

Article 2014

Résumé Le génome du virus de l'igname X (YVX), un nouveau membre du genre Potexvirus issu de l'igname (*Dioscorea trifida*), a été complètement séquencé. Les analyses structurales et phylogénétiques ont montré que le plus proche parent de YVX est le virus X du nerine. Une étude de prévalence a révélé que YVX ne se trouvait que sur des plantes maintenues en Guadeloupe et qu'il infectait également les membres du complexe *D. cayenensis rotundata*. Cette étude fournit des preuves de l'existence de deux potexvirus supplémentaires, l'un infectant *D. nummaria* à Vanuatu et l'autre, *D. bulbifera* et *D. rotundata* en Haïti et *D. trifida* et *D. rotundata* en Guadeloupe. Ces travaux montrent également que les amorces dégénérées spécifiques du potexvirus ciblant le domaine de la polymérase lié à ORF1 sont bien adaptées à l'identification des trois potexvirus rapportés ici. Les ignames (*Dioscorea* spp) sont l'un des produits alimentaires les plus importants du marché. tropiques et subtropicaux [4]. Les ignames comestibles, qui représentent environ 10 des env. 600 espèces connues d'ignames produisent des tubercules amylacés à haute valeur nutritive et jouent un rôle clé dans la sécurité alimentaire, représentant une part substantielle de la consommation alimentaire en Asie, en Afrique, dans le Pacifique et dans les Amériques, y compris les Caraïbes. Les ignames jouent également un rôle important dans l'économie locale de nombreux pays en développement. Plusieurs espèces d'ignames sont également utilisées en médecine traditionnelle comme source d'antioxydants [6] et dans l'industrie pharmaceutique pour l'extraction de stéroïdes, y compris la diosgénine, une sapogénine stéroïdienne aux propriétés œstrogéniques et antitumorales [16].

Les ignames sont multipliées par voie végétative, favorisant ainsi l'accumulation de phytovirus. À ce jour, plusieurs virus des genres Aureusvirus, Badnavirus, Carlavirus, Comovirus, Cucumovirus, Fabavirus, Macluravirus, Potexvirus et Potyvirus ont été signalés et caractérisés dans *Dioscorea* spp [8–10, 13–15, 18–21, 26.]. Cependant, la diversité des virus infectant les ignames reste largement inexplorée. L'impact des infections virales sur le rendement et la qualité des tubercules peut être important et menace parfois même la culture de l'igname. Par exemple, la culture de *Dioscorea trifida* connaît un fort déclin dans les Caraïbes en raison de sa forte sensibilité aux potyvirus. Des efforts sont déployés dans le monde entier pour promouvoir l'assainissement du matériel génétique d'igname infecté afin de produire et de distribuer des tubercules / plantules propres afin de lutter contre les virus de l'igname et de rétablir la production et la productivité. Cependant, ces efforts sont freinés par notre connaissance limitée de la diversité des virus infectant les ignames, ce qui empêche de développer des outils de diagnostic appropriés et rentables. Ces efforts sont également impactés par la découverte récente de séquences de badnavirus endogènes dans le génome des ignames du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* [22, 24]. *D. trifida* accession # 551 de la collection d'ignames du Centre de ressources biologiques pour les plantes tropicales (CRB-PT) de Guadeloupe, présentant des symptômes bénins de chlorose foliaire, a été positivement indexée pour la présence de potexvirus par RT-PCR réalisée sur les acides nucléiques totaux (TNA) extraites des tissus des feuilles [5], en utilisant la paire d'amorces dégénérées spécifiques du potexvirus Potex-2RC / Potex-5 [25]. Ces amorces ciblent le domaine actif de la polymérase conservé de la réplicase codée par le cadre de lecture ouvert 1 des potexvirus (ORF1). Le produit d'amplification a été cloné dans le vecteur facile pGEM-T (Promega, France) et séquence. L'analyse de la séquence a montré qu'elle était homologue de la région correspondante d'autres potexvirus mais qu'elle était néanmoins distante de toute séquence de la base de données GenBank, ce qui suggère qu'elle correspond à un potexvirus non encore caractérisé. Afin d'amplifier et de séquencer les 30 moitiés de son génome, l'amorce Potex-Yam-GSP4 (50 GGACGAGACCCTCTATCGAGCAACCATT 30) a été conçue sur la base de la séquence du produit d'amplification (Fig. 1A) et utilisée avec l'oligonucléotide LDprim PCR de transcription inverse à distance, telle que décrite par Youssef et al. [27] Cela a généré un produit d'amplification de 3 150 pb. Pour la partie 50 du génome, l'amorce Po-tex-Yam-rev (50

GAGATTGGCTCTCTAGAGC 30) a été conçue sur la base de la séquence interne obtenue à l'origine, tandis qu'une amorce en amont Potex-Yam-fw2 (50 TACGCYACMRTGGTDCTHCC 30) a été conçue sur la base des séquences observées avec potexviral. chez *D. trifida*, les données des étiquettes de séquence (EST) générées par le projet ARCAD (Agropolis Resource Centre for Conservation des Cultures, Adaptation et Diversité) (non publiées). Ces amorces ont été utilisées dans une longue expérience d'amplification par RT-PCR, générant un produit de 2 487 pb chevauchant le produit de 30 par 67 nucléotides. Enfin, sur la base de la séquence de 50 régions ainsi obtenue, l'amorce potex-50-rev (50 GCGTGTGCGCCA GGTATGTACTGAAACC 30) a été conçue et utilisée dans une expérience 50 RACE, générant un produit de 704 pb couvrant l'extrémité 50 du génome viral. chevauchant le produit d'amplification PCR long par 116 nucléotides. Les produits d'amplification ont été clonés dans pGEM-T Easy Vector et séquencés par Beckman Coulter Genomics (Takesley, UK). L'assemblage et l'analyse des séquences, y compris les études phylogénétiques, ont été réalisés avec MEGA 6.0 [23].

Le génome complet de l'isolat de potexvirus infectant *D. trifida* accession n ° 551 a été reconstitué en assemblant les trois séquences qui se chevauchent, présentant une homologie de 100% dans les régions de chevauchement, ce qui suggère qu'accession n ° 551 était infectée par un seul isolat viral. La taille du génome viral est de 6 158 nucléotides, à l'exclusion de la queue de 30 polyA. Son organisation (Fig. 1A) est typique des membres du genre Potexvirus, avec cinq cadres de lecture ouverts (ORF). Un grand ORF (ORF1, nt 79-4236) code pour une ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp ou réplicase), y compris le

motif central de RdRp conservé caractéristique ([11], S / TGx3Tx3NS / Tx22GDD, nt 3667-3802). Le premier codon d'initiation en position 79 se trouve dans un contexte favorable pour l'initiation (GGTATGGC), avec un G en position -3, une purine en position 4 et un GC après le codon de départ [12, 17]. Trois ORF plus petits et qui se chevauchent, ORF 2 (nt 4270-4933), ORF 3 (nt 4926-5250) et ORF 4 (nt 5179-5380) codent pour des protéines putatives à bloc de trois gènes TGBp1, TGBp2 et TGBp3, dont les séquences, l'arrangement et la fonction dans le mouvement viral sont typiques et conservés parmi les virus-virus [2]. ORF2 et ORF3 se chevauchent sur 7 nt, alors que ORF3 et ORF4 se chevauchent sur une séquence plus longue (71 nt). ORF5 (nt 5384-6029), code pour la protéine d'enveloppe putative (CP), qui contient le motif de noyau amphipathique conservé (AAFDxFx2Vx4A, nt 5798-5837) partagé par les membres de la famille Alphaflexiviridae [1, 3]. Les régions non traduites de 50 et 30 ont respectivement une longueur de 78 nt et de 128 nt, cette dernière comprenant un signal de polyadénylation supposé (AATAAA, nt 6053-6059). L'analyse BLAST par rapport à la base de données GenBank et l'analyse phylogénétique réalisée à l'aide des séquences d'acides aminés RdRp et CP (Fig. 1B et C) ont confirmé que ce virus est un membre du genre Potexvirus mais qu'il n'a pas d'équivalent proche dans la base de données. En effet, le pourcentage d'identité de séquence le plus élevé pour l'une des cinq protéines virales n'a jamais atteint plus de 51,9% avec aucun des potexvirus analysés, ce qui indique clairement que l'isolat étudié représente un potexvirus non séquencé précédemment (Tableau 1), pour lequel le nom virus de l'igname X (YVX) est proposé. Ces analyses phylogénétiques et des analyses supplémentaires effectuées sur les séquences d'acides aminés des autres protéines putatives codées par le génome de YVX ont montré que le membre du genre Potexvirus, le plus étroitement apparenté à YVX, est le virus nérine X (NVX; voir le tableau 1).

