps réel (28,6ng/µl). Le rapport entre la densité optique à 260nm et la densité optique à 280nm pour cette mesure était bien compris entre 1,8 et 2. L'intervalle de concentration des standards choisi pour les quantifications ultérieures s'étend de 10^{-4} ng/µl à 10^{-8} ng/µl.

2.2.2. Test de sensibilité

Il est apparu au cours d'un test de sensibilité que la limite de détection du PLMVd par PCR en temps réel se situe à une concentration 1000 fois plus faible que celle de la RT-PCR classique. Cette amélioration de la sensibilité est très semblable à celle constatée lors de la détection du CLBv par RUIZ-RUIZ *et al.* (2009). En effet, un échantillon de jus brut positif dilué 100X (dilution utilisée couramment dans ce travail de façon à ne pas inhiber la RT-PCR) apparaît positif par RT-PCR. Lorsqu'une rétro-transcription est appliquée à ce même jus brut positif (ce qui dilue encore le jus brut 10X) afin de réaliser la PCR en temps réel, on remarque que la concentration en ARN de PLMVd dans cet échantillon est de $4,377.10^{-6}$ ng/réaction. Des dilutions en série de ce jus brut sont restées quantifiables par PCR en temps réel jusqu'à $4,694.10^{-9}$ ng/réaction (qui correspond à une dilution initiale de 100.000X, soit une dilution finale de 10^6 X). Par contre, la détection par RT-PCR classique n'a été possible que jusqu'à une dilution du jus brut de 1000X. La sensibilité de la RT-PCR classique qui a été mesurée ici est en accord avec celle obtenue par FEKIH HASSEN (2007b).

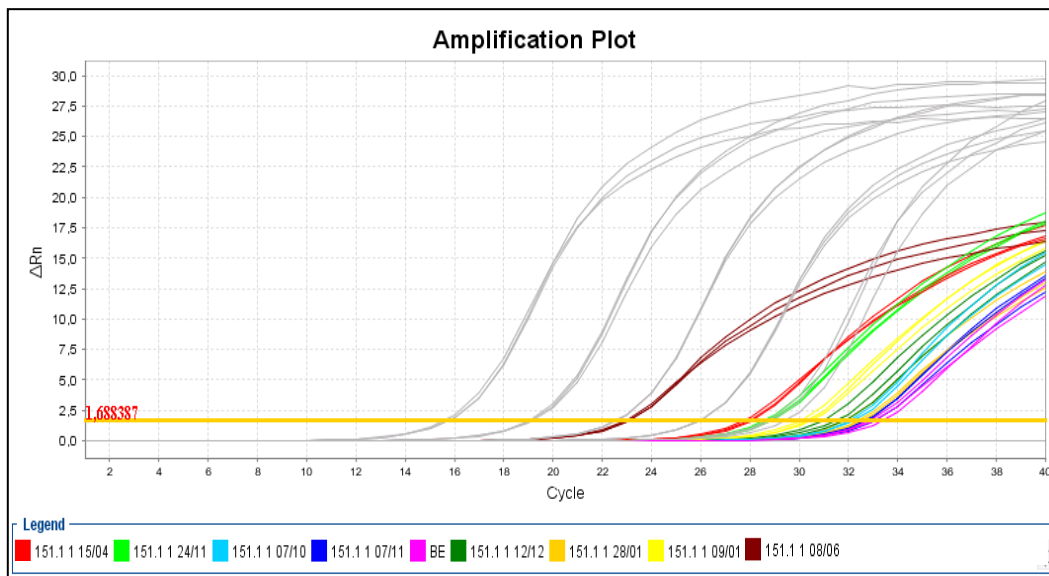
2.2.3. Application de la PCR en temps réel à la quantification absolue du PLMVd dans les plants inoculés par les variants 151.1, 6A et P8

Une fois les informations concernant la sensibilité de la PCR en temps réel acquises et le protocole optimisé, la PCR en temps réel a pu être appliquée pour quantifier le PLMVd à partir des échantillons. Ces derniers ont été obtenus après extraction et rétro-transcription à partir de feuilles prélevées à différents moments entre octobre 2008 et juin 2009 et conservées

à -80°C. Tous les échantillons issus d'un même plant ont pu être analysés sur une même plaque multi-puits de PCR en temps réel, ce qui a permis de réduire au maximum les variations dues aux différentes réactions PCR.

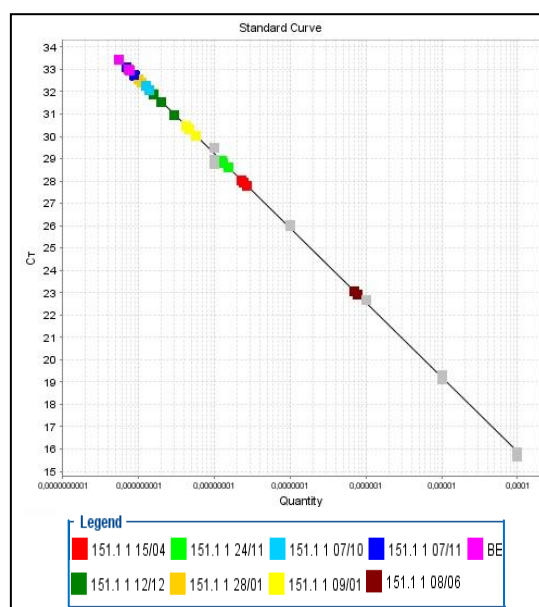
A titre d'exemple, les résultats obtenus après traitement des données lors d'une PCR en temps réel sont représentés à la Figure 17. Les valeurs normalisées de fluorescence (ΔRn) obtenues au cours des cycles d'amplification ont permis de tracer des courbes d'amplification. Le seuil de fluorescence est fixé à une valeur particulière de ΔRn par le programme d'analyse afin d'obtenir le C_T pour chaque réaction.

Figure 17. Evolution de ΔRn (fluorescence normalisée) dans les différents puits de la plaque de PCR en temps réel au cours des cycles d'amplification. Les courbes grises correspondent aux standards de concentration connue et la droite horizontale $\Delta Rn=1,688387$ représente le seuil de fluorescence.



Les valeurs de C_T des standards permettent de tracer une courbe standard où elles sont associées à des quantités de fragments d'ADN présents dans le puits avant amplification (Figure 18). Les valeurs de C_T obtenues pour les échantillons sont reportées sur cette droite d'étalonnage afin de déterminer la quantité de fragments d'ADN (en nanogrammes) présents dans les échantillons.

Figure 18. Courbe standard représentant l'évolution des valeurs de C_T en fonction de la quantité de fragments d'ADN en nanogramme par réaction avant qu'ils soient amplifiés.



Dans cet exemple, le coefficient de détermination de la courbe standard (R^2) est 0,998 et la pente obtenue est -3,337, ce qui correspond à une efficacité de 99,371 %. Les valeurs obtenues en nanogrammes d'ADN par réaction ont pu être converties en nombre de molécules de PLMVd par réaction ou par milligramme de feuille en comme décrit au point 3.6 de la partie Matériel et méthodes. Les valeurs obtenues devraient pourtant être corrigées en fonction de l'efficacité de l'enzyme utilisé lors de l'étape de rétro-transcription qui précédait la PCR en temps réel. STÅHLBERG *et al.* (2004) ont déterminé les rendements de cet enzyme (SuperScript III) pour différentes valeurs de nombre de molécules d'ARN par réaction. Pour une concentration initiale de 10^4 molécules d'ARN/réaction, le rendement est de 90% alors qu'il serait de 43% pour une concentration initiale de 10^3 molécules d'ARN/réaction. La majorité des titres obtenus dans le présent travail sont inférieurs à ceux étudiés par STÅHLBERG *et al.* (2004), ce qui rend impossible le calcul de valeurs exactes de titre en viroïde et permet seulement de comparer les valeurs obtenues dans le présent travail entre elles. D'ailleurs, le calcul utilisé pour la conversion de molécules de PLMVd/réaction en nombre de molécules de PLMVd/mg de feuille décrit au point 3.6 est approximatif vu qu'une partie des molécules du PLMVd reste dans la matrice végétale lors du broyage et ne se retrouve pas dans le volume récolté.

Le Tableau 2 présente les résultats obtenus lors des quantifications du PLMVd par PCR en temps réel dans les plants inoculés par les variants 151.1, 6A et P8. Les valeurs moyennes de C_T et de quantités présentées dans ce tableau ont été calculées à partir des trois répétitions de réaction réalisées pour chaque échantillon.

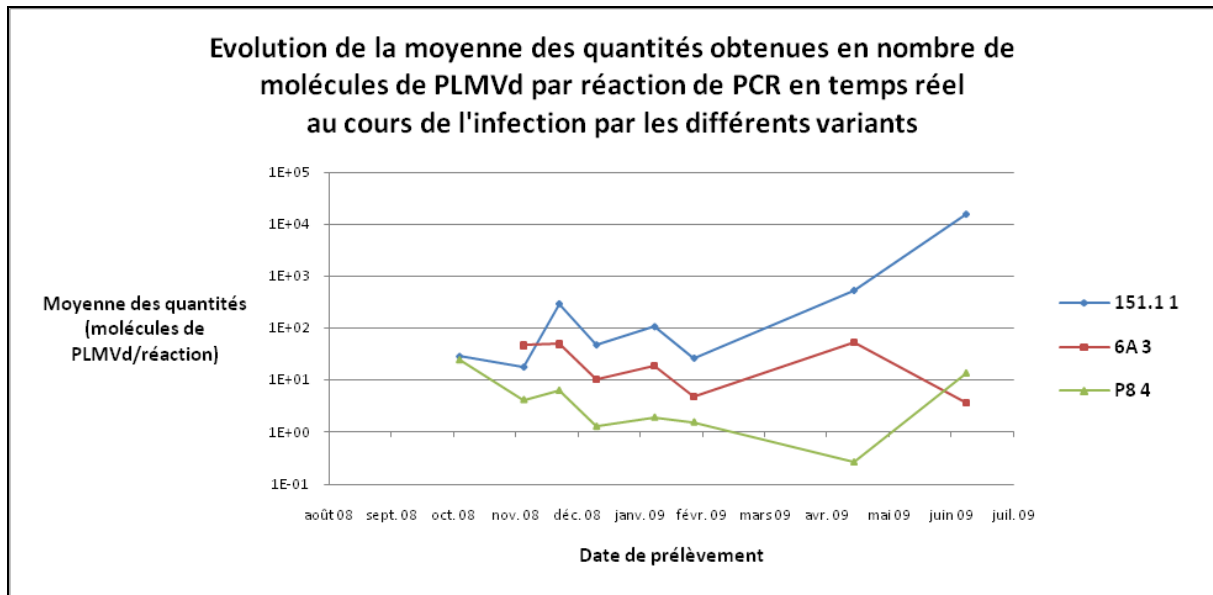
Tableau 2. Quantification absolue du PLMVd par PCR en temps réel dans les plants inoculés par les variants 151.1 (plant n°1), 6A (plant n°3) et P8 (plant n°4). Les valeurs de l'avant-dernière colonne correspondent aux moyennes des quantités en nombre de molécules/réaction jusqu'au prélèvement concerné. Le dernier prélèvement sur plant inoculé par le variant 151.1 est utilisé comme référence dans les plaques PCR des variants mutés et est marqué en rouge.

Variant et numéro du plant inoculé	Date de prélèvement	C _T moyen	Quantité moyenne (ng/réaction)	Ecart-type (ng/réaction)	Quantité moyenne (molécules /réaction)	Moyenne des quantités jusqu'à un prélèvement particulier (molécules /réaction)	Approximation de la quantité moyenne (molécules/mg de feuille)
151.1 1	7/10/2008	32,162	1,322.10 ⁻⁰⁹	1,058.10 ⁻¹⁰	2,901.10 ⁰¹		2,901.10 ⁰⁴
151.1 1	7/11/2008	32,849	8,267.10 ⁻¹⁰	1,126.10 ⁻¹⁰	1,814.10 ⁰¹		1,814.10 ⁰⁴
151.1 1	24/11/2008	28,778	1,369.10 ⁻⁰⁸	1,587.10 ⁻⁰⁹	3,005.10 ⁰²		3,005.10 ⁰⁵
151.1 1	12/12/2008	31,469	2,204.10 ⁻⁰⁹	7,243.10 ⁻¹⁰	4,837.10 ⁰¹		4,837.10 ⁰⁴
151.1 1	9/01/2009	30,258	4,945.10 ⁻⁰⁹	7,301.10 ⁻¹⁰	1,085.10 ⁰²		1,085.10 ⁰⁵
151.1 1	28/01/2009	32,298	1,224.10 ⁻⁰⁹	2,998.10 ⁻¹⁰	2,687.10 ⁰¹	8,857.10 ⁰¹	2,687.10 ⁰⁴
151.1 1	15/04/2009	27,916	2,476.10 ⁻⁰⁸	2,183.10 ⁻⁰⁹	5,435.10 ⁰²		5,435.10 ⁰⁵
151.1 1	8/06/2009	23,010	7,305.10⁻⁰⁷	5,084.10⁻⁰⁸	1,603.10⁰⁴	2,138.10 ⁰³	1,603.10⁰⁷
6A 3	7/11/2008	32,419	2,140.10 ⁻⁰⁹	1,105.10 ⁻¹⁰	4,698.10 ⁰¹		4,698.10 ⁰⁴
6A 3	24/11/2008	32,354	2,267.10 ⁻⁰⁹	5,023.10 ⁻¹⁰	4,975.10 ⁰¹		4,975.10 ⁰⁴
6A 3	12/12/2008	34,744	4,657.10 ⁻¹⁰	9,071.10 ⁻¹¹	1,022.10 ⁰¹		1,022.10 ⁰⁴
6A 3	9/01/2009	33,800	8,662.10 ⁻¹⁰	1,488.10 ⁻¹⁰	1,901.10 ⁰¹		1,901.10 ⁰⁴
6A 3	28/01/2009	35,837	2,244.10 ⁻¹⁰	1,006.10 ⁻¹¹	4,924.10 ⁰⁰	2,618.10 ⁰¹	4,924.10 ⁰³
6A 3	15/04/2009	32,200	2,498.10 ⁻⁰⁹	5,293.10 ⁻¹⁰	5,482.10 ⁰¹		5,482.10 ⁰⁴
6A 3	8/06/2009	36,338	1,673.10 ⁻¹⁰	6,351.10 ⁻¹¹	3,671.10 ⁰⁰	2,705.10 ⁰¹	3,671.10 ⁰³
151.1 1	8/06/2009	22,464	1,529.10⁻⁰⁶	1,880.10⁻⁰⁷	3,355.10⁰⁴		3,355.10⁰⁷
P8 4	7/10/2008	34,787	1,115.10 ⁻⁰⁹	1,750.10 ⁻⁰⁹	2,447.10 ⁰¹		2,447.10 ⁰⁴
P8 4	7/11/2008	35,796	1,922.10 ⁻¹⁰	1,916.10 ⁻¹⁰	4,217.10 ⁰⁰		4,217.10 ⁰³
P8 4	24/11/2008	35,294	2,903.10 ⁻¹⁰	3,169.10 ⁻¹⁰	6,371.10 ⁰⁰		6,371.10 ⁰³
P8 4	12/12/2008	37,006	5,899.10 ⁻¹¹	2,297.10 ⁻¹¹	1,295.10 ⁰⁰		1,295.10 ⁰³
P8 4	9/01/2009	36,440	8,801.10 ⁻¹¹	3,349.10 ⁻¹¹	1,932.10 ⁰⁰		1,932.10 ⁰³
P8 4	28/01/2009	36,672	7,145.10 ⁻¹¹	1,353.10 ⁻¹¹	1,568.10 ⁰⁰	6,642.10 ⁰⁰	1,568.10 ⁰³
P8 4	15/04/2009	39,231	1,213.10 ⁻¹¹	3,584.10 ⁻¹²	2,661.10 ⁻⁰¹		2,661.10 ⁰²
P8 4	8/06/2009	33,613	6,233.10 ⁻¹⁰	2,215.10 ⁻¹⁰	1,368.10 ⁰¹	6,724.10 ⁰⁰	1,368.10 ⁰⁴
151.1 1	8/06/2009	23,781	5,666.10⁻⁰⁷	4,253.10⁻⁰⁸	1,244.10⁰⁴		1,244.10⁰⁷

Ces résultats sont regroupés par plaque de PCR en temps réel. Les plaques où le PLMVd est quantifié dans les plants inoculés par les variants mutés comportent aussi une quantification absolue du PLMVd dans les feuilles prélevées le 8 juin sur un plant inoculé par le variant 151.1 (cet échantillon sert de référence). Les valeurs principalement interprétées dans ce travail sont les quantités moyennes en nombre de molécules de PLMVd par réaction de PCR en temps réel.

La Figure 19 représente sur une échelle exponentielle l'évolution de la moyenne de ces quantités au cours du temps pour un plant inoculé par le variant 151.1, un plant inoculé par le variant 6A et un plant inoculé par le variant P8.

Figure 19. Graphique représentant l'évolution de la moyenne du nombre de molécules de PLMVd par réaction de PCR en temps réel (échelle exponentielle) au cours du temps pour des plants inoculés par le variant 151.1 (plant n°1), 6A (plant n°3) et P8 (plant n°4).



Ce graphique permet de constater que le titre en PLMVd dans le plant inoculé par le variant P8 était moins élevé que dans le plant inoculé par le variant 6A et qu'il était plus faible dans ce dernier plant que dans le plant inoculé par le variant 151.1. De plus, la plupart des accroissements et des réductions de la quantité en PLMVd/réaction ont coïncidé pour les plants inoculés par les différents variants, au moins jusqu'au prélèvement du 28 janvier. Les moyennes des quantités pour l'ensemble des prélèvements (ou pour les prélèvements jusqu'au 28 janvier) pour chaque variant sont présentées au Tableau 2. Les rapports entre ces moyennes pour le variant 151.1 et les moyennes pour les variants mutés permettent de comparer leurs niveaux d'accumulation. En prenant en compte tous les prélèvements, on a rencontré dans les plants inoculés par le variant 151.1 des titres en PLMVd 80 fois plus élevés que dans ceux inoculés par le variant 6A et 320 fois plus élevés que dans ceux inoculés par le variant P8. En ne prenant en compte que les prélèvements jusqu'au 28 janvier, on a rencontré dans les plants inoculés par le variant 151.1 des titres en PLMVd trois fois plus élevés que dans ceux inoculés par le variant 6A et 13 fois plus élevés que dans ceux inoculés par le variant P8.

Dans le cas des plants inoculés par le variant 151.1, l'analyse de la variance a révélé que la date de prélèvement est un facteur très hautement significatif dans la détermination des quantités en nombre de molécules de PLMVd par réaction (l'analyse statistique est détaillée au point 3.1 des Annexes). La comparaison des moyennes de ces quantités entre elles grâce au test de Fisher a montré qu'elles ne sont pas significativement différentes pour les prélèvements du 7 octobre et du 28 janvier. Par contre, les valeurs pour les autres prélèvements sont toutes significativement différentes entre elles et par rapport aux autres (Tableau 3).

Tableau 3. Comparaison des quantités en nombre de molécules de PLMVd par réaction mesurées dans les plants inoculés par les variants 151.1 (plant n°1), 6A (plant n°3) et P8 (plant n°4). Le dernier prélèvement sur plant inoculé par le variant 151.1 est utilisé comme référence dans les plaques PCR des variants mutés et est marqué en rouge. Les lettres de la dernière colonne correspondent à des groupes de valeurs qui ne sont pas significativement différentes entre elles.

Variant et numéro du plant inoculé	Date de prélèvement	Quantité moyenne (molécules /réaction)	Regroupement de valeurs statistiquement égales
151.1 1	7/10/2008	2,901.10 ⁰¹	B
151.1 1	7/11/2008	1,814.10 ⁰¹	A
151.1 1	24/11/2008	3,005.10 ⁰²	E
151.1 1	12/12/2008	4,837.10 ⁰¹	C
151.1 1	9/01/2009	1,085.10 ⁰²	D
151.1 1	28/01/2009	2,687.10 ⁰¹	B
151.1 1	15/04/2009	5,435.10 ⁰²	F
151.1 1	8/06/2009	1,603.10⁰⁴	R
6A 3	7/11/2008	4,698.10 ⁰¹	J
6A 3	24/11/2008	4,975.10 ⁰¹	J
6A 3	12/12/2008	1,022.10 ⁰¹	H
6A 3	9/01/2009	1,901.10 ⁰¹	I
6A 3	28/01/2009	4,924.10 ⁰⁰	G
6A 3	15/04/2009	5,482.10 ⁰¹	J
6A 3	8/06/2009	3,671.10 ⁰⁰	G
151.1 1	8/06/2009	3,355.10⁰⁴	R
P8 4	7/10/2008	2,447.10 ⁰¹	L
P8 4	7/11/2008	4,217.10 ⁰⁰	L
P8 4	24/11/2008	6,371.10 ⁰⁰	L
P8 4	12/12/2008	1,295.10 ⁰⁰	L
P8 4	9/01/2009	1,932.10 ⁰⁰	L
P8 4	28/01/2009	1,568.10 ⁰⁰	L
P8 4	15/04/2009	2,661.10 ⁻⁰¹	K
P8 4	8/06/2009	1,368.10 ⁰¹	M
151.1 1	8/06/2009	1,244.10⁰⁴	R

L'analyse de la variance des résultats de la plaque de PCR en temps réel qui concerne le variant 6A (voir Annexes point 3.2) indiquent aussi que la date de prélèvement est un facteur très hautement significatif dans la détermination des quantités en nombre de molécules de PLMVd par réaction. Les moyennes de ces quantités dans les plants inoculés par le variant 6A sont comparées d'une part au titre du jus brut de référence (à l'aide du test de Dunnett) et d'autre par entre elles (grâce au test de Fisher). Le test de Dunnett révèle que ces valeurs mesurées à différentes dates dans les plants inoculés par le variant 6A sont toujours significativement inférieures au titre du jus brut de référence (151.1). En comparant les valeurs mesurées dans les plants inoculés par le variant 6A entre elles par le test de Fisher, celles-ci peuvent être regroupées. Les titres rencontrés le 7 novembre, le 24 novembre et le 15 avril ne sont pas significativement différents. Il n'y a pas non plus de différences significatives entre les prélèvements du 28 janvier et du 8 juin (Tableau 3). Les valeurs obtenues au cours des autres prélèvements sont significativement différentes entre elles et par rapport aux autres (Tableau 3).

En utilisant la même démarche que pour le variant 6A, nous avons constaté que la date de prélèvement est un facteur significatif dans la détermination des quantités en PLMVd pour les plants inoculés par le variant P8 (voir Annexes point 3.3). Ces titres obtenus entre octobre 2008 et juin 2009 sont significativement inférieurs au titre du jus brut de référence (151.1). Contrairement à ce qui a été constaté pour le variant 6A, les différences qui existent entre les quantités mesurées pour les plants inoculés par le variant P8 ne sont généralement pas significatives. Les seules différences significatives sont rencontrées entre d'une part le prélèvement du 15 avril et d'autre part les prélèvements du 7 octobre, du 7 novembre et du 24 novembre ou entre d'une part le prélèvement du 8 juin et d'autre part ceux du 12 décembre, du 28 janvier et du 15 avril (Tableau 3).

La PCR en temps réel a aussi été utilisée afin de déterminer si, pour un même plant infecté par le variant 151.1, la quantité de PLMVd dans une feuille symptomatique était différente de celle contenue dans une feuille asymptomatique. Le Tableau 4 présente les résultats obtenus lors des quantifications absolues du PLMVd par PCR en temps réel dans des feuilles symptomatiques ou asymptomatiques issues de mêmes plants inoculés par le variant 151.1 (plants n°1 et 5). Les valeurs moyennes de C_T et de quantités absolues présentées dans ce tableau sont calculées à partir des trois répétitions de réaction réalisées pour chaque échantillon.

Tableau 4. Quantification absolue du PLMVd par PCR en temps réel dans des feuilles symptomatiques ou asymptomatiques issues de mêmes plants inoculés par le variant 151.1 (plants n°1 et 5).

Variant et numéro du plant inoculé	Date de prélèvement	Phénotype des feuilles	Quantité moyenne (ng/réaction)	Ecart-type (ng/réaction)	Quantité moyenne (molécules /réaction)	Approximation de la quantité moyenne (molécules/mg de feuille)
151.1 5	24/11/2008	asymptomatique	1,973.10 ⁻⁰⁹	2,251.10 ⁻¹⁰	4,330.10 ⁰¹	4,330.10 ⁰⁴
		symptomatique	6,325.10 ⁻¹⁰	4,172.10 ⁻¹⁰	1,388.10 ⁰¹	1,388.10 ⁰⁴
	9/01/2009	asymptomatique	1,765.10 ⁻¹⁰	2,379.10 ⁻¹⁰	3,874.10 ⁰⁰	3,874.10 ⁰³
		symptomatique	1,364.10 ⁻⁰⁹	6,509.10 ⁻¹⁰	2,994.10 ⁰¹	2,994.10 ⁰⁴
151.1 1	24/11/2008	asymptomatique	2,482.10 ⁻¹⁰	2,276.10 ⁻¹⁰	5,448.10 ⁰⁰	5,448.10 ⁰³
		symptomatique	3,679.10 ⁻⁰⁷	3,503.10 ⁻⁰⁸	8,075.10 ⁰³	8,075.10 ⁰⁶

Les valeurs principalement interprétées dans ce travail sont les quantités moyennes en nombre de molécules de PLMVd par réaction. L'analyse de la variance décrite au point 3.4 des Annexes a permis de déterminer l'importance de l'impact des facteurs de l'expérimentation sur les valeurs obtenues. Nous avons constaté que ces mesures réalisées sur différents plants (plants n°1 et 5) et à partir d'échantillons récoltés à des dates différentes (le 24 novembre et le 9 janvier) ne peuvent pas être regroupées selon le phénotype des feuilles (asymptomatique ou symptomatique) car les facteurs « plant inoculé » et « date de prélèvement » interagissent très hautement significativement avec le facteur « phénotype ». Les résultats ont donc été comparés séparément pour chaque plant inoculé et pour chaque date de prélèvement à l'aide du test T de Student (test d'égalité de deux moyennes). Ils ont tout d'abord révélé que la quantité en nombre de molécules de PLMVd par réaction n'est pas significativement différente dans les feuilles asymptomatiques par rapport aux feuilles symptomatiques pour le prélèvement du 24 novembre sur le plant n°5. Ensuite, la quantité n'est pas non plus significativement différente dans les feuilles asymptomatiques et dans les feuilles symptomatiques pour le prélèvement du 9 janvier sur le plant n°5. Enfin, la quantité

est significativement inférieure dans les feuilles asymptomatiques par rapport aux feuilles symptomatiques pour le prélèvement du 24 novembre sur le plant n°1. Ces résultats divergent et aucune règle générale ne peut en être tirée car l'analyse ne comporte pas assez de données.

2.3. Discussion

2.3.1. Variant 151.1

La RT-PCR a révélé que 55% des plants inoculés par le variant 151.1 étaient infectés six mois à un an après inoculation. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu lors des campagnes de détection menées par PARISI en 2006 au cours desquelles le PLMVd avait été détecté dans 75% des plants 10 mois après leur inoculation par des dimères d'ARN de ce variant. Ces plants positifs ont donc pu être utilisés comme témoins positifs et base de comparaison. Dans la littérature, 93% des plants inoculés par dimères d'ARN sont infectés neuf à dix mois après inoculation (AMBRÓS *et al.*, 1998), il est possible que l'infection après inoculation mécanique par le variant 151.1 soit plus difficile à réussir que celle par d'autres variants. Il faut aussi garder à l'esprit que de la variabilité apparaît rapidement dans la descendance des variants du PLMVd et peut amener à la prédominance d'un variant différent de celui inoculé (AMBRÓS *et al.*, 1999).

Les résultats de la quantification par PCR en temps réel ont révélé que, au cours des mois de l'infection, la quantité en PLMVd dans les plants inoculés par le variant 151.1 n'est pas restée constante. Une tendance d'évolution du titre en PLMVd au cours des mois a pu être constatée. Début octobre, la quantité était de 29 molécules de PLMVd/réaction (ce qui, selon nos estimations, équivaut à $2,901 \cdot 10^4$ molécules de PLMVd/mg de feuille). Une augmentation du titre a eu lieu jusqu'à atteindre 301 molécules de PLMVd/mg de feuille (approximativement $3,005 \cdot 10^5$ molécules/mg de feuille) en fin novembre. Il s'en est suivi une baisse du titre jusqu'à 27 molécules/réaction ($2,687 \cdot 10^4$ molécules/mg de feuille) en janvier. Une nouvelle augmentation du titre a amené la quantité à 16030 molécules/réaction ($1,603 \cdot 10^7$ molécules/mg de feuille) en juin.

Cette progression au cours des mois semble suivre l'évolution des conditions de croissance des plants de pêcher. En effet, la baisse du titre en PLMVd constatée entre le 24 novembre et le 28 janvier peut être mise en relation avec la baisse des conditions de luminosité et de température (période hivernale) qui a entraîné une croissance réduite des plants de pêcher. De même, l'augmentation du titre en PLMVd observé entre le 28 janvier et le 6 juin peut découler d'une amélioration des conditions de luminosité et de température (période printanière) associée à une croissance accélérée des plants. Il est d'ailleurs avéré que le PLMVd se réplique le plus rapidement lorsque la plante hôte est en croissance particulièrement active (Singh *et al.*, 2003).

Seul, le taux de croissance de la plante ne peut expliquer la réduction du titre en PLMVd au cours de l'hiver. Deux hypothèses pourraient expliquer ce phénomène. La première hypothèse se base sur l'occurrence du phénomène de *RNA silencing* constatée dans les tissus des plants de pêcher infectés par le PLMVd (ST-PIERRE *et al.*, 2009). Les siRNAs générés par le PLMVd peuvent amener à la dégradation d'une partie des molécules du viroïde lui-même via l'action du *dicer* et du RISC. Dans ce cas, une partie des molécules du PLMVd pourraient

probablement échapper au *RNA silencing* grâce à leur localisation subcellulaire ou via un autre mécanisme non encore connu (LANDRY *et al.*, 2004). Le *RNA silencing* pourrait participer à la dégradation du PLMVd tout au long de l'infection mais être compensé par la réplication importante du viroïde lorsque la plante hôte est en croissance active.

Un autre élément qui pourrait être responsable de la diminution du titre en PLMVd au cours de l'hiver est l'hétérogénéité de la répartition du PLMVd dans la plante. En effet, de nouvelles feuilles apparaissent régulièrement entre deux prélèvements tandis que d'anciennes feuilles peuvent se flétrir et tomber. Les jeunes feuilles sont asymptomatiques ou présentent des symptômes réduits. Certaines de ces nouvelles feuilles ont été intégrées dans les prélèvements. Dans l'éventualité où la répartition du PLMVd entre feuilles anciennes et nouvelles (symptomatiques et asymptomatiques) est inégale, le titre en PLMVd s'en trouve au final plus dilué dans le jus brut au fur et à mesure que l'échantillon se compose de jeunes feuilles. C'est pour appréhender ce phénomène que le PLMVd a été quantifié dans des échantillons issus de feuilles symptomatiques et asymptomatiques broyées séparément. Comme il sera décrit au point 2.3.3, il semble que la répartition du PLMVd soit hétérogène entre feuilles symptomatiques et asymptomatiques mais que l'impact de ce phénomène sur les résultats soit faible.

Les trois hypothèses que nous avons développées ci-dessus permettent d'expliquer à la fois la diminution du titre en viroïde au cours de l'hiver ainsi que son augmentation durant les mois d'été. La croissance active du plant et donc l'importante réplication du PLMVd dans toutes les feuilles (jeunes ou anciennes) contrebalancerait le *RNA silencing* à partir du mois de février. De plus, l'expérience de l'Unité de Phytopathologie dans l'étude du PLMVd a montré que cette variation du titre en PLMVd se reproduit de saison en saison. Enfin, nous ne pouvons exclure l'éventuelle participation de phénomènes encore inconnus dans l'évolution du titre en viroïde, tels que l'interaction du PLMVd avec des protéines spécifiques.

2.3.2. Variants mutés

Dans le cas des plants inoculés par le variant 6A et le variant P8, la RT-PCR n'a pas révélé la présence du PLMVd. La fiabilité et la reproductibilité de ce test par RT-PCR ayant été démontrée (FEKIH HASSEN *et al.*, 2006), nous aurions pu en conclure que les plants n'étaient pas infectés par le PLMVd.

Cependant, dans l'hypothèse d'une accumulation de PLMVd dans les tissus qui soit trop faible pour être détectable par RT-PCR, la PCR en temps réel (dont la sensibilité est plus élevée) a été utilisée sur des jus bruts extraits de certains de ces plants. Dans les plants inoculés par le variant 6A, des quantités allant de 4 molécules de PLMVd/réaction (ce qui donne, selon nos estimations, $3,671.10^3$ molécules/mg de feuille) à 55 molécules/réaction ($5,482.10^4$ molécules/mg de feuille) ont été mesurées. Ces quantités sont significativement inférieures à celles présentes dans le jus brut de référence (151.1). La tendance observée est que les quantités en PLMVd mesurées pour les plants inoculés par le variant 6A sont généralement plus faibles (au même moment) que les quantités mesurées pour les plants inoculés par le variant de référence (151.1). L'évolution au cours des mois du titre en PLMVd dans les plants inoculés par le variant 6A suit la progression décrite précédemment pour le variant 151.1 en étant trois fois moindre en moyenne (pour les cinq premiers mois). Seule la

dernière valeur mesurée (le 6 juin) dévie fortement de cette progression : dans les plants inoculés par le variant 6A, le PLMVd est présent en quantité 9100 fois moindre que dans les plants inoculés par le variant 151.1 à cette même date.

Dans les plants inoculés par le variant P8, des quantités allant d'une molécule par réaction ($2,661.10^2$ molécules de PLMVd/mg de feuille) à 24 molécules/réaction ($2,447.10^4$ molécules/mg de feuille) ont été mesurées. Cependant, certaines de ces valeurs sont probablement imprécises étant donné qu'elles sont très faibles. Ces quantités sont significativement inférieures à celles présentes dans le jus brut de référence (151.1). Les quantités mesurées pour les plants inoculés par le variant P8 sont généralement beaucoup plus faibles (au même moment) que les quantités mesurées pour les plants inoculés par le variant de référence (151.1). La progression du titre en PLMVd dans les plants inoculés par le variant P8 au cours des mois suit lui aussi la progression décrite précédemment pour le variant 151.1 en étant en moyenne 13 fois moindre. Les deux dernières valeurs mesurées (le 15 avril et le 6 juin) dévient fortement de cette progression : la quantité mesurée est 900 fois moindre le 6 juin dans le cas d'une inoculation par le variant P8 par rapport à une inoculation par le variant 151.1.

Ces résultats de PCR en temps réel mettent en avant la présence d'un ou plusieurs variants du PLMVd dans les tissus des plants inoculés en juin par les variants mutés 6A et P8. Ces quantités sont très faibles, elles se situent en dessous du seuil de détection de la RT-PCR classique. La quantité initiale en PLMVd mesurée est probablement équivalente au premier prélèvement pour les plants inoculés par les différents variants. Ensuite, cette quantité diverge au cours des mois. Pourtant, la tendance d'évolution du titre en PLMVd pour les variants mutés suit celle du variant 151.1 et pourrait être expliquée de la même façon qu'au point précédent. Quoiqu'il en soit, on constate que non seulement le PLMVd est présent dans les plants inoculés par les variants mutés mais qu'il est actif et se réplique. Ceci montre la limite du test de détection par RT-PCR classique. Ces résultats seront mis en rapport avec les symptômes observés et les caractéristiques des mutations elles-mêmes au point 4.

2.3.3. Feuilles symptomatiques et asymptomatiques

Dans un premier temps, en accord avec la littérature, tous les prélèvements réalisés au cours du présent travail ont résulté du choix aléatoire d'un certain nombre de feuilles asymptomatiques et symptomatiques lorsque les deux phénotypes étaient présents sur un même plant. Lors de la pesée, si la masse de feuilles prélevées était trop élevée, des morceaux de feuilles étaient éliminés plutôt que des feuilles entières (afin de conserver la diversité du prélèvement).

Pourtant, certains prélèvements ont comporté très peu de feuilles et/ou ont comporté de plus en plus de nouvelles feuilles peu symptomatiques et de moins en moins d'anciennes feuilles symptomatiques (comme décrit au point 2.3.1). Il était donc nécessaire de réaliser un test pour vérifier si la répartition du PLMVd est homogène entre les feuilles de pêcher ou si ce facteur d'hétérogénéité est à prendre en compte dans l'interprétation des résultats. La PCR en temps réel a permis de quantifier le PLMVd dans différentes feuilles issues de prélèvements sur des mêmes plants inoculés par le variant 151.1.

Les résultats de ce test nous portent à croire que le titre en PLMVd est différent dans une feuille symptomatique ou asymptomatique d'un même plant inoculé par le variant 151.1. Ces valeurs sont elles-mêmes différentes des quantités mesurées dans les extraits composés par broyage de feuilles sélectionnées aléatoirement sur un même plant (feuilles symptomatiques et asymptomatiques), c'est-à-dire les valeurs présentées au Tableau 2 (page 50). Pourtant, aucune règle générale n'est observée si l'on réalise des comparaisons séparément pour les plants et les dates de prélèvement testés : des feuilles asymptomatiques peuvent contenir un titre en PLMVd trois fois plus élevé ou 1500 fois plus faible que les feuilles symptomatiques.

L'hypothèse initiale de répartition du viroïde – l'homogénéité des titres entre toutes les feuilles d'un même plant infecté – reposait sur le fait qu'il s'agit d'une infection systémique et que le PLMVd est réparti de façon homogène entre les différents organes de la plante (GORA-SOCHACKA, 2004 ; FLORES *et al.*, 2006a). Selon nos résultats, cette hypothèse doit être nuancée. La précaution qui consiste à sélectionner aléatoirement les feuilles prélevées apparaît comme importante afin que l'échantillon soit suffisamment représentatif de la population des feuilles étudiées. Il n'aurait pas été possible de prélever des échantillons plus grands parmi ces populations vu le nombre réduit de feuilles présentes sur les plants de pêcher. Enfin, cette constatation est une hypothèse qui pourrait mener vers une standardisation des tests de certification.

Des observations semblables ont été réalisées chez d'autres espèces de viroïdes et divers phénomènes pourraient expliquer cette hétérogénéité de répartition du PLMVd. Comme décrit au point 2.5.2.1 de la Synthèse bibliographique, le titre en ASBVd est plus élevé dans les tissus décolorés (symptomatiques) d'une feuille atteinte par un variant sévère que dans les tissus verts (asymptomatiques). Dans l'hypothèse où les symptômes qui apparaissent dans un tissu découlent du PTGS, une quantité plus élevée en viroïde dans ce tissu (qui génère plus de siRNAs) stimulerait plus fortement et plus rapidement le PTGS ainsi que l'apparition de symptômes (MARKARIAN *et al.*, 2004).

Par contre, les siRNAs produits entraînent aussi la dégradation du viroïde, réduisant sa concentration dans les tissus, la corrélation entre les titres en ces deux types de molécules devrait alors être inverse. De plus, les siRNAs peuvent se déplacer de cellule en cellule et limiter l'expansion du viroïde dans la plante (TABLER *et al.*, 2004 ; FLORES *et al.*, 2006a). Si les siRNAs sont déjà présents dans la nouvelle feuille ou que le SAR y a induit une réponse, son infestation par le viroïde est peut-être ralentie ou empêchée.

Dans le cadre du présent travail, l'hétérogénéité de répartition du PLMVd doit donc être considérée comme un facteur qui entre en compte dans la quantité en viroïde mesurée au même titre que le taux de réplication du viroïde et l'effet probable du *RNA silencing*. Pourtant, ce facteur ne semble pas avoir introduit un biais important. Tout d'abord, les feuilles ont été prélevées aléatoirement et le résultat (quantité absolue) obtenu est une moyenne pour le prélèvement qui se rapproche de la moyenne pour le plant. Ensuite, le résultat de l'analyse semble peu influencé si l'échantillon comporte des feuilles à haut et à bas titre en viroïde (les rapports entre quantités pour les différents variants obtenus dans ce travail sont plutôt de l'ordre de la dizaine ou de la centaine). Par contre, si un prélèvement ne contient que des feuilles à titre faible en viroïde, le plant peut être déclaré non infecté à tort. Enfin, les

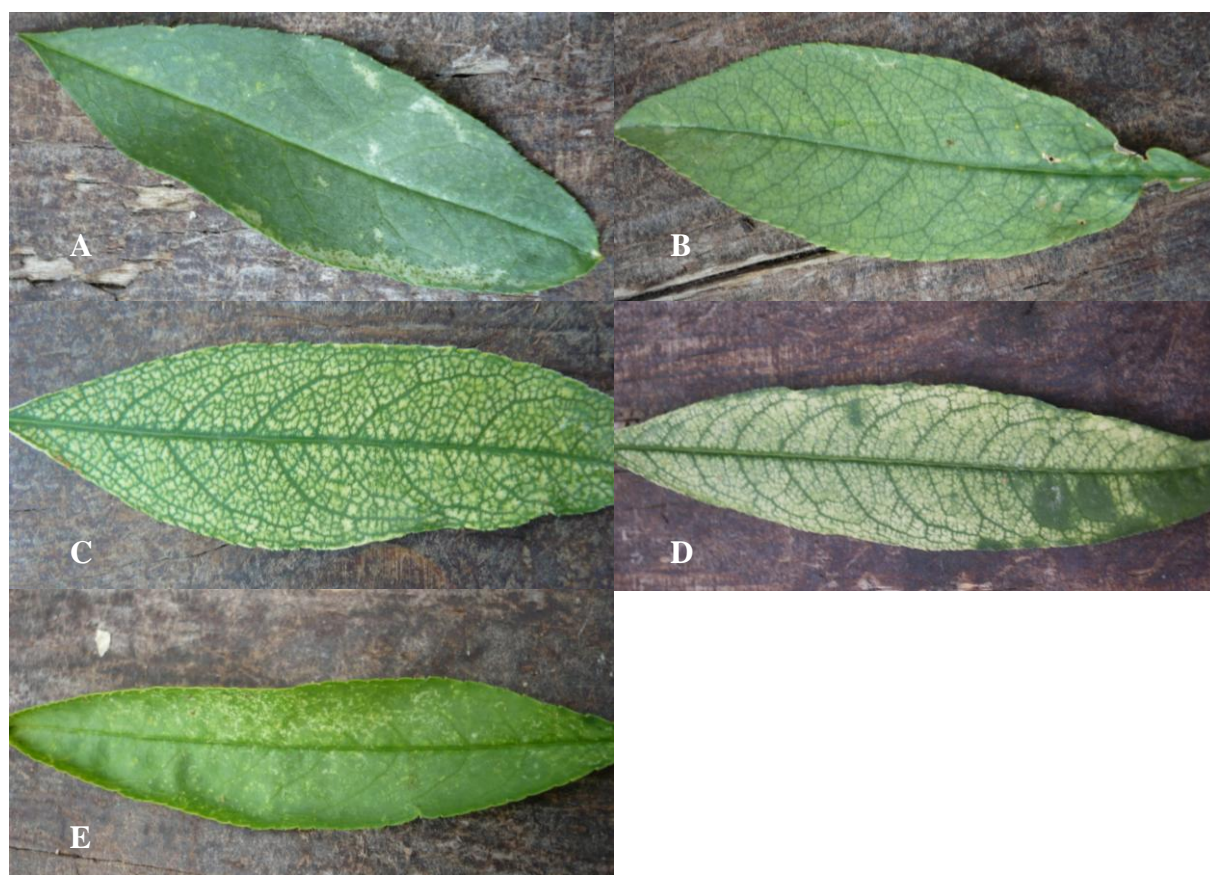
tendances d'évolution observées pour les titres en PLMVd mesurés pour les plants inoculés par les différents variants coïncident alors qu'ils découlent de prélèvements et d'analyses tout à fait distincts.

3. Caractérisation de la pathogénicité

3.1. Observation du phénotype des feuilles

L'intensité des symptômes présents sur les feuilles de pêcher prélevées a été observée. Les principaux phénotypes répertoriés dans notre expérience ont été : le phénotype asymptomatique, la mosaïque légère, la mosaïque sévère, la chlorose et l'affection par les acariens (Figure 20).

Figure 20. Photos de feuilles de pêcher présentant des symptômes caractéristiques : A) phénotype asymptomatique B) mosaïque légère C) mosaïque sévère D) chlorose E) affection par les acariens



La description du phénotype des plants inoculés par les variants 151.1, 6A et P8 est basé sur l'état des feuilles prélevées à différents moments entre octobre 2008 et juin 2009. Les phénotypes prédominants observés sont présentés dans le Tableau 5. Une certaine variabilité dans l'intensité des symptômes a été constatée entre différentes feuilles d'un même plant et entre les feuilles de plants inoculés par un même variant ou par différents variants. De plus, les symptômes provoqués par les acariens ont pu partiellement masquer les symptômes dus au PLMVd.

Tableau 5. Phénotypes prédominants des plants inoculés par différents variants du PLMVd, observés au cours de l'infection. Le rouge correspond à la surimposition de symptômes provoqués par les acariens sur les autres symptômes potentiels.

Date d'observation	Variant 151.1	Variant 6A	Variant P8
6/10/2008	mosaïque sévère	(non observé)	mosaïque sévère
7/11/2008	mosaïque légère	mosaïque légère	mosaïque légère
24/11/2008	mosaïque sévère	mosaïque sévère	mosaïque sévère
12/12/2008	mosaïque sévère	mosaïque sévère	mosaïque sévère
9/01/2009	mosaïque sévère	mosaïque sévère	mosaïque légère
28/01/2009	mosaïque sévère	mosaïque sévère	mosaïque légère
15/04/2009	mosaïque légère	asymptomatique	asymptomatique
8/06/2009	mosaïque légère	mosaïque légère	asymptomatique
24/06/2009	mosaïque légère	mosaïque légère	mosaïque légère

La tendance d'évolution du phénotype des plants inoculés par les trois variants du PLMVd est une réduction de l'intensité des symptômes.

3.2. Discussion

Entre octobre et janvier, le phénotype prédominant des plants inoculés par les variants 151.1, 6A et P8 est le symptôme de mosaïque sévère. De janvier à juin, ces plants présentent plutôt une mosaïque légère voire l'absence de symptômes. Ces symptômes ont probablement été causés par le PLMVd. En effet, les plants de pêcher utilisés étaient sains avant leur inoculation. L'infection des plants par un virus est improbable vu l'éloignement de ces plants par rapport aux cultures de pêcher et vu l'absence d'insecte vecteur constatée. Il est peu probable qu'ils aient subi un stress hydrique, un stress à la chaleur, au froid ou une carence. Pourtant, ces plants étaient en état de stress physiologique car ils n'ont pas subi d'hivernage et ont été maintenus en pleine croissance pendant deux ans. Enfin, le pêcher n'est pas particulièrement adapté à la culture sous serre.

Le variant 151.1 utilisé dans ce travail avait été sélectionné pour son caractère sévère parmi une série de variants jamais décrits auparavant dans la littérature et dont la pathogénicité a été analysée par FEKIH HASSEN (2007b) et PARISI (2006). En plus, la variété de pêcher GF-305 est connue pour être très sensible à l'infection par le PLMVd, permettant le développement rapide de symptômes (apparition après 8 à 12 semaines) (AMBRÓS *et al.*, 1998 ; FLORES *et al.*, 2006a). Malgré cela, l'expérimentation a été menée sur une période d'un an seulement, ce qui a laissé peu de temps au viroïde pour se répliquer et se propager dans la plante entière.

Au cours de cette expérimentation, divers facteurs non contrôlés ont pu avoir un impact sur les plants de pêcher. Les conditions de température de la culture en serre n'ont pas toujours été optimales et ont varié. Le PLMVd se réplique rapidement lorsque la température est supérieure à 20°C, ce qui a été le cas durant la majeure partie de l'expérimentation (Singh *et al.*, 2003). En juin, de nombreuses feuilles ont affiché des symptômes dus à la présence d'acariens (parfois en surimposition des autres symptômes), il s'agissait de décolorations ponctuelles allant vers le jaune et de points noirs. Ces symptômes, même si ils étaient facilement discernables de la mosaïque, ont pu masquer les chloroses ou les mosaïques dues au PLMVd.

Comme constaté au cours des campagnes de détection menées par PARISI (2006), la méthode d'inoculation utilisée semble efficace et le variant 151.1 induit des symptômes de mosaïque ou de chlorose.

La répartition des symptômes entre les feuilles est hétérogène. Sur un même plant, certaines feuilles sont chlorotiques et d'autres non alors que l'infection est connue pour être systémique et le viroïde pour être présent dans toute la plante de façon uniforme (AMBRÓS *et al.*, 1998). Cette hétérogénéité est difficile à mettre en relation avec la nature systémique des siRNAs (TABLER *et al.*, 2004). Cette variabilité d'expression de symptômes entre les feuilles d'un même plant de pêcher avait déjà été mise en évidence par PARISI (2006).

Pour expliquer la tendance d'évolution du phénotype, il faut prendre en compte le fait que le nombre de feuilles présentant des symptômes sévères a diminué au fil des prélèvements et qu'elles ont été remplacées par des nouvelles feuilles légèrement symptomatiques ou asymptomatiques. A partir des observations réalisées, on peut déduire la présence de symptômes sévères quelques mois après l'inoculation de chacun des trois variants inoculés et la moindre incidence des symptômes sur des nouvelles feuilles apparues au printemps. Ces conclusions concernant la pathogénicité seront mises en relation avec celles concernant la réplication au point 4.

4. Discussion concernant les mutations

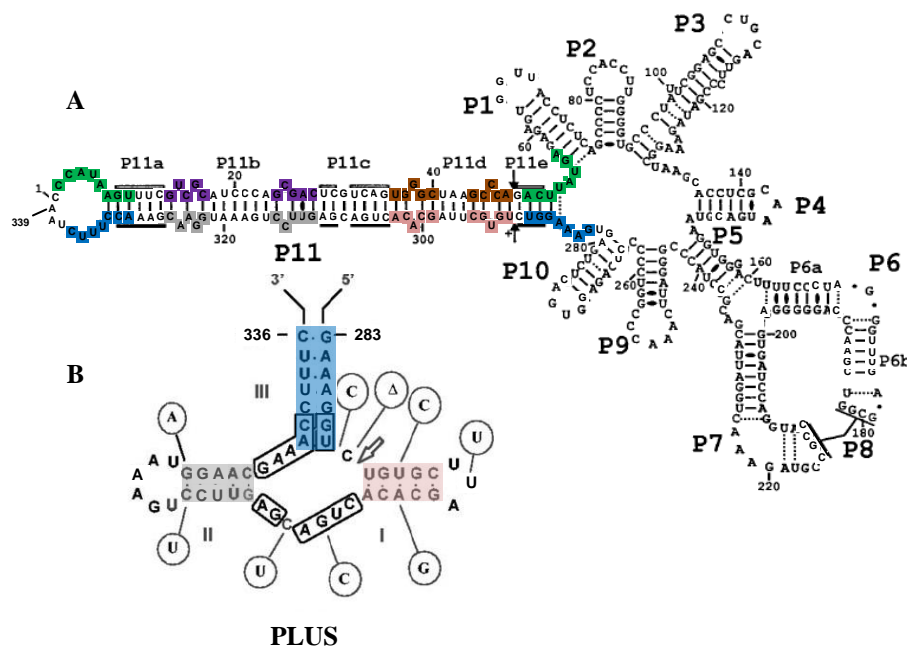
La structure secondaire des viroïdes est prédite via des logiciels informatiques ou par cartographie à l'aide de nucléases. A partir de là, des relations hypothétiques entre structures et fonctions peuvent être proposées. Pour se rapprocher de la réalité, il faudrait pouvoir caractériser les structures adoptées *in vitro* et *in vivo* (BUSSIÈRE *et al.*, 2000).

Pour établir le lien entre un élément de structure du viroïde et une fonction spécifique dans sa réplication *in vivo* ou dans son interaction avec l'hôte, plusieurs preuves doivent être apportées. Tout d'abord, il faut démontrer que le motif structural concerné se forme bien *in vivo*. Ensuite, la réversion d'une mutation vers le type sauvage n'est pas une preuve directe du rôle de la structure d'ARN touchée dans un processus biologique du ou des nucléotides impliqués. Il en va de même en ce qui concerne des mutations apportant une ou des fonctions. Par contre, le rôle d'un élément peut être démontré par des mutations qui amènent à des pertes de fonction (ZHONG *et al.*, 2006). Enfin, l'étude de plants dans leur ensemble ne suffit pas à révéler si la cause du caractère non infectieux d'un variant muté provient d'une étape défailante du cycle de réplication (par exemple, l'auto-clivage) ou du fait que son transit intra- ou extracellulaire n'a pas eu lieu. Pour apporter ces preuves, des approches génétiques, structurales, biochimiques, cellulaires et moléculaires doivent être intégrées. C'est ainsi que ZHONG *et al.*, (2006) ont démontré que l'intégrité d'un élément structural du PSTVd (la boucle E) est essentielle pour la réplication de ce viroïde.

Pour réaliser des altérations génétiques dans la molécule d'ARN du viroïde, il est nécessaire de comprendre sa structure tertiaire et les effets que la mutation aurait sur cette structure. Si la structure secondaire est maintenant bien connue, beaucoup d'incertitudes persistent concernant la structure tertiaire (ZHONG *et al.*, 2006).

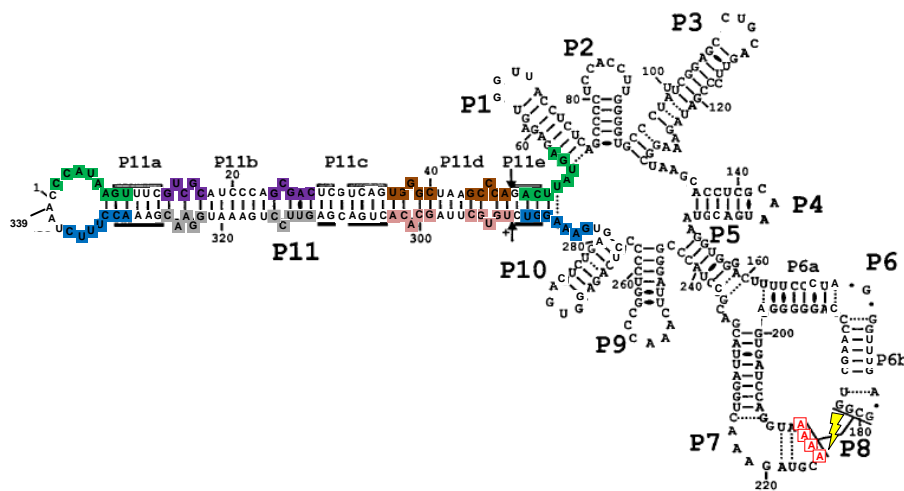
Les mutations appliquées ont consisté à déstabiliser le pseudo-nœud P8 et à modifier la région du ribozyme impliquée dans l'auto-clivage du viroïde, elles ont été décrites dans le point 1.2 du Matériel et méthodes. La structure secondaire et la séquence de l'ARN de polarité positive du variant 151.1 ainsi que la structure adoptée par son ribozyme en tête de marteau sont représentées dans la Figure 21.

Figure 21. (A) Structure secondaire et séquence de l'ARN de polarité positive du variant 151.1 du PLMVd et (B) structure adoptée par son ribozyme en tête de marteau de polarité positive. Les nucléotides colorés dans la tige P11 s'apparient aux nucléotides de la même couleur lors de la formation du ribozyme en tête de marteau. Les flèches indiquent les sites d'auto-clivage prédits. Les résidus encadrés en noir constituent le cœur catalytique conservé dans toutes les structures en tête de marteau et dans des positions similaires (MALFITANO *et al.*, 2003).



La Figure 22 présente l'emplacement des mutations réalisées dans la tige P8 du variant 151.1 pour obtenir le variant muté P8.

Figure 22. Structure secondaire et séquence de l'ARN de polarité positive du variant 151.1 muté au niveau de la tige P8 (variant P8). Les nucléotides mutés sont marqués en rouge.



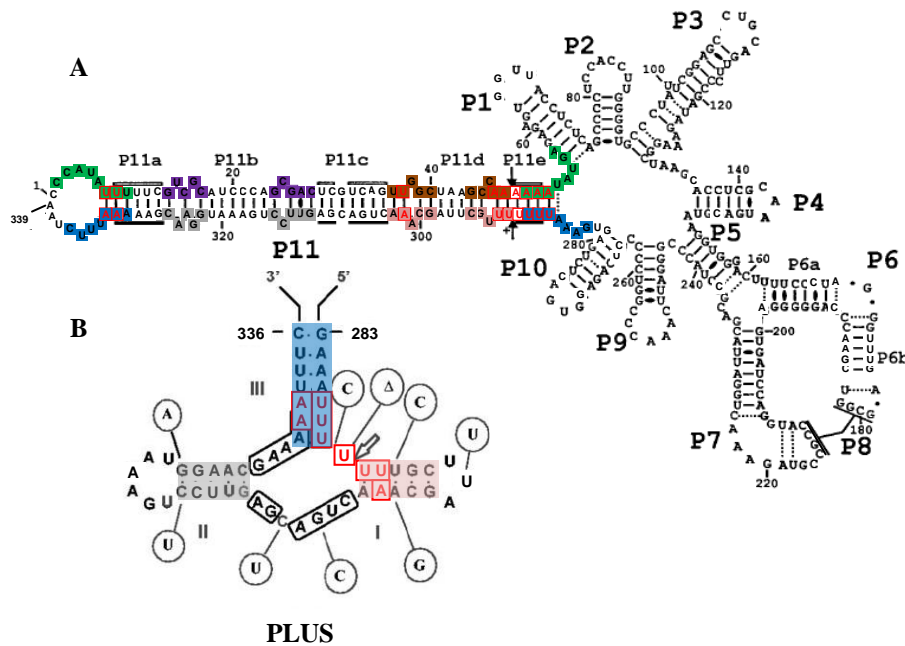
Comme décrit au point 2.3.2, la quantité en PLMVd mesurée dans les plants inoculés par le variant P8 est bien plus faible que celle mesurée lorsque le plant a été inoculé par le variant 151.1 mais on observe toujours une réplication. De plus, des symptômes apparaissent sur le plant et s'atténuent une année après l'inoculation (point 3.2).

BUSSIÈRE *et al.* (2000) ont démontré par cartographie à l'aide de nucléases que le pseudo-nœud P8 ne se forme pas *in vitro* lorsque les nucléotides $_{212}CCGC_{215}$ sont remplacés par quatre adénines. De plus, ces mutations n'affectent pas significativement les autres appariements de nucléotides qui ont lieu dans la molécule du PLMVd. Le pseudo-nœud P8 semble participer à la stabilité de la molécule du PLMVd non mutée en la rendant plus compacte. Il est probable que ce rôle soit la cause de la conservation de cette structure. Le présent travail semble confirmer indirectement la formation du pseudo-nœud *in vivo* dans les variants naturels du PLMVd.

L'impossibilité de ce repliement a pu rendre la molécule instable et/ou vulnérable à la dégradation par des RNases de l'hôte. Dans l'hypothèse d'un lien avec le *RNA silencing*, le profil en siRNAs généré par le viroïde a pu être légèrement modifié par la présence des mutations. Des siRNAs capables d'induire des symptômes sur la plante hôte ont peut-être été générés dans un premier temps à partir du variant inoculé. Il est possible qu'ensuite un ou plusieurs autres variants soient apparus par mutation à partir du variant P8 vu la grande variabilité qui peut être générée dans la descendance d'un variant du PLMVd (AMBRÓS *et al.*, 1999). Le « pouvoir pathogène » des siRNAs produits par la suite à partir de ces nouveaux variants s'est peut-être révélé moins important, limitant la sévérité des symptômes. Une interaction hypothétique entre le pseudo-nœud et des protéines ou des gènes de l'hôte a pu également être affectée par la disparition de la structure. Malheureusement aucune donnée concernant une telle interaction n'est actuellement disponible dans la littérature concernant les viroïdes.

Les mutations caractéristiques du variant 6A sont illustrées par la Figure 23.

Figure 23. (A) Structure secondaire et séquence de l'ARN de polarité positive du variant 151.1 muté dans la région du ribozyme (variant 6A) et (B) structure adoptée par son ribozyme en tête de marteau de polarité positive dans le variant 6A. Les nucléotides colorés dans la tige P11 s'apparient aux nucléotides de la même couleur lors de la formation du ribozyme en tête de marteau. Les nucléotides mutés sont marqués en rouge. Les flèches indiquent les sites d'auto-clivage prédits. Les résidus encadrés en noir constituent le cœur catalytique conservé dans toutes les structures en tête de marteau et dans des positions similaires (MALFITANO *et al.*, 2003).



Comme décrit au point 2.3.2, la quantité en PLMVd mesurée dans les plants inoculés par le variant 6A est plus faible que celle mesurée lorsque le plant a été inoculé par le variant 151.1 et on observe une réplication. De plus, des symptômes apparaissent sur le plant et s'atténuent une année après l'inoculation (point 3.2).

Dans la partie supérieure de la tige P11 de polarité positive, la séquence $_{47}CAGACG_{52}$ a été remplacée par $_{47}AAAAAA_{52}$, d'autres mutations ont été réalisées dans la partie supérieure de cette tige avec pour objectif de compenser la modification $_{47}AAAAAA_{52}$ de façon à conserver la structure du ribozyme en tête de marteau (son cœur catalytique). Des mutations homologues (telles le remplacement de $_{287}CGUCUG_{292}$ par $_{287}UUUUUU_{292}$) ont aussi été réalisées dans la partie inférieure de la tige P11 afin de maintenir son appariement avec la partie supérieure. C'est la partie inférieure de la tige P11 qui se replie en tête de marteau pour auto-cliver le PLMVd de polarité positive (ces structures sont représentées à la Figure 23) et c'est donc l'effet des substitutions de $_{287}CGUCUG_{292}$ par $_{287}UUUUUU_{292}$ qui nous intéresse.

Les structures de polarité négative ne sont pas représentées ici car les mutations y occupent la même place que dans les structures de polarité positive. En effet, les motifs du ribozyme se retrouvent alors sur la partie supérieure de la tige P11 ainsi que la substitution UUUUUU. Les structures en tête de marteau négative et positive sont très semblables pour ce qui est des nucléotides mutés : seule la paire de bases U_7-A_{52} dans la polarité négative est différente de la paire de bases $C_{332}-G_{287}$ correspondante dans la polarité positive. En effet, la séquence du cœur catalytique de la structure ribozyme en tête de marteau est fort conservée.

VOROBEVA *et al.* (2008) ont réalisé des modifications dans la région non conservée de la séquence des motifs en tête de marteau *trans* et ont observé que son activité de ligation était significativement affecté par ces mutations. Ils ont observé une augmentation de 10X du taux de ligation ainsi qu'une augmentation du taux de clivage après avoir ajouté un renflement de huit nucléotides à la tige III du ribozyme. Ce type de modifications pourrait stabiliser le complexe formé entre les différentes parties du ribozyme. L'ajout de ce renflement dans la tige I a par contre réduit les taux d'auto-clivage et de ligation. Si cette modification est placée à au moins six nucléotides du site d'auto-clivage, elle n'a pas d'effet. Si les tiges sont plus longues, le ribozyme semble mettre plus de temps pour passer à sa forme active, ce qui amène à un moindre clivage.

RUFFNER *et al.* (1990) ont mené une étude où ils ont mesuré le taux de clivage du ribozyme pour chaque nucléotide conservé ou semi-conservé qu'ils ont modifié par mutagenèse dirigée. Parmi les résidus conservés, on rencontre trois paires de bases et neuf résidus (simple brin) du cœur catalytique. Au sein de ces deux catégories, une paire de bases et chacun des neuf résidus sont essentiels à la réplication du ribozyme et ne peuvent pas être modifiés.

La modification du taux d'auto-clivage du ribozyme qui découle de l'altération de certains des résidus concernés par le présent travail est connue. C'est le cas de la paire de bases conservée qui se forme entre le résidu C₃₃₁ et le résidu G₂₈₈ dans la tige III du ribozyme de polarité positive. Les mutations qui modifient cette paire de bases en A₃₃₁-U₂₈₈ devraient réduire de 75% le taux de clivage du ribozyme. La mutation de C₂₉₀ en U₂₉₀ (directement en 5' du site de clivage) est connue pour amener le taux de clivage à 0,05% de ce qu'il est pour le ribozyme naturel (RUFFNER *et al.*, 1990). L'effet de la modification de la paire de bases U₇-A₅₂ dans la polarité négative du ribozyme en A₇-U₅₂ n'est pas connue.

Des recherches ont montré que la plupart des mutations de résidus conservés n'altèrent pas la capacité d'interaction entre les différentes parties de la structure en tête de marteau. Les faibles taux de clivages ne découlent donc souvent pas d'une absence de repliement de la structure en tête de marteau. C'est pourtant le cas dans les trois premières mutations discutées ici qui amènent à la détection de très peu de complexes ribozymes. Les nucléotides essentiels du ribozyme participent probablement aux interactions tertiaires nécessaires au maintien de la structure et fournissent des groupes fonctionnels pour la liaison d'ions et le mécanisme catalytique (RUFFNER *et al.*, 1990).

Les groupes fonctionnels ne sont pas tous impliqués dans le site actif du ribozyme mais nombre d'entre eux forment des interactions structurales qui sont hautement coopératives et la perturbation d'une de ces interactions peut déstabiliser l'ensemble (BLOUNT *et al.*, 2007).

Ainsi, les mutations permettent vraisemblablement à la structure de se refermer mais l'activité catalytique n'est probablement pas conservée ou elle est réduite. De plus, des études ont révélé l'existence d'une corrélation positive entre l'importance de l'auto-clivage *in vitro* et la capacité infectieuse de certains variants du PLMVd (FLORES *et al.*, 2006a). On pourrait donc supposer que le taux d'auto-clivage du variant 6A est fortement amoindri par rapport au variant de référence suite à la présence des mutations dans le ribozyme mais que cette réaction catalytique a toujours lieu. Le taux d'auto-clivage n'est probablement pas directement

proportionnel à la capacité de réplication du viroïde. Les multimères du PLMVd pourraient également reposer sur des molécules de l'hôte pour être clivés.

Comme proposé dans le cas des mutations P8, il est aussi possible que le profil en siRNAs généré par le viroïde soit modifié dans les régions qui portent les mutations, menant peut-être à une réponse différente de la plante. Pareillement au variant P8, le variant 6A pourrait entraîner l'apparition d'une descendance différente. Le séquençage de l'ARN de viroïde présent dans les extraits récoltés aurait pu confirmer ou infirmer cette hypothèse mais la quantité de PLMVd rencontrée dans les échantillons issus des plants P8 et 6A était trop faible pour réaliser cette manipulation. Vérifier si les mutations induites sont toujours présentes dans le(s) variant(s) qui compose(nt) ces isolats apporterait des informations supplémentaires sur le rôle biologique des structures concernées.

Il pourrait s'avérer qu'après inoculation du variant 6A et/ou du variant P8, ces variants soient incapables de se maintenir ou de se répliquer mais que certaines mutations aient lieu qui restaurent la structure originale de la molécule ou l'amènent à un autre état actif.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans le présent travail, la réplication et la pathogénicité de variants mutés du PLMVd ont été caractérisées suite à leur inoculation sur plants de pêcher de la variété GF-305. Le variant de référence utilisé comme base de comparaison était le variant sévère 151.1, les autres variants ont été obtenus par mutagenèse dirigée à partir du 151.1.

La première modification avait pour but d'empêcher la formation du pseudo-nœud P8 dans la molécule du PLMVd (BUSSIÈRE *et al.*, 2000), il s'agit du variant P8. Le variant 6A, par contre, voit la séquence $_{47}\text{CAGACG}_{52}$ dans la tige qui porte le ribozyme remplacée par la séquence $_{47}\text{AAAAAA}_{52}$, certaines autres mutations compensatoires ont aussi été réalisées afin de conserver la structure du ribozyme en tête de marteau et la tige P11.

Afin de caractériser la réplication de ces variants, la RT-PCR classique a d'abord été utilisée pour détecter quels plants étaient infectés par le PLMVd. Ce test mis au point en laboratoire par FEKIH HASSEN *et al.* (2006) a permis de mettre en évidence le PLMVd dans 55% des plants inoculés par le variant de référence 151.1 mais dans aucun plant inoculé par les variants mutés P8 et 6A (un an après l'inoculation).

La PCR en temps réel a alors été employée pour quantifier le PLMVd dans le jus brut extrait de feuilles prélevées entre le quatrième et le douzième mois après l'inoculation de ces variants. Cette technique est plus sensible que la RT-PCR classique, elle a révélé la présence de molécules du PLMVd dans les extraits issus des plants inoculés par le variant 151.1, le variant 6A ou le variant P8. Le titre en PLMVd dans les feuilles de plants inoculés par le variant P8 est très faible, il est inférieur à celui qui est présent dans les feuilles de plants inoculés par le variant 6A qui est lui-même inférieur à la quantité en viroïde obtenue après inoculation par le variant 151.1.

En outre, le titre en PLMVd mesuré dans les plants inoculés par le variant 151.1, 6A ou P8 varie au cours de la période de prélèvements. Jusqu'en fin novembre, cette valeur augmente, elle diminue ensuite jusqu'en janvier pour s'accroître à nouveau par après. Cette tendance est constatée pour les plants inoculés par chacun des différents variants. Il est probable que les accroissements du titre en PLMVd découlent d'une réplication plus importante due à une meilleure croissance de la plante hôte (Singh *et al.*, 2003). Les diminutions de la quantité en PLMVd pourraient être expliquées par la dégradation de sa molécule via le phénomène du *RNA silencing* et en partie à cause de la répartition hétérogène du PLMVd qui semble avoir été constatée entre des feuilles asymptomatiques et symptomatiques d'un même plant. Cette dernière constatation reste une hypothèse à confirmer et pourrait être prise en compte dans la standardisation des tests de certification.

La caractérisation de la pathogénicité de ces variants a reposé sur l'observation de leur phénotype. La tendance d'évolution du phénotype des plants inoculés par les trois variants du PLMVd est une réduction de l'intensité des symptômes. La majorité des feuilles de ces plants affichaient une mosaïque sévère six mois après l'inoculation. Au cours des six mois suivants, les plants ont présenté de plus en plus de symptômes de mosaïques légères et l'absence de symptômes sur certaines feuilles. Les feuilles fortement symptomatiques du début d'infection ont été prélevées ou ont flétri et les nouvelles feuilles ont présenté moins de symptômes. Les

conditions biotiques et abiotiques de culture en serre n'ont pas toujours été optimales et peuvent avoir eu un effet sur l'état physiologique des pêcheurs. Quoiqu'il en soit, les mutations introduites dans ces variants ne semblent pas avoir eu un impact sur leur pouvoir pathogène.

Les réductions du titre en PLMVd par rapport au variant de référence pour les deux types de mutations induites semblent confirmer la fonction des structures concernées. D'un côté, le pseudo-nœud P8 semble jouer un rôle important, probablement dans le maintien de la stabilité du PLMVd et de sa résistance face à la dégradation par les RNases. D'un autre côté la conservation de l'identité des nucléotides impliqués dans le cœur catalytique du ribozyme en tête de marteau est probablement essentielle au bon fonctionnement de la réaction d'auto-clivage.

La démarche utilisée dans ce travail est bien adaptée à l'étude de la relation entre la structure et la fonction des motifs d'entités telles les viroïdes. Elle peut être utilisée pour tester *in vivo* l'effet d'autres mutations sur la réplication et la pathogénicité du PLMVd. Il serait pourtant préférable de s'assurer de l'absence d'autres facteurs de variation entre les mesures et de vérifier la séquence des variants isolés sur les plants après une année. Les prélèvements devraient être débutés directement après l'inoculation des plants par les différents variants du PLMVd afin de pouvoir comparer les quantités initiales en viroïde présentes dans les tissus.

Une étude pourrait se concentrer sur l'effet des mutations 6A sur la réplication du PLMVd *in vitro* afin de mieux aborder l'origine des phénomènes observés dans le présent travail. De plus, l'étude de l'évolution des profils en siRNAs et/ou de la modification d'expression des gènes en relation avec l'évolution des symptômes et du titre en PLMVd pourrait mener à une meilleure compréhension des phénomènes impliqués.

La technique de PCR en temps réel utilisée dans le présent travail est plus sensible que la RT-PCR classique et réduit le risque de contamination post-amplification. Elle pourrait être utilisée en routine lors des tests de certification des plants de pêcher ou afin de rechercher des quantités plus faibles en PLMVd dans le cadre d'études fondamentales. L'investissement initial aussi bien que le coût par réaction de la PCR en temps réel (précédée d'une rétro-transcription) sont plus élevés que dans le cas de la RT-PCR classique. Pourtant, nous avons montré que la PCR en temps réel permet de déceler la présence du PLMVd dans les tissus de pêcher indicateur bien plus tôt que via le protocole de RT-PCR classique. En effet, l'incubation en plant de pêcher durant neuf mois est nécessaire pour obtenir la certitude que le PLMVd s'est suffisamment répliqué pour être détectable par RT-PCR classique. N'oublions pas non plus que beaucoup de variants du viroïde ne se répliquent probablement pas aussi vite que le variant 151.1.

ANNEXES

1. Séquences

1.1. Séquence de l'oligonucléotide d'ADN homologue utilisé comme standard de PCR en temps réel

5'-
 CCTCTCAGCCCCTCCACCTTGGGGTGCCCTATTCGGAGCCTGCAGTTCCCGATAGA
 AAGGCTAAGCACCTCGCAATGACGTAAGGTGGG-3'

1.2. Séquence de l'oligonucléotide d'ADN complémentaire utilisé comme standard de PCR en temps réel

5'-
 CCCACCTTACGTCATTGCGAGGTGCTTAGCCTTTCTATCGGGAAGTGCAGGCTCCG
 AATAGGGCACCCCAAGGTGGAGGGGCTGAGAGG-3'

2. Méthodes

2.1. SuperScriptTM III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)

- 1) Mix and briefly centrifuge each component before use.
- 2) Combine the following in a 0.2- or 0.5-ml tube:

Component	Amount
up to 5 µg total RNA	n µl
Primer : 2 µM gene-specific primer (GSP)	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
DEPC-treated water	to 10 µl

- 3) Prepare the following cDNA Synthesis Mix, adding each component in the indicated order.

Component	Amount
10X RT buffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
DTT	2 µl
RNaseOUT (40 U/µl)	1 µl
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl

- 4) Incubate at 65°C for 5 min, then place on ice for at least 1 min.
- 5) Add 10 µl of cDNA Synthesis Mix to each RNA/primer mixture, mix gently, and collect by brief centrifugation. Incubate as follows.
- 6) 50 min at 50°C
- 7) Terminate the reactions at 85°C for 5 min. Chill on ice.

Date de prélèvement = 07/10/2008

soustrait de :

Date de

prélèvement	Lower	Center	Upper
07/11/2008	-0,3532	-0,2060	-0,0588
24/11/2008	0,8669	1,0140	1,1612
12/12/2008	0,0603	0,2075	0,3546
09/01/2009	0,4234	0,5706	0,7178
28/01/2009	-0,1879	-0,0408	0,1064
15/04/2009	1,1250	1,2722	1,4193
08/06/2009	2,5953	2,7424	2,8896

Date de prélèvement = 07/11/2008

soustrait de :

Date de

prélèvement	Lower	Center	Upper
24/11/2008	1,0884	1,2200	1,3517
12/12/2008	0,2819	0,4135	0,5451
09/01/2009	0,6450	0,7766	0,9082
28/01/2009	0,0336	0,1652	0,2968
15/04/2009	1,3466	1,4782	1,6098
08/06/2009	2,8168	2,9484	3,0800

Date de prélèvement = 24/11/2008

soustrait de :

Date de

prélèvement	Lower	Center	Upper
12/12/2008	-0,9382	-0,8065	-0,6749
09/01/2009	-0,5751	-0,4434	-0,3118
28/01/2009	-1,1864	-1,0548	-0,9232
15/04/2009	0,1265	0,2581	0,3898

08/06/2009 1,5968 1,7284 1,8600

Date de prélèvement = 12/12/2008

soustrait de :

Date de

prélèvement	Lower	Center	Upper
09/01/2009	0,2315	0,3631	0,4947
28/01/2009	-0,3799	-0,2483	-0,1166
15/04/2009	0,9331	1,0647	1,1963
08/06/2009	2,4033	2,5349	2,6666

Date de prélèvement = 09/01/2009

soustrait de :

Date de

prélèvement	Lower	Center	Upper
28/01/2009	-0,7430	-0,6114	-0,4798
15/04/2009	0,5700	0,7016	0,8332
08/06/2009	2,0402	2,1718	2,3035

Date de prélèvement = 28/01/2009

soustrait de :

Date de

prélèvement	Lower	Center	Upper
15/04/2009	1,1813	1,3130	1,4446
08/06/2009	2,6516	2,7832	2,9148

Date de prélèvement = 15/04/2009

soustrait de :

Date de

prélèvement	Lower	Center	Upper
08/06/2009	1,3386	1,4703	1,6019

3.2. Analyse des résultats de quantification en nombre de molécules de PLMVd par réaction pour les plants inoculés par le variant 6A

normalité des populations vérifiée par le test de Ryan et Joiner

nécessité de réaliser une transformation \log_{10} des quantités pour respecter l'égalité des variances

3.2.1. Test d'égalité des variances : \log_{10} Quantité versus Date de prélèvement

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Variant	Date de prélèvement	N	Lower	StDev	Upper
6A	07/11/2008	3	0,0094826	0,022775	0,4071
6A	24/11/2008	3	0,0381004	0,091507	1,6356
6A	12/12/2008	2	0,0288092	0,085136	21,7371
6A	09/01/2009	2	0,0253654	0,074959	19,1387
6A	28/01/2009	2	0,0065932	0,019484	4,9747
6A	15/04/2009	2	0,0313766	0,092723	23,6743
6A	08/06/2009	2	0,0572016	0,169040	43,1598
151.1	08/06/2009	3	0,0215762	0,051820	0,9263

Bartlett's Test (Normal Distribution)

Test statistic = 5,94; p-value = 0,547

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 1,43; p-value = 0,285

3.2.2. Analyse de la variance (AV1) pour les plants inoculés par le variant 6A et le jus brut de référence (151.1) : \log_{10} Quantité versus Date de prélèvement

Source	DF	SS	MS	F	P
Date de prélèvement	7	29,74842	4,24977	635,38	0,000***
Error	11	0,07357	0,00669		
Total	18	29,82199			

3.2.5. Comparaison des moyennes des quantités pour les plants inoculés par le variant 6A entre eux par la méthode de Fisher

95% Individual Confidence Intervals
Simultaneous confidence level = 64,85%

Date de prélèvement = 07/11/2008
soustrait de :
Date de
prélèvement Lower Center Upper
24/11/2008 -0,1421 0,0186 0,1794
12/12/2008 -0,8459 -0,6662 -0,4864
09/01/2009 -0,5755 -0,3957 -0,2159
28/01/2009 -1,1591 -0,9793 -0,7996
15/04/2009 -0,1172 0,0626 0,2423
08/06/2009 -1,3027 -1,1229 -0,9431

Date de prélèvement = 24/11/2008
soustrait de :
Date de
prélèvement Lower Center Upper
12/12/2008 -0,8646 -0,6848 -0,5051
09/01/2009 -0,5941 -0,4144 -0,2346
28/01/2009 -1,1778 -0,9980 -0,8182
15/04/2009 -0,1359 0,0439 0,2237
08/06/2009 -1,3213 -1,1416 -0,9618

Date de prélèvement = 12/12/2008
soustrait de :
Date de
prélèvement Lower Center Upper

09/01/2009 0,0736 0,2705 0,4674
28/01/2009 -0,5101 -0,3132 -0,1162
15/04/2009 0,5318 0,7287 0,9257
08/06/2009 -0,6537 -0,4567 -0,2598

Date de prélèvement = 09/01/2009
soustrait de :
Date de
prélèvement Lower Center Upper
28/01/2009 -0,7806 -0,5836 -0,3867
15/04/2009 0,2613 0,4583 0,6552
08/06/2009 -0,9241 -0,7272 -0,5303

Date de prélèvement = 28/01/2009
soustrait de :
Date de
prélèvement Lower Center Upper
15/04/2009 0,8450 1,0419 1,2388
08/06/2009 -0,3405 -0,1436 0,0534

Date de prélèvement = 15/04/2009
soustrait de :
Date de
prélèvement Lower Center Upper
08/06/2009 -1,3824 -1,1855 -0,9885

3.3. Analyse des résultats de quantification en nombre de molécules de PLMVd par réaction pour les plants inoculés par le variant P8

normalité des populations vérifiée par le test de Ryan et Joiner

nécessité de réaliser une transformation \log_{10} des quantités pour respecter l'égalité des variances

3.3.1. Test d'égalité des variances : \log_{10} Quantité versus Date de prélèvement

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Variant	Date de prélèvement	N	Lower	StDev	Upper
P8	07/10/2008	3	0,413077	1,00218	19,002
P8	07/11/2008	3	0,201451	0,48875	9,267
P8	24/11/2008	2	0,210425	0,62945	180,801
P8	12/12/2008	3	0,071962	0,17459	3,310
P8	09/01/2009	3	0,078265	0,18988	3,600
P8	28/01/2009	3	0,033390	0,08101	1,536
P8	15/04/2009	2	0,043551	0,13027	37,420
P8	08/06/2009	3	0,067023	0,16261	3,083
151.1	08/06/2009	3	0,013216	0,03206	0,608

Bartlett's Test (Normal Distribution)

Test statistic = 21,45; p-value = 0,006

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

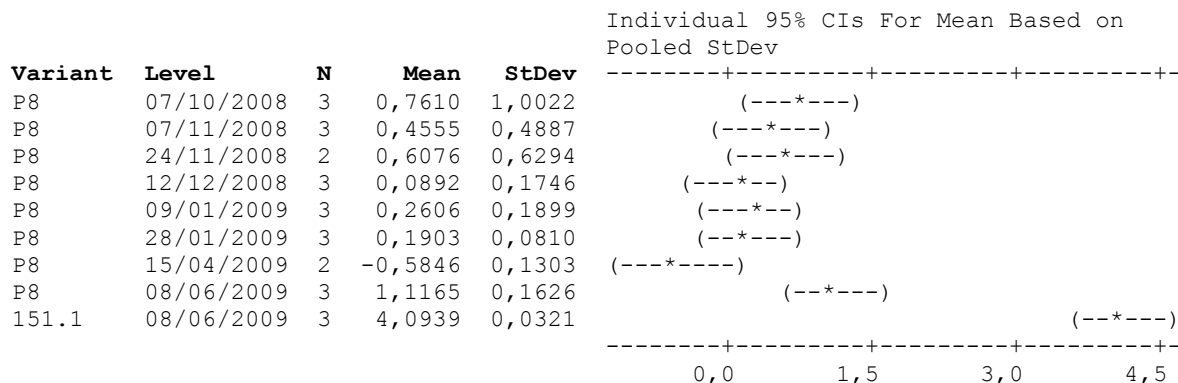
Test statistic = 1,43; p-value = 0,285

3.3.2. Analyse de la variance (AV1) pour les plants inoculés par le variant P8 et le jus brut de référence (151.1) : \log_{10} Quantité versus Date de prélèvement

Source	DF	SS	MS	F	P
Date de prélèvement	8	40,586	5,073	26,18	0,000***
Error	16	3,101	0,194		

Total 24 43,687

S = 0,4402 R-Sq = 92,90% R-Sq(adj) = 89,35%



3.3.3. Comparaison des moyennes des quantités pour les plants inoculés par le variant P8 par rapport au titre du jus brut de référence (151.1) par la méthode de Dunnett :

95% Individual Confidence Intervals

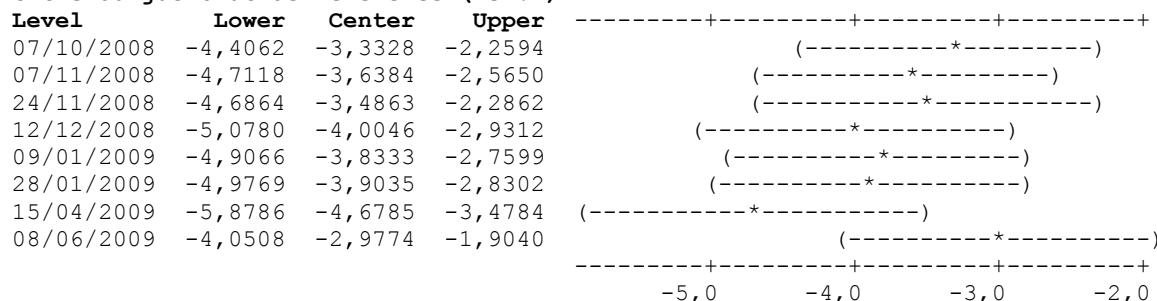
Family error rate = 0,05

Individual error rate = 0,0087

Critical value = 2,99

Control = level (151.1 08/06/2009) of Date de prélèvement

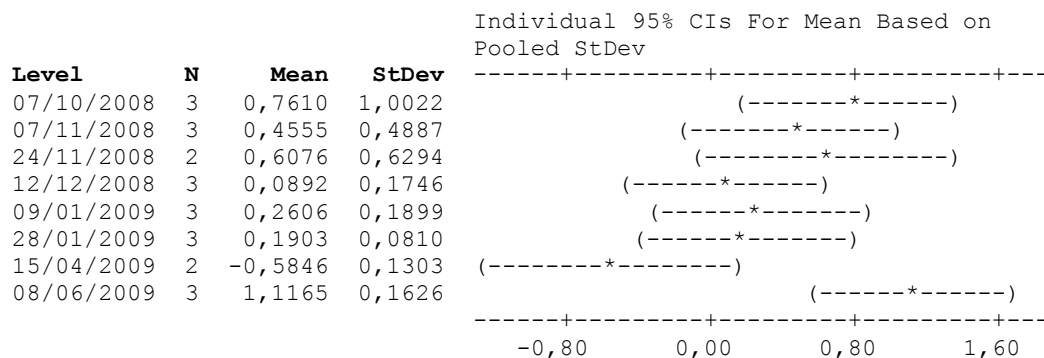
Intervalles pour les quantités dans les plants inoculés par le variant P8 moins le titre du jus brut de référence (151.1)



3.3.4. Analyse de la variance des quantités pour les plants inoculés par le variant P8 entre eux : log₁₀ Quantité versus Date de prélèvement

Source	DL	SC	CM	F	P
Date de prélèvement	7	4,444	0,635	2,87	0,044*
Error	14	3,099	0,221		
Total	21	7,543			

S = 0,4705 R-Sq = 58,92% R-Sq(adj) = 38,38%



3.3.5. Comparaison des moyennes des quantités pour les plants inoculés par le variant P8 entre eux par la méthode de Fisher

95% Individual Confidence Intervals
Simultaneous confidence level = 56,54%

Date de prélèvement = 07/10/2008

soustrait de :

Date de prélèvement	Lower	Center	Upper
07/11/2008	-1,1295	-0,3056	0,5183
24/11/2008	-1,0746	-0,1535	0,7676
12/12/2008	-1,4957	-0,6718	0,1521
09/01/2009	-1,3243	-0,5004	0,3234
28/01/2009	-1,3946	-0,5707	0,2532
15/04/2009	-2,2668	-1,3457	-0,4245
08/06/2009	-0,4685	0,3554	1,1793

Date de prélèvement = 07/11/2008

soustrait de :

Date de prélèvement	Lower	Center	Upper
24/11/2008	-0,7690	0,1521	1,0732
12/12/2008	-1,1901	-0,3662	0,4577
09/01/2009	-1,0187	-0,1949	0,6290
28/01/2009	-1,0890	-0,2651	0,5587
15/04/2009	-1,9612	-1,0401	-0,1189
08/06/2009	-0,1629	0,6610	1,4849

Date de prélèvement = 24/11/2008

soustrait de :

Date de prélèvement	Lower	Center	Upper
12/12/2008	-1,4394	-0,5183	0,4028
09/01/2009	-1,2681	-0,3469	0,5742
28/01/2009	-1,3384	-0,4172	0,5039
15/04/2009	-2,2012	-1,1922	-0,1831

08/06/2009 -0,4122 0,5089 1,4300

Date de prélèvement = 12/12/2008

soustrait de :

Date de prélèvement	Lower	Center	Upper
09/01/2009	-0,6525	0,1714	0,9953
28/01/2009	-0,7228	0,1011	0,9250
15/04/2009	-1,5950	-0,6738	0,2473
08/06/2009	0,2033	1,0272	1,8511

Date de prélèvement = 09/01/2009

soustrait de :

Date de prélèvement	Lower	Center	Upper
28/01/2009	-0,8942	-0,0703	0,7536
15/04/2009	-1,7663	-0,8452	0,0759
08/06/2009	0,0320	0,8558	1,6797

Date de prélèvement = 28/01/2009

soustrait de :

Date de prélèvement	Lower	Center	Upper
15/04/2009	-1,6961	-0,7749	0,1462
08/06/2009	0,1022	0,9261	1,7500

Date de prélèvement = 15/04/2009

soustrait de :

Date de prélèvement	Lower	Center	Upper
08/06/2009	0,7799	1,7011	2,6222

3.4. Analyse des résultats de quantification en nombre de molécules de PLMVd par réaction pour les feuilles symptomatiques et asymptomatiques récoltées sur plants inoculés par le variant 151.1

normalité des populations vérifiée par le test de Ryan et Joiner

nécessité de réaliser une transformation \log_{10} des quantités pour améliorer l'égalité des variances mais celle-ci n'est pas respectée

3.4.1. Test d'égalité des variances : \log_{10} Quantité versus Date de prélèvement

95% Bonferroni confidence intervals for standard deviations

Date de prélèvement	-n° plant	Phénotype	N	Lower	StDev	Upper
24/11/2008-1		asympt.	3	0,288302	0,67494	10,445
24/11/2008-1		sympt.	3	0,018095	0,04236	0,656
24/11/2008-5		asympt.	3	0,020573	0,04816	0,745
24/11/2008-5		sympt.	3	0,137941	0,32293	4,998
09/01/2009-5		asympt.	2	0,399877	1,14575	219,402
09/01/2009-5		sympt.	3	0,090272	0,21133	3,271

Bartlett's Test (Normal Distribution)

Test statistic = 16,83; p-value = 0,005

Levene's Test (Any Continuous Distribution)

Test statistic = 3,72; p-value = 0,032

3.4.2. Analyse de la variance (AV2 GLM) pour les feuilles symptomatiques et asymptomatiques récoltées sur plants inoculés par le variant 151.1 : \log_{10} Quantité versus Date de prélèvement-n° plant; Phénotype

Factor	Type	Levels	Values
Date de prélèvement			
-n° plant	fixed	3	24/11/2008-1; 24/11/2008-5; 09/01/2009-5
Phénotype	fixed	2	asympt.; sympt.

Analysis of Variance for \log_{10} Quantité, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Date de prélèvement-n° plant	2	4,9030	5,7204	2,8602	12,44	0,002
Phénotype	1	8,3430	8,2235	8,2235	35,76	0,000
Date de prélèvement						
-n° plant*Phénotype	2	11,8786	11,8786	5,9393	25,82	0,000***
Error	11	2,5299	2,5299	0,2300		
Total	16	27,6545				

S = 0,479578 R-Sq = 90,85% R-Sq(adj) = 86,69%

Unusual Observations for \log_{10} Quantité :

Obs	Quantité	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
7	0,87887	0,06870	0,33911	0,81017	2,39 R
9	-0,74147	0,06870	0,33911	-0,81017	-2,39 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

décomposition de l'AV2 en 3 tests : un pour chaque groupe de valeurs Date de prélèvement-n° plant

3.4.3. Test T de Student pour les valeurs mesurées le 24/11/2008 sur le plant n°5 : \log_{10} Quantité versus Phénotype

Phénotype	N	Mean	StDev	SE Mean
A	3	1,6347	0,0482	0,028
S	3	1,069	0,323	0,19

Difference = μ (A) - μ (S)

Estimate for difference: 0,566

95% CI for difference: (-0,245; 1,377)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = 3,00 P-Value = 0,095 DF = 2

3.4.4. Test T de Student pour les valeurs mesurées le 09/01/2009 sur le plant n°5 : \log_{10} Quantité versus Phénotype

Phénotype	N	Mean	StDev	SE Mean
A	2	0,07	1,15	0,81
S	3	1,442	0,211	0,12

Difference = μ (A) - μ (S)

Estimate for difference: -1,374

95% CI for difference: (-11,784; 9,037)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -1,68 P-Value = 0,342 DF = 1

3.4.5. Test T de Student pour les valeurs mesurées le 24/11/2008 sur le plant n°1 : \log_{10} Quantité versus Phénotype

Phénotype	N	Mean	StDev	SE Mean
A	3	0,492	0,675	0,39
S	3	3,9058	0,0424	0,024

Difference = μ (A) - μ (S)

Estimate for difference: -3,413

95% CI for difference: (-5,093; -1,733)

T-Test of difference = 0 (vs not =): T-Value = -8,74 P-Value = 0,013* DF = 2

BIBLIOGRAPHIE

- AMBRÓS S., HERNÁNDEZ 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 Quasispe. *Journal of virology*, **72**(9), 7397-7406.
- AMBRÓS S., HERNÁNDEZ C. & FLORES R., 1999. Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host. *Journal of general virology*, **80**(8), 2239-2252.
- APPLIED BIOSYSTEMS, 2007. *StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Getting Started Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments*. PN 4376785.
- BARBA M., GUMPF D.J. & HADIDI A, 2003. Quarantine of imported germplasm. In: HADIDI A., FLORES R., RANGLES J.W. & SEMANCIK J.S., eds. *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing 350-356.
- BARBA M., RAGOZZINO E. & FAGGIOLI F., 2007. Pollen transmission of Peach latent mosaic viroid. *Journal of Plant Pathology*, **89**(2), 287-289.
- BLOUNT K.F., & UHLENBECK O.C., 2005. The structure-function dilemma of the hammerhead ribozyme. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **34**, 415-440.
- BOONHAM N., GONZÁLEZ PÉREZ L., MENDEZ M.S., LILIA PERALTA E., BLOCKLEYA A., WALSHA K., BARKERA I. & MUMFORDA R.A., 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of Potato spindle tuber viroid. *Journal of Virological Methods*, **116**(2), 139-146.
- BUSSIÈRE F., LEHOUX J., THOMPSON D.A., SKRZECZKOWSKI J. & PERREAULT J.P., 1999. Subcellular Localization and Rolling Circle Replication of Peach Latent Mosaic Viroid: Hallmarks of Group A Viroids. *Journal of virology*, **74**(6), 2647-2654.
- 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, branched secondary structure *Journal of virology*, **73**(8), 6353-6360.
- CÔTÉ F., DE LA PEÑA M., FLORES R. & PERREAULT J.P., 2003. Ribozyme reactions of viroids. In: HADIDI A., FLORES R., RANGLES J.W. & SEMANCIK J.S., eds. *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing 350-356.
- DE LA PEÑA M. & FLORES R., 2002. Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid RNA: Dissection of the Pathogenicity Determinant and Comparative Fitness of Symptomatic and Non-symptomatic Variants. *J. Mol. Biol.*, **321**, 411-421.
- DELGADO S., MARTÍNEZ DE ALBA À.E., HERNÁNDEZ 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. *Journal of general virology*, **89**(20), 12934-12943.
- DIENER T.O., 1989. Circular RNAs: Relics of precellular evolution? *D2*, **86**, 9370-9374.

- DING B., ITAYA A. & ZHONG X., 2005. Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 606-612.
- FEKIH HASSEN I., ROUSSEL S., KUMMERT J., FAKHFAKH H., MARRAKCHI M., JIJAKLI M.H., 2006. Development of a Rapid RT-PCR Test for the Detection of Peach Latent Mosaic Viroid, Pear Blister Canker Viroid, Hop Stunt Viroid and Apple Scar Skin Viroid in Fruit Trees from Tunisia. *Journal of Phytopathology*, **154**, 217-223.
- FEKIH HASSEN I., MASSART S., MOTARD J., ROUSSEL S., PARISI O., KUMMERT J., FAKHFAKH H., MARRAKCHI M., PERREAULT J.P. & JIJAKLI M.H., 2007a. Molecular features of new Peach Latent Mosaic Viroid variants suggest that recombination may have contributed to the evolution of this infectious RNA. *Virology*, **383**(2), 178-182.
- FEKIH HASSEN I., 2007b. *Détection des viroïdes des arbres fruitiers et étude épidémiologique, moléculaire et biologique du viroïde de la mosaïque latente du pêcher en Tunisie*. Thèse de doctorat : Université de Tunis El Manar Faculté des Sciences De Tunis Département des Sciences Biologiques (Tunisie).
- FLORES R., HERNANDEZ C., LLACER G. & DESVIGNES J.C., 1998. *Peach latent mosaic viroid*. Description of Plant Viruses, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=362>, (18/03/09).
- FLORES R., RANDES J.W. & OWENS R.A., 2003. Classification. In: HADIDI A., FLORES R., RANDES J.W. & SEMANCIK J.S., eds. *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing 71-74.
- FLORES R., DELGADO S., RODIO M.E., AMBRÓS S., HERNÁNDEZ C. & DI SERIO F., 2006a. Peach latent mosaic viroid: not so latent. *Molecular Plant Pathology*, **7**(4), 209-221.
- FLORES R., DAROS J.A., HERNANDEZ C., DI SERIO F., 2006b. Viroids. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. 10.1038/npg.els.0004279
- GONNÉ S., 2007. *Mise au point d'un test de RT-PCR en temps réel pour la détection du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd)*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- GÓRA-SOCHACKA A., 2004. Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochimica Polonica*, **51**(3), 587-607.
- HADIDI A. & CANDRESSE T., 2003. Polymerase chain reaction. In: HADIDI A., FLORES R., RANDES J.W. & SEMANCIK J.S., eds. *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing 115-122.
- HANOLD D., SEMANCIK J.S. & OWENS R.A., 2003. Polyacrylamide gel electrophoresis. In: HADIDI A., FLORES R., RANDES J.W. & SEMANCIK J.S., eds. *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing 95-101.
- HERNÁNDEZ C. & FLORES R., 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3711-3715.

- HERNÁNDEZ C., DI SERIO F., AMBRÓS S., DARÒS J.A. & FLORES R., 2006. An Element of the Tertiary Structure of Peach Latent Mosaic Viroid RNA Revealed by UV Irradiation. *Journal of virology*, **80**(18), 9336-9340.
- LANDRY P., THOMPSON D. & PERREAULT J.P., 2004. The role of viroids in gene silencing: the model case of Peach latent mosaic viroid. *Can. J. Plant Pathol.*, **26**, 31-38.
- 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.
- LEPAIR S., 2008. *Caractérisation moléculaire des relations hôte-pathogène de plants de pêchers infectés par le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd)*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- LEPOIVRE P., 2003. Les mécanismes de résistance et la spécificité parasitaire. In: LEPOIVRE P., *Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte*. Bruxelles, BEL : De Boeck Université 161-191.
- MALFITANO M., DI SERIO F., COVELLI L., RAGOZZINO A., HERNANDEZ C. & FLORES R., 2003. Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology*, **313**, 492-501.
- MARKARIAN N., LI H.W., DING S.W. & SEMANCIK J.S., 2003. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.*, **149**, 397-406.
- MOTARD J., BOLDUC F., THOMPSON D. & PERREAULT J.P., 2008. The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appears to be defined by a conserved sequence. *Virology*, **373**(2), 362-375.
- MÜHLBACH H.P., WEBER U., GÓMEZ G., PALLÁS V., DURAN-VILA N. & HADIDI A., 2003. Molecular hybridization. In: HADIDI A., FLORES R., RANGLES J.W. & SEMANCIK J.S., eds. *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing 103-113.
- OWENS R.A., 2008. Viroids. In: Roossinck M.J., ed. *Plant Virus Evolution*. Berlin, Heidelberg : Springer. 83-109.
- PARISI O., 2006. *Etude de la pathogénicité de différents variants du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd) et mise au point d'une technique de détection du phénomène d'extinction post-transcriptionnelle de gènes (Posttranscriptional gene silencing)*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- PARISI O., 2007. *Contribution à la caractérisation moléculaire des relations hôte-pathogène de plants de pêchers infectés par le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd)*. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).
- PELCHAT M., COTE F. & PERREAULT J.P., 2001. Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. *Arch. Virol.*, **146**, 1753-1763.
- RODIO M.E., DELGADO S., FLORES R. & DI SERIO F., 2006. Variants of Peach latent mosaic viroid inducing peach calico: uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *Journal of general virology*, **87**, 231-240.

- RUFFNER D.E., STORMO G.D. & UHLENBECK O.C., 1990. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry*, **29**, 10695-10702.
- RUIZ-RUIZ S., AMBRÓS S., VIVES M.D.C., NAVARRO L., MORENO P. & GUERRI J., 2009. Detection and quantitation of Citrus leaf blotch virus by TaqMan real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, **160**, 57-62.
- SINGH R.P., RANDLES J.W. & HADIDI A., 2003. Strategies for the control of viroid diseases. In: HADIDI A., FLORES R., RANDLES J.W. & SEMANCIK J.S., eds. *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publishing 115-122.
- STÅHLBERG A., KUBISTA M. & PFAFFL M., 2004. Comparison of Reverse Transcriptases in Gene Expression Analysis. *Clinical Chemistry*, **50**(9), 1678-1680.
- ST-PIERRE P., HASSEN F., THOMPSON D. & PERREAULT J.P., 2008. Characterization of the siRNAs associated with peach latent mosaic viroid infection. *Virology*, **383**(2), 178-182.
- STRATAGENE, 2007. *Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide*. Stratagene,
<http://muffa.uniud.it/fileadmin/documenti/pdf/Esercitazioni/IntroductionToQPCR.pdf>,
(02/02/09).
- TABLER M. & TSAGRIS M., 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *TRENDS in Plant Science*, **9**(7), 339-348.
- VOROBEVA M.A., PRIVALOVA A.S. , VENYAMINOVA A.G. & VLASSOV V.V., 2008. Trans Hammerhead Ribozyme: Ligation vs. Cleavage In: DOBRETSOV N., Kolchanov N., Rozanov A. & Zavarzin G., eds. *Biosphere Origin and Evolution*. 10.1007/978-0-387-68656-1_10 143-155.
- WANG M.B., BIAN X.Y., WU L.M., LIU L.X., SMITH N.A., ISENEGGER D., WU R.M., MASUTA C., VANCE V.B., WATSON J.M., REZAIAN A., DENNIS E.S. & WATERHOUSE P.M., 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(9), 3275-3280.
- ZHONG X., LEONTIS N., QIAN S., ITAYA A., QI Y., BORIS-LAWRIE K. & DING B., 2006. Tertiary Structural and Functional Analyses of a Viroid RNA Motif by Isostericity Matrix and Mutagenesis Reveal Its Essential Role in Replication. *Journal of virology*, **80**(17), 8566-8581.