

INRS-Institut Armand-Frappier  
Université du Québec

Caractérisation biologique d'un virus isolé chez la luzerne

Mémoire présenté  
Pour l'obtention  
Du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

Par  
Arianne Bouchard Gagnon

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne: Éric Déziel

Examineur externe : Serge Laberge

Directeur de recherche : Jean-François Laliberté

Codirecteur de recherche : Marc-André D'Aoust

Septembre 2006

## Résumé

La découverte d'un ARN codant pour une ARN-dépendante ARN-polymérase (RdRp) virale dans une lignée de luzerne a suscité l'intérêt de la compagnie Médicago Inc. Comme l'utilisation des plantes constitue leur plate-forme de production de protéines recombinantes, la caractérisation de ce présumé virus devenait très intéressante. En effet, il est possible de se servir des virus comme un vecteur d'expression pour la production de protéines recombinantes.

Notre hypothèse de travail était donc d'identifier les autres composantes qui sont associées avec la RdRp et d'évaluer le potentiel de ce virus comme vecteur d'expression.

Pour arriver à démontrer notre hypothèse, une extraction de l'ARN viral a été effectuée suivie d'une purification sur gel. Cet ARN purifié a été cloné et inséré dans un vecteur pour qu'il soit séquencé. En comparant les séquences obtenues avec celles disponibles dans les banques de données, une homologie de séquence a été obtenue avec une capsid virale.

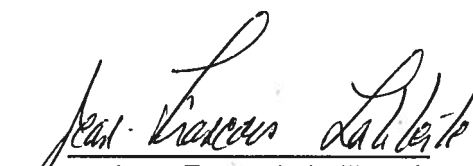
Afin de s'assurer que la luzerne possède des particules virales, une série d'ultracentrifugations sur gradient de sucrose a été effectuée afin d'isoler des particules virales. Des particules virales ont pu être isolées et observées en microscopie électronique. Les données obtenues nous ont permis de déterminer la dimension et la structure du virus.

L'analyse des données obtenues nous a permis de conclure qu'un virus de la famille des partivirus infectait notre luzerne, soit Oneida 2. La difficulté de son

isolement nous a permis de constater qu'il se trouvait en faible quantité dans la plante infectée. L'utilisation de ce virus comme vecteur protéique est donc peu probable, puisqu'il infecte les plantes en trop faible quantité. On obtiendrait un faible rendement de production.

Notre hypothèse de recherche s'est révélée confirmée puisque les lignées de plantes positives pour la RdRp sont porteuses d'un virus.

  
Ariane Bouchard Gagnon

  
Jean-François Laliberté  
Directeur de recherche

## Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Chapitre 1.....	1
Revue de littérature.....	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. La luzerne.....	1
1.3. Résultats préliminaires.....	1
2. Moléculture végétale.....	2
2.1 Exemples de protéines recombinantes.....	3
3. Stratégies d'expression dans les plantes.....	7
3.1 Vecteurs viraux.....	8
4. Les Virus.....	9
4.1 Stratégies d'expression des virus.....	9
4.1.1. Virus à ARN simple brin de polarité positive.....	10
4.1.2. Virus à ARN simple brin de polarité négative.....	11
4.1.3. Virus à ARN simple brin .....	11
5. Virus infectant la luzerne.....	14
6. <i>Partitiviridae</i> .....	15
6.1 <i>Alfalfa cryptic virus</i> .....	16
7. Hypothèse et objectifs expérimentaux.....	17
7.1. Caractérisation des autres composantes.....	18
7.2. Détection et analyse des particules virales.....	18
7.3. Vecteur d'expression protéique.....	18
Chapitre 2.....	19
Matériel et Méthodes.....	19
1. Milieux de culture.....	19
2. Souches.....	20
3. Vecteurs de clonage.....	20
3.1. pCR2.1.....	20
3.2. pET21a.....	21
4. Isolement d'ARN double brin.....	21
5. Méthodes de clonage.....	22
5.1. Amplification de fragments d'ADN par PCR.....	22
5.2. Analyse sur gel d'agarose.....	22
5.3. PCR et RT-PCR.....	23
5.3.1. RT-PCR.....	23
5.3.2. Extraction des ARNs totaux.....	24
5.3.3. Transcription inverse.....	25
5.3.4. 5'-Race.....	25
5.4. Clonage.....	26
5.4.1. Digestion enzymatique.....	26
5.4.2. Déphosphorylation.....	26
5.4.3. Ligation.....	27
5.4.4. Transformation.....	27

5.4.5. Choc thermique.....	27
5.4.5. Électroporation.....	27
5.5. Extraction ADN plasmidique.....	28
5.5.1. MiniPrep traditionnelle.....	28
5.5.2. MiniPrep Sigma.....	28
6. Buvardage de type Northern.....	29
6.1. Préparation de la sonde.....	29
6.2. Séparation de l'ARN sur gel d'agarose.....	29
6.3. Transfert.....	29
6.4. Hybridation.....	30
6.5. Détection.....	30
7. Isolement de particules virales.....	32
8. Production d'anticorps.....	33
8.1. Purification de corps d'inclusion.....	33
8.2. Séparation des protéines.....	34
8.3. Injection dans le lapin.....	34
9. Analyse de l'expression.....	34
9.1. Extraction de protéines solubles.....	34
9.2. Immunobuvardage.....	35
Chapitre 3.....	37
Résultats.....	37
1.1. Purification d'ARN double brin.....	37
1.2. Clonage, séquençage et banques de données.....	39
1.3. Buvardage de type Northern.....	51
2. Détection et caractérisation des particules virales.....	53
2.1. Isolement et observation en microscope électronique.....	53
2.2. Production d'un sérum de lapin.....	55
2.3. Détection de protéines virales.....	56
Chapitre 4.....	57
Discussion.....	57
1.Caractérisation des autres composantes.....	57
2.Détection et caractérisation des particules virales.....	59
3.Perspectives d'avenir.....	63
Conclusion.....	65
Remerciements.....	66
Bibliographie .....	67

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Stratégie d'expression des virus à ARN sb (+).....	12
<b>Figure 2</b> : Stratégie d'expression des virus à ARN sb (-) segmenté .....	12
<b>Figure 3</b> : Stratégie d'expression des virus à ARN double brin .....	13
<b>Figure 4</b> : Photo en microscopie électronique du <i>Beet cryptic virus</i> .....	16
<b>Figure 5</b> : Purification d'ARNdb de plantes de luzerne .....	38
<b>Figure 6</b> : Homologie de la RdRp (ARN-1) avec la RdRp du <i>Oyster mushroom isometric virus</i> .....	42
<b>Figure 7</b> : Comparaison de la séquence de la capsidie avec celle de la capsidie du <i>Raphanus sativus cryptic virus 1</i> ( <i>Partitiviridae</i> ) .....	43
<b>Figure 8</b> : Portion de la RdRp avec une forte homologie avec les RdRp virale .....	44
<b>Figure 9</b> : Comparaison de la séquence de l'ARNdb-2 avec celle de la capsidie du <i>Raphanus sativus cryptic virus 1</i> ( <i>Partitiviridae</i> ) .....	45
<b>Figure 10</b> : Séquence en acides nucléiques et en acides aminés de la RdRp .....	46
<b>Figure 11</b> : Séquence en acides nucléiques et en acides aminés de la capsidie.....	48
<b>Figure 12</b> : Immunobuvardage de type Northern sur des extraits d'ARN totaux avec sonde RdRp .....	52
<b>Figure 13</b> : Immunobuvardage de type Northern sur des extraits d'ARN totaux avec sonde capsidie.....	52
<b>Figure 14</b> : Observation en microscopie électronique de particules virales chez la plante Oneida 2.....	54
<b>Figure 15</b> : Gel SDS-PAGE dont les protéines sont colorées au bleu de Coomassie.....	55
<b>Figure 16</b> : Immunobuvardage sur les purifications virales des plantes Oneida 2 et 11.9 .....	56

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Production de vaccins dans les plantes transgéniques .....	4
<b>Tableau II</b> : Production d'anticorps par les plantes transgéniques .....	5
<b>Tableau III</b> : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques .....	6
<b>Tableau IV</b> : Différents virus pouvant infecter la luzerne .....	14
<b>Tableau V</b> : Amorces de Clontech utilisées pour l'amplification d'ARNdb .....	24
<b>Tableau VI</b> : Amorces utilisées pour le 5'-RACE de la capsid .....	26
<b>Tableau VII</b> : Amorces utilisées pour la production de sondes.....	31
<b>Tableau VIII</b> : Dilution des anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western Blot .....	36
<b>Tableau IX</b> : Résumé des séquences .....	39
<b>Tableau X</b> : Comparaison de la séquence RdRp avec celles de virus de la famille des <i>Partitiviridae</i> .....	50
<b>Tableau XI</b> : Comparaison de la séquence Capsid avec celles répertoriées .....	50

## Liste des abréviations

*Agrobacterium tumefaciens* : *A. tumefaciens*  
ARN double brin : ARNdb  
ARN-polymérase ARN-dépendante : RdRp  
Base : b  
Centimètre : cm  
Dalton : d  
Désoxyribonucléotide : dNTP  
*Escherichia coli* : *E. coli*  
Gramme : g  
Heure : h  
Kilo : k  
Masse moléculaire relative (le poids moléculaire d'une paire de bases est d'environ 650 daltons) :  $M_r$   
Microgramme :  $\mu\text{g}$   
Microlitre :  $\mu\text{l}$   
Millilitre : ml  
Minute : min.  
Mole (molarité) : M  
Nanogramme : ng  
Nanomètre : nm  
Nanomole : nM  
Normal : N  
Omhs :  $\Omega$   
Paire de bases : pb  
Pico : p  
Poids/volume : p/v  
Pourcentage : %  
Seconde : sec.  
Simple brin : simple brin  
Unité : U  
Variable attribuée à la longueur d'onde d'une onde électromagnétique comme la lumière visible :  $\lambda$   
*Virus de la mosaïque du navet* : TuMV  
Volt : V



# Chapitre 1

## Revue de littérature

### 1.1 Généralités

Mon projet de maîtrise s'est fait en collaboration avec la compagnie Medicago Inc. dont le siège social se trouve à Québec et qui a été fondée en 1997. Cette compagnie se spécialise dans le développement de produits biopharmaceutiques de nouvelle génération conçus pour lutter contre les maladies humaines importantes. Medicago Inc. a développé une plate-forme de production de protéines thérapeutiques dans la luzerne (*Medicago sativa*). L'utilisation des plantes permet une production de protéines de manière économique et sécuritaire.

### 1.2 La luzerne

La luzerne est une plante pérenne, c'est-à-dire qu'elle ne meurt pas après la fauche. C'est une plante qui atteint sa maturité très rapidement après une coupe (e.g. en moins de cinq semaines). La luzerne peut-être récoltée au moins dix fois par année pendant plus de dix ans

### 1.3 Résultats préliminaires à la base du projet

La compagnie a effectué une étude du stress au froid sur la luzerne. Lors de cette étude, un ADN complémentaire de 1761 bases est ressorti en grande quantité du lot des différents ADNc obtenus. Pour vérifier si cet ADNc a une origine chromosomique, un buvardage de type Southern a été effectué. Cependant, aucun signal n'a été détecté. Ce qui suggérait que cet ADNc ne

provient pas du génome de la luzerne mais probablement d'un autre organisme. Une comparaison de la séquence de cet ADNc avec les banques de données a révélé qu'il code pour une protéine vraisemblablement d'origine virale, soit une ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). De plus, lors de leurs analyses, la présence d'ARN de polarité positive et négative a été détectée.

Suite à ces constatations, la présence d'un virus dans les plants de luzerne a été envisagée. Les plantes n'avaient aucun symptôme de maladie et l'idée de l'utilisation d'un virus comme système de production protéique dans la plante a été soulignée. En effet, on peut utiliser un virus comme vecteur d'expression. Comme la majorité des virus de plantes possède une gamme d'hôtes large, il devient intéressant d'utiliser ces virus comme un vecteur d'expression.

## **2 Moléculature végétale**

De plus en plus, les plantes sont utilisées comme plate-forme de production pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou industriel – la moléculature (Fischer et al. 2004; Giddings et al. 2000). En effet, les plantes sont sécuritaires, efficaces et économiques pour ce type de production. Les résultats actuels indiquent que la moléculature végétale permettra une réduction importante du coût de production comparativement aux coûts actuels de production dans les cellules de mammifères, d'insectes, de champignons ou de procaryotes.

Les principales plantes utilisées en moléculature sont le tabac, le maïs, la pomme de terre et la luzerne. La production de protéines dans la plante présente de nombreux avantages (Fischer et al. 2000). Un de ses avantages est que les agents pathogènes infectant les plantes ne le sont pas pour les humains. Inversement, les agents pathogènes humains ne se retrouvent pas associés aux plantes. Aussi, les plantes effectuent des modifications post-traductionnelles,

comme l'assemblage multimérique et avec quelques différences mineures dans l'étape de la glycosylation, ce qui ne sont pas possibles avec les plates-formes de production bactériennes. Il est possible d'exprimer la protéine d'intérêt dans des tissus précis de la plante (e.g. expression dans la partie comestible de la plante), ce qui aide dans la purification de la protéine d'intérêt. Finalement, les plantes peuvent croître dans des conditions non stériles, ce qui est moins coûteux que la fabrication de protéines recombinantes dans des cellules animales.

## **2.1 Exemples de protéines recombinantes**

Tout d'abord, les molécules produites dans la plante sont le plus souvent des protéines destinées principalement à un usage pharmaceutique (Ma et al. 2003), comme les anticorps et l'interleukine humaine qui agit contre le cancer (Daniell et al. 2001b ; Doran, P. 2000). Par contre, il existe d'autres protéines recombinantes qui serviront à la confection de biomatériaux (Matsumoto, K. et al 2001) et de plastiques biodégradables (Hanley et al. 2000).

Pour l'usage pharmaceutique, la nature comestible des plantes représente un atout dans la production de vaccins destinés tant aux êtres humains qu'aux animaux. En effet, il est possible de déclencher une réponse immunitaire par l'administration par voie orale d'un antigène (Tableau I). Aussi, la production d'anticorps est également envisagée par la moléculature végétale (Tableau II). Par exemple, les IgG recombinants sont de plus en plus utilisés comme agents thérapeutiques et ils représentent de nos jours plus du tiers des protéines en essais cliniques aux États-Unis. On retrouve aussi la production de cytokines, de facteurs de croissance, des hormones, de protéines sanguines et plasmatiques (Tableau III).

**Tableau I : Production de vaccins dans les plantes transgéniques**

<b>Protéine exprimée</b>	<b>Agent pathogène visé</b>	<b>Plantes</b>	<b>Références</b>
Sous-unité de toxine B du choléra	<i>Vibrio cholerae</i>	Pomme de terre, tabac	Arakawa et al. 1998; Daniell et al. 2001a
Glycoprotéine B du CMV	Cytomégalovirus	Tabac	Tackaberry et al. 1999
Hémagglutinine	Virus de la rougeole	Tabac	Huang et al. 2001
Sous-unité A2 du rotavirus	Rotavirus	Pomme de terre	Yu et Langridge 2001
Sous-unité B de la toxine Thermosensible	<i>Escherichia coli</i>	Tabac, pomme de terre, maïs	Tacket et al. 2000; Mason et al. 1998
rHBsAg – protéine de surface	Virus hépatite B	Tabac, pomme de terre, laitue	Thanavala et al. 1995; Richter et al. 2000
Protéine de la capsid	Virus de Norwalk	Tabac, pomme de terre	Mason et al. 1996; Tacket et al. 2000
Fragment C de la toxine tétanique	<i>Clostridium tetani</i>	Tabac	Tregoning et al. 2003
Protéine structurale VP1	Fièvre aphteuse	<i>Arabidopsis</i> , Luzerne	Carillo et al. 1998; Wigdorovitz et al. 1999
VP60	Virus hémorragique du lapin	Pomme de terre	Castanon et al. 1999
Leucotoxine Lkt66/50	Pneumonie à <i>Pasteurella</i> (bovins)	Trèfle blanc	Lee et al. 2001

**Tableau II : Production d'anticorps dans les plantes transgéniques**

<b>Protéine exprimée</b>	<b>Objectif</b>	<b>Plantes</b>	<b>Références</b>
scFv de IgG de cellules B de lymphome de souris	Traitement du lymphome non-Hodgkin	Tabac	McCormick et al. 1999
slgA-G, IgG1	Traitement du cancer (anti-CEA)	Tabac	Stoger et al. 2000
IgG	Traitement de l'hépatite B (HBV)(antigène de surface)	Tabac	Valdes et al. 2003
IgG1, scFv, Fab	Diagnostique infarctus myocarde (anti-créatine kinase humaine)	Tabac, <i>Arabidopsis</i>	De Neve et al. 1993; Bruyns et al. 1996
scFv-IT	Traitement du cancer hématologique (anti CD40)	Tabac	Francisco et al. 1997
slgA-G, IgG1	Traitement de la carie dentaire (anti-adhésine II de <i>Streptococcus mutans</i> )	Tabac	Ma et al. 1996; Smith et al. 2000

scFv : fragment à chaîne unique variable, Fab : fragment ab, scFv-IT : scFv-immunotoxine-bryodine, CEA : Antigènes carcinoembryogéniques.

**Tableau III : Production de produits pharmaceutiques dans les plantes transgéniques**

<b>Protéine</b>	<b>Application</b>	<b>Plantes</b>	<b>Références</b>
Protéine C humaine	Anticoagulant : Voie de synthèse de protéine C	Tabac	Cramer et al. 1996
Hirudine	Anticoagulant : Antithrombine directe (sans besoin de co- facteur)	Tabac, Colza, Moutarde	Parmenter et al. 1995, Boothe et al. 1997
Somatotrophine humaine	Hormone de croissance	Tabac	Staub et al.2000
Erythropoïétine humaine	Anémie	Tabac	Matsumoto et al. 1995
Facteur de croissance épidermique humain	Réparation de blessures/ contrôle de la prolifération cellulaire	Tabac	Higo et al. 1993
Interféron- $\beta$ humain Interféron $-\alpha$ 2b/ 8 humain	Traitement de l'hépatite B et C	Tabac pomme de terre	Edelbaum et al. 1992, Ohya et al. 2001
Facteur de stimulation de colonie de granulocyte-macrophage humain	Facteur de croissance hématopoïétique	Tabac	James et al. 2000
Albumine de sérum humain	Cirrhose du foie, brûlures et chirurgie	Tabac	Sijmons et al. 1990
Hémoglobine $\alpha,\beta$ humaine	Substituts sanguins	Tabac	Dieryck et al. 1997
Collagène-1 homotrimérique humain	Collagène	Tabac	Ruggiero et al. 2000

### 3 Stratégies d'expression dans les plantes

Il existe deux stratégies d'expression de protéines d'intérêt dans les plantes, soit la transformation génétique stable et l'expression transitoire. Dans l'expression stable, on insère un gène dans le génome de la plante, ce qui permet de transmettre la séquence de générations en générations. Il y a deux principales méthodes d'introduction d'un nouveau matériel génétique dans les cellules végétales, soit le bombardement au moyen de micro-particules et la transformation par *Agrobacterium tumefaciens*. Dans ces deux cas, un promoteur est ajouté en amont du gène d'intérêt. En majorité, on utilise des promoteurs constitutifs, comme par exemple le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). Souvent, le gène d'intérêt se trouve sous le contrôle de ce promoteur, ce qui donne une expression constante de la protéine recombinante. Par contre la quantité de protéines produites n'est pas très élevée (Porta et al. 2002), même parfois très faible. De plus, les végétaux transformés individuellement avec le même plasmide présentent souvent des niveaux d'expression différents. Ce phénomène n'est pas toujours corrélé avec le nombre de copies (Gelvin, 1998). On considère que cette expression variable peut-être due à la position du site d'intégration de l'ADN étranger dans le génome hôte. Ce qui affecte le niveau de l'expression des transgènes. Cependant, d'autres chercheurs ont montré que des facteurs supplémentaires autres que la position du site d'intégration contribuent au niveau de l'expression des transgènes (Gelvin, 1998). De plus, l'expression continue de protéines peut devenir très néfaste pour la plante. C'est pourquoi maintenant il est possible d'utiliser un système d'expression inductible dans des tissus spécifiques.

L'expression transitoire de gènes est souvent préférable à l'établissement de transfectants stables, car cette dernière approche prend beaucoup de temps et exige que la protéine exprimée n'ait pas d'effet négatif sur la croissance des cellules. Le choix d'un promoteur adéquat est important. Majoritairement, on choisit un promoteur fort et constitutif, puisque, dû à l'instabilité génétique, il y a

possibilité que le gène s'excise. L'expression transitoire offre ainsi l'avantage que la protéine désirée peut être exprimée en quelques jours. Ainsi, si un problème survient, une modification de la construction peut avoir lieu rapidement sans qu'on aille de besoin de produire plusieurs autres lignées de plantes.

### 3.1 Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux sont utilisés comme méthode d'expression transitoire. (Giddings et al. 2000; Marillonnet et al. 2005). Les virus sélectionnés sont manipulés afin d'introduire dans le génome du virus le gène d'intérêt codant pour la protéine désirée. Suite à l'introduction du virus dans la plante, le gène d'intérêt est répliqué et traduit comme les protéines du virus. De plus, les virus nouvellement formés peuvent se propager dans la plante. Ce qui permet une augmentation de la production de protéines recombinantes. Les vecteurs viraux permettent ainsi l'expression d'un gène étranger, avec une forte amplification intracellulaire du transgène par le virus porteur. Les vecteurs viraux végétaux dérivent principalement de virus à ARN simple brin de polarité positive.

Lors des premiers développements des vecteurs viraux (e.g. BMV et TMV) (French et al. 1986), on remplaçait une séquence non essentielle à la réplication (par exemple le gène codant pour la protéine de la capsid) du virus par le gène d'intérêt. Par contre, cette approche empêchait la propagation du virus à travers la plante et résultait en une faible production de protéines recombinantes. Dans la deuxième génération de vecteurs, le gène d'intérêt est ajouté au génome du virus tout en conservant tous ses gènes. Ces vecteurs permettent une réplication du virus et une infection systémique de la plante. La protéine d'intérêt peut être exprimée sous forme libre ou en fusion avec une protéine virale. Dans ce dernier cas des sites de clivages protéolytiques peuvent être ajoutés à la protéine d'intérêt pour permettre de générer une protéine libre. Aussi, la protéine fusionnée peut être utilisée pour la confection de vaccins. Par



exemple, un épitope peut être fusionné à la capsid, ce qui permet une présentation de séquences peptidiques étrangères à la surface de particules virales.

## **4 Les virus**

Les virus peuvent être classifiés de plusieurs manières, selon la géométrie de la particule virale, la présence ou non d'enveloppe, l'identité de leurs hôtes, le mode de transmission ou par le type de maladie qu'ils occasionnent. La plus pratique des classifications est probablement par type d'acide nucléique et son mode d'expression.

Il existe des virus à ADN et à ARN. Cependant le génome de la majorité des virus phytopathogènes est formé d'ARN plutôt que d'ADN (Pringle, 1999). Le génome des virus à ARN peut être codé dans deux directions différentes. Les gènes peuvent être lus dans la direction 5'→3' (polarité positive ou +) ou dans la direction opposée (polarité négative ou -). Les virus à ARN sont généralement constitués d'une molécule linéaire ou circulaire d'ARN. Certains virus contiennent des douzaines de molécules d'ARN. La taille des virus varie de 1700 à 60000 bases. Il y a trois types de virus ARN : à doubles brins, à sens positif ou à sens négatif.

### **4.1 Stratégies d'expression des virus**

La stratégie d'expression du virus dépend de la nature et de la structure du matériel génétique: ADN ou ARN; génome bicaténaire ou monocaténaire, segmenté ou non, circulaire ou linéaire. Selon la nature et de la structure du matériel génétique, les informations contenues dans le génome viral peuvent être traduites soit directement ou après une étape de transcription. Dans la

cellule, les virus détournent la machinerie de synthèse d'acides nucléiques ou de protéines à leur profit avec dans certains cas, une inhibition de synthèses d'ARN et d'ADN de l'hôte.

Les stratégies d'expression utilisées par les virus sont différentes selon la nature de l'ARN génomique. Comme un génome ARN (+) est identique à un ARN messager, il est directement traduit par la machinerie cellulaire. Au contraire, les génomes de polarité négative ou bicaténaire doivent être préalablement transcrits.

Pour permettre la réplication du virus à ARN de polarité négative ou bicaténaire, il faut en outre la synthèse de nouvelles molécules d'ARN (génomique ou messager). Pour s'y faire, le virus utilise une protéine virale nommée ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp). Tous les virus à ARN, à l'exception des rétrovirus, codent cette enzyme. L'ARN polymérase dans ce cas doit être associée au départ au virion. Il existe des protéines accessoires qui peuvent aussi participer à cette activité. Elles peuvent diriger l'ARN polymérase vers le site intracellulaire adéquat (membrane, vésicule) ou sur les sites spécifiques de la matrice ARN (site en 5' pour l'initiation et en 3' pour la terminaison). De plus, ces protéines accessoires peuvent faciliter l'activité de l'ARN polymérase (par exemple l'hélicase). On retrouve parfois des protéines d'origine cellulaires qui peuvent être associées à la réplication et/ou transcription des virus (Strauss et al. 2001).

#### **4.1.1 Virus à ARN simple brin de polarité positive**

Cet ensemble comprend la majorité des virus de plante. Le génome de ces virus peut directement servir de messager. Ainsi, les enzymes responsables de la multiplication sont synthétisées après l'infection et ne nécessitent pas d'être apportées par le virion; le génome viral en lui-même est donc infectieux. Par

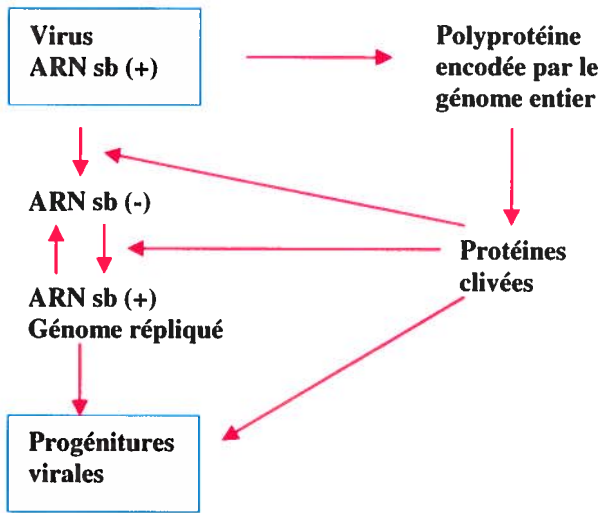
exemple, on retrouve le virus de la mosaïque du navet (TuMV), soit un *picornaviridae*. L'ARN génomique de ce dernier est traduit en une seule polyprotéine (Fig. 1) qui subira des clivages successifs par des protéases virales. Ces processus de maturation donneront naissance aux protéines structurales qui s'assembleront pour donner la capsidie et les protéines non structurales. Ces dernières interviendront dans les étapes de réplication, transcription secondaire et clivage protéolytique (Rueckert et al. 1996).

#### **4.1.2 Virus à ARN simple brin de polarité négative**

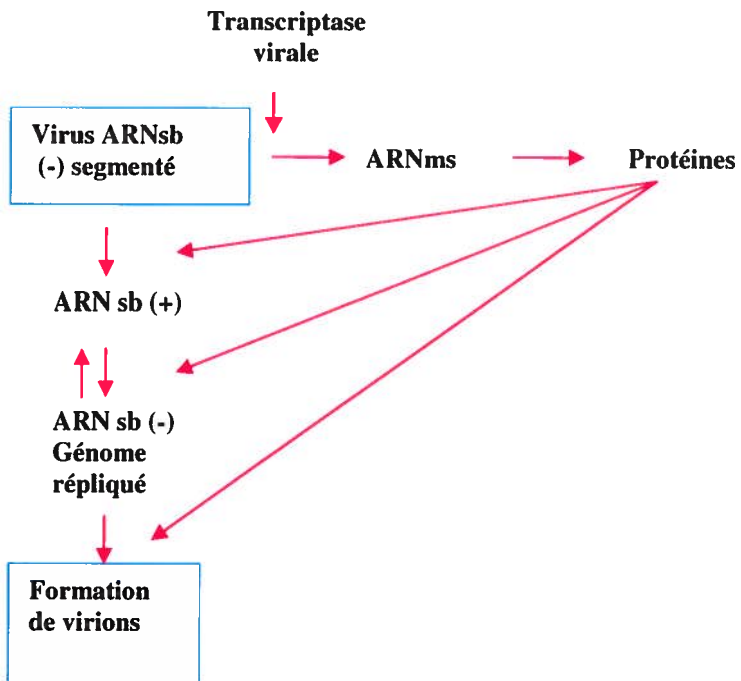
Dans cette catégorie on retrouve le virus *Tomato spotted wilt virus* qui fait partie de la famille des *Tospovirus*, soit un *bunyaviridae*. Ce virus a un génome segmenté. Les génomes, de polarité négative, ne sont pas infectieux. L'infection nécessite donc une ARN polymérase associée au virion pour la transcription en ARNm. La transcription se fait presque comme chez les virus à génome non segmenté. Chaque segment est transcrit alors en un ARNm lui-même traduit en une protéine ou polyprotéine qui subit un clivage protéolytique. Lors de la réplication, l'ARN polymérase initie la synthèse des brins ARN (+) et ARN (-) sans l'intervention d'amorces (Fig. 2) (Portela et al. 1999).

#### **4.1.3 Virus à ARN double brin**

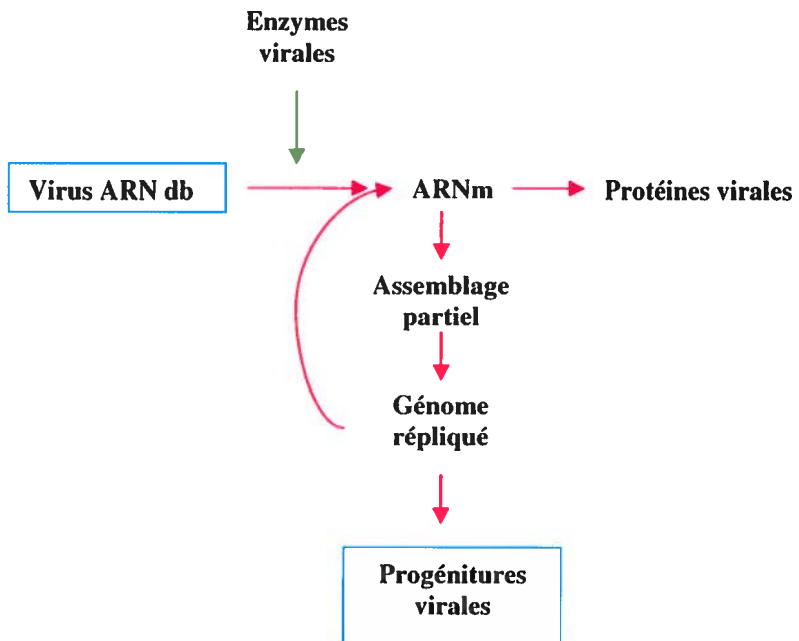
La première étape est la transcription d'un ARNm à partir de chaque segment du génome par l'ARN polymérase associée du virion. Ces virus ont un génome qui est transcrit à l'intérieur de la capsidie par une ARN polymérase empaquetée dans le virion. L'ARNm sort de la particule dans le cytoplasme où il est traduit en protéine. Ce brin ARN (+) peut aussi être encapsidé et copié pour la synthèse d'un nouveau génome ARN bicaténaire. Cette stratégie est utilisée par les réovirus et les virus de la famille des *Partitiviridae* (Fig. 3) (Gibbs et al. 2000; Smart et al. 1999; Strauss et al. 2000).



**Figure 1 : Stratégie d'expression des virus à ARN sb (+)**



**Figure 2 : Stratégie d'expression des virus ARNs (-) segmenté**



**Figure 3 :** Stratégie d'expression des virus à ARN double brin

## 5 Virus infectant la luzerne

Il existe plus d'une trentaine de virus connus à ce jour qui infectent la luzerne. Cependant, certains virus sont asymptomatiques, ce qui rend difficile, de caractériser tous les virus pouvant infecter la plante. La majorité des virus sont des virus à ARN simple brin de polarité positive (Tableau IV), ce qui concorde avec le fait que la majorité des virus infectant les plantes sont des virus à ARNs (+). Il est intéressant de constater que des virus ne causent aucun symptôme chez la plante.

**Tableau IV:** Différents virus pouvant infecter la luzerne

Famille	Genre	Espèce	Mode de transmission	Symptômes
<u>Partitiviridae</u> (ARNdb)	Alphacryptovirus	<i>Alfalfa cryptic virus 1</i>	Graine, division cellulaire	aucun
	Betacryptovirus	<i>Alfalfa cryptic virus 2</i>	Graine, division cellulaire	aucun
<u>Bromoviridae</u> (ARNsb+)	Alfamovirus	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	Par un vecteur; insecte, inoculation mécanique	Présent (tâches en mosaïque)
<u>Potyviridae</u> (ARNsb+)	Potyvirus	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Par un vecteur; insecte, inoculation mécanique	Présent (tâches en mosaïque)
<u>Geminiviridae</u> (ADNsb)	hybrigeminivirus	<i>Beet curly top hybrigeminivirus</i>	Par un vecteur; insecte, inoculation mécanique	Présent (ex.malformation des jeunes feuilles)
<u>Comoviridae</u> (ARNsb+)	Nepovirus	<i>Lucerne Australian latent nepovirus</i>	Graine	Aucun
<u>Potyviridae</u> (ARNsb+)	Potyvirus	<i>Clover yellow vein virus</i>	Par un vecteur; insecte, inoculation mécanique	Présent (tâches en mosaïque)
<u>Bromoviridae</u> (ARNsb+)	Cucumovirus	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Par un vecteur; insecte, inoculation mécanique	Présent (tâches en mosaïque)
<u>Comoviridae</u> (ARNsb+)	Comovirus	<i>Red clover mottle virus</i>	Par un vecteur; insecte, inoculation mécanique	Présent (tâches en mosaïque)

Source : <http://image.fs.uidaho.edu/>

## 6 La famille des *Partitiviridae*

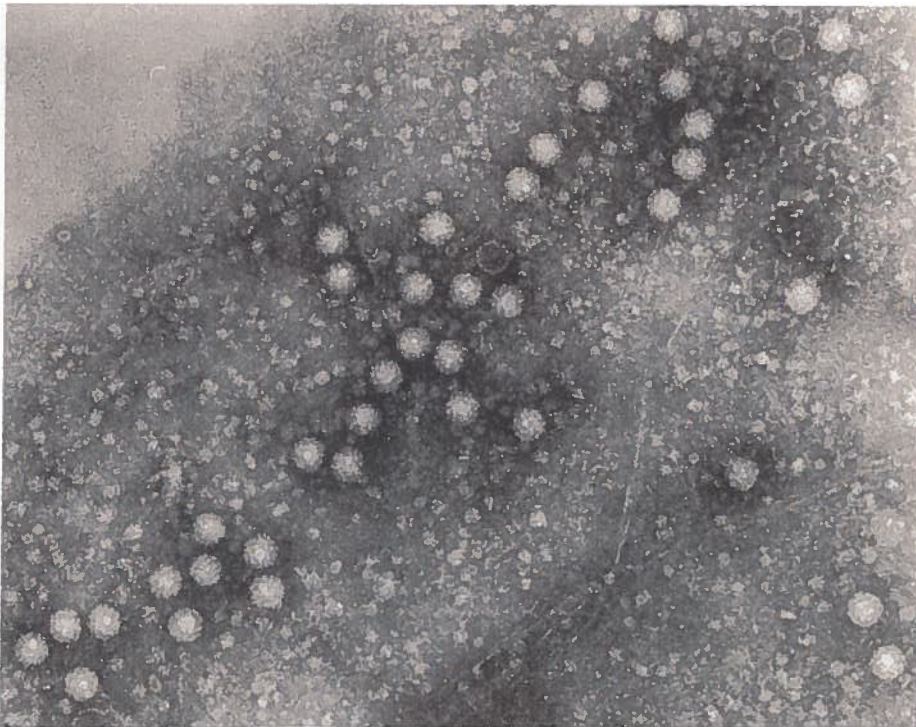
La famille des *Partitiviridae* comprend 4 genres (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). On retrouve les *Partivirus*, les *Chrysovirus*, les *Alphacryptovirus* et les *Betacryptovirus*. Ce sont tous des virus de morphologie icosaédrique, non-enveloppés et mesurant autour de 30 – 40 nm de diamètre (Fig. 4). Ce sont des virus fragmentés comprenant 2 fragments linéaires double brins d'ARN mesurant autour de 1,4 – 3,0 kpb. Chacun des brins est encapsidé séparément dans une capsidie de dimension similaire. Le brin le plus court code pour la capsidie et l'autre pour une RdRp. Ces virus sont associés à des infections latentes. Les *Partivirus* et les *Chrysovirus* sont les virus hôtes des champignons. Les virus sont transmis de manière intracellulaire lors de la division cellulaire et la sporogénèse. Pour ce qui est des *Alphacryptovirus* et les *Betacryptovirus*, ils sont transmis par l'ovule et par le pollen lors de la formation de graines. Il n'y a pas transmission de cellules à cellules, sauf lors de la division cellulaire. Les *Alphacryptovirus* sont des particules virales de 30 nm de diamètre. On retrouve près de 20 virus connus de ce genre. Pour ce qui est des *Betacryptovirus*, se sont des particules de 38 nm de diamètre. Ce sont des virus asymptomatiques chez les plantes, ce qui explique que ces virus ne sont pas très connus.

## 6.1 Alfalfa cryptic virus

La luzerne est connue pour contenir des crypto virus (Boccardo et al. 1987) mais peu d'informations à propos de ces virus sont connus présentement. Les données connues à ce jour sont les suivantes :

- Présence de 2 types de particules icosaédriques, dont une majoritaire de 30 nm et l'autre de 38 nm de diamètre (Accotto et al. 1989)
- 2 segments d'ARN doubles brins
- Présence d'une activité ARN dépendante-ARN polymérase dans les particules virales
- La plus long segment code pour la RdRp ( $M_r 1,27 \times 10^6$ ) et l'autre pour la capsid ( $M_r 1,17 \times 10^6$ )

Donc, les informations connues ont permis de classifier ce virus dans la famille des *Partitiviridae* du genre *Alphacryptovirus*.



**Figure 4:** Photo en microscopie électronique du *Beet cryptic virus*  
Source : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>



## 7 Hypothèse et objectifs expérimentaux

L'expression de protéines recombinantes dans les plantes est de plus en plus intéressante puisqu'elle entraîne une diminution du coût de production de celles-ci et permet une augmentation des niveaux des productions pour une population vieillissante. De nos jours, on obtient les protéines recombinantes dans la plante par transformation de la plante ou par l'infection d'un virus recombinant. L'utilisation d'un virus endogène ne causant aucun symptôme de maladie chez la plante est très prometteuse.

Medicago a démontré que dans certains de leurs plants de luzerne, il était possible d'extraire un ARN possédant une queue poly (A) qui ressemble à la RdRp virale. De plus, cet ARN n'a pas une origine génomique.

Hypothèse : Nous croyons que la luzerne est infectée par un virus suite aux résultats obtenus par la compagnie. Notre hypothèse de travail est que d'autres composantes devraient accompagner la RdRp et que les plantes RdRp positive devraient être infectées par un virus.

Le principal objectif de la recherche est de déterminer si d'autres composantes accompagnent la RdRp. Le second objectif est de constater si la luzerne de la lignée Oneida 2 possède des particules virales et le troisième objectif est de vérifier si les virus qui pourraient infecter la plante pourraient être utilisés comme vecteur d'expression protéique.

### **7.1 Caractérisation biologique des autres composantes qui accompagnent la RdRp**

Tout d'abord, une extraction de l'ARNdb de la luzerne aura lieu et sera suivie d'une purification sur gel. À partir de cet ARN purifié, il sera cloné et inséré dans un vecteur pour qu'il soit séquencé. Ainsi, il sera possible de déterminer quelles sont les composantes qui accompagnent la RdRp en comparant les séquences obtenues avec celles disponibles dans les banques de données.

### **7.2 Détection et analyse des particules virales**

Des extraits des plantes Oneida 2 et de 11.9 subiront des ultracentrifugations sur gradient de sucrose afin de vérifier si la luzerne possède des particules virales. Les virus isolés pourront être alors observés en microscopie électronique. On pourra déterminer la dimension et la structure du virus. La présence de la protéine RdRp dans les particules virales sera effectuée avec l'aide d'anticorps anti-RdRp qui auront été produit ultérieurement dans le lapin. Cette étape permettra de confirmer que les particules observées en microscopie sont celles désirées.

### **7.3 Vecteur d'expression protéique**

Dans l'espoir de l'utilisation du virus comme un vecteur d'expression de protéines d'intérêt, le potentiel du virus comme vecteur d'expression protéique sera analysé. Il faudra vérifier en outre si le virus est fortement exprimé dans la plante et son mode de propagation.

## Chapitre 2

### Matériel et Méthodes

#### 1 Milieux de culture

Le milieu de croissance des souches de *Escherichia coli* (*E. coli*) et d'*Agrobacterium tumefaciens* est celui conçu par Luria-Bertani (LB). Il est composé (p/v) en solide ou en liquide de 1% Tryptone, 0,5% extrait de levure et 1% de NaCl. Le pH est ajusté à 7,0 avec le NaOH 5 N. On ajoute 1,5% d'agar pour un milieu solide.

On ajoute au milieu un ou plusieurs des trois antibiotiques suivants pour permettre la sélection de clones positifs, soit : l'ampicilline (100 µg/ml), la kanamycine (50 µg/ml) ou la tétracycline (2 µg/ml).

La température de croissance de *E. coli* est de 37°C et celle de *A. tumefaciens* et de la levure est de 30°C.

## 2 Souches

### *Escherichia coli*

XL-1Blue : supE44 / hsdR17 / recA1 / endA1 / gyrA46 / thi / relA1 / lac<sup>-</sup>F  
(proAB<sup>+</sup> lac<sup>q</sup> lacZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup>))

DH5α : supE44 / hsdR17 / recA1 / endA1 / gyrA96// thi-1 / relA1

BL 21 : F<sup>-</sup> ompT/ gal/ dcm/ lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene  
1 ind1 sam7 nin5])

TOP10 : Φ80lacZΔM15 / ΔlacX74 / recA1 / araΔ139Δ (ara-leu)7697 / galU  
/galK / rpsL (Str<sup>R</sup>) / endA1 nupG / F<sup>-</sup> mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)

## 3 Vecteurs de clonage

### 3.1 pCR2.1

Il a été utilisé pour le clonage de produits PCR obtenus avec la Taq polymérase qui ajoute des adénines en 3'. Ce vecteur est commercialisé par la compagnie Invitrogen (catalogue #K2040-40). Ce vecteur est linéarisé et possède des thymines aux extrémités 5'. La ligation des séquences ADN ayant des extrémités compatibles s'effectue et donne un produit prêt pour la transformation dans *E. coli* TOP10.

### 3.2 pET21a

Ce plasmide est commercialisé par la compagnie Novagen. Il permet la production de protéines recombinantes dans *E. coli*. L'expression du gène codant la protéine d'intérêt est sous le contrôle d'un promoteur fort provenant du bactériophage T7. La transcription est effectuée par une ARN polymérase T7 provenant de la cellule hôte. Le gène de l'ARN polymérase T7 est sous le contrôle du promoteur *lacUV5* dans des bactéries contenant une copie chromosomique de l'ARN polymérase T7. L'expression des protéines recombinantes dans ces cellules est induite par l'addition d'IPTG dans la culture cellulaire.

## 4 Isolement d'ARN double brin

Pour purifier l'ARN double brin (ARNdb) de la luzerne, 3,5 g de feuilles ont été broyées dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et d'un pilon. Le broyat a été resuspendu dans 7 ml du tampon STE [Tris-Base 0,05 M, NaCl 0,1 M, Na<sub>2</sub>EDTA 0,001 M]. À ce mélange, on ajoute 1 ml de SDS 10%, 0,5 ml de bentonite 2% et 9 ml de phénol saturé avec STE contenant 0,1% de 8-hydroxyquinoline. Le tout a été homogénéisé puis centrifugé à 8000 x *g* pendant 15 minutes. La phase aqueuse a été récoltée (volume final de 10 ml complété avec du STE) et 2.1 ml d'éthanol 95% ont été ajoutés.

L'échantillon a été par la suite déposé sur une colonne contenant 0,5 g de cellulose CF-11 (Whatmann, catalogue #4021050) préalablement équilibré avec 10 ml de tampon STE contenant 16% d'éthanol. Un lavage de la colonne avec 20 ml d'une solution STE contenant 16% éthanol a été effectué. Avant de recueillir l'ARN, 1 ml de tampon STE a été ajouté à la colonne. Finalement, 10 ml de tampon STE ont été ajoutés et des fractions de 0,5 ml ont été recueillies. Un millilitre d'éthanol 95% contenant 25 µl d'acétate de sodium 3,0 M (pH 5,5) a été

ajouté à chaque fraction. Après une incubation de 2 h à -20°C, les échantillons ont été centrifugés à 8000  $\times$  g pendant 25 minutes. Les culots ont été resuspendus et mis ensemble dans un volume final de 40  $\mu$ l d'eau.

## **5 Méthodes de clonage**

### **5.1 Amplification de fragments d'ADN par réaction polymérase en chaîne**

Les réactions PCR ont été faites dans un volume final de 50  $\mu$ l qui contenaient 50 pmol de chacune des amorces, 50 ng de matrice, 200  $\mu$ M de dNTPs avec 2,5 U de Taq DNA polymérase (Biogene catalogue #D1000Y) dans un tampon contenant 45 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,01% Tween 20 ainsi que 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Les conditions d'amplification étaient les suivantes : une série de cycles de 30 sec. à 95°C pour la dénaturation, de 30 sec. à environ 5°C de moins que le  $T_m$  le plus bas des amorces pour l'hybridation et à 1min/1000bases pour l'élongation. La température d'hybridation est déterminée par l'équation suivante :  $T_a = 69,3 + 0,41(\% \text{guanine et cytosine}) - (650 / \text{taille de l'amorce})$ . Une élongation finale à 72°C durant 15 min. a été faite.

### **5.2 Analyse sur gel d'agarose**

Le pourcentage d'agarose pouvait varier entre 0,8% à 1,2% dépendamment de la taille des fragments à séparer. Le tampon de l'électrophorèse contenait 40 mM Tris-acétate pH 8,0, 1 mM EDTA. Le tampon final de chargement contenait 50 mM Tris pH 7,5, 100 mM EDTA pH 7,5, 10% glycérol, 0,05% Bleu de Bromophénol, 0,05% Xylène Cyanol. Pour l'extraction de fragments d'ADN, une trousse d'extraction de MILLIPORE (catalogue #LSKG EL0 50) a été utilisée, ainsi qu'un tampon d'électrophorèse modifié fourni dans la trousse.

### 5.3 PCR ET RT-PCR

#### 5.3.1 Transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR)

À partir des bandes ARNdb extraites sur le gel d'agarose, une copie ADN complémentaire à l'ARNdb extrait a été générée. Par la suite, les ADNc correspondants ont été amplifiés par PCR.

La réaction de transcriptase inverse a été faite avec la trousse de Clontech (catalogue #k1617-1). Le mélange réactionnel contenait 0,5 µg d'ARNdb, 10pmol de l'amorce CDS III (Tableau V) possédant un oligo(dT)<sub>30</sub> qui a été incubé à 72°C durant 2 min. pour dénaturer l'ARN et puis incubé sur glace pour 2 min. pour permettre aux oligos présents de s'hybrider. L'élongation a été effectuée durant 1 h à 42°C, suite à l'addition de 0,2 mM de dNTPs, 2,5 U de la reverse transcriptase MMLV (extraite du virus de la leucémie murine de Moloney) et 10 pmol de l'amorce BD SMART III qui a été ajouté 10 min. après l'élongation. La transcriptase a été inactivée à 75°C durant 10 min. Toutes traces d'ARN ont été ensuite détruites par une incubation de 20 min. à 37°C avec 1 µl de RNase H (2 unités).

Par la suite, avec la trousse de Clontech (catalogue #k1615-1), une amplification par PCR a été effectuée sur le produit obtenu. La Taq DNA polymérase (Biogene catalogue #D1000Y) a été utilisée. Ainsi, 2,5 U ont été utilisées pour chaque amplification en présence de son tampon 45 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,01% Tween 20 et 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Les réactions ont été faites dans un volume final de 50 µl contenant 10 pmol de chaque amorce, 2 µl d'ADNc double brins, 0,2 mM de dNTPs. Au départ, pour favoriser la dénaturation de l'ADN, les échantillons étaient maintenus à 95°C pendant 30 sec.. Par la suite, les cycles étaient les suivants : soit une série successive de 10

sec. à 95°C et de 6 min. à 68°C (avec 5 sec. supplémentaires à chaque cycle) durant 22 cycles. Une élongation finale de 5 min. a été faite à 68°C.

Les produits de PCR ont ensuite été clonés directement dans le vecteur pCR2.1 de la trousse TA cloning kit.

**Tableau V:** Amorces de Clontech utilisées pour l'amplification d'ARNdb

Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'	Utilité	Matrice
CDS III	5'-ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCGACA TG-d(T)30VN-3'	Amplification de l'ARN	ARNdb isolé
BD SMART III	5-'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGG CCATTATGGCCGGG-3'		
5' PCR	5'-TTCCACCCAAGCAGTGGTATCAACGC AGAGTGG-3'	Amplification de l'ADNc db	ADNc double brin
3' PCR	5'-GTATCGATGCCACCCCTCTAGAGGC CGAGGCCGCGCGACA-3'		

### 5.3.2 Extraction des ARNs totaux

Les plantes de luzerne Oneida 2 et 11.9 sont respectivement positives et négatives pour la RdRp. Les feuilles ont été conservées à -80°C. Deux techniques ont été utilisées pour l'extraction des ARNs. Dans les deux cas, les feuilles ont été broyées à l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. La première méthode a été faite avec la trousse d'extraction RNeasy® Plant Mini Kit de QIAGEN (catalogue #74903) et les ARNs totaux ont été extraits d'un maximum de 100 mg de broyat. Pour obtenir plus d'ARNs totaux, le réactif TRIzol (Invitrogen catalogue#15596-026) a été utilisé. Lors de la lyse des cellules de la plante, le réactif TRIzol maintient l'intégrité de l'ARN. Suite à l'ajout de chloroforme, une centrifugation à 8 000 x g est effectuée, ce qui sépare la



solution en une phase aqueuse et une phase inorganique. L'ARN se retrouve dans la phase aqueuse.

### **5.3.3 Transcription inverse**

Un total de 5 µg d'ARNs totaux a été dénaturé durant 5 min. à 65°C puis à 25°C afin de permettre aux 300 ng d'oligo(dT)<sub>18</sub> (ou un oligo spécifique) présents de s'hybrider. L'élongation des amorces a été effectuée durant 60 min. à 42°C dans un tampon 0,05 M Tris-HCl pH 8,0, 0,075 M KCl et 0,003 M MgCl<sub>2</sub>, 1 U RNase inhibitor, 40 mM d'un mélange de dNTPs et de 50 U de la reverse transcriptase StrataScript RT dans un volume final de 50 µl. La réaction de la reverse transcriptase a été inactivée à 90°C durant 5 minutes.

### **5.3.4 5'-RACE**

Afin de connaître la séquence complète de l'inconnu, une transcription inverse (point 5.3.3) avec l'oligo spécifique ARI-SP1 (tableau VI) a été effectuée sur les ARN totaux provenant de la luzerne ONEIDA 2. Une purification de l'ADNc sur colonne a été effectuée (Roche catalogue #1732668). Dix-neuf microlitres d'ADNc purifiée, 2,5 µl de tampon de réaction 10X (Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl, pH 8,3) et 2,5 µl d'ATP (2 mM) ont été mélangés et incubés 3 min. à 94°C et déposés sur glace. Ensuite, 1 µl de Terminal transferase I (80 U/µl) (Roche catalogue # 3333566) a été ajouté, le tout a été mélangé et incubé à 37°C durant 20 min. La transférase a été inactivée 10 min. à 70°C. Un PCR à partir de 5 µl de l'ADNc ayant subi l'ajout de nucléotides adénosine a été fait avec la Taq DNA polymerase en utilisant l'oligo CDS III et ARI-SP2. Le produit de PCR a été inséré dans le vecteur pCR2.1.

**Tableau VI : Amorces utilisées pour le 5'-RACE de la capsid**

<b>Nom de l'amorce</b>	<b>Séquence 5' → 3'</b>	<b>Utilité</b>	<b>Matrice</b>
ARI-SP1	5'-GAACATAACTAACGATAATC-3'	Amplification de l'ARN	ARN total
ARI-SP2	5'-TAGCGGCTATTCCATGAGGA-3'	Amplification d'ADNc en ADNdb	ADNc de la capsid

## **5.4. Clonage**

### **5.4.1 Digestion enzymatique**

Pour 1 µg d'ADN à digérer, il faut environ 2-3 unités d'enzymes. Les réactions ont été effectuées généralement dans un volume de 20 µl dans un tampon spécifique à chaque enzyme. Les réactions ont été incubées pendant 2 h à 37°C.

### **5.4.2 Déphosphorylation**

Cette technique favorise l'insertion d'un fragment ADN dans un vecteur, en empêchant ce dernier de se refermer sur lui-même lors de la ligation. L'enzyme qui a été utilisée est la phosphatase alcaline de crevette (SAP) de Roche (catalogue #1758250). Cette enzyme élimine les phosphates 5' terminaux et est inactivée à 65°C durant 20 min.

### **5.4.3 Ligation**

L'enzyme T4 DNA ligase de New England Biolabs (catalogue #M0202s) permet la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3' OH et 5' P de l'ADN. La ligation a été effectuée durant 16 h à 4°C dans un volume final de 20 µl dans un tampon 10X fourni (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 100 mM Dithiothreitol et 250 µg/ml de BSA). Un ratio vecteur/insert de 1/3 a été utilisé.

### **5.4.4 Transformation**

La transformation par choc thermique a été utilisée pour *E. coli*. L'électroporation a été utilisée pour la transformation de *A. tumefaciens*.

### **5.4.5 Choc thermique**

La transformation des cellules XL1-Blue ou DH5α chimiquement compétentes a été effectuée selon le protocole décrit dans Sambrook et al., 2000.

### **5.4.6 Électroporation**

La transformation a été effectuée dans une cuve à électrodes. La souche XL1-Blue a été utilisée pour chaque préparation de cellules compétentes. Cette opération consiste à faire subir aux cellules une série de lavages à l'eau stérile, pour éliminer au maximum la présence de sels. En effet, lors de l'électroporation, les cellules subissent un choc électrique et une concentration en sels trop importante provoquerait un arc électrique qui endommagerait celles-ci.

(Sambrook et al. 2000). L'ADN (50 à 150 ng) a été mis en présence de 50 µl de suspension bactérienne électro-compétente. Les conditions de l'électroporation avec le Pulse Controller de BioRad étaient de 400 Ω de résistance, 1,6 V, 25 µFD d'impédance avant l'ajout de 1 ml de LB. Après 2 heures d'incubation à 30°C les bactéries ont été étalées sur un milieu gélosé, avec l'antibiotique approprié, suivi d'une incubation de 2-3 jours à 30°C.

## **5.5 Extraction ADN plasmidique**

### **5.5.1 MiniPrep traditionnelle**

Des milieux LB supplémentés avec l'antibiotique approprié ont été ensemencés par des bactéries contenant l'ADN plasmidique désiré. Les culots obtenus suite à la centrifugation de la culture ont été resuspendus dans 100 µl de TEG (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, Glucose 50 mM, pH 8,0) contenant 100 µg/ml de RNase A. L'homogénat a été incubé 5 min. sur glace, et 100 µl de tampon de lyse frais a été ajouté (0,2 N NaOH, 1% SDS). Après 5 min., 150 µl d'une solution neutralisante (3 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 M NaAc) ont été ajoutés. La solution a été centrifugée 5 minutes et le surnageant a été conservé dans un autre tube. L'ADN plasmidique a été récupéré par une précipitation à l'éthanol 95%. L'alcool a été enlevé et le culot a subi un autre lavage (éthanol 70%). Finalement, le culot a été resuspendu dans 30 µl d'eau.

### **5.5.2 Miniprep Sigma**

Les plasmides ont été parfois purifiés avec la trousse de Sigma (catalogue # G1N350). L'extraction s'est effectuée selon les directives du fabricant.

## **6 Buvarinage de type Northern**

Toutes les manipulations se font dans des conditions sans RNases.

### **6.1 Préparation de la sonde**

La trousse (catalogue #1585606) de Roche a été utilisée pour la production de la sonde codant pour la RdRp et celle de la capsid. Les sondes ont été produites comme décrit dans le protocole de la compagnie. Un produit de PCR a été utilisé comme matrice pour la production des sondes (tableau VII).

### **6.2 Séparation de l'ARN sur gel d'agarose**

Quinze  $\mu\text{g}$  d'ARN total par échantillon ont été utilisés. Les échantillons ont été déposés sur un gel d'agarose de 1,5% dans un tampon MOPS 1X (20 mM MOPS, 5 mM acétate de sodium, 2 mM EDTA pH 7,0) contenant 2 % de formaldéhyde. Les échantillons (10  $\mu\text{l}$ ) ont été mélangés avec 18  $\mu\text{l}$  du tampon de chargement (300  $\mu\text{l}$  de formamide, 120  $\mu\text{l}$  de formaldéhyde, 75  $\mu\text{l}$  de MOPS 10X et 3  $\mu\text{l}$  de bromure d'éthidium (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )). Le mélange a été chauffé à 65°C durant 10 min. et mis sur glace pendant 1 minute. Les échantillons ont été déposés sur gels et migrés à 3-4 V par cm de gel dans un tampon de migration de MOPS 1X.

### **6.3 Transfert de l'ARN sur une membrane de nylon par capillarité**

Suite à l'électrophorèse, le gel a été trempé 2 fois durant 15 min. dans du SSC 20X (3 M NaCl, 300 mM citrate de sodium, pH 7,0) pour enlever le formaldéhyde. Un montage standard en sandwich du gel a été effectué. Un transfert a été fait durant 16 h.

#### **6.4 Pré-hybridation et hybridation de la membrane**

Le DIG Easy Hyb Granules de Roche (catalogue #1796895) a été utilisé comme tampon. Sept ml de tampon pour la pré-hybridation ont été utilisés pour une membrane de 10 x 7 cm et 3 ml pour l'hybridation finale. Le tampon a été chauffé à 68°C durant 3 minutes. Puis la membrane a été incubée durant 30 min. à 68°C avec le tampon de pré-hybridation dans un four à hybridation permettant la rotation des tubes. Durant cette étape, 50 µl d'eau contenant 100 ng de sonde/ml de tampon ont été bouillies durant 5 min. et déposées doucement dans un bain de glace. L'amorce dénaturée a été mélangée dans le tampon d'hybridation préchauffé. Le tampon de pré-hybridation a été remplacé par celui contenant l'amorce et le tout a été incubé à 68°C durant 16 heures. Par la suite, la membrane a été incubée 2 fois 5 min. dans un tampon de faible stringence (2X SSC, 0,1% SDS). Finalement, le tampon de forte stringence (0,1X SSC, 0,1% SDS) a été chauffé à 68°C et la membrane a été incubée 15 min. avec agitation.

#### **6.5 Détection de sondes hybridées par chemiluminescence**

La membrane a été déposée dans le tampon de lavage (0,1 M d'acide maléïque, 0,15 M NaCl, 0,3% (v/v) Tween 20, pH 7,5) avec agitation durant 2 minutes. Ensuite, elle a été incubée 30 min. dans la solution de blocage 1X de Roche (catalogue #1585762) avec agitation à la température pièce. L'anticorps anti-DIG-AP de Roche (catalogue #1093274) a été dilué 1 :1000 dans 20 ml le tampon de blocage 1X et la membrane a été incubée durant 30 min. avec agitation à la température de la pièce. La membrane a été par la suite lavée 2 fois 15 min. dans le tampon de lavage 1X. La trousse CDP-Star de Roche (catalogue #2041677) a été utilisée pour révéler l'anticorps en utilisant un film de Kodak.

**Tableau VII:** Amorces utilisées pour la production de sondes

<b>Nom de l'amorce</b>	<b>Séquence 5' → 3'</b>	<b>Utilité</b>	<b>Matrice</b>
Rd15.c	5'-GATAATCGGTTACCAGCCCTC-3'	Amplification d'un segment ADN de RdRp	pET21a/RdRp
Rd847.r	5'-GCTACTCTCGACTGGAAA -3'		
5x	5'-CTAACCAGATTATCGTTAGT -3'	Amplification d'un segment ADN de la capside	PCR2.1/ capside clone #10
3x	5'-GAACTAGAAACATCTAGACG-3'		

## **7 Isolement de particules virales**

Les feuilles ont été broyées à l'azote liquide en une fine poudre. Une quantité de 15 g de poudre ont été utilisés pour chacune des isollements. Un volume de 3 ml de tampon PKE (30 mM phosphate de sodium pH 7,6, 150 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA et 0,25% de 2-β-mercaptoéthanol) par gramme de poudre ont été ajoutés et mélangés durant 1 h à 4°C. L'échantillon a été passé sur une gaze pliée en quatre. Le filtrat a été ajusté à une concentration de 6% de polyéthylène glycol et 0,15 M de NaCl. Le tout a été laissé sur glace durant 1 heure. Le mélange a été centrifugé à 8000 x *g* pour 15 min. à 4°C. Le surnageant a été décanté et le culot a été resuspendu dans le tampon PE (5 mM de phosphate de sodium pH 7,6, 10 mM de Na<sub>2</sub>EDTA et 0,25% de 2-β-mercaptoéthanol). Du tétrachlorure de carbone a été ajouté à une concentration de 25%, l'échantillon a été mélangé fortement et centrifugé à 8000 x *g* pour 15 min. à 4°C. Le surnageant a été ajusté à 1% de Triton X-100 et subi une ultracentrifugation à 70 000 x *g* pour 3 h sur un gradient de sucrose de 20-40%. Le culot et les bandes ont été resuspendus dans le tampon PE et ils ont été observés en microscopie électronique pour la présence de particules virales.



## 8 Production d'anticorps RdRp chez le lapin

### 8.1 Purification de corps d'inclusion

Deux cultures de 500 ml LB-amp ont étéensemencées avec 5 ml d'une pré-culture du clone pET21a/RdRp. Une incubation à 37°C avec agitation jusqu'à une densité optique de 0,4 ( $\lambda$ 600) a été effectuée, puis 5 ml d'IPTG 100 mM a été ajouté et le tout est incubé durant 3 h à 37°C avec agitation.

**Isolement :** Les cellules bactériennes ont été centrifugées à 7000 x *g* pendant 5 min. et resuspendues dans 4 ml de tampon de lyse froid (100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Tris pH 8,0). Ensuite, elles ont subi un traitement à la French Press pour les faire éclater. Le produit récolté a été centrifugé à 5000 x *g* pour 10 min. à 4°C et resuspendues dans 5 ml de tampon de lyse contenant 0,1% de déoxycholate. Les cellules ont été incubées sur glace 10 min. et 20  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> (2 M) ainsi que 50  $\mu$ l de DNase I (1 mg/ $\mu$ l) ont été ajoutés. Une centrifugation de 30 min. à 8000 x *g* a été effectuée. Les cellules du culot obtenu ont été resuspendues dans 30 ml de tampon de lyse + NP-40 1% et ont ensuite subies la même centrifugation. Les cellules ont été resuspendues dans 30 ml de tampon de lyse contenant Triton X-100 (0,5%) et centrifugées de nouveau. Ensuite, les cellules du culot ont été resuspendues avec une solution d'urée 1 M contenant 50 mM Tris pH 8,0 et centrifugées pour être ensuite resuspendues dans 30 ml de tampon de lyse. Finalement, elles ont été centrifugées pour une dernière fois et resuspendues dans 5 ml de tampon de lyse.

## **8.2 Séparation des protéines par électrophorèse**

Un total de 400 µg de protéines RdRp a été séparé sur 2 gels de polyacrylamide de 10%. Les gels ont été colorés avec du bleu de Coomassie et la bande correspondante à la RdRp a été découpée et brisée en de minuscules morceaux.

## **8.3 Injection dans le lapin**

Les protéines préparées ont été envoyées à l'université McGill grâce à une collaboration avec le Dr Marc Fortin. Une première injection de 350 ng de protéines a été faite à 2 lapins suivie de 100 ng à la troisième, sixième et à la dixième semaine. À la douzième semaine, les lapins ont été saignés et le sérum contenant les anticorps isolés.

## **9 Analyse de l'expression de la protéine RdRp**

### **9.1 Extraction des protéines totales solubles de la luzerne**

Les feuilles ont été conservées à -80°C. Lors de leur utilisation pour analyse, elles ont été broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un pilon et d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Ces échantillons ont été mélangés fortement dans 3 volumes de tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM PMSF). Une centrifugation (13 000 x *g*) durant 10 min. a permis d'enlever les débris cellulaires. Le tout est conservé à -80°C.

## 9.2 Immunobuvardage

Environ de 5 à 10 µg de protéines ont été mélangées dans le tampon 2X de Laemmli en présence de 200 mM de β-mercaptoéthanol. L'homogénat a été bouilli 3 min. pour permettre aux protéines d'être dénaturées et centrifugées à vitesse maximale durant 3 minutes. Les protéines ont été séparées sur un gel de polyacrylamide (10 à 12%) contenant 0,1% SDS. Les échantillons ont migré dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 6,8, 240 mM Glycine, 0,1% SDS; pH 8,3) à 200 V avant d'être transférés sur une membrane de nitrocellulose pendant une heure à 100 V dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 20% Méthanol; pH 8,3).

La membrane a été déposée pendant 10 min. dans du glycérol 10%. Ensuite, elle a été immergée pendant une heure ou 16 h (4°C) dans la solution de blocage 5% lait- PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH7,4)-0,2% Tween-20 pour saturer les endroits non spécifiques. La membrane a été incubée 2 heures avec l'anticorps primaire à température pièce ou 16 h à 4°C (voir tableau VIII). La membrane a subi 2 lavages de 5 min. (PBS 1X-0,2% Tween-20) et ensuite a été incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la phosphatase alcaline (voir tableau VIII) à température pièce durant 1 heure. Le substrat chimioluminescent luminol de la trousse ECL d'Amersham pharmacia (catalogue #RPN2132) a été utilisée pour la détection.

**Tableau VIII:** Dilution des anticorps utilisés pour les immunobuvardages de type Western Blot

<b>Anticorps (primaires et secondaires)</b>	<b>Dilutions (PBS-5%Lait-0.2%Tween-20)</b>
Anti-T7 de souris Monoclonal	1 :5000
Pré-immun lapin1 et 2 Anti-RdRp final lapin 1 et 2 Polyclonal (Produit à Université McGill)	1 :1000
Anti-lapin de mouton – Peroxydase polyclonal (Chemicon cat. #AP304P)	1 :2000
Anti-IgG (H+L) de souris de chèvre- Peroxydase Polyclonal (KPL cat. #0741806)	1 :5000

## Chapitre 3

### Résultats

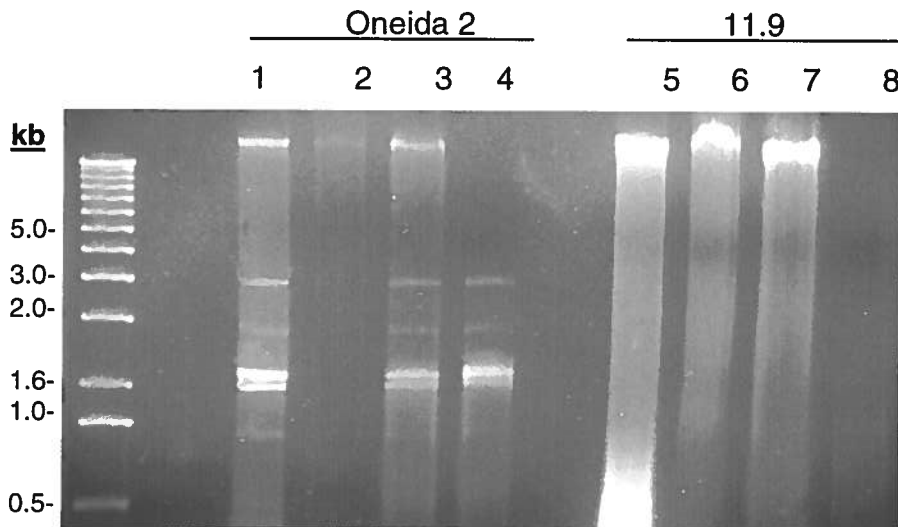
Les données recueillies par la compagnie Medicago Inc. orientaient les recherches vers la possibilité que certaines plantes de luzerne soient porteuses de virus. En effet une séquence similaire à celle des RdRp virales avait été trouvée. L'objectif principal de ma recherche devenait alors la caractérisation des autres composantes virales qui accompagneraient la RdRp.

#### 1.1 Purification d'ARN double brin

Il y a formation d'ARN double brin lors d'une étape intermédiaire de la réplication des virus à ARN. La purification de l'ARNdb permet donc d'identifier les autres composantes associées avec l'ARN codant pour la RdRp. La purification de l'ARNdb a été effectuée sur des feuilles de luzerne des lignées Oneida 2 et 11.9. Oneida 2 est une plante de luzerne dont la présence de la RdRp a été détectée. La plante lignée 11.9 est par contre négative pour la présence de la RdRp. Une extraction a été effectuée à partir de 3,5 g de feuilles pour chacune des lignées. Les produits récoltés lors des extractions ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1% (Fig. 5). Suite à la migration et une coloration au bromure d'éthidium, deux bandes d'égales intensités, ayant une taille d'environ 1,5 et 1,8 kb, et deux bandes de taille supérieure (1,9 et 3,0 kb) mais de plus faible intensité ont été observées chez Oneida 2 (puit 1). Ces bandes n'étaient pas présentes pour 11.9 (puit 5). Par contre, une bande à la même hauteur et de poids moléculaire très élevé (plus de 10 kb) a été remarquée sur l'extrait 11.9 et Oneida 2 (puits 1 et 5). Afin, de déterminer si les bandes observées pour Oneida 2 sont bien de l'ARN double brin, des traitements DNase et RNase avec ou sans sel ont été effectués. La présence de sel dans l'extrait permet de maintenir les ARN sous leur forme double brin, forme qui n'est pas dégradée par la RNase. Lors du traitement

RNase sans sel aucune bande n'a résisté au traitement (puit 2). Par contre, lors de l'ajout de sel, la résistance des 2 bandes prédominantes chez Oneida 2 a été observée (puit 3). La bande supérieure lors des traitements avec RNase a résisté tant chez Oneida 2 que 11.9 (puits 2, 3, 6 et 7). Lors du traitement DNase chez Oneida 2 et 11.9, la bande supérieure a été dégradée totalement, par contre les bandes inférieures n'ont subi aucune dégradation (puits 4 et 8).

Ces résultats indiquent la présence de deux ARN double brin chez Oneida 2. Ces deux molécules possèdent des tailles pouvant leur permettre de coder pour la RdRP et une autre composante virale.



**Figure 5 :** Purification d'ARNdb de plantes de luzerne. L'ARN db a été purifié par chromatographie sur une colonne de cellulose et analysé par électrophorèse sur un gel non dénaturant de 1% d'agarose avec un marqueur à ADN db.

Produits récoltés de la purification ARNdb (Dans les puits 1 et 5; l'ARNdb a subi aucun traitement, puits 2 et 6; traitement RNase sans sel, puits 3 et 7; traitement RNase en présence de sel, (puits 4 et 8; traitement DNase)

## 1.2 Clonage, séquençage et banques de données

Les ARN double brin ont été clonés et séquencés afin d'en connaître leur nature.

Les bandes autour de 1,5 et 1,8 kb ont été extraites du gel. Chacune des bandes a été transcrite en ADN en utilisant une transcriptase inverse et un PCR a été réalisé avec la trousse de Clontech à partir du produit obtenu lors du RT. Le produit d'amplification obtenu a été inséré dans le vecteur pCR2.1. L'ADN plasmidique a été isolé des colonies obtenues. Divers clones ont été obtenus dont les inserts avaient des longueurs différentes. Les clones ont été séquencés en utilisant les amorces M13 forward et reverse. Les séquences obtenues ont été comparées entre elles et avec les banques de données. L'analyse des séquences a démontré la présence de trois séries d'insert : une série correspondait à l'ARN désigné ARNdb-1 codant pour la portion 3' de la RdRp (6 clones), une autre série de 4 clones codait pour l'ARN désigné ARNdb-2 (soit la capsid), finalement l'autre série contenait sept clones qui codaient pour des ARN différents. Puisque la portion 3' de la RdRp originale est identique à celle obtenue par Medicago, un 5' RACE supplémentaire n'a pas eu lieu.

Un 5' RACE a été effectué pour s'assurer que la copie ADN de l'ARN db-2 était de pleine longueur. Le produit de la PCR a été inséré dans le vecteur pCR2.1 et une dizaine de colonies ont été séquencées. Le tableau IX résume les propriétés des ARN double brin.

**Tableau IX:** Résumé des séquences

Génome	Longueur (pb)	Nucléotides codants	Acides aminés	Masse mol. kDa	Fonction
ARNdb 1	1 890	1 761	587	58,7	RdRp
ARNdb 2	1 429	1 215	405	40,5	Capsid

La séquence nucléique des deux ARN double brin a été comparée aux séquences inscrites dans GenBank. La séquence de l'ARNdb-1 a montré une forte homologie avec la RdRp de *Oyster mushroom isometric virus* (OMV), un membre des *Partitiviridae* (Fig. 6). Cette comparaison confirme le résultat obtenu préalablement par Medicago inc., soit que cet ARN code pour une RdRp. Lorsque la séquence 2 a été soumise aux banques de données, une homologie de séquence a été obtenue pour des virus de la famille des *Partitiviridae* (voir Tableau X).

Pour ce qui est de la séquence de l'ARNdb-2, il y a une forte homologie avec l'ARN codant pour la protéine de capsid du *Raphanus sativus cryptic virus 1*, également un membre des *Partitiviridae* (Fig. 7). Le Tableau XI montre le pourcentage d'identité avec l'ARN codant pour la protéine de la capsid venant des virus de la famille des *Partitiviridae* et des *Cryptoviridae*.

Une comparaison des séquences protéiques de la RdRp (Fig. 8) et celle de la capsid (Fig. 9) avec les virus ayant le plus fort pourcentage d'identité ont été effectuées. Même si le pourcentage d'identité est faible, des motifs propres aux RdRp et aux capsides ont été conservés (en bleu). Ce qui permet de confirmer les fonctions des 2 séquences.

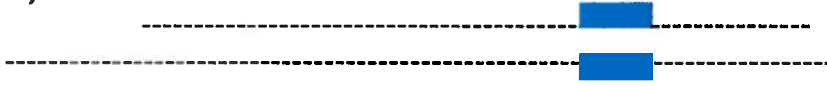
Comme les résultats nous orientent vers les virus de la famille de *Partitiviridae*, une analyse de cette famille permet de constater que ces virus possèdent un génome segmenté en 2 fragments, dont un des fragments code pour une RdRp et l'autre pour la capsid. Nos données laissent donc à penser que nous avons affaire à un cryptovirus qui infecte Oneida 2. Ce qui laisse envisager que l'inconnu est une capsid qui accompagne la RdRp pour former un virus dans Oneida 2.

Le clonage, le séquençage et l'analyse de cette famille de virus, nous laisse croire que la RdRp se retrouve dans une des 2 bandes isolées et que



probablement seulement une autre composante l'accompagne. La RdRp est une séquence de 1890 bases dont 1761 sont codantes. Ce qui donne une séquence de 587 acides aminés, soit une protéine de 58,7 kDa (Fig. 10). Pour l'inconnue, c'est une séquence nucléique codante de 1215 bases (Fig. 11), ce qui forme une séquence de 405 acides aminés, soit une protéine de 40.5 kDa (Tableau XII).

**A)**



**B)**

```
OMV 1329  CATTTCAGGAATATACTCAGGATATATGCAAACCCAGATCCTCGATTCCCTGTACAATATG
          ||||| || ||||| ||||| ||||| | || || || || || ||||| |||||
RdRp1047  CATTCTGGTATATACTCTGGATACTTCCAGACACAAATACTAGATTTCGATGTACAATTGT

OMV 1389  GTTATGATCTTTACTATGGTTTCTCGGCTTGGCTTCGATCTCGACAAAGTCGTTATTTAA
          ||||| ||||| ||| | | ||| | | ||| ||||| || | ||| | |||||
RdRp 1107 GTTATGATCTTCACTGTTCTATCTAGAATGGGGTTTGATCTTGAAAGAGTTGAAATTTAA

OMV 1449  GTTCAAGGCGATGATTCCATTTTC 1472
          || ||||| ||||| ||||| |||||
RdRp1167  GTACAAGGAGATGATTCCATTTTC 1232
```

**Figure 6: A)** Portion homologue de la RdRp (ARN-1) avec la RdRp du *Oyster mushroom isometric virus*

**B)** Comparaison de la séquence nucléique de la RdRp avec *le Oyster mushroom isometric virus* (OMV) (*Partitiviridae*)

```

      1140      1150      1160      1170      1180      1190
Raphan TTCTTTAACTGATTCTTCCACTTACCTGTCACTTGATGACTCGGTAACCTAAGATGATGAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RdRp-2 TTCTTCCACTTAC-CTGTCACTTG--ATGACTCGGTAACCTAAG--ATGATGAAGTCTAA
      1150      1160      1170      1180      1190      1200

      1200      1210      1220      1230      1240      1250
Raphan GTCTAAGAATTAGATTCTGCGTTTCCGTCGTCTAGATGTTTCTAGTTCCGGTTTTATTTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RdRp-2 GAATTAGATTCTGCGTTTCCGT--CGTCTAGATGTTTCTAGT--TCCGGTTTTATTTCG
      1210      1220      1230      1240      1250

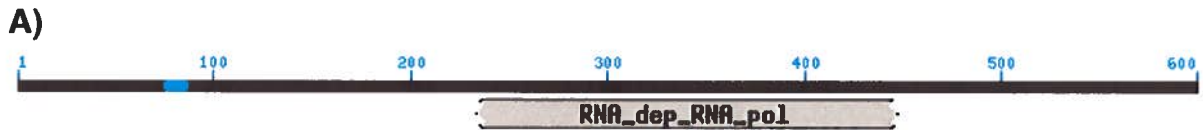
      1260      1270      1280      1290      1300      1310
Raphan GCTTCTTTATTTTGTAGGATTTAGAACAACCAAAAAAATTTTAAAATCACT--TG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RdRp-2 CTTCTTTATTTTGTAGGATTTAGAACAACCAAAAAAATTTTAAAATCACTTGCTG
      1260      1270      1280      1290      1300      1310

      1320      1330      1340      1350      1360
Raphan CTGTTTTTTTATTTCTCGTCCTGCGTTTTTCCTTTT--GTCAGTCGTTTTTTTCAATTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RdRp-2 TTTTTTTTATTTCTCGTCCTGCGT--TTTTCTTTTGTGTCAGTC-GT--TTTTTTCAATTT
      1320      1330      1340      1350      1360      1370

      1370      1380      1390      1400      1410      1420
Raphan CTTTTCTGTTTCGACTTAAAAAACTAAAAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RdRp-2 TTTTTCTGTTTCGACTTAAAAAACTAAAAACTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
      1380      1390      1400      1410      1420      1430

```

**Figure 7 :** Comparaison de la séquence de la capsid avec celle de la capsid du *Raphanus sativus cryptic virus 1 (Partitiviridae)*



**B)**

RdRp 15 MKNIEIIGYKPSLAKPIRGNVDPNSNINYGNIVDYALRKYL TNEEFTIVTRGYRRSQWA 73  
M NI+I+G S AK I G++ + Y NIVD+ALR++LT E V GYRRSW+

OMV 1 MLNIQILGSFKSAAKAIVGHLTTPLRVETYNIVDHALRRFLTPAETDEVINGYRRSVWS 60

RdRp EDSLKSDLKLDSDYFPVLK DTHYNAIEHTRKLFKPDSLLKPIHFSDLRHYPWQLSTNI 133  
EDSL +D++KL+S+ V KD HY+NAI H +K+F P+ L+P+HF+DLR YPWQLST++

OMV EDSL MNDINKLNSEEH SVPKDEHYWNAI SHVQKMFTPEVPLQPVHF TDLRKYPWQLSTSV 120

RdRp GAPFATSKSWNEYVIQKF-----DEGF 155  
GAP+ATSKSW YV + DE

OMV GAPYATSKSWQNYVRESLMATR TATRPLNSLNPTTAIYLLKPTKV NLSILRCSRND E-- 178

RdRp TKSYYRDLFREA HGESLLPEMIDRRM TKRNLYNEMFFINRTNIHLIKDGHTTSSGHDLK 215  
TK R + + L ++ D RMTK NLY+E FF R NIH K G SGHD +

OMV TKPLQRIVLH HKKTDPL--KIYDIRM TKHNL YSEAFFHARKNIHYAKLGLRETDSGHDFR 236

RdRp YWNTAFARQH LVESH D---EDKIRLVFGAPSTFLMAELTFIWPLQTSLLYQGER SPMLW 271  
YWNTAFARQH+VE + K+RLVFGAP T L AEL FIWPLQT LL + SPMLW

OMV YWNTAFARQH IVEKKPGILA QPKVRLVFGAPFTLLTAE LIFIWPLQTHLLMQDFSPMLW 296

RdRp GYETTTGGWSR LYKWASSRMPRYDFVATLDWKR FDRDARHTV I SDIHLQVMRSYFDFNNG 331  
GYET GGW RL S ++ VATLDW FDR ARHTVI DIH VMR FDF NG

OMV GYETILGGWYRLRGHLSGKIDTDKLVATLDW SFGDRYARHTVIKDIHTKVMR PCFDF TNG 356

RdRp YHPTIHYPDSTGANPQ-----RIENLWNWMTDATLTIPLMLPDGKILRFKHSGIYSGYF 385  
YHPT YP ST + R+ENLWNWMTDA LT+PL++PDG ++RF HSGIYSGY

OMV YHP THRYPISTVD ADEQPVSTRLENLWNWMTDAVLTVP LLMPDGT MIRFT HSGIYSGYM 416

RdRp QTQILDSMYNCVMIFTVLSRMGF DLERVEIKVQGDDSI FLMCYPFITLQNTFLQMF AHYA 445  
QTQILDS+YN VMIFT++SR+GFDL++V IKVQGDDSI F++ FI + N FL MF HYA

OMV QTQILDSL YNMVMIFTMVSRLGFDL DKVVIK VQGDDSI FMLLCCFILIANWFLTMFKHYA 476

RdRp KIYFGSTLNIDKSEILPSLENAEVLKYRNHGTM PYREELQLLAML RHPERTVSLPSLMAR 505  
YFG+ L+ KSEI SLE+AEVLKYRN +PYR+ + LLA LRHPER+ +L +LMAR

LYYFGAVLSDKKSEIRDSLEHAEVLKYRN R NGI PYRDP IALLAQLRHPERSDTLQALMAR 536

RdRp SIGIAYANCGFHSRVYQICEDIYNFLKAGGYS PDPHGLPGSLR YRQNYVPGYSE-VDISH 564  
+IGIAYANCG RVYQICEDIY +L G++PD GLP LR+ Q ++PG E +DIS

OMV AIGIAYANCGSDPRVYQICEDIYLYLANKGF TPAKGLPSGLRFIQTHLPGGDETIDISR 596

RdRp FPSYFETV 572  
FP+Y+ETV

OMV FPTYYETV 604

**Figure 8 : A)** Portion de la RdRp avec une forte homologie avec les RdRp virale  
**B)** Comparaison de la RdRp avec le *Oyster mushroom isometric virus* (OMV) (*Partitiviridae*)

CP	STSSYSPSSLMDYIVHQINSNLVDNFYFKRTPPDYHPYVIRLYYGVIFWVQCIRAGHYV	71
	STSSY P+ Y++++S +V + + P ++Y ++ ++Q +RA	
RSV	STSSYIPNFTSAFYLNKMSLQVTLNWTNNCSGWVPPYSQIYISMLLYLQVMRAMKKA	159
CP	GEL--DMSKHQFLGRFLDAHPLESLTVAGPLIPLFKTLCASQP-EIPTFGKVYPRLPVAV	128
	G L + P ESL V GPL+ LF+ + A +P + +FG V P LPA	
RSV	GVLRPNSELSHLNFEMSTIFPFESLMVPGPLVNLNFENITAFRPLQTDSEFGNVTPFLPAEP	219
CP	GPNNRDEFIKNDITSNLLPNVPGIFALLEHLNGIINPTPPAEPAYPKKGMHIPVTATTNQ	188
	G + F N LP++P + + L + E A + G++ + +	
RSV	GWSNATFFAPNGSLVRHLPHIPALISRLRI-----CETA-SENGLNDISFSAHHH	269
CP	ATIFGHHTFPVPAERTNRDRWALCSSLGQYCEADARLNEAFAERYSKFRFPTHRANGAL	248
	F F + ++ L + GL L + + FP + +	
RSV	GPEFISELFGHICDNDLPEQLLLLTPGLATSYSGLTYLWRQARSQQLRSLFPEALTVNDV	329
CP	IEIDY--FLSMDVSMWFAQVKKVAAAAAAYFEGSGTLVDCPPHGIAANQIIVS-----	300
	+ + FL +D +WF+ + + Y+ GS L P G AA +I +	
RSV	VPNTWTSFLCLDNDSDWFSPLAAMNKYCYWHGSAPLSSI PADGSAAGSMICNELNGSS	389
CP	-----YVPPLFNVTAPTRFADPASQFPFAFK-LATSARNLPTLSEMAAMAQTNV	349
	+ P + AP A+P +P L AR T E +++ +	
RSV	IYRLAQWTAPIMDPPADEDAPPVIAEPGYYPNPNPVLIFDAR---TCIEDISSAHMFSA	446
CP	MMYRTHPYFGDFGIET---IEGEFWDIRPLESSLTDSSTYLSLDDSVTKMMKSK	400
	M + HP +G ++G+FW+ P S Y ++ + + S+	
RSV	MTF--HPNLI PYGANRANFLKQFWNCHPPSYSAHAHQVYPAVSALIAREYHSE	498

**Figure 9 :** Comparaison de la séquence de l'ARNdb-2 avec celle de la capsid du *Raphanus sativus cryptic virus 1 (Partitiviridae)*

## ARNdb-1

GGTCAAATTCTTCCAGAATTTAAGTGAATACTCTTACCCCTGGTCTTACAAATCTAA  
 AGAATTTTGTCTTTGCAGAATTACTCTACATATACACACACACAAACACACA

1	ATG AAG AAT ATC GAG ATA ATC GGT TAC AAG CCC TCT TTG GCT AAA CCT	48
1	M K N I E I I G Y K P S L A K P	16
49	ATT CGT GGT AAT GTT GAT CCT AAC TCA AAC ATT AAT TAC GGT AAT	93
17	I R G N V D P N S N I N Y G N	31
94	ATC GTC GAT TAT GCT TTA AGA AAA TAC CTC ACT AAT GAG GAG TTT	138
32	I V D Y A L R K Y L T N E E F	46
139	ACT ATC GTC ACA CGT GGC TAT CGT CGC TCA CAA TGG GCT GAA GAC	183
47	T I V T R G Y R R S Q W A E D	61
184	AGT CTT AAA AGT GAT TTA GAT AAA CTA GAT TCA GAC TAC TTT CCC	228
62	S L K S D L D K L D S D Y F P	76
229	GTG CTC AAA GAT ACC CAT TAT TAT AAT GCT ATC GAA CAC ACT CGG	273
77	V L K D T H Y Y N A I E H T R	91
274	AAA TTA TTT AAA CCT GAT TCT TTA CTT AAG CCT ATA CAT TTT TCT	318
92	K L F K P D S L L K P I H F S	106
319	GAC TTG CGC CAT TAC CCA TGG CAG TTA TCT ACT AAT ATC GGT GCC	363
107	D L R H Y P W Q L S T N I G A	121
364	CCT TTT GCT ACT AGT AAA AGT TGG AAC GAA TAC GTA ATA CAG AAA	408
122	P F A T S K S W N E Y V I Q K	136
409	TTC GAT GAA GGT TTT ACC AAA TCT TAT TAT CGA GAC TTA TTT CGT	453
137	F D E G F T K S Y Y R D L F R	151
454	GAA GCC CAC GGA GAA AGT CTA CTT CCT GAG ATG ATT GAT CGT CGT	498
152	E A H G E S L L P E M I D R R	166
499	ATG ACG AAA CGC AAT CTA TAC AAT GAA ATG TTC TTT ATT AAC CGC	543
167	M T K R N L Y N E M F F I N R	181
544	ACA AAT ATC CAC TTA ATT AAA GAT GGA CAC ACT ACT AAC TCA AGT	588
182	T N I H L I K D G H T T N S S	196
589	GGT CAT GAT CTC AAA TAT TGG AAC ACA GCA TTT GCT CGA CAG CAT	633
197	G H D L K Y W N T A F A R Q H	211
634	CTA GTT GAA TCC CAT GAT GAA GAT AAG ATC CGC TTA GTA TTC GGT	678
212	L V E S H D E D K I R L V F G	226
679	GCT CCT TCC ACA TTT TTG ATG GCT GAA CTG ACG TTT ATC TGG CCT	723
227	A P S T F L M A E L T F I W P	241
724	TTA CAG ACA AGC TTA CTA TAC CAA GGA GAA CGT TCT CCT ATG CTA	768
242	L Q T S L L Y Q G E R S P M L	256
769	TGG GGC TAT GAA ACC ACT ACT GGT GGT TGG TCT AGA CTA TAT AAA	813
257	W G Y E T T T G G W S R L Y K	271
814	TGG GCC TCC TCT AGG ATG CCT AGG TAT GAT TTT GTT GCT ACT CTC	858
272	W A S S R M P R Y D F V A T L	286
859	GAC TGG AAA CGG TTT GAT AGA GAC GCT AGA CAT ACT GTC ATC TCT	903
287	D W K R F D R D A R H T V I S	301

904	GAT	ATA	CAT	CAA	CTT	GTT	ATG	AGA	TCA	TAT	TTT	GAT	TTC	AAT	AAT	948
302	D	I	H	Q	L	V	M	R	S	Y	F	D	F	N	N	316
949	GGA	TAT	CAT	CCT	ACA	ATC	CAC	TAC	CCT	GAC	TCC	ACC	GGA	GCC	AAC	993
317	G	Y	H	P	T	I	H	Y	P	D	S	T	G	A	N	331
994	CCT	CAA	AGA	ATT	GAG	AAC	CTA	TGG	AAT	TGG	ATG	ACT	GAC	GCA	ACT	1038
332	P	Q	R	I	E	N	L	W	N	W	M	T	D	A	T	346
1039	TTA	ACG	ATT	CCG	CTA	ATG	TTG	CCT	GAC	GGT	AAG	ATA	CTT	CGA	TTT	1083
347	L	T	I	P	L	M	L	P	D	G	K	I	L	R	F	361
1084	AAA	CAT	TCT	GGT	ATA	TAC	TCT	GGA	TAC	TTC	CAG	ACA	CAA	ATA	CTA	1128
362	K	H	S	G	I	Y	S	G	Y	F	Q	T	Q	I	L	376
1129	GAT	TCG	ATG	TAC	AAT	TGT	GTT	ATG	ATC	TTC	ACT	GTT	CTA	TCT	AGA	1173
377	D	S	M	Y	N	C	V	M	I	F	T	V	L	S	R	391
1174	ATG	GGG	TTT	GAT	CTT	GAA	AGA	GTT	GAA	ATT	AAA	GTA	CAA	GGA	GAT	1218
392	M	G	F	D	L	E	R	V	E	I	K	V	Q	G	D	406
1219	GAT	TCC	ATT	TTC	TTA	ATG	TGC	TAT	CCT	TTC	ATT	ACT	CTT	CAA	AAT	1263
407	D	S	I	F	L	M	C	Y	P	F	I	T	L	Q	N	421
1264	ACG	TTT	CTA	CAG	ATG	TTC	GCT	CAC	TAT	GCG	AAA	ATT	TAC	TTT	GGA	1308
422	T	F	L	Q	M	F	A	H	Y	A	K	I	Y	F	G	436
1309	TCA	ACT	TTA	AAT	ATT	GAT	AAA	AGT	GAA	ATA	TTA	CCT	AGC	CTT	GAA	1353
437	S	T	L	N	I	D	K	S	E	I	L	P	S	L	E	451
1354	AAC	GCT	GAG	GTA	TTG	AAA	TAT	CGC	AAC	CAT	GGT	ACT	ATG	CCA	TAT	1398
452	N	A	E	V	L	K	Y	R	N	H	G	T	M	P	Y	466
1399	CGT	GAA	GAA	CTA	CAA	CTA	TTA	GCT	ATG	TTG	AGA	CAC	CCT	GAA	AGG	1443
467	R	E	E	L	Q	L	L	A	M	L	R	H	P	E	R	481
1444	ACT	GTC	TCG	TTA	CCA	TCG	CTG	ATG	GCT	CGA	TCC	ATC	GGC	ATT	GCT	1488
482	T	V	S	L	P	S	L	M	A	R	S	I	G	I	A	496
1489	TAT	GCT	AAC	TGT	GGA	TTC	CAC	TCT	CGT	GTC	TAC	CAA	ATT	TGC	GAG	1533
497	Y	A	N	C	G	F	H	S	R	V	Y	Q	I	C	E	511
1534	GAT	ATC	TAT	AAC	TTT	CTG	AAA	GCC	GGA	GGC	TAT	AGC	CCT	GAC	CCG	1578
512	D	I	Y	N	F	L	K	A	G	G	Y	S	P	D	P	526
1579	CAT	GGT	TTA	CCA	GGT	AGT	CTA	CGC	TAT	AGG	CAA	AAT	TAC	GTT	CCA	1623
527	H	G	L	P	G	S	L	R	Y	R	Q	N	Y	V	P	541
1624	GGA	TAT	TCT	GAA	GTT	GAC	ATT	AGT	CAC	TTC	CCT	AGT	TAT	TTT	GAA	1668
542	G	Y	S	E	V	D	I	S	H	F	P	S	Y	F	E	556
1669	ACT	GTC	CGC	CTT	CTC	CAA	GAG	CCA	ACT	CGT	GAC	TTA	GTT	TCC	GAA	1713
557	T	V	R	L	L	Q	E	P	T	R	D	L	V	S	E	571
1714	AAG	CAT	TGG	CCA	TTA	AAA	CAC	TTT	ATC	GGT	ATC	CCC	GGA	AAG	TCT	1758
572	K	H	W	P	L	K	H	F	I	G	I	P	G	K	S	586
1759	TAA	1761														
587	*															

**Figure 10:** Séquence en acides nucléiques (non codants en rouge) et en acides aminés de la RdRp

## ARNdb-2

	TCT GGA ATA CAT ATT ACT TAT GCT CCT AGA TTG AGC ACG AGT AGT	46
1	S G I H I T Y A P R L S T S S	15
47	TAC TCC CCC TCC TCT TTG ATG ATG GAC TAT ATC GTT CAT CAA ATC	91
16	Y S P S S L M M D Y I V H Q I	30
92	AAC TCT AAC TTA GTT GAT AAT TTT TAT TTC AAA AGG ACC CCC CCT	136
31	N S N L V D N F Y F K R T P P	45
137	GAT TAT CAT CCC TAC GTC ATC CGC CTA TAT TAT GGC GTG ATC TTC	181
46	D Y H P Y V I R L Y Y G V I F	60
182	TGG GTT CAG TGC ATT CGC GCT GGA CAC TAT GTT GGT GAA CTT GAT	226
61	W V Q C I R A G H Y V G E L D	75
227	ATG AGT AAG CAC CAA TTT CTG GGC CGC TTC CTA GAT GCT CAT CCA	271
76	M S K H Q F L G R F L D A H P	90
272	CTT GAA AGC CTG ACC GTC GCT GGG CCC CTC ATC CCT CTG TTC AAA	316
91	L E S L T V A G P L I P L F K	105
317	ACG CTG TGT GCT TCA CAG CCT GAA ATA CCC ACT TTC GGG AAA GTC	361
106	T L C A S Q P E I P T F G K V	120
362	TAT CCA AGG CTA CCC GCA GTT GTC GGC CCT AAC CGC CGT GAT GAA	406
121	Y P R L P A V V G P N R R D E	135
407	TTT ATT AAG AAT GAT ATC ACT TCA AAC CTG CTT CCA AAC GTC CCT	451
136	F I K N D I T S N L L P N V P	150
452	GGG ATT TTT GCG TTG CTT GAG CAC CTT AAT GGT ATC ATC AAC CCC	496
151	G I F A L L E H L N G I I N P	165
497	ACC CCT CCC GCT GAA CCC GCT TAC CCA AAG AAG GGT ATG CAC ATA	541
166	T P P A E P A Y P K K G M H I	180
542	CCT GTT ACT GCT ACT ACC AAC CAG GCG ACC ATT TTT GGG CAT CAC	586
181	P V T A T T N Q A T I F G H H	195
587	ACT TTT CCT GTG CCT GCT GAG AGA ACT AAC AGA GAC CGT TGG GCT	631
196	T F P V P A E R T N R D R W A	210
632	CTT TGC TCT TCT GGT TTA CAA TAT GAA TGT GAA GCT GAT GCC CGT	676
211	L C S S G L Q Y E C E A D A R	225
677	CTG AAT GAG GCC TTC GCT GAA AGG TAC TCA AAA TTC AGA TTT CCT	721
226	L N E A F A E R Y S K F R F P	240
722	ACT CAT AGG GCA AAT GAT GCA CTT ATT GAG ATA GAT TAC TTT CTA	766
241	T H R A N D A L I E I D Y F L	255
767	TCT ATG GAT GTA TCA ATG GCT TGG TTC GCC CAA GTC AAG AAA GTT	811
256	S M D V S M A W F A Q V K K V	270
812	GCT GCT GCT GCC GCT GCC TAT TTT GAA GGG TCT GGC ACC CTC GTT	856
271	A A A A A A Y F E G S G T L V	285
857	GAC TGT CCT CCT CAT GGA ATA GCC GCT AAC CAG ATT ATC GTT AGT	901
286	D C P P H G I A A N Q I I V S	300
902	TAT GTT CCA CCA CTG TTC AAT GTT ACT GCC CCT ACC CGA TTT GCA	946
301	Y V P P L F N V T A P T R F A	315



947	GAC	CCT	GCC	TCC	CAG	TTC	CCG	TTT	GCT	TTC	AAA	CTG	GCA	ACC	TCC	991
316	D	P	A	S	Q	F	P	F	A	F	K	L	A	T	S	330
992	GCC	CGC	AAC	CTT	CCC	ACT	CTT	TCC	GAA	TCA	ATG	GCC	GCT	ATG	GCC	1036
331	A	R	N	L	P	T	L	S	E	S	M	A	A	M	A	345
1037	CAA	ACT	AAT	GTG	ATG	ATG	TAT	CGC	ACA	CAT	CCT	TAT	TTT	GGT	GAC	1081
346	Q	T	N	V	M	M	Y	R	T	H	P	Y	F	G	D	360
1082	TTT	GGA	ATT	GAG	ACT	ATC	GAA	GGT	GAA	TTT	TGG	GAT	ATT	CGC	CCC	1126
361	F	G	I	E	T	I	E	G	E	F	W	D	I	R	P	375
1127	CTT	GAA	TCT	TCT	TTA	ACT	GAT	TCT	TCC	ACT	TAC	CTG	TCA	CTT	GAT	1171
376	L	E	S	S	L	T	D	S	S	T	Y	L	S	L	D	390
1172	GAC	TCG	GTA	ACT	AAG	ATG	ATG	AAG	TCT	AAG	AAT	TAG	ATT	CTG	CGT	1216
391	D	S	V	T	K	M	M	K	S	K	N	*	I	L	R	405
1217	TTC	CGT	CGT	CTA	GAT	GTT	TCT	AGT	TCC	GGT	TTT	ATT	TCG	CTT	CTT	1261
406	F	R	R	L	D	V	S	S	S	G	F	I	S	L	L	420
1262	TAT	TTT	GTT	AGG	ATT	TAG	AAC	AAA	AAC	CAA	AAA	AAA	TTT	TAA	AAT	1306
421	Y	F	V	R	I	*	N	K	N	Q	K	K	F	*	N	435
1307	CAC	TTG	CTG	TTT	TTT	TAT	TTC	TCG	TCC	TGC	GTT	TTT	CCT	TTT	GTC	1351
436	H	L	L	F	F	Y	F	S	S	C	V	F	P	F	V	450
1352	AGT	CGT	TTT	TTT	CAA	TTT	CTT	TTC	TGT	TTC	GAC	TTA	AAA	AAA	ACT	1396
451	S	R	F	F	Q	F	L	F	C	F	D	L	K	K	T	465
1397	AAA	AAC	TCA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	1429				
466	K	N	S	K	K	K	K	K	K	K	K	476				

**Figure 11** : Séquence en acides nucléiques (non codants en rouge) et en acides aminés de la capsid

**Tableau X:** Comparaison de la séquence RdRp avec celles de virus de la famille des *Partitiviridae*

<b>Virus</b>	<b>Famille</b>	<b>% Identité</b>
Oyster mushroom irometric virus II	partitivirus	54
White clover cryptic virus I	alphacryptovirus	32
Radish yellow edge virus	alphacryptovirus	34
Amasya cherry disease virus	partitivirus	34
Cherry chlorotic rusty spot	partitivirus	31

**Tableau XI:** Comparaison de la séquence Capside avec celles répertoriées

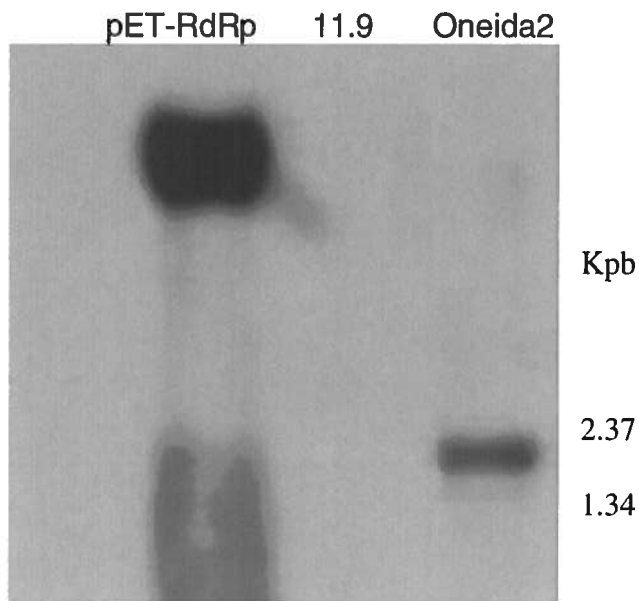
<b>Virus</b>	<b>Famille</b>	<b>% Identité</b>
Raphanus Sativus cryptic virus 1	partitivirus	24
Amasya cherry disease virus	partitivirus	21
Cherry chlorotic rusty spot virus	partitivirus	23
White clover cryptic virus I	alphacryptovirus	20
Vicia cryptic virus	partitivirus	19

### 1.3 Buvarbage de type Northern

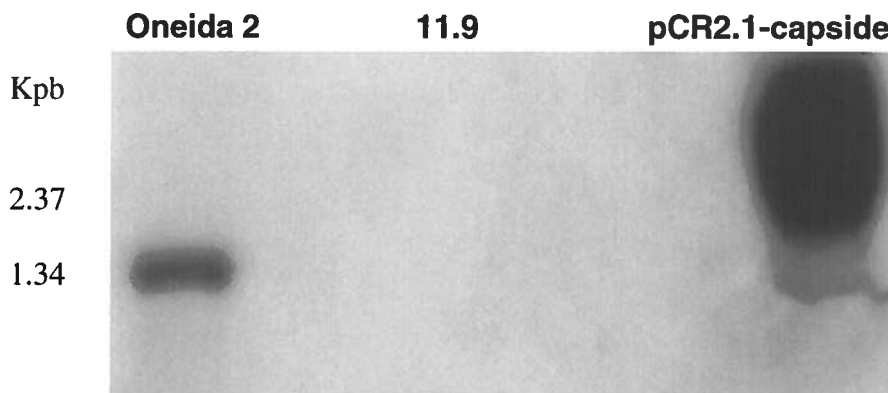
Un buvardage de type Northern a été réalisé pour confirmer que les ARN double brin codant pour la RdRp et la protéine de la capsid se retrouvent seulement chez les plantes Oneida 2 et pas dans la lignée 11.9.

L'ARN total a été isolé de Oneida 2 et de 11.9 et séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose dénaturant. Après transfert sur une membrane de nylon, une hybridation a été faite avec une sonde spécifique pour la RdRp et pour la composante «X», soit celle de la capsid. Avec la sonde RdRp, un signal d'environ 1900 bases a été observé chez Oneida 2 (Fig. 12). Ce signal n'a pas été détecté pour 11.9. Pour ce qui est de la sonde «X», un signal d'environ 1400 bases a été observé pour Oneida 2 seulement (Fig. 13).

Les résultats obtenus ont montré que la composante X a une ressemblance avec la composante qui accompagne la RdRp.



**Figure 12:** Immunobuvardage de type Northern sur des extraits d'ARN totaux provenant des plantes Oneida 2 et 11.9 pour la détection de RdRp dans les plantes avec une sonde RdRp-Dig



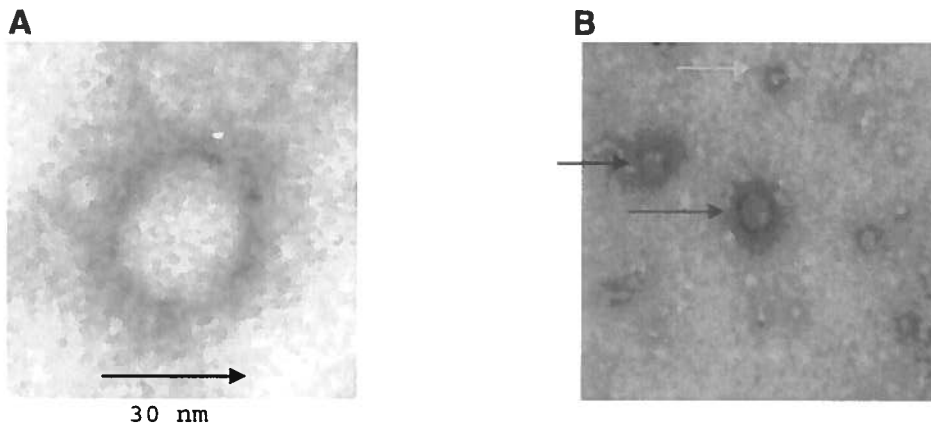
**Figure 13:** Immunobuvardage de type Northern sur des extraits d'ARN totaux provenant des plantes Oneida 2 et 11.9 pour la détection de la capsid dans les plantes avec une sonde capsid-Dig

## **2 Détection et caractérisation des particules virales**

### **2.1. Isolement et observation en microscopie électronique par transmission**

Pour s'assurer de la présence d'un virus chez Oneida 2, un isolement de particules virales a été réalisé. Comme l'analyse des séquences a démontré que la capsid et la RdRp pouvait provenir d'un virus de la famille des *Partitiviridae*, il était important de vérifier si des particules virales de morphologie icosaédrique mesurant autour de 30-38 nm pouvaient être observées dans Oneida 2.

C'est avec l'aide d'une série de centrifugations et d'ultracentrifugations sur un gradient de sucrose qu'une très fine bande a pu être isolée. Pour confirmer que les particules qu'on désirait observer étaient belles et bien des particules virales, les plantes de la lignée 11.9 ont servi de témoin négatif. Plusieurs séries d'isolements de particules virales des plantes Oneida 2 et du témoin 11.9 ont été effectuées. En effet, il fallait s'assurer que ce qu'on observait était du virus. De plus, les virus de cette famille sont en petite quantité lorsqu'ils infectent une plante, ce qui rend difficile leur isolement. Suite à l'ultracentrifugation à 70 000 x *g* sur un gradient de sucrose de 20-40%, une faible bande était apparente. Cette bande a été isolée et resuspendue. Les produits récoltés ont ensuite été analysés en microscopie électronique. Des particules virales icosaédriques de 30 nm et de 38 nm ont été observées chez Oneida 2 (Fig. 14) et non chez 11.9 comme attendu lors de trois isolements différents. La concentration de ces particules est très faible, soit moins de 1 million de virus par millilitre, soit la quantité d'éluant recueillie lors de l'isolement, ce qui rend leur visualisation difficile. Les particules de 38 nm ont été observées seulement lors d'un isolement, mais leur faible concentration peut expliquer ce fait. Les résultats obtenus permettent d'affirmer que Oneida 2 est infectée par un virus mais en faible quantité.

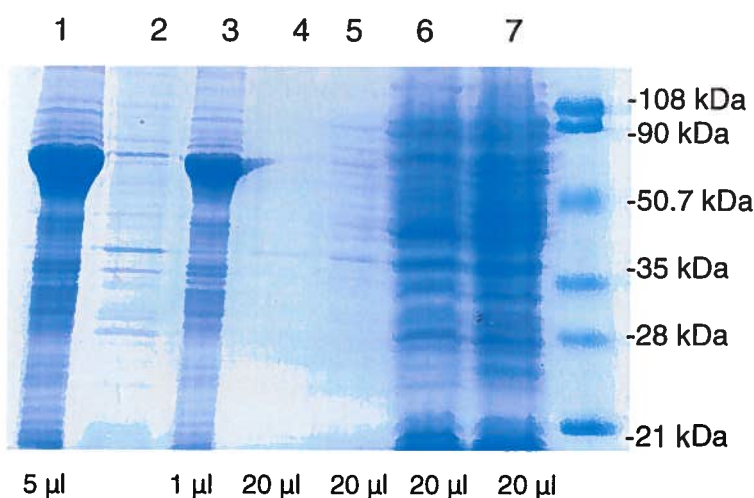


**Figure 14:** Observation en microscopie électronique de particules virales chez la plante Oneida 2  
**Figure A :** particule virale icosaédrique de 30 nm de diamètre  
**Figure B :** Isolement de particules virales chez Oneida 2 en compagnie de protéines de la plante (bleu : virus de 30 nm, rouge : virus de 38 nm, vert : protéine)

## 2.2 Production d'un sérum de lapin dirigé contre la RdRp

Chaque virion de *Partitiviridae* contient une molécule de RdRp. Afin de confirmer que les particules observées en microscopie électronique étaient bien du virus, la présence de la RdRp a été déterminée.

Le gène codant pour la RdRp a été cloné dans le vecteur d'expression pET21a. Le plasmide pET21a/RdRp a été cultivé dans *E.coli* BL-1 pour la production de protéines recombinantes. La production de RdRp sous la forme de corps d'inclusion a été vérifiée par migration des protéines sur un gel SDS-PAGE, dont les protéines ont été colorées au bleu de Coomassie. Une quantité de 1 et de 5  $\mu$ l du culot final de la purification des corps d'inclusion ont été déposés sur gel. La coloration des protéines a permis de constater une forte quantité de protéines avec un poids moléculaire d'environ 60 kDa (Fig. 15, puits 1 et 3) comme attendu. Dans les autres puits (puits 4,5,6 et 7), le surnageant des lavages du culot a été déposé sur gel afin de s'assurer que seulement les contaminants étaient expulsés lors des lavages et non la protéine d'intérêt. La bande correspondante à la RdRp a été découpée et envoyée pour la production d'anticorps polyclonaux.

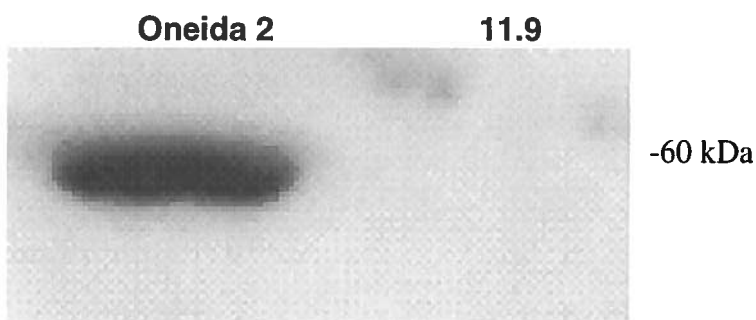


**Figure 15** : Gel SDS-PAGE dont les protéines sont colorées au bleu de Coomassie  
**Puits 1 et 3** : Culot final récolté et resuspendu  
**Puits 4 et 5** : Surnageant des 2 derniers lavages  
**Puits 6 et 7** : Surnageant des 2 premiers lavages

### 2.3 Détection de protéines virales RdRp sur les isolements

Une série d'injections de protéines RdRp recombinantes (une première de 350 ng et 3 de 100 ng) ont été injectées dans 2 lapins à différentes semaines. Comme les anticorps anti-RdRp ont été produits, les extraits des isolements de particules virales des plantes Oneida 2 et 11.9 ont pu être analysés. Ainsi, on pouvait confirmer que le virus observé chez Oneida 2 en microscopie électronique est celui qu'on tente de caractériser. Un immunobuvardage avec l'anticorps anti-RdRp (dilution du sérum 1/1000) a été réalisé sur les purifications virales. Une bande à 60 kDa a été observée chez Oneida 2 et non chez 11.9 (Fig. 16). Ce qui permet de signifier que les particules virales qui ont été observées en microscopie électronique correspondaient à ce qu'on cherchait.

La présence de la RdRp dans les particules virales qui a été confirmée par immunobuvardage suggère fortement que le virus observé en microscopie doit être celui qu'on tente de caractériser.



**Figure 16:** Immunobuvardage sur les purifications virales des plantes Oneida 2 et 11.9. Détection de la RdRp avec le sérum du lapin 2 contenant des anticorps anti-RdRp



## Chapitre 4

### Discussion

La présence d'un ARN codant pour une RdRp virale dans une lignée de luzerne a suscité l'intérêt de Medicago Inc. Comme l'utilisation des plantes constitue leur plate-forme de production de protéines recombinantes, la caractérisation de ce présumé virus était très intéressante. En effet, il est possible de se servir des virus comme un vecteur d'expression pour la production de protéines recombinantes. Lors de leur infection, les protéines sont produites très rapidement. Le but du travail était donc d'identifier les autres composantes avec lesquelles la RdRp est associée, et d'évaluer le potentiel de ce virus comme vecteur d'expression.

#### **1 Caractérisation des autres composantes**

Il y a formation d'un ARN double brin lors de la réplication d'un virus à ARN (Strauss et al. 2001). Cette caractéristique a été utilisée pour identifier les autres composantes associées à la RdRp. Des extractions d'ARNdb ont été effectuées sur des plantes de luzerne positives (Oneida 2) et négatives (11.9) pour la RdRp. L'ARNdb a été purifié par chromatographie sur colonne de cellulose CF-11 de Whatman (Boccardo et al. 1988). Deux fragments de 1,5 et de 1,8 kb ont été identifiés spécifiquement pour Oneida 2. La quantité de ces ARN n'est pas en forte quantité. Pour obtenir une bande d'au moins 500 ng d'ARN, il a fallu au départ plusieurs grammes de feuilles afin d'obtenir cette concentration. Des traitements à la RNase (avec ou sans sel) et DNase ont confirmé que les ARN identifiés étaient bien de l'ARNdb. Des expériences de buvardage Northern ont de plus confirmé la présence de ces deux ARNdb spécifiquement chez Oneida 2. La présence des deux bandes supérieures, soit

de 1,9 et 3 kb, pourrait s'expliquer par une étape intermédiaire lors de la réplication.

Ces ARNdb ont été par la suite clonés et séquencés. Les séquences obtenues ont été comparées entre elles et avec les banques de données. Les informations obtenues ont indiqué que l'ARNdb de 1,8 kb possède une forte homologie avec les ARN codant pour la RdRp des partitivirus. Une homologie a été constatée pour l'ARNdb-2 et les ARN codant pour la protéine de capsid de la famille des *Partitiviridae*. Ce sont des virus à ARN doubles brins et segmentés. Le brin le plus long code pour une RdRp et l'autre code pour une capsid et ces virus ont une morphologie icosaédrique et mesure de 30 à 38 nm de diamètre (Boccardo et al. 20005 a et b).

On retrouve dans la famille des *Partitiviridae* deux genres de virus pouvant infecter les plantes. Il y a les *alphacryptovirus* qui sont des virus de 30 nm de diamètre et les *betacryptovirus* qui eux sont de 38 nm. Ces virus causent des infections asymptomatiques et sont produits en faible quantité, ce qui rend leur caractérisation laborieuse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/49000000.htm>).

Afin de s'assurer que la séquence codant pour une capsid se retrouve seulement chez Oneida 2 et que cette composante accompagne la RdRp, un buvardage de type Northern a été effectué. De plus, cette expérience permettait de vérifier que ces 2 protéines étaient exprimées uniquement par un seul ARN et qu'il était différent pour chacun. Les buvardages ont été fait à partir de l'ARN total dont un avec une sonde qui reconnaît la RdRp et l'autre la capsid. Comme la quantité ARNdb était très faible, il a fallu mettre plus de 1 ug d'ARN total sur gel afin d'obtenir un résultat. Il a été ardu d'obtenir un résultat. La faible concentration ARNdb est due à la faible concentration du virus dans la plante. Il a donc fallu faire plusieurs essais avant de déterminer la bonne concentration d'ARN total à mettre sur gel pour que la sonde puisse s'apparier. Finalement, des résultats ont pu être obtenus. Une seule bande a été reconnue par la sonde-

capside à une hauteur d'environ 1400 bases et une autre autour de 1900 bases pour la RdRp. Ces bandes ont pu être observées seulement chez Oneida 2 et non chez 11.9. Ces résultats suggèrent que la composante trouvée lors du séquençage (capside) soit propre aux plantes qui sont infectées par la RdRp. La difficulté d'obtenir un bon résultat dû au faible taux d'ARN codant pour les 2 protéines démontre qu'il est très probable qu'on soit en présence d'un cryptovirus.

## **2 Détection et caractérisation des particules virales**

La purification de particules virales et leur visualisation en microscopie électronique ont confirmé que Oneida 2 est infectée par un cryptovirus. Pour pouvoir observer des particules virales en microscopie électronique, il faut avoir  $1 \times 10^6$  particules virales par millilitre. L'obtention d'une telle concentration a été difficile. En effet, les cryptovirus sont très peu nombreux dans les plantes (Acotto et al. 1990). Il a fallu alors plusieurs tentatives avant d'obtenir un extrait concentré. Finalement, un extrait a démontré des particules icosaédriques mesurant 30 nm de diamètre. Aucune particule de ce genre n'a été observée dans les plantes de la lignée 11.9. La faible quantité de virus observée par échantillon en microscopie confirme que le virus n'est pas abondant dans la plante.

Une des caractéristiques des cryptovirus est la présence d'une molécule de RdRp dans chaque particule virale (Strauss et al. 2000). Ainsi, un immunobuvardage de type Western a été réalisé sur l'échantillon obtenu lors de l'isolement de particules virales afin de s'assurer que les virus observés en microscopie électronique sont ceux qu'on tente de caractériser. Donc, suite à la production d'un sérum de lapin dirigé contre la RdRp, il a été possible de constater qu'une protéine de 60 kDa était détectée dans les fractions contenant les particules virales. Ce qui confirme qu'on a observé le virus qu'on désirait.

Il est possible maintenant de conclure dans ces 2 parties que les plantes porteuses de la RdRp sont infectées par un virus. Cette particule virale à ARN double fragmenté possède toutes les caractéristiques des *Partitiviridae* et comme se sont des particules icosaédriques mesurant 30 nm, on peut classer ce virus comme étant un *alphacryptovirus*.

L'avantage majeur d'utiliser un vecteur viral est la production élevée de la protéine d'intérêt dans la plante. Il a déjà été démontré que la capsid virale peut constituer près de 1% de la quantité de protéines contenues dans des feuilles infectées (Dolja et al. 1992). Ce qui signifie que la protéine d'intérêt pourrait être produite en aussi grande quantité. Un autre avantage est que la production de protéines se fait rapidement. En effet, si on utilise des plantes transgéniques, il faut compter plusieurs mois pour la sélection et la croissance de la plante. Par contre, avec des vecteurs viraux, quelques jours sont nécessaires pour infecter et enfin récolter. Ainsi, il était intéressant de vérifier le potentiel des cryptovirus comme vecteur d'expression de protéines. Tout d'abord, une comparaison avec un autre virus de plante utiliser comme vecteur d'expression est primordiale. Comme aucun virus de la famille des *Partitiviridae* n'a été étudié comme vecteur d'expression, une analyse avec un virus d'une autre famille est intéressante. Une comparaison avec le virus étudié dans notre laboratoire, soit le *virus de la mosaïque du navet* (TuMV). Ce virus est un potyvirus et ce groupe contient le plus grand nombre de virus de plantes (Ward et al. 1991). De plus, ces virus peuvent infecter un grand spectre d'hôtes. Les virions sont des particules flexibles et filamenteuses non enveloppés (Langenberg et al. 1997). Leur génome est un ARN de polarité positive d'environ 10 kb. Les potyvirus sont des vecteurs d'expression intéressants (Guo et al. 1998). Leur forme filamenteuse n'est pas une limite quant à la taille du génome à encapsidé. Ce qui fait en sorte qu'on peut ajouter de longues séquences étrangères dans le génome viral. Son génome de polarité positive peut être utilisé directement comme ARN messager (Carrington et al. 1990). Le génome viral encode pour une large polyprotéine qui subi des clivages afin d'obtenir des protéines matures. Ce qui fait en sorte que la

traduction des gènes d'intérêt ce fait à partir du même ARN que les gènes viraux et ce qui engendre que la protéine d'intérêt est synthétisée en quantité équimolaire avec les protéines virales. Comme chaque particule virale est formée d'environ 2000 unités de protéines de la capsid, la protéine d'intérêt va être exprimée en grande quantité dans les cellules infectées (Fernández-Fernández et al. 2001). Maintenant, il est possible de vérifier si notre virus a un potentiel à être utilisé comme vecteur d'expression. Tout d'abord, il y a des avantages à utiliser un alphacryptovirus comme vecteur d'expression comparativement à un potyvirus. C'est qu'il ne cause aucun symptôme de maladie chez la plante, donc la plante peut croître normalement et il a aussi peu de chance qu'il soit transmis dans l'environnement. En effet, ce type de virus se transmet seulement par les graines et non par des pucerons comme chez le TuMV. Par contre, même s'il y a un génome compact, soit seulement deux fragments, ce qui facilite sa manipulation, une restriction survient. Comme c'est un virus icosaédrique, la longueur du segment étranger devient une contrainte comparativement à un potyvirus qui lui n'a pas de limite quant à la taille du génome à être encapsidé. En plus, il y a un autre désavantage majeur. C'est que le virus se retrouve en très faible quantité dans la plante, ce qui fait en sorte que peu de protéines recombinantes puissent être produites lors de la réplication virale. Comparativement au TuMV, ce dernier se retrouve en grande quantité dans la plante infectée et dû à son mode de réplication beaucoup de protéines d'intérêt pourront être produites. Cette analyse met en évidence que l'utilisation d'un cryptovirus comme vecteur d'expression n'est probablement pas avantageux et rentable.

Pour ce qui est de la réplication du virus, elle se fait à l'intérieur des particules virales. On retrouve une à deux RdRp à l'intérieur de la capsid. Chaque segment est transcrit en un ARNm lui-même traduit en une protéine. Lors de la réplication, l'ARN polymérase initie la synthèse des brins ARN (+) et ARN (-) sans l'intervention d'amorces. Lorsqu'il y a formation de l'ARN (-), ce

dernier est encapsidé avec une protéine RdRp et une nouvelle particule virale est formée.

En 1990, une équipe italienne a publié un article parlant d'un virus infectant la luzerne, soit l'*alfalfa crypto virus 1* (Accotto et al. 1990). Aucune séquence de ce virus n'a été publiée. Par contre, cette équipe a été en mesure de démontrer que deux types de particules se retrouvaient dans la luzerne, soit des virions icosaédriques de 38 nm et de 30 nm majoritairement. Deux brins ARNdb ont été trouvés. Le brin le plus long était estimé à un  $M_r$  de  $1,27 \times 10^6$  dalton (le poids moléculaire d'une paire de bases est de 650 daltons, soit environ 1954 pb) et codait pour une RdRp. L'autre plus petit codait pour une capsidie avec un  $M_r$   $1,17 \times 10^6$  Da (soit environ 1800 pb). Ils ont aussi démontré qu'il y avait une activité d'une RdRp qui était associée au virion. Les résultats obtenus à cette époque et ceux obtenus aujourd'hui, nous laisse croire que le virus infectant Oneida 2 est un *alfalfa crypto virus*. En effet, notre RdRp a une séquence nucléique de 1890 pb, ce qui est très semblable à celle trouvé par l'équipe d'Accotto. Par contre, la séquence de notre capsidie est beaucoup plus courte, elle fait 1429 pb. Donc, ces deux virus semblent avoir évolué dans la même direction et font partie de la même famille. Cependant, seule le séquençage des ARNdb du virus de l'équipe d'Accotto pourrait démontrer qu'on est en présence du même virus et de constater si une évolution du virus s'est produite.

### **3 Perspectives d'avenir**

Nos résultats démontrent que les plantes Oneida 2 sont infectées par l'Alfalfa cryptovirus. Ces virus sont peu connus et une compréhension plus approfondie de cette famille est très intéressante.

Les données dans la littérature semblent indiquer que la réplication de l'ARN virale se produit à l'intérieur de chacun des virions, soit dans le cytoplasme de la cellule infectée. L'interaction entre la RdRp et la protéine de la capsid serait donc un élément important de la réplication. L'interaction pourrait être observée par la technique de Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) (Hu et al. 2005). Cette technique est basée sur la formation d'un complexe fluorescent. Deux fragments d'une protéine fluorescente se lient ensemble lorsqu'il y a interaction de deux protéines fusionnées aux fragments de la protéine fluorescente. La technique BiFC est adaptée fortement aux conditions physiologiques normales de l'environnement. La haute sensibilité de la technique BiFC et le faible bruit de fond de fluorescence des cellules sont deux caractéristiques intéressantes de cette méthode. De plus, les protéines qui n'interagissent pas sont non fluorescentes. Cette technique est donc très intéressante pour comprendre davantage la réplication virale. Pour ce faire, une première protéine (RdRp) est insérée dans un vecteur en aval de la partie 5' de la GFP (Green Fluorescent Protein) et l'autre protéine (capsid) en amont de la partie 3' codante pour la GFP. Suite à une agroinfiltration de deux à trois jours dans la plante des deux vecteurs, les interactions vont être observées au microscope confocal. Pour qu'il puisse y avoir observation d'un signal fluorescent, la protéine GFP doit être complète. Pour s'y faire, il doit y avoir interaction entre la RdRp et la capsid. Lors de l'interaction, la partie 5' de la GFP rencontre la partie 3' ce qui donne une protéine complète GFP et un signal lumineux s'en ressort.

Ainsi, nous allons pouvoir approfondir nos connaissances sur ce virus. Il va être possible de constater si la RdRp est en association constante avec la capsid et comment la réplication s'effectue.

Une autre orientation de recherche pourrait être de déterminer les conditions optimales pour avoir un titre viral le plus élevé dans la luzerne. Ainsi, il pourrait devenir intéressant d'utiliser ce virus comme vecteur d'expression. Pour ce faire, il pourrait y avoir une variation des conditions de croissance de la luzerne (température, pourcentage de gaz carbonique, taux humidité...). De plus, faire des études en champs pourraient être très intéressantes. En effet, il peut être possible que la plante soit plus vulnérable aux virus car les conditions sont plus difficiles qu'en serre. Les changements de température et l'exposition à des prédateurs (exemple des pucerons) pourraient être des facteurs pouvant influencer la croissance du virus dans la luzerne. Finalement, il est possible qu'il y ait une augmentation de la réplication virale suite à la fauche de la luzerne. Une étude des plants avant, 24 et 48 h après la coupe serait intéressante. En effet, comme la plante est en sénescence, il est possible que le virus prenne le dessus puisque la plante ne produit plus les protéines nécessaires à sa défense.



## Conclusion

L'utilisation des plantes pour la production de produits biopharmaceutiques est très intéressante. L'utilisation d'un virus comme système de production de protéines recombinantes est plus prometteur et efficace que l'introduction du gène d'intérêt dans le génome de la plante. Comme les plantes peuvent croître en champs, une forte production de protéines recombinantes est envisageable. La détection d'une RdRp virale dans des plants de luzerne a suscité un intérêt par la compagnie Medicago. Nous avons proposé que leurs plants de luzerne soient infectés par un virus, mais lequel? Nous avons donc eu comme objectif de le caractériser.

Dans ce projet, nous avons effectué la caractérisation des autres composantes qui accompagnent la RdRp afin de déterminer quel type de virus infecte la plante.

Il a été trouvé qu'une seule autre composante accompagne la RdRp (1,9 kb), cette inconnue code pour une capsid (1,4 kb). Lors de la comparaison des séquences avec des banques de données, une homologie de séquences avec des virus de la famille des *Partitiviridae* a été constatée. Ce sont des virus doubles brins, segmenté et icosaédrique de 30-38 nm. Nous avons vérifié en microscopie électronique que les plantes étaient infectées. Des particules icosaédriques de 30 nm ont été observées. L'ensemble des résultats nous a permis de déterminer que c'est bel et bien un *alphacryptovirus* qui infecte les plants de luzerne Oneida 2.

## Remerciements

Je veux remercier tout d'abord mon directeur de recherche Jean-François Laliberté de m'avoir accueilli dans son laboratoire. En plus de me donner son aide, il a su me transmettre le plaisir de la recherche lors de mes études.

Je tiens à remercier mes collègues pour leur appui et leur aide. J'ai passé deux belles années en leur compagnie.

Je remercie mes parents qui ont su me supporter toute ma vie dans mes divers projets.

Finalement, je remercie mon amour Olivier de m'avoir encouragé dans ma rédaction.

## Bibliographie

- Accotto, G. P.; Donson, J., et Mullineaux, P. M. Mapping of *Digitaria streak virus* transcripts reveals different RNA species from the same transcription unit. *EMBO J.* 1989; 8(4): 1033-9.
- Accotto G.P.; Marzachi C; Luisoni E et Milne RG. Molecular characterization of *alfalfa cryptic virus 1*. *J Gen Virol.* 1990; 71: 433-7.
- Ahlquist, P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science.* 2002; 296(5571): 1270-3.
- Arakawa, T.; Chong, D.K.X. et Langridge, W.H.R. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol.* 1998; 16: 292–297.
- Boccardo, G. et Accotto, G. P. RNA-dependent RNA polymerase activity in two morphologically different *white clover cryptic viruses*. *Virology.* 1988; 163(2): 413-9.
- Boccardo, G. et Candresse, T. Complete sequence of the RNA1 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus Alphacryptovirus. *Arch Virol.* 2005a; 150(2): 399-402.
- Boccardo, G. et Candresse, T. Complete sequence of the RNA2 of an isolate of *White clover cryptic virus 1*, type species of the genus Alphacryptovirus. *Arch Virol.* 2005b; 150(2): 403-5.
- Boccardo, G.; Lisa, V.; Luisoni, E. et Milne, R. G. Cryptic plant viruses. *Adv Virus Res.* 1987; 32: 171-214.
- Boothe, J.G; Parmenter D.L.et Saponja J.A. Molecular farming in plants: oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Develop. Res.* 1997; 42: 172-81.
- Bruyns, A. M.; De Jaeger, G.; De Neve, M.; De Wilde, C.; Van Montagu, M et Depicker, A. Bacterial and plant-produced scFv proteins have similar antigen-binding properties. *FEBS Lett.* 1996; 386(1): 5-10.
- Carrillo, C.; Wigdorovitz, A.; Oliveros, J. C.; Zamorano, P. I.; Sadir, A. M.; Gomez, N.; Salinas, J.; Escribano, J. M. et Borca, M. V. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *Journal of Virology* : 1998; 72(2): 1688-90.

- Carrington, J.C. et Freed, D.D. Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology*. 1990; 64: 1590-7.
- Castanon, S.; Marin, M. S.; Martin-Alonso, J. M.; Boga, J. A.; Casais, R.; Humara, J. M.; Ordas, R. J. et Parra, F. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against *rabbit hemorrhagic disease virus*. *Journal of Virology*. 1999; 73(5): 4452-5.
- Cheng, R. H.; Caston, J. R.; Wang, G. J.; Gu, F.; Smith, T. J.; Baker, T. S.; Bozarth, R. F.; Trus, B. L.; Cheng, N. et Wickner, R. B. Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric Gag dimers. *J Mol Biol*. 1994; 244(3): 255-8.
- Cooper, B.; Eckert, D.; Andon, N. L.; Yates, J. R., et Haynes, P. A. Investigative proteomics: identification of an unknown plant virus from infected plants using mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.*; 14(7): 736-41.
- Costa-Mattioli, M.; Cristina, J.; Romero, H.; Perez-Bercof, R.; Casane, D.; Colina, R.; Garcia, L.; Vega, I.; Glikman, G.; Romanowsky, V.; Castello, A.; Nicand, E.; Gassin, M.; Billaudel, S., et Ferre, V. Molecular evolution of *hepatitis A virus*: a new classification based on the complete VP1 protein. *J Virol.*; 76(18): 9516-25.
- Cramer, C. L.; Boothe, J. G. et Oishi, K. K. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999; 240: 95-118.
- Cramer, C. L.; Weissenborn, D. L.; Oishi, K. K.; Grabau, E. A.; Bennett, S.; Ponce, E.; Grabowski, G. A. et Radin, D. N. Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. In *engineering plants for commercial products and applications*. (eds Collins, , G.B. et Sheperd, R.J.)1996: 62–71 (New York Academy Of Sciences, NY).
- Daniell, H.; Lee, S. B.; Panchal, T., et Wiebe, P. O. Expression of the native cholera toxin B subunit gene et assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol*. 2001a; 311(5): 1001-9.
- Daniell, H.; Streatfield, S. J., et Wycoff, K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci*. 2001b; (5): 219-26.

- De Neve, M.; De Loose, M.; Jacobs, A.; Van Houdt, H.; Kaluza, B.; Weidle, U.; Van Montagu, M. et Depicker, A. Assembly of an antibody and its derived antibody fragment in *Nicotiana* and *Arabidopsis*. *Transgenic Res.* 1993; 2(4): 227-37.
- Dierckx W.; Pagnier, J.; Poyart, C.; Marden, M. C.; Gruber, V.; Bournat, P.; Baudino, S. et Merot, B. Human haemoglobin from transgenic tobacco. *Nature.* 1997; 386: 29–30.
- Dolja V.V.; McBride H.J. et Carrington J.C. Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of  $\beta$ -glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 10208-12.
- Doran, P. M. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol.* 2000; 11(2): 199-204.
- Edelbaum, O.; Stein, D.; Holland, N.; Gafni, Y.; Livneh, O.; Novick, D.; Rubinstein, M. et Sela, I. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *J Interferon Res.* 1992; 12(6): 449-53.
- Fernández- Fernández M.R., Mourino M., Rivera J., Rodriguez F; Plana-Duran J. Et Garcia J.A. Protection of rabbits against *Rabbit Hemorrhagic Disease Virus* by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology.* 2001; 280(2): 283-91.
- Fischer, R.; Hoffmann, K.; Schillberg, S., et Emans, N. Antibody production by molecular farming in plants. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2000; 14(2): 83-92.
- Fischer, R.; Stoger, E.; Schillberg, S.; Christou, P. et Twyman, R. M. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Curr Opin Plant Biol.* 2004; 7: 152-8.
- Francisco, J. A.; Gawlak, S. L.; Miller, M.; Bathe, J.; Russell, D.; Chace, D.; Mixan, B.; Zhao, L.; Fell, H. P. et Siegall, C. B. Expression and characterization of bryodin 1 and a bryodin 1-based single-chain immunotoxin from tobacco cell culture. *Bioconjug Chem.* 1997; 8(5): 709-13.
- French, R.; Janda, M. et Ahlquist P. Bacterial gene inserted in an engineered RNA virus: efficient expression in monocotyledonous plants cells. *Science.* 1986; 231: 1294-97.
- Galipienso, L.; Vives, M. C.; Moreno, P.; Milne, R. G.; Navarro, L., et Guerri, J. Partial characterisation of *citrus leaf blotch virus*, a new virus from Nagami kumquat. *Arch Virol.* 2001; 146(2): 357-68.

- Garcia-Arenal, F.; Fraile, A., et Malpica, J. M. Variation and evolution of plant virus populations. *Int Microbiol.* 2003; 6(4): 225-32.
- Gelvin, S. B. The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr Opin Biotechnology.* 1998; 9 (2): 227-32.
- Ghabrial, S. A. New developments in fungal virology. *Adv Virus Res.* 1994; 43: 303-88.
- Ghabrial, S. A. Origin, adaptation and evolutionary pathways of fungal viruses. *Virus Genes.* 1998; 16(1): 119-31.
- Gibbs, M.J.; Koga, R.; Moriyama, H.; Pfeiffer, P. et Fukuhara, T. Phylogenetic analysis of some large double-stranded RNA replicons from plants suggests they evolved from a defective single-stranded RNA virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81: 227-33.
- Giddings, G.; Allison, G.; Brooks, D., et Carter, A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol.* 2000; 18(11): 1151-5.
- Gleba, Y.; Klimyuk, V., et Marillonnet, S. Magniffection--a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine.* 2005; 23(17-18): 2042-8.
- Gubler, U. et Hoffman, B. J. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene.* 1983; 25(2-3): 263-9.
- Guo H.S.; Lopez-Moya J.J. et Garcia J.A. Susceptibility to recombination rearrangements of a chimeric *Plum Pox Potivirus* genome after insertion of a foreign gene. *Virus Research.* 1998; 57: 183-195.
- Haasnoot, P. C.; Bol, J. F., a et Olsthoorn, R. C. A plant virus replication system to assay the formation of RNA pseudotriloop motifs in RNA-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(22): 12596-600.
- Hanley, Z.; Slabas, T., et Elborough, K. M. The use of plant biotechnology for the production of biodegradable plastics. *Trends Plant Sci.* 2000; 5(2): 45-6.
- Hiatt, A. et Ma, J. K. Characterization and applications of antibodies produced in plants. *Int Rev Immunol.* 1993; 10(2-3): 139-52.
- Hiatt, A. J. Preparation & some properties of soluble succinic dehydrogenase from higher plants. *Plant Physiol.* 1961; 36(5): 552-7.

- Higo, K.; Saito, Y. et Higo, H. Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of *cauliflower mosaic virus* 35S promoter in transgenic tobacco. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993; 57(9): 1477-81.
- Hu, CD; Grinberg, AV et Kerppola, TK. Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis. *Current Protocols in Cell Biology*, 21.3. Wiley Interscience, 2005.
- Huang, Z.; Dry, I.; Webster, D.; Strugnell, R. et Wesselingh, S. Plant-derived *measles virus* hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine.* 2001; 19: 15-16.
- Ihrmark, K.; Johannesson, H.; Stenstrom, E., et Stenlid, J. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genet Biol.* 2002; 36(2): 147-54.
- James, E. A.; Wang, C.; Wang, Z.; Reeves, R.; Shin, J. H.; Magnuson, N. S. et Lee, J. M. Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Expr Purif.* 2000; 19(1): 131-8.
- Jones, R. A. Determining 'threshold' levels for seed-borne virus infection in seed stocks. *Virus Res.* 2000; 71(1-2): 171-83.
- Kim, M. J. et Kao, C. Factors regulating template switch in vitro by viral RNA-dependent RNA polymerases: implications for RNA-RNA recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(9): 4972-7.
- Koga, R.; Horiuchi, H., et Fukuhara, T. Double-stranded RNA replicons associated with chloroplasts of a green alga, *Bryopsis cinicola*. *Plant Mol Biol.* 2003; 51(6): 991-9.
- Lakshman, D. K.; Jian, J., et Tavantzis, S. M. A double-stranded RNA element from a hypovirulent strain of *Rhizoctonia solani* occurs in DNA form and is genetically related to the pentafunctional AROM protein of the shikimate pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(11): 6425-9.
- Lakshman, D. K.; Liu, C.; Mishra, P. K., et Tavantzis, S. Characterization of the arom gene in *Rhizoctonia solani*, and transcription patterns under stable and induced hypovirulence conditions. *Curr Genet.* 2006; 49(3): 166-77.
- Langenberg, W.G. et Zhang, L. Immunocytology shows the presence of *tobacco etch virus* P3 protein in nuclear inclusions. *Journal of Structural Biology.* 1997; 118: 243-7.

- Lee, R. W.; Strommer, J.; Hodgins, D.; Shewen, P. E.; Niu, Y. et Lo, R. Y. Towards development of an edible vaccine against *bovine pneumonic pasteurellosis* using transgenic white clover expressing a Mannheimia haemolytica A1 leukotoxin 50 fusion protein. *Infect Immun.* 2001; 69(9): 5786-93.
- Livieratos, I. C.; Eliasco, E.; Muller, G.; Olsthoorn, R. C.; Salazar, L. F.; Pleij, C. W., et Coutts, R. H. Analysis of the RNA of *Potato yellow vein virus*: evidence for a tripartite genome and conserved 3'-terminal structures among members of the genus Crinivirus. *J Gen Virol.* 2004; 85(Pt 7): 2065-75.
- Luisoni, E.; Milne, R. G.; Accotto, G. P., et Boccardo, G. Cryptic viruses in hop trefoil (*Medicago lupulina*) and their relationships to other cryptic viruses in legumes. *Intervirol.* 1987; 28(3): 144-56.
- Ma, J.K.; Drake, P. M., and Christou, P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nat Rev Genet.* 2003; 4(10): 794-805.
- Ma, J.K. et Hein, M.B. Antibody production and engineering in plants, In *Engineering plants for commercial products and applications.* (eds Collins, G.B. & Sheperd, R.J.) 1996: 72–81.
- Ma, J. K.; Hikmat, B. Y.; Wycoff, K.; Vine, N. D.; Chargelegue, D.; Yu, L.; Hein, M. B. et Lehner, T. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat. Med.* 1998; 4:601-6.
- Marillonnet, S.; Thoeringer, C.; Kandzia, R.; Klimyuk, V., et Gleba, Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(6): 718-23.
- Marzachi, C.; Milne, R. G., et Boccardo, G. In vitro synthesis of double-stranded RNA by carnation cryptic virus-associated RNA-dependent RNA polymerase. *Virology.* 1988; 165(1): 115-21.
- Mason, H. S.; Ball, J. M.; Shi, J. J.; Jiang, X.; Estes, M. K. et Arntzen, C. J. Expression of *Norwalk virus* capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(11): 5335-40.
- Mason, H. S.; Haq, T. A.; Clements, J. D. et Arntzen, C. J. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine.* 1998; 16(13): 1336-43.



- Mason, H. S.; Lam, D. M. et Amtzen, C. J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992; 89(24): 11745-9.
- Matsumoto, K.; Nakamura, T.; Fukuda, S.; Sekine, T.; Ueda, H. et Shimizu, Y. A gelatin coated collagen-polyglycolic acid composite membrane as a dural substitute. *ASAIO J.* 2001; 47(6): 641-5.
- Matsumoto, S.; Ikura, K.; Ueda, M. et Sasaki, R. Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol Biol.* 1995; 27(6): 1663-72.
- McCabe, P. M.; Pfeiffer, P., et Van Alfen, N. K. The influence of dsRNA viruses on the biology of plant pathogenic fungi. *Trends Microbiol.* 1999; 7(9): 377-81.
- McCormick, A. A.; Kumagai, M. H.; Hanley, K.; Turpen, T. H.; Hakim, I.; Grill, L. K.; Tuse, D.; Levy, S. et Levy, R. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96: 703-8.
- Narvaez, G.; Skander, B. S.; Ayllon, M. A.; Rubio, L.; Guerri, J. et Moreno, P. A new procedure to differentiate *citrus tristeza virus* isolates by hybridization with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J Virol Methods.* 2000; 85(1-2): 83-92.
- Natsuaki, T.; Natsuaki, K. T.; Okuda, S.; Teranaka, M.; Milne, R. G.; Boccardo, G. et Luisoni, E. Relationships between the cryptic and temperate viruses of alfalfa, beet and white clover. *Intervirology.* 1986; 25(2):69-75.
- Nomura, K.; Osaki, H.; Iwanami, T.; Matsumoto, N. et Ohtsu, Y. Cloning and characterization of a totivirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Helicobasidium mompa* Tanaka. *Virus Genes.* 2003; 26(3): 219-26.
- Ohya, K.; Matsumura, T.; Ohashi, K.; Onuma, M. et Sugimoto, C. Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants. *J Interferon Cytokine Res.* 2001; 21(8): 595-602.
- Parmenter, D.L.; Boothe, J. G.; van Rooijen, G. J.; Yeung, E. C. et Moloney, M. M. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning. *Plant Mol. Biol.* 1995; 29: 1167-80.

- Pfeiffer, P. Nucleotide sequence, genetic organization and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *J Gen Virol*. 1998; 79 ( Pt 10): 2349-58.
- Pogue, G. P.; Lindbo, J. A.; Garger, S. J., et Fitzmaurice, W. P. Making an ally from an enemy: plant virology and the new agriculture. *Annu Rev Phytopathol*. 2002; 40: 45-74.
- Porta, C. et Lomonosoff, G. P. Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2002; 19: 245-91.
- Portela, A.; Zurcher, T.; Nieto, A. et Ortin, J. (1999). Replication of *orthomyxoviruses*. *Adv.Virus Res*.1999; 54: 319-48.
- Pringle, C.R. Virus taxonomy. *Arch Virol*. 1999; 144: 421-9.
- Richter, L. J.; Thanavala, Y.; Amtzen, C. J. et Mason, H. S. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol*. 2000; 18(11): 1167-71.
- Rong, R.; Rao, S.; Scott, S. W.; Carner, G. R., et Tainter, F. H. Complete sequence of the genome of two dsRNA viruses from *Discula destructiva*. *Virus Res*. 2002; 90(1-2): 217-24.
- Roossinck, M. J. Plant RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol*. 2003; 6(4): 406-9.
- Rueckert, R.R. *Picornaviridae: the viruses and their replication*. *Fields Virology*. 1996; deuxième édition: 609-654.
- Ruggiero, F.; Exposito, J. Y.; Bournat, P.; Gruber, V.; Perret, S.; Comte, J.; Olganier, B.; Garrone, R. et Theisen, M. Triple helix assembly and processing of human collagen produced in transgenic tobacco plants. *FEBS Letter*. 2000; 469(1): 132-6.
- Sambrook J.; MacCallum P. et Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (troisième édition). 2000. Volume 1. Chapitre 1.
- Sijmons, P. C.; Dekker, B. M. ;Schrammeijer, B.; Verwoerd, T. C.; van den Elzen, P. J. et Hoekema, A, P.C. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio Technology*. 1990; 8: 217–21.
- Smart, C.D.; Yuan, W.; Foglia, R.; Nuss, D.L.; Fulbright, D.W. et Hillman, B.I. *Cryphonectria hypovirus 3*, a virus species in the family hypoviridae with a single open reading frame. *Virology*. 1999; 265: 66-73.

- Smith, M.D. et Glick, B.R. The production of antibodies in plants. *Biotechnol. Adv.* 2000; 18: 85–89.
- Staub, J. M.; Garcia, B.; Graves, J.; Hajdukiewicz, P. T.; Hunter, P.; Nehra, N.; Paradkar, V.; Schlittler, M.; Carroll, J. A.; Spatola, L.; Ward, D.; Ye, G et Russell, D. A. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat Biotechnol.* 2000; 18(3): 333-8.
- Stoger, E.; Schillberg, S.; Twyman, R. M.; Fischer, R., et Christou, P. Antibody production in transgenic plants. *Methods Mol Biol.* 2004; 248: 301-18.
- Stoger, E.; Vaquero, C.; Torres, E.; Sack, M.; Nicholson, L.; Drossard, J.; Williams, S.; Keen, D.; Perrin, Y. ; Christou, P. et Fischer, R. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol.* 2000; 42: 583-90.
- Strauss, E. E.; Lakshman, D. K. et Tavantzis, S. M. Molecular characterization of the genome of a partitivirus from the basidiomycete *Rhizoctonia solani*. *J Gen Virol.* 2000; 81(Pt 2): 549-55.
- Strauss S.E.; Roizman B.; Martin M.A.; Lamb R.A.; Griffin D.E.; Howley P.M. et Knipe D.M. *Fields Virology*. Quatrième édition. Knipe DM, Howley PM. Eds. Lippincott Williams et Wilkins Philadelphia. 2001; 3087 pages.
- Symons, R. H. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(14): 2683-9.
- Tackaberry, E. S.; Dudani, A. K.; Prior, F.; Tocchi, M.; Sardana, R.; Altosaar, I. et Ganz, P. R. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine.* 1999; 17(23-24): 3020-9.
- Tacket, C.O. Human immune responses to a novel *Norwalk virus* vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. Infect. Dis.* 2000; 182: 302-5.
- Thanavala, Y.; Yang, Y. F.; Lyons, P.; Mason, H. S. et Arntzen, C. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 3358-61.
- Thompson, J. R.; Leone, G.; Lindner, J. L.; Jelkmann, W., et Schoen, C. D. Characterization and complete nucleotide sequence of *Strawberry mottle virus*: a tentative member of a new family of bipartite plant picorna-like viruses. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 1): 229-39.

- Tregoning, J. S.; Nixon, P.; Kuroda, H.; Svab, Z.; Clare, S.; Bowe, F.; Fairweather, N.; Ytterberg, J.; van Wijk, K. J.; Dougan, G. et Maliga, P. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(4): 1174-9.
- Vaira, A. M.; Accotto, G. P.; Costantini, A., et Milne, R. G. The partial sequence of RNA 1 of the ophiovirus *Ranunculus white mottle virus* indicates its relationship to rhabdoviruses and provides candidate primers for an *ophiovirus*-specific RT-PCR test. *Arch Virol.* 2003; 148(6): 1037-50.
- Vaira, A. M.; Milne, R. G.; Accotto, G. P.; Luisoni, E.; Masenga, V., et Lisa, V. Partial characterization of a new virus from ranunculus with a divided RNA genome and circular supercoiled thread-like particles. *Arch Virol.* 1997; 142(11):2131-46.
- Vaira, A. M.; Semeria, L.; Crespi, S.; Lisa, V.; Allavena, A., et Accotto, G. P. Resistance to tospoviruses in *Nicotiana benthamiana* transformed with the N gene of *tomato spotted wilt virus*: correlation between transgene expression and protection in primary transformants. *Mol Plant Microbe Interact.* 1995; 8(1): 66-73.
- Valdes, R.; Reyes, B.; Alvarez, T.; Garcia, J.; Montero, J. A.; Figueroa, A.; Gomez, L.; Padilla, S.; Geada, D.; Abrahantes, M. C.; Dorta, L.; Fernandez, D.; Mendoza, O.; Ramirez, N.; Rodriguez, M.; Pujol, M.; Borroto, C. et Brito, J. Hepatitis B surface antigen immunopurification using a plant-derived specific antibody produced in large scale. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310(3): 742-7.
- Wang, P. F.; Novak, W. R.; Cantwell, J. S.; Babbitt, P. C.; McLeish, M. J., et Kenyon, G. L. Expression of Torpedo californica creatine kinase in *Escherichia coli* and purification from inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* 2002; 26(1): 89-95.
- Ward, C.W. et Shukla, D.D. Taxonomy of potyviruses: current problems and some solutions. *Intervirology.* 1991; 32: 269-296.
- Wei, C. Z.; Osaki, H.; Iwanami, T.; Matsumoto, N., et Ohtsu, Y. Molecular characterization of dsRNA segments 2 and 5 and electron microscopy of a novel reovirus from a hypovirulent isolate, W370, of the plant pathogen *Rosellinia necatrix*. *J Gen Virol.* 2003; 84(Pt 9): 2431-7.
- Wigdorovitz, A.; Carrillo, C.; Dus Santos, M. J.; Trono, K.; Peralta, A.; Gomez, M. C.; Rios, R. D.; Franzone, P. M.; Sadir, A. M.; Escribano, J. M. et Borca, M. V. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa

transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*. 1999; 255(2): 347-53.

Yu, J. et Langridge, W. H. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol*. 2001; 19(6): 548-52.

Zhang, J.; Wang, C.; Guo, S.; Chen, J. et Xiao, P. [Studies on the plant hormones produced by 5 species of endophytic fungi isolated from medicinal plants (Orchidacea)]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 1999; 21(6): 460-5.

Zhang, Y. P. et Rowhani, A. A strategy for rapid cDNA cloning from double-stranded RNA templates isolated from plants infected with RNA viruses by using Taq DNA polymerase. *J Virol Methods*. 2000; 84(1): 59-63.

Zhu, H.; Kim, D. J.; Baek, J. M.; Choi, H. K.; Ellis, L. C.; Kuester, H.; McCombie, W. R.; Peng, H. M., et Cook, D. R. Syntenic relationships between *Medicago truncatula* and *Arabidopsis* reveal extensive divergence of genome organization. *Plant Physiol*. 2003; 131(3): 1018-26.

## Internet

<http://image.fs.uidaho.edu/> visité le 6 juin 2006

<http://www.medecine.unige.ch/~linder/ecole/Protocol2.html> visité le 20 février 2007

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/490000000.htm> visité le 20 février 2006

<http://www.uq.edu.au/vdu/VDUPotyvirus.htm> visité le 13 mars 2007