La transmission mécanique de l'isolat viral à des hôtes herbacés, notamment *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *Chenopodium quinoa* et *C. amaranticolor*, a été tentée, mais aucune infection locale ou systémique n'a été observée et aucun virus YVX n'a été détecté dans les indicateurs. lorsqu'il a été testé par RT-PCR sur des TNA à l'aide de la paire d'amorces dégénérées spécifiques du virus potex - Potex-2RC / Potex-5. Une étude de la prévalence du virus a été réalisée par RT-PCR comme décrit ci-dessus sur 170 accessions provenant de la collection d'ignames CRB-PT de Guadeloupe. Ces accessions ont été collectées à l'origine dans 14 pays (Barbade, Brésil, Dominique, République dominicaine, Guyane française, Guadeloupe, Haïti, Côte d'Ivoire, Jamaïque, Martinique, Nouvelle-Calédonie, Nigéria, Philippines et Porto Rico). conservés

en Guadeloupe dans des conditions de terrain pendant de nombreuses années. De même, 213 entrées supplémentaires provenant de l'installation de quarantaine d'ignames du Centre international de recherche en agronomie pour le développement (CIRAD) à Montpellier (France) ont été analysées. Ces accessions ont été collectées dans 20 pays (Bénin, Brésil, Burkina Faso et Faso, Cameroun, Cuba, Fidji, France, Guyane française, Ghana, Guadeloupe, Guinée, Haïti, Inde, Côte d'Ivoire, Madagascar, Martinique, Papouasie-Nouvelle-Guinée, Togo, Vanuatu, Vietnam) et sont conservés en serre. Un total de 17 échantillons étaient positifs: 12

échantillons provenant de la collection de CRB-PT de Guadeloupe et cinq échantillons provenant de l'installation de quarantaine des ignames du Cirad. Les produits d'amplification ont été clonés et séquences et les séquences d'acides aminés correspondantes ont été comparées. Une séquence de marqueur d'expression de séquence (EST) du projet ARCAD correspondant à la même région génomique virale a également été incluse dans l'analyse. L'arbre phylogénétique reconstruit (Fig. 2) a montré que des variants étroitement apparentés à l'isolat séquencé YVX infectent les accessions de *D. trifida* et *D. rundundata* de la collection CRB-PT. La séquence EST d'igname, obtenue à partir du numéro d'accèsion 554 (*D. trifida*) de la même collection, présente également une homologie significative avec l'isolat entièrement séquencé et s'agglomère avec elle avec un support bootstrap de 100%, suggérant qu'elle correspond à une variante virale appartenant à la souche même espèce virale. Il n'existe donc actuellement aucune indication de la présence de YVX chez des espèces d'igname autres que *D. trifida* et *D. rotundata*. De manière surprenante, l'arbre phylogénétique présenté à la figure 2 fournit également la preuve de l'existence de deux groupes supplémentaires distincts de séquences de potexvirus à partir des échantillons analysés. Le premier groupe comprend trois séquences amplifiées à partir d'échantillons de *D. nummularia* provenant de Vanuatu (VU206DnX, VU332DnX, VU333DnX) et présentant une homologie de séquence d'acides aminés entre eux dans la protéine incluse. Un deuxième groupe comprend quatre séquences amplifiées à partir d'échantillons de *D. bulbifera* et *D. rotundata* d'Haïti (HT302DbX et HT167DrX) et d'échantillons de *D. trifida* et *D. rotundata* de Guadeloupe (accès de *D. trifida* n° 647 et GP12DrX). 97,7% d'homologie de séquence d'acides aminés les uns aux autres. Le niveau moyen de divergence des acides aminés entre les séquences de ces trois groupes de séquences potexviraux d'igname variait entre 26,5 et 36,6%. Comme l'illustre l'arbre phylogénétique de la figure 2, ces valeurs sont bien supérieures à celles observées entre certains membres d'espèces approuvées du genre Potexvirus, telles que les valeurs de 9,9% à 14,4% entre les membres du virus du cactus X (CVX), le groupe opuntia virus X (OpVX), le groupe schlerumgergera virus X (SchVX) et le virus zygotocactus X (ZVX) ou les valeurs comprises entre 17,1 et 20,4% entre le virus de l'asparagus 3 (AV3), le virus de la mosaïque du malva (MalMV) et le virus de la mosaïque du narcisse (NMV). Ces résultats suggèrent donc fortement que des membres de deux autres espèces de Potexvirus étaient également présents dans les ignames analysées.

Jusqu'à présent, un seul virus de la variole, le virus de la dioscorea latent (DLV), a été signalé chez des ignames [13]. Bien qu'aucune donnée de séquence ne soit disponible pour le DLV, celui-ci a été détaillé en détail [20] et a montré des relations sérologiques croisées avec quelques potexvirus définis. Son statut taxonomique semble donc être fermement établi. DLV a été identifié chez *D. floribunda* asymptomatique à Porto Rico, où il s'est avéré qu'il se propageait naturellement [7, 13, 21], mais dans aucun des 37 cv de *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta* ou *D. rotundata* collecté par Phillips et al. [20] dans huit pays (Barbade, Indonésie, Malaisie, Nigéria, Papouasie-Nouvelle-Guinée, Philippines, Porto Rico et Îles Salomon). La DLV a été détectée sérologiquement dans des échantillons de *D. alata* provenant de plusieurs îles du Pacifique Sud, mais n'a pu être détectée par RT-PCR dans aucun de ces échantillons à l'aide d'amorces dégénérées spécifiques du potexvirus [14]. Cela suggère que DLV pourrait être un membre du genre Potexvirus qui est différent de ceux rapportés dans ce travail, bien que cela doive être approfondi lorsque les données moléculaires deviennent disponibles pour DLV. De plus, il a été signalé que le DLV était facilement transmissible par inoculation mécanique à une gamme d'hôtes herbacés et qu'il ne provoquait une infection asymptomatique que sur les feuilles inoculées de la plupart des hôtes

expérimentaux, mais une infection systémique asymptomatique chez *Nicotiana benthamiana* et *N. mégalosiphon* [7, 20, 21]. En revanche, les expériences d'inoculation réalisées dans le présent travail ont montré que l'isolat de YVX provenant de l'igname n° 551 n'est pas en mesure d'infecter, localement ou par voie systémique, les divers virus.

hôtes expérimentaux testés, y compris *N. benthamiana*. Compte tenu de la différence de gamme d'hôtes et de l'incapacité de Lebas [14] à amplifier le DLV en utilisant des amorces dégénérées spécifiques du potexvirus, il est probable que l'isolat de YVX analysé ici soit différent du DLV. Il reste à déterminer si les symptômes bénins observés lors de l'accession d'origine à l'igname n° 551, qui ont donné des résultats négatifs pour les badnavirus, les closterovirus, les macluravirus et les sadwavirus mais testés positifs pour les potyvirus, ont été causés par YVX ou par un agent co-infectant. que tous les autres échantillons infectés par YVX étaient asymptomatiques.

Aucun réactif immunologique ou moléculaire spécifique n'est actuellement disponible pour le diagnostic fiable des trois potexvirus d'igname décrits. En revanche, les expériences d'inoculation réalisées dans le présent travail ont montré que l'isolat de YVX provenant de l'igname n° 551 n'est pas en mesure d'infecter, localement ou par voie systémique, les divers virus.

hôtes expérimentaux testés, y compris *N. benthamiana*. Compte tenu de la différence de gamme d'hôtes et de l'incapacité de Lebas [14] à amplifier le DLV en utilisant des amorces dégénérées spécifiques du potexvirus, il est probable que l'isolat de YVX analysé ici soit différent du DLV. Il reste à déterminer si les symptômes bénins observés lors de l'accession d'origine à l'igname n° 551, qui ont donné des résultats négatifs pour les badnavirus, les closterovirus, les macluravirus et les sadwavirus mais testés positifs pour les potyvirus, ont été causés par YVX ou par un agent co-infectant. que tous les autres échantillons infectés par YVX étaient asymptomatiques.

Aucun réactif immunologique ou moléculaire spécifique n'est actuellement disponible pour le diagnostic fiable des trois potexvirus d'igname décrits dans ce travail. Les résultats présentés ici démontrent toutefois que la RT-PCR réalisée sur des TNA extraits de tissus de feuille utilisant la paire d'amorces dégénérées spécifiques du potexvirus Potex-2RC / Po-tex-5 [25] convient bien à la détection des trois potexvirus rapportés ici et pourraient être utilisés pour améliorer l'état sanitaire des dépôts de matériel génétique d'igname et pour prévenir la propagation de ces agents. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser la diversité des potexvirus infectant les ignames afin de mettre au point des outils génériques de diagnostic moléculaire pour la détection de ces virus, y compris le DLV.

Article 2017

La séquence du génome du virus TR de *Dioscorea bacilliformis*, un membre du genre Badnavirus infectant *Dioscorea* spp., met en lumière la fonction possible des virus endogènes *Dioscorea* bacilliformes. Résumé La séquence du génome complet du virus TR de *Dioscorea* bacilliforme (DBTRV) a été déterminée. Les parents les plus proches du DBTRV sont le virus AL de *Dioscorea* bacilliforme (DBALV) et le virus RT de *Dioscorea* bacilliforme 1 (DBRTV1). Des amorces spécifiques ont été conçues et utilisées pour déterminer la prévalence de DBTRV dans une collection de matériel génétique d'igname. Il a été constaté que ce virus infecte les plantes de *Dioscorea alata* et de *D. trifida* en Guadeloupe et en Guyane française. La DBTRV n'a été détectée dans aucune des accessions testées de *D. cayenensis-rotundata*. L'analyse *in silico* a fourni des preuves de la présence de séquences endogènes de type DBTRV dans le génome de *D. cayenensis-rotundata*, indiquant un rôle possible de ces séquences dans la défense antivirale. Les ignames (*Dioscorea* spp.) Sont un élément important l'alimentation dans le monde entier, en particulier en Afrique de l'Ouest et dans le Pacifique Sud [1, 2], ainsi que dans les Caraïbes. Ils jouent un rôle clé dans toute la zone intertropicale dans les programmes de diversification de l'agriculture visant à accroître l'autosuffisance alimentaire. Au cours des 10 dernières années, plusieurs virus des genres Aureusvirus, Badnavirus, Carlavirus, Comovirus, Cucumovirus, Faba virus, Macluravirus, Potexvirus et Potyvirus ont été signalés dans des ignames cultivées, révélant ainsi le large éventail de virus infectant cette culture. Le fait que les ignames cultivées soient multipliées par voie végétative est susceptible de favoriser l'accumulation de virus au point que les infections multiples sont courantes, ce qui rend difficile l'évaluation des symptômes et l'impact sur les rendements de virus individuels.

Les badnavirus (famille des Caulimoviridae, genre Badavirus) sont largement étudiés en raison de leur forte prévalence et de leur impact économique sur des cultures tropicales importantes telles que le cacao, la banane, la canne à sucre, les agrumes et les ignames et leur grande diversité moléculaire [3]. Les génomes de quatre badnavirus distincts infectant des ignames ont été complètement séquencés: le virus AL de *Dioscorea bacilliforme* (DBALV), le virus bacilliforme de *Dioscorea* SN (DBSNV), le virus RT de forme 1 (DBRTV1) et le virus de la tuberculose *Dioscorea* 2 (DBRTV2) [4–6]. Ces séquences ont été utilisées pour des études phylogénétiques, ainsi que des séquences de nucléotides partielles générées par PCR en utilisant la paire d'amorces spécifiques du virus du navirus BadnaFP / BadnaRP ciblant le domaine conservé de la transcriptase inverse / ribonucléase H (RT / RNaseH) [7]. Ces analyses ont révélé l'existence de 15 types de badnavirus distincts chez l'igname [6–9]. Cependant, mis à part DBALV, DBSNV, DBRTV1 et DBRTV2, il n'existe toujours pas de preuve que les formes épisomiques de ces virus sont encore existantes. Ils pourraient donc exister en tant que formes endogènes appelées virus endogènes de bacilliformes de *Dioscorea* (eDBV) [10]. Une recherche de badnavirus a été effectuée par PCR dans 65 accessions de *D. trifida* conservées dans la collection du Centre de ressources biologiques pour les plantes tropicales (BRC). -TP) des Antilles françaises. Pour cela, l'ADN génomique total a été extrait de vitroplants à l'aide d'un mini kit DNeasy Plant (QIAGEN, Courtaboeuf, France). La qualité de l'ADN a été évaluée par PCR en utilisant la paire d'amorces atpB1 / atpB2 et les conditions décrites par Soltis et al. [11]. La PCR spécifique au badnavirus a été réalisée à l'aide de l'amorce BadnaFP / BadnaRP comme décrit par Umber et al. [dix]. Un produit d'amplification de la taille attendue (579 pb) a été obtenu chez 96,9% (63/65) des échantillons analysés (tableau S1), ce qui suggère que ces produits de PCR ont été amplifiés à partir des génomes épisomaux de badnavirus et des eDBV. Une recherche spécifique de formes épisomiques a été effectuée en utilisant une immuno-capture-PCR (IC-PCR) réalisée sur des extraits de feuilles des mêmes 65 obtentions de *D. trifida*, comme décrit par Umber et al. [12] avec les modifications suivantes: la paire d'amorces Bad-naFP / BadnaRP a été utilisée pour l'amplification de séquences de mauvais navirus, et la paire d'amorces atpB1 / atpB2 a été utilisée pour le suivi de la contamination par l'ADN génomique de l'igname pouvant conduire à des résultats faussement positifs. amplification des eDBV. Au total, 38 échantillons (58,5%) ont été trouvés positifs (Tableau S1), une diminution marquée par rapport aux 96,9% d'échantillons positifs susmentionnés, indiquant que des badnavirus épisomaux étaient présents dans les accessions de *D. trifida* analysées et qu'une grande partie des produits obtenus par PCR résultaient de l'amplification des eDBV.

Une sélection de 11 produits IC-PCR a été clonée dans pGEM-T Easy Vector (Promega, Charbonnières, France). Un à quatre clones ont été séquencés pour chaque produit d'amplification (Beckman Coulter, Takeley, Royaume-Uni), donnant un total de 21 séquences (tableau S1). L'analyse phylogénétique a montré que les 21 séquences appartenaient toutes aux groupes 8 et 9 d'igname-navirus définis par Kenyon et al. [8] et nommés DBV-A (A) et DBV-B par Bousalem et al. [9]. Fait intéressant, les accessions n° 50 et n° 52 hébergent des séquences des deux groupes (Fig. 1A), illustrant le fait que des infections mixtes par des membres de différentes espèces de badnavirus se produisent chez l'igname. Il est établi qu'il existe des formes épisomiques de badnavirus dans 4 des 15 groupes, car les génomes des membres de ces groupes ont été entièrement séquencés à partir de préparations de virus purifiées (groupes 4 et 8, [4, 5]) ou après amplification en cercle tournant (RCA), qui amplifie sélectivement les formes épisomales des génomes viraux à ADN circulaires (groupes 13 et 14, [6]). Au contraire, les séquences nucléotidiques du groupe 9 d'igname-badnavirus n'étaient rapportées que sous forme endogène dans les génomes de *D. cayenensis-rotundata* avant ce travail [10, 13]. Par conséquent, le séquençage du génome épisomal de pleine longueur d'un badnavirus d'igname du groupe 9 a été entrepris. Pour cela, une paire d'amorces tournées vers l'extérieur (DBV-BgenF / DBV-BgenR; voir la figure 2 et le tableau S2) a été conçue à partir de la séquence 7P_12 provenant d'une IC-PCR réalisée sur l'échantillon 496_Borelli (identifiant d'accession de *D. trifida* PT-IG-00432). Nous avons utilisé 100 ng d'ADN génomique de cet échantillon comme matrice dans une expérience de PCR longue. Le mélange de PCR contenait 400 nM de chaque amorce, 400 IM de dNTP et 2,5 U d'ADN polymérase LongAmp Taq (New England Biolabs, Evry, France). Les conditions de PCR étaient de 4 mn à 94 ° C; 25 cycles de 30 à 94 ° C, 30 à 58 ° C, 7 mn à 72 ° C; et une étape d'élongation finale de 10 mn à 72 ° C. Un seul produit PCR de la taille attendue (7-8 kpb) a été généré et cloné dans pGEM-T Easy Vector. L'insert d'un clone recombinant (n° 496-8) a été entièrement séquencé sur les deux brins en utilisant une stratégie de marche du génome (Beckman Coulter), générant une séquence de 6685 pb. Une analyse in silico a montré que cette séquence couvrait la quasi-totalité du génome viral d'un badnavirus (Fig.

2), l'absence de l'extrémité 5' de la région intergénique et le début de ORF1 et l'affichage de trois décalages de trames entraînant des perturbations du cadre de lecture. Des paires d'amorces supplémentaires ORF2496F / ORF2496R, MID1ORF3F / MID1ORF3R, MID2ORF3F / MID2ORF3R, ENDORF3F / ENDORF3R et IG496F / IG496R (tableau S2) ont été conçues et utilisées dans le cadre d'expériences de PCR. ambiguïtés et compléter la séquence (Fig. 2). Les mélanges réactionnels contenaient 200 nM de chaque amorce et 1 U d'ADN polymérase de Phusion (New England Biolabs). Les conditions de PCR étaient de 30 s à 98 ° C; 30 cycles de 10 à 98 ° C, 30 à 58 ° C et 45 à 72 ° C; et une étape d'élongation finale de 10 mn à 72 ° C. Les produits de PCR ont été clonés dans pGEM-T Easy Vector, et cinq clones recombinants par produit de PCR ont été séquencés sur les deux brins. Toutes les séquences affichaient une identité de 99% avec les régions superposées du clone n° 496-8. L'assemblage de la séquence a été réalisé à l'aide de Geneious R9 (Biomatters, Auckland, Nouvelle-Zélande) et a abouti à une séquence de 7333 pb (numéro d'accèsion GenBank KX430257) représentant toutes les caractéristiques du génome d'un badnavirus [14].

Trois cadres de lecture ouverts ont été identifiés (Fig. 2). Comme ceux du virus de la banane striée IM [15], les ORF 2 et 3 étaient dans un cadre de traduction -1 par rapport au précédent ORF, les codons de départ et d'arrêt des ORF 1 et 2 se chevauchaient, et ceux des ORF 2 et 3 étaient séparés par deux nucléotides. Un site de liaison d'amorce de brin négatif putatif a été identifié (5'-TGGTATCAGAGCTCTGGT-3') et, par convention, le nucléotide 5' de ce motif a été désigné début de génome. Conformément à un modèle de traduction avec balayage qui fuit, il n'y avait pas de codons AUG internes à ORF1 ou à 2. Des promoteurs putatifs ont été identifiés dans la région du génome située entre l'extrémité de ORF3 et le site de liaison à l'amorce de brin négatif et incluaient un TATA. une boîte (AGCTATATAAGCA) en position 7192-7204 et une boîte CAAT (ACTCAATTATT) en position 7165-7175.

La traduction conceptuelle des ORF 1, 2 et 3 a donné naissance à des protéines ayant des poids moléculaires de 16,7, 13,6 et 215,4 kDa, respectivement. Plusieurs domaines conservés ont été détectés dans la polyprotéine codée par ORF3, y compris un motif d'UTPase caractéristique des protéines de mouvement des membres de la famille Caulimoviridae [16] en position 344-473 et des domaines associés aux activités de la protéase aspartique et de la transcriptase inverse / RNase H aux positions 1196-1308 et 1457-1619, respectivement (Fig. 2). Un motif de doigt de zing (CKCFLCGAEGHFARECPN) typique de la protéine d'enveloppe des membres de la famille des Caulimoviridae [14] a été trouvé en position 920-937.

Les comparaisons de séquences effectuées sur la séquence nucléotidique du domaine RT / RNaseH de la séquence du génome assemblé (position 5881-6408) ont montré que cette séquence présentait une identité de séquence nucléotidique de 65,5% à 73,7% avec la région correspondante d'autres badnavirus de virus épisomal entièrement séquencés (Tableau 1).

Considérant que le critère de démarcation des espèces pour le genre Badnavirus est une identité de 80% dans ce domaine, la séquence du génome assemblé appartient à une nouvelle espèce de ce genre et nous proposons le nom de virus de Dioscorea bacilliform TR (DBTRV) pour ce virus. Des comparaisons supplémentaires de séquences réalisées sur les séquences nucléotidiques des ORF 1, 2 et 3 et les séquences d'acides aminés codées correspondantes ont confirmé que DBTRV est un virus distinct infectant l'igname (Tableau 1).

Considérant que le critère de démarcation des espèces pour le genre Badnavirus est une identité de 80% dans ce domaine, la séquence du génome assemblé appartient à une nouvelle espèce de ce genre et nous proposons le nom de virus de Dioscorea bacilliform TR (DBTRV) pour ce virus. Des comparaisons supplémentaires de séquences réalisées sur les séquences nucléotidiques des ORF 1, 2 et 3 et les séquences d'acides aminés codées correspondantes ont confirmé que DBTRV est un virus distinct infectant l'igname (Tableau 1). Comme le montre la figure 1B, DBTRV et DBALV représentent des taxons frères du genre Badnavirus et forment un groupe monophylétique bien supporté avec d'autres badnavirus de l'igname.

Tirant parti d'une banque de chromosomes artificiels bactériens (BAC) de *D. trifida* accession 519_Lac bleu 3 (numéro d'identification PT-IG-00455; H. Berges, INRA, Toulouse, France, non publié), une recherche de séquences endogènes de l'igname badnavirus du groupe 9, appelé eDBV9, dans le génome de cette accession a été tentée. Pour cela, une hybridation moléculaire a été réalisée sur des clones BAC comme décrit par Gayral et al. [17], utilisant cinq sondes couvrant les positions du génome DBTRV 531-849, 3404-4005, 4186-4783, 5855-6432 et 7022-289, respectivement. Aucun signal d'hybridation positif n'a été obtenu, ce qui suggère que cette accession de *D. trifida* peut ne pas héberger de séquences analogues à DBTRV (données non présentées). De même, aucune séquence de type eDBTRV n'a pu être trouvée dans les séquences EST de *D. alata* disponibles dans GenBank après l'analyse BLAST (données non

présentées), ce qui suggère que de telles séquences ne sont pas non plus présentes dans le génome de *D. alata*.

La prévalence de DBTRV a été évaluée dans la collection in vitro de germplasm d'igname conservée au BRC-TP des Antilles françaises. Pour cela, une paire d'amorces spécifique à DBTRV (DBTRV-F / DBTRV-R; Tableau S2) ciblant le domaine DBTRV RT / RNaseH a été conçue sur la base de l'alignement des séquences de nucléotides présentées sur la figure 1A. Un total de 253 accessions ont été criblées par IC-PCR (voir tableau S1), en utilisant ces amorces et les conditions décrites ci-dessus. Des indexations supplémentaires ont été effectuées sur les mêmes extraits de feuilles en utilisant une paire d'amorces dégénérées spécifiques du badnavirus BadnaFP / BadnaRP. Les indexations ont montré que 35,6% (90/253) des échantillons analysés étaient infectés par des badnavirus, que le DBTRV seul était présent dans 14,6% (37/253) de ces échantillons et dans 24,6% (16/65) des échantillons de *D. trifida* (Tableau S3). Plusieurs des accessions de *D. trifida* infectées par DBTRV provenaient de Guadeloupe et de Guyane française et ont été conservées exclusivement in vitro depuis leur introduction dans la collection BRC-PT. Par conséquent, la zone de distribution de DBTRV comprend au moins la Guadeloupe et le français. Guyane. Les autres accessions utilisées dans ce travail ont été conservées en terrain découvert en Guadeloupe après leur introduction et avant leur conservation en vitroplants, rendant impossible l'établissement de l'origine géographique de DBTRV dans ces accessions. Cependant, la conception d'outils de détection spécifiques permet maintenant d'étudier la présence de DBTRV dans toutes les zones de production d'igname. Fait intéressant, le DBTRV a également été détecté dans 16,9% (21/124) des accessions de *D. alata* répertoriées, mais pas dans les 34,6% (18/52) des accessions de *D. cayenensis-rotundata* infectées par le badnavirus.

On s'attend à ce que l'accès à la première séquence complète du génome d'un badnavirus de l'igname du groupe 9 rapporté ici puisse aider à affiner la structure des eDBV réarrangés. En effet, une analyse in silico a montré que des parties non caractérisées des séquences eDBV9 réarrangées récemment décrites dans le génome de *Dioscorea cayenensis-rotundata* [10] présentent une identité allant jusqu'à 93% avec la région intergénique de DBTRV (tableau S4). En outre, plusieurs séquences de eDBV9 affichaient une identité à 100% avec DBTRV sur des séquences de plus de 25 nt, permettant potentiellement la synthèse de petits ARN interférents ciblant DBTRV. On peut donc supposer que ces séquences eDBV9 pourraient déclencher une défense basée sur la neutralisation contre DBTRV, comme cela avait été supposé précédemment pour d'autres éléments viraux endogènes [18], et expliquer l'absence de plantes infectées par DBTRV parmi les obtentions de *D. cayenensis-rotundata* étudiées. dans ce travail.

Article 2019

Nous avons ici évalué la capacité de l'approche de séquençage MinION à détecter et caractériser virus infectant une plante d'igname d'eau. Cette plate-forme de séquençage a constamment révélé la présence

de plusieurs espèces de virus végétaux, y compris le virus bacilliforme de *Dioscorea*, le virus de la mosaïque douce de Yam et le virus de la nécrose chlorotique de Yam. Un ampélavirus potentiellement nouveau a également été détecté par une approche complémentaire du séquençage Illumina. La séquence complète du génome du virus de la nécrose chlorotique de l'igname a été déterminée à l'aide du séquençage de Sanger, ce qui a permis de déterminer la couverture et la précision du séquençage.

de la technologie MinION. Alors que le taux d'erreur moyen total de séquençage des lectures de MinION liées au virus de la nécrose chlorotique de l'igname était de 11,25%, nous montrons que la séquence consensus obtenue soit par

l'assemblage de novo ou après la cartographie, les lectures de MinION sur la séquence génomique du virus étaient identiques à > 99,8% avec la séquence de référence dérivée de Sanger. Du point de vue des applications potentielles du séquençage MinION pour le diagnostic des maladies des plantes, ces degrés de précision du séquençage démontrent que l'approche MinION peut être utilisée à la fois pour détecter de manière fiable et pour séquencer avec précision des génomes de virus de plantes à ARN simple brin polyadénylé de sens positif presque complets.

Les approches métagénomiques ont permis la découverte de centaines d'espèces de virus auparavant inconnues^{1–4}. Ces découvertes ont renforcé notre compréhension des rôles écologiques et des impacts des communautés virales, indiquant que les virus sont probablement des composants essentiels d'écosystèmes aussi divers que l'intestin humain^{5,6} et les océans^{7,8}.

Par exemple, les approches métagénomiques qui prennent en compte les arrangements spatiaux des échantillons de plantes et les contextes environnementaux précis des sites d'échantillonnage individuels ont révélé l'impact de l'agriculture sur la distribution et la prévalence des virus de la plante à l'échelle de l'écosystème⁹. Bien que l'utilité de la métagénomique virale pour le diagnostic et la surveillance virale fasse encore l'objet de débats¹⁰⁻¹³, ces approches se sont avérées efficaces pour la découverte d'agents étiologiques inconnus^{12,14,15}. Spécifiquement, en virologie végétale, les approches de la métagénomique virale se concentrant sur l'analyse de petits ARN interférents dérivés du virus (siRNA) gagnent en popularité pour la détection des virus viraux connus et non caractérisés au sein de plantes infectées^{2,16,17}.

Les méthodologies de la métagénomique virale, qui reposaient jusqu'à présent principalement sur les technologies de séquençage à haut débit de seconde génération (Roche 454, Illumina, Ion Torrent, etc.), ont généré des milliards de 150 à 300 nucléotides (nt) ou de 21 à 24 nt les petites lectures d'ARN (ARNs) et, en fonction de la couverture du séquençage, ont permis de détecter et de caractériser les variants génétiques de basse fréquence au sein de populations virales¹⁸. Bien que les approches de la métagénomique virale aient élargi notre vision de la biodiversité virale mondiale et ouvert la voie à une meilleure compréhension de l'écologie et de l'évolution virales, plusieurs biais méthodologiques sapent l'analyse et l'affectation taxonomique des lectures de séquence et des contigs générés à l'aide de ces approches^{11,19,20}.

L'un des problèmes méthodologiques les plus importants concerne la production et l'analyse de lectures courtes²¹. Lorsqu'une séquence de référence apparentée connue n'est pas disponible pour guider la cartographie de lectures courtes, les lectures doivent être assemblées de novo pour obtenir soit des séquences du génome complet, soit des "contigs" de séquence génomique de grande taille. Ces séquences assemblées de novo sont généralement des chimères de lectures provenant de différentes variantes virales^{22,23}: un facteur qui devrait exclure l'utilisation de ces séquences pour la fabrication de données phylogénétiques et démographiques. De plus, la différenciation entre les séquences virales exogènes et endogènes reste difficile à obtenir sur la base de contigs de novo assemblés à lecture courte, car l'environnement génomique de ces contigs est généralement absent.

Un deuxième problème méthodologique lié aux approches métagénomiques qui utilisent des méthodes de séquençage de deuxième génération a trait à la difficulté de créer des scènes anciennes en enchaînant lectures et contigs. Le fait de ne pas créer suffisamment de contendants ou de contigs assez grands peut réduire les proportions de lectures pouvant être identifiées de manière fiable comme étant liées à des espèces de virus connues à l'aide d'approches basées sur l'alignement telles que BLAST²⁴. Ce problème technique est aggravé par la pénurie de taxons viraux représentés dans les bases de données publiques sur les séquences de nucléotides telles que GenBank. En conséquence, jusqu'à 70% ou plus des lectures générées par certaines études de métagénèse virale dans l'environnement finissent par être qualifiées de «matière noire» car elles n'ont pas d'homologie détectable avec des séquences dans le public. bases de données de séquences nucléotidiques^{19,25}.

Les techniques de séquençage de troisième génération capables de générer des lectures beaucoup plus longues à partir de molécules individuelles d'ARN ou d'ADN promettent d'éliminer le besoin d'assembler des contigs de novo à partir de lectures de séquences courtes. Ces techniques pourraient donc éviter les problèmes mentionnés ci-dessus²⁶. Parmi les techniques de séquençage de troisième génération, figure celle mise en œuvre dans le Oxford Nanopore MinION. Le MinION s'est récemment révélé efficace pour fournir, en temps réel, des lectures moyennes supérieures à 15 kilobases²⁷⁻²⁹. Alors que le taux d'erreur par nucléotide des lectures longues de MinION dépasse fréquemment 20% - ce qui est nettement supérieur à celui des lectures plus courtes d'Illumina³⁰ -, les hauts niveaux de couverture du génome pouvant être atteints avec l'analyse des données après séquençage peuvent toujours donner des séquences consensuelles, dont la précision est supérieure à 99%³¹ et qui peuvent être efficaces pour identifier les variants viraux recombinants³². Le MinION a été utilisé pour détecter et déterminer la séquence complète (ou presque complète) du génome d'une gamme de virus animaux et humains, notamment Ebola³³, Dengue³⁴, Zika³⁵, uenza³¹, Cowpox³⁶ et le virus de Ross River³⁷. Les seules applications publiées du MinION pour le séquençage des génomes du virus de la plante impliquaient la détection du virus de la raie de maïs, du virus de la mosaïque jaune du maïs et du totivirus du maïs chez le maïs³⁸ et du virus de la sharka chez le prunier³⁹.

Ici, nous avons cherché à utiliser le MinION pour détecter et caractériser plusieurs virus de la plante infectant une seule plante d'igname. Cette plate-forme de séquençage s'est avérée efficace pour la détection du virus bacilliforme *Dioscorea* (DBV, genre Badnavirus), du virus de la mosaïque de l'igname (YMMV, genre Potyvirus) et du virus de la nécrose chlorotique de l'igname (YCNV,

genre Macluravirus). La séquence génomique complète du virus YCNV a été déterminée à l'aide d'une approche de séquençage de Sanger afin de permettre la quantification comparative des degrés de couverture et de précision du séquençage à l'aide des plates-formes Illumina et MinION. Nous montrons que les séquences consensus de YCNV, obtenues par assemblage de novo ou par cartographie des lectures de MinION sur un génome de référence, étaient identiques à > 99,8% à la séquence de Sanger dérivée de ce virus, ce qui indique que le MinION devrait dans un proche avenir être fiable améliorer la recherche sur les virus des plantes et leur surveillance. Matériaux et méthodes

Matériel végétal. Une plante d'igname d'eau (*Dioscorea alata*) infectée par le YMMV et le YCNV a été collectée à Kerala (Inde) en 2010 et maintenue in vivo au DSMZ Plant Virus Department (PV-1066).

Petite extraction d'ARN et séquençage Illumina. De petites molécules d'ARN (ARNs), y compris de petits ARN interférant de 21 à 24 nucléotides (nt), ont été extraites à partir de feuilles symptomatiques de l'échantillon d'igname en utilisant un kit RNazolRT (WAK Chemie, Steinbach, Allemagne) conformément au protocole du fabricant (RNazol® RT Brochure, 2010, Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, OH). La petite fraction d'ARN a été quantifiée dans un uorimètre Qubit en utilisant un kit de dosage Qubit RNA HS (ermo Fischer Scienti, Waltham, USA) et sa qualité a été vérifiée dans un bioanalyseur 2100 (Agilent). L'ARN ayant passé le contrôle de qualité a été utilisé pour la préparation de la bibliothèque et soumis à un séquençage à haut débit sur un instrument Illumina «Hi-Seq 2000» faisant appel aux services d'une société commerciale (Fasteris SA, Plan-les-Ouates, Suisse).

Criblage in silico de données d'étiquettes (EST) disponibles publiquement. Recherche systématique de séquences virales dans des séquences assemblées de novo (à l'aide du programme d'assemblage de séquences CAP340) à partir de ressources EST disponibles publiquement (EST) (numéros d'accès GenBank: HO809681-HO825421, HO825422-HO840419 et HO850622-HO864016).) a été réalisée à l'aide des recherches BLASTn et BLASTx dans les bases de données de séquences de la collection de nucléotides GenBank (nt / nr) implémentées dans le logiciel KoriBlast 3.1 (KoriLog, Muzillac, France) avec un seuil maximal de valeur e de 10⁻³.

Caractérisation de la séquence complète du génome de la nécrose chlorotique d'igname par séquençage de Sanger. L'ARN total de l'échantillon d'eau d'igname a été extrait à l'aide du mini kit Qiagen RNeasy Plant (Qiagen, Valencia, CA) comme décrit par le fabricant. Un ensemble de 30 amorces se chevauchant (Tableau supplémentaire 1) a été conçu sur la base d'un alignement (en utilisant MUSCLE41 avec les paramètres par défaut) de la séquence consensus de YCNV obtenue en utilisant l'approche de l'ARNs Illumina, une séquence longue de 2306 nt avec un degré de similitude élevé (80.7 %) au YCNV récupéré à partir de séquences EST de *D. alata* obtenues à partir d'une plante cultivée au Nigeria⁴² et de séquences d'espèces de macluravirus connues (virus de la mosaïque nécrotique de l'igname chinoise (CYNMV) et virus de la mosaïque nécrotique chlorotique de l'igname (YCNMV)). Les réactions de RT-PCR ont été réalisées à l'aide du kit Qiagen OneStep RT-PCR (Qiagen, Valencia, CA). 25 µL du mélange réactionnel de RT-PCR consistaient en 1 µL d'ARN élué, 14 µL d'eau sans ARNase, 5 µL de tampon RT-PCR (5X), 1 µL de mélange dNTP (10 mM), 1,5 µL de chaque amorce (10 µM) et 1 µL de mélange enzymatique RT-PCR. Le programme de RT-PCR était le suivant: 50 ° C pendant 30 minutes, 95 ° C pendant 15 minutes, 35 cycles à 94 ° C pendant 1 minute, 55 ° C pendant 1 minute et 72 ° C pendant 1 ou 2 minutes avec une température normale de 72 ° C. C extension pour 10min. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2% dans du tampon TAE coloré au bromure d'éthidium et visualisés sous lumière ultraviolette. Les extrémités extrêmes n'étant pas couvertes, les extrémités exactes ont été analysées par 5' et 3'-RACE. Pour amplifier et séquencer la région 5' du génome de YCNV, des ADNc ont été produits avec l'amorce spécifique du virus YamMac31R (tableau complémentaire 1) en utilisant la transcriptase inverse SuperScript III.

....

Résultats

Affectation taxonomique des lectures liées aux virus produites par la technologie de séquençage MinION.

Dans le but de comparer l'utilité potentielle des plateformes de séquençage Illumina et MinION dans un contexte de découverte de virus, nous avons tenté de déterminer le complément des virus présents dans une seule usine d'igname à l'aide d'un dispositif Nanopore MinION. Au total, 2 036 598 lectures ont été générées, dont 41 487 (2%) ont été identifiées comme provenant probablement de virus à l'aide de recherches DIAMOND (tableau 1). Alors que la plupart de ces lectures virales ont été attribuées au YMMV (22 055 lectures, 53,2%) et au YCNV (19 252 lectures, 46,4%), 156 lectures (0,4%, $1,2 \times 10^{-4}$ <DIAMOND e-values < $1,7 \times 10^{-34}$) étaient liés au DBV, 17 aux pestivirus (0,04%, $7,5 \times 10^{-6}$ <valeurs e DIAMOND < $7,4 \times 10^{-15}$), 5 à des virus (0,01%, $3,8 \times 10^{-19}$ <DIAMOND e- valeurs < $3,4 \times 10^{-37}$) et 2 aux begomovirus (0,005%, 8×10^{-4} <valeurs e DIAMOND < $1,2 \times 10^{-10}$). Il est intéressant de noter que le DBV est apparemment le virus le plus répandu chez l'igname⁵⁶ et que des séquences de gémiovirus endogènes (EGV) transcriptionnellement actives ont également été identifiées comme faisant partie intégrante du génome de nombreuses espèces d'ignames⁵⁷. Les deux lectures MinION de begomovirus récupérées dans cette étude partagent 67% et 89% des identités avec des EGV précédemment identifiées chez *D. alata*. Cinq lectures ont été attribuées au genre Bymovirus: un genre soeur du genre Macluravirus de la famille des Potyviridae. Ces lectures peuvent avoir été mal attribuées en raison du taux potentiellement élevé d'erreurs de séquençage de MinION et peuvent en fait être des lectures liées au macluravirus.

Lecture de l'assemblée de novo d'Illumina et de MinION. Au total, 15 365 074 petits ARN, y compris de petits ARN interférents, ont été générés à partir d'échantillons d'eau igname. En accord avec l'analyse des lectures MinION, 56 contigs > 100 nt de long obtenus par assemblage de novo de lectures Illumina ont montré des degrés de similitude significatifs avec les badnavirus, les macluravirus et les potyvirus d'après les recherches de BLASTx (Tableau 2). Globalement, ces contigs étaient plus courts (longueur maximale de 2424 nt) que les lectures MinION. Bien que les contigs partageant des identités avec des virus, des virus et des pestivirus n'aient pas été récupérés à l'aide d'un assemblage de novo de lectures Illumina, 4 contigs liés à des ampélovirus ont été identifiés ($5,0 \times 10^{-5}$ <valeurs BLASTx < $3,0 \times 10^{-14}$).

L'assemblage de novo des lectures MinION a donné deux grands contigs. Les comparaisons de BLASTn entre ces deux contraintes et toutes les séquences de GenBank ont indiqué que les scores de similarité les plus élevés ont été détectés avec YMMV (numéro d'accès KJ125479, pourcentage d'identité de nucléotide le plus élevé = 85%, couverture de la requête = 99%, valeur e = 0). pour le contig # 1 (8791 pb) et YCNV (numéro d'accès MG755240, pourcentage d'identité de nucléotide le plus élevé = 82%, couverture de la requête = 99%, valeur e = 0) pour le contig # 2 (7277 pb).

Caractérisation de la séquence complète du génome du virus de la nécrose chlorotique de l'igname. Une séquence génomique complète de 8263 nt de l'isolat de YCNV du Kerala (numéro d'accès MH341583) a été encore assemblée et annotée, confirmant qu'elle possède une organisation typique du génome du macluravirus (Fig. 1B), comprenant un grand cadre de lecture ouvert (ORF) prédit traduire en une longue polyprotéine de 2628 aa (Fig. 1B). Ce grand ORF unique, qui commence à la position 147 et se termine à la position 8033, a été prédit par analogie avec d'autres macluravirus pour coder neuf produits fonctionnels après clivage, notamment un composant auxiliaire protéinase (HC-Pro), P3 (protéine de fonction inconnue), 7 K (protéine de fonction inconnue), une hélicase putative à inclusion cylindrique (IC), 9 K (protéine de fonction inconnue), une protéine liée au génome (VPg), une protéase à inclusion nucléaire (Nla-Pro), inclusion polymérase (Nlb) et une protéine d'enveloppe (CP) 58,59. Comme les autres génomes de macluravirus annotés connus, ce virus est dépourvu de protéinase P1 et utilisera probablement ses protéinases HC-Pro et Nla pour le clivage de la polyprotéine. Le site d'auto-clivage de HC-Pro entre HC-Pro et P3 correspond probablement au site FVG / V situé aux positions 259 à 262 de la polyprotéine.

Sur la base de l'alignement de la polyprotéine longue de 2628 aa avec le virus de la mosaïque nécrotique chinoise (CYNMV) du virus latent d'artichaut (ArLV) et du virus YCNV isolés du virus YCNV-YJish de China⁶⁰, des sites présumés de la protéinase et du YCNV ont été identifiés avec le dipeptide canonique Q (E) / M (A) avec un résidu L conservé à la position -2 à partir du site de clivage. Ces sites de clivage potentiels étaient situés aux positions 569 (Q / A, clivées entre P3 et 7 K), 630 (Q / M, 7K-CI), 1289 (Q / A, CI-9K), 1369 (E / M, 9K-Nla) et 2340 (E / M, Nlb-CP) de la poly-protéine (Fig. 1B). Deux autres sites de clivage présumés contenant des dipeptides non canoniques, notamment E / I (1551, VPg-Nla) et Q / H (1768, Nla-Nlb) ont également été identifiés. Le clivage de la polyprotéine donne donc des protéines matures des tailles suivantes: HC-Pro (261 aa), P3 (309 aa), 7 K (62 aa), CI (660 aa), 9 K (81 aa), VPg. -Nla (400 aa et 183 pour VPg seul), Nlb (573 aa) et CP (289 aa). Comme identifié dans d'autres macluravirus, un ORF P3N-

PIPO que l'on trouve classiquement chez les membres des Potyviridae. On a identifié des sites de clivage comportant le dipeptide canonique Q (E) / M (A) avec un résidu L conservé à la position -2 du site de clivage. Ces sites de clivage potentiels étaient situés aux positions 569 (Q / A, clivées entre P3 et 7 K), 630 (Q / M, 7K-CI), 1289 (Q / A, CI-9K), 1369 (E / M, 9K-NIa) et 2340 (E / M, NIb-CP) de la polyprotéine (Fig. 1B). Deux autres sites de clivage présumés contenant des dipeptides non canoniques, notamment E / I (1551, VPg-NIa) et Q / H (1768, NIa-NIb) ont également été identifiés. Le clivage de la polyprotéine donne donc des protéines matures des tailles suivantes: HC-Pro (261 aa), P3 (309 aa), 7 K (62 aa), CI (660 aa), 9 K (81 aa), VPg. -NIa (400 aa et 183 pour VPg seul), NIb (573 aa) et CP (289 aa). Comme identifié dans d'autres macluravirus, un ORF P3N-PIPO que l'on trouve classiquement chez les membres de Potyviridae⁶¹ a été identifié dans le ORF P3. La séquence GAAAAAA de glissement de polymérase consensus (nt positions 1358 à 1364) est présente, suivie d'une courte région PIPO de 59 aa, se terminant au niveau d'un codon d'arrêt aux positions 1538 à 1540 du génome.

Un arbre phylogénétique basé sur les séquences du génome entier de macluravirus connus a indiqué que le YCNV isolait des grappes du Kerala avec les autres macluravirus décrits (Fig. 2A), ses parents les plus proches étant l'isolat de YCNV de Chine et deux autres macluravirus isolés de l'igname: CYNMV et yam chlorotic necrotic virus de la mosaïque (YCNMV) 59,62. Le virus partageant l'identité par paire la plus élevée dans l'ensemble du génome avec l'isolat de YCNV au Kerala (81,9%) est l'isolat de YCNV YJish (figure 2B).

....
Évaluation du taux d'erreur total des lectures de MinION liées au virus YCNV. Le taux d'erreur moyen total de séquençage des 19 252 lectures MinION liées au virus YCNV était de 11,25%, incluant les substitutions, les insertions et les suppressions. De plus, le nombre moyen d'insertions par nucléotide par lecture et le nombre moyen de délétions par nucléotide par lecture étaient respectivement de 0,003% et 0,015%. Il convient de noter que l'approche fondée sur l'alignement utilisée pour le calcul du taux d'erreur de séquençage moyen total a révélé que plusieurs lectures de MinION étaient composées de régions non contiguës du génome du virus YCNV, ce qui suggère que les variants viraux défectueux ont été séquencés ou que les variantes de MinION ont été générées. séquences chimériques.

Couverture génomique et profondeur du séquençage du génome des séquences du virus YCNV obtenues à l'aide d'un assemblage de novo ou de la cartographie de lectures Nanopore et Illumina. L'assemblage de novo des lectures MinION a donné un grand contig (contig # 2) couvrant 87,5% du génome complet du virus YCNV et partageant une identité par paire de 99,889% avec la séquence de référence de Sanger de ce génome (Tableau 3). La partie 5 'de la séquence YCNV était absente de ce contig MinION. L'assemblage de novo des lectures Illumina a donné 18 contigs qui ont été enchaînés pour former un seul écran couvrant 88,1% du génome complet du virus YCNV et partageant une identité par paire de 99,739% avec la séquence de Sanger de référence de ce génome (Tableau 3)

Discussion

Bien que l'approche de séquençage MinION se soit récemment révélée être une technologie portable fiable en temps réel qui améliore la recherche et la surveillance des virus humains et animaux^{31,33–37}, cette technologie a jusqu'à présent été rarement utilisée en virologie végétale^{38,39}. Nous avons ici évalué la capacité de cette approche de séquençage à détecter et caractériser les virus infectant une plante d'igname. Bien que notre objectif primordial soit de déterminer si MinION devait être utilisé en virologie végétale pour améliorer la recherche et le suivi des virus viraux, nous avons contesté la technologie MinION avec la technologie de séquençage Illumina bien établie et comparé les résultats obtenus avec ces deux technologies. approches de séquençage.

Trois virus ont été détectés, notamment un badnavirus, un macluravirus et un potyvirus. D'autres séquences virales n'ont été révélées que par l'une ou l'autre des deux approches de séquençage, y compris les séquences apparentées aux pestivirus et aux begomovirus révélées par les séquences MinION et les séquences apparentées à l'ampélovirus révélées par Illumina. À ce jour, le genre Pestivirus ne contient aucune espèce de virus de la plante. Il est donc plausible que l'apparition de lectures liées au pestivirus soit une conséquence de la contamination par du matériel génétique provenant d'un virus animal. Deux lectures de MinION liées à des virus à begomovirus peuvent indiquer la présence de séquences géminivirales endogènes transcrites⁵⁷. Ceci est dû au protocole MinION développé dans cette étude: séquences de poly (A) spécifiquement ciblées: qui auraient vraisemblablement été des transcrits d'ARNm polyadénylés dérivés de bactéries ou de champignons associés à des plantes ou à des plantes (Figure 1 supplémentaire). Fait intéressant, il est possible que l'échantillon d'igname analysé ait été infecté

par un nouvel ampélovirus non détecté par l'approche MinION. Spécifiquement, les ampélovirus ont un génome d'ARNsp sens positif dépourvu de tractus 3' poly (A) et n'ont probablement pas été amplifiés à l'aide de la stratégie d'amplification MinION utilisée dans cette étude (Figure 1 supplémentaire) et les transcrits de ce virus non polyadénylé ont été analysés. peut-être bien trop peu pour être détecté par le MinION.

Dans l'ensemble, la présente étude montre que le MinION est un moyen efficace de détecter et de caractériser les génomes viraux d'ARNs sens positifs qui ont des faisceaux 3' poly (A). Cela indique également que l'assemblage de novo des lectures MinION peut produire des séquences génomiques de haute qualité presque complètes pour des espèces de virus de plantes.

Cependant, l'étude révèle également que les virus de plantes dépourvus de tractus 3' poly (A) (par exemple, les ampélovirus) pourraient potentiellement ne pas être détectés à l'aide du protocole MinION appliqué ici. Ce biais n'aurait probablement pas posé problème si les génomes viraux avaient été amplifiés aléatoirement. Il est intéressant de noter qu'une étude récente a montré que MinION permettait la détection rapide des virus entériques après la ligature d'adaptateurs de séquençage à des génomes viraux pré-amplifiés au hasard⁶³. Spécifiquement, les approches de la métagénomique virale basées sur l'amplification aléatoire d'acides nucléiques associés aux virions (VANA), purifiées à partir de particules ressemblant à des virus, se sont révélées efficaces pour la découverte de nouveaux virus de plantes à ARN et à ADN^{2,64,65}, ce qui ouvre la voie. moyen de séquencer tous les types de virus de plantes en utilisant la technologie MinION. De plus, les bibliothèques MinION 1D2 doivent être utilisées car elles offrent des avantages de précision accrus par rapport à l'approche 1D existante. Cependant, la détection de virus de plantes par MinION sans PCR peut poser problème en raison de la difficulté technique et de la lenteur de la purification de grandes quantités d'ADN / ARN de virus de plantes provenant d'échantillons de tissus végétaux.

Le séquençage de Sanger du macluravirus infectant l'igname a fourni une norme à laquelle nous pourrions comparer le degré de couverture du génome et la précision du séquençage obtenus par les approches MinION et Illumina. Cependant, avant d'utiliser le génome de ce macluravirus comme séquence directrice, nous avons provisoirement

l'a assigné. Le virus partageant l'identité par paire la plus élevée dans l'ensemble du génome avec l'isolat de YCNV au Kerala (81,9%) est l'isolat de YCNV, YCNV-YJish (Fig. 2B). Ce degré de similarité est supérieur aux seuils de démarcation des espèces recommandés pour tous les genres de Potyviridae (identité de séquence inférieure à 76% dans le gène de la protéine d'enveloppe ou dans le génome entier), ce qui suggère que la plante d'igname cette étude est infectée par le virus YCNV. Alors que la couverture génomique des lectures cartographiées d'Illumina était supérieure à celle des lectures MinION cartographiées, les séquences consensuelles du virus YCNV générées par les deux approches partageaient une identité de plus de 99,83% avec la séquence de Sanger de référence du virus YCNV (tableau 3). La combinaison des lectures MinION et Illumina a donné une séquence consensuelle du virus YCNV partageant une identité de 99,93% avec la séquence du virus YCNV déterminée par Sanger (tableau 3). Ce degré de précision se traduit par un maximum de six erreurs sur un génome de 8263 nt. Compte tenu de la variabilité intra-isolat connue des virus à ARN et du fait que des séquences ont été déterminées à partir de différentes parties de plantes collectées à différents moments pour les approches de séquençage de MinION, Illumina et Sanger, ce «taux d'erreur maximal» est remarquablement bas. Les différences éditées correspondent probablement à des différences réelles entre les populations virales séquencées et non à des erreurs de séquençage.

Outre cette promesse, l'utilité potentielle de la plate-forme MinION pour générer des lectures de séquençage supérieures à 10 kb pourrait avoir un impact majeur sur les études de métagénomique virale. Les lectures de cette longueur engloberaient les génomes de la plupart des virus à génome à ARN ou ADNsb. Cela corrigerait deux des plus importants biais apparus au cours des études de métagénomique^{11,20}. Premièrement, les lectures longues résoudre les problèmes de chimère de montage qui ontLes tentatives infestées d'utiliser des plateformes de séquençage à lecture courte telles qu'Illumina pour séquencer des génomes directement à partir de populations virales non clonales. Deuxièmement, les plates-formes de séquençage à lecture longue telles que MinION produiront un nombre moins élevé de lectures non attribuées (c'est-à-dire réduiront la quantité de matière noire) en augmentant l'efficacité avec laquelle les lectures peuvent être assemblées en contigs. Alors que la taille de ces contigs sera plus grande, la probabilité que des gènes très variables (tels que les gènes suppresseurs de silence ou codant pour des protéines de mouvement) soit liée de manière précise dans les contigs à des gènes plus conservés (telles que des protéines d'enveloppe, des polymérases ou des gènes associés à la réplication) Sera augmenté.

Cependant, le taux d'erreur par lecture du MinION reste très élevé (la plupart dépassant 10%) et le nombre total de nucléotides séquencés est inférieur à Illumina et aux autres plates-formes de lecture plus courtes. De plus, il reste à déterminer si la plate-forme MinION est capable de différencier les séquences virales exogènes des virus endogènes, entre les différentes composantes des génomes viraux segmentés ou entre les variants viraux. Ces limitations pourraient gêner l'assemblage de novo fiable des lectures de MinION, ce qui pourrait encore conduire à des séquences consensus chimériques combinant des lectures provenant de variants viraux différents. Par conséquent, il existe encore plusieurs domaines dans lesquels des améliorations sont encore nécessaires avant que les séquences générées par cette technologie puissent être utilisées de manière fiable pour des analyses en aval, telles que la recherche de preuves de recombinaison génétique, d'évolution évolutive ou de mutations rompant la résistance. Néanmoins, démontrer avec succès que l'approche MinION peut être utilisée à la fois pour détecter de manière fiable et pour séquencer avec précision des génomes de virus de la plante presque complets est un premier pas important vers l'application de plates-formes de séquençage hautement portables telles que le MinION pour le diagnostic de virus. On a déjà tenté d'identifier des espèces de plantes étroitement apparentées⁶⁶ et de surveiller en temps réel les virus Zika au Brésil de manière mobile⁶⁷. Bien que la surveillance sur le terrain des maladies virales des plantes soit encore une première étape manquante vers l'identification et le contrôle de l'émergence de nouvelles maladies des plantes, l'utilisation généralisée de plates-formes de séquençage hautement portables telles que MinION est susceptible de révolutionner le diagnostic des maladies des plantes et est déjà prête à l'emploi. permettre la mise en place de réseaux fiables d'épidémiosurveillance.

Article Fouilloux

Oligonucléotides Dégénérés Polyvalents Réaction En Chaîne De Transcription Inverse-Polymérase: Un Outil De Détection Polyvalente Et De Caractérisation pour les trichovirus, les capillovirus et les foveavirus

Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Gentit, P., Dulucq, M.-J., Marais, A. et Candresse, T. 2005. Transcription inverse par polymérase en chaîne des oligonucléotides dégénérés polyvalents: une détection polyvalente et outil de caractérisation des trichovirus, des capillovirus et des foveavirus. *Phytopathology* 95: 617-625.

Un test de réaction en chaîne de polymérase (RT-PCR) niché et polyvalent utilisant des amorces dégénérées contenant de l'inosine (oligonucléotides polyvalents dégénérés [PDO]) a été mis au point pour les virus des arbres fruitiers filamenteux appartenant aux genres Trichovirus, Capillovirus et Foveavirus. Le produit de 362 pb a été amplifié à partir d'extraits d'acide nucléique obtenus à partir d'échantillons de feuilles de Prunus et de Malus. Tous les virus ciblés ont été détectés, démontrant la polyvalence du test. La variabilité d'une collection d'isolats du virus de la tache chlorotique de la pomme a été analysée à l'aide de la séquence des ADNc amplifiés par PDO RT-PCR. Cette technique a également été utilisée pour cribler des fruits contenant des fruits à noyau infectés par des agents connus ou par des maladies transmissibles par la greffe de type viral, d'étiologie inconnue. Les résultats obtenus ont en outre validé la large spécificité du test, avec une amplification positive obtenue pour les virus non caractérisés ou partiellement caractérisés associés à des troubles de la cerise et de la pêche. Le séquençage des produits de PCR amplifiés, soit directement, soit après le clonage, a permis l'identification de variants d'agents connus et l'identification provisoire de deux nouveaux agents, un trichovirus et un foveavirus. De plus, les comparaisons de séquences ont montré que la séquence de la région ciblée est informative sur le plan phylogénétique et a une valeur taxonomique prédictive.

Les dernières années ont été marquées par une évolution spectaculaire de la taxinomie des virus de plantes. Cela provient en partie de la disponibilité accrue de séquences génomiques pour des agents bien connus et en partie de la rapidité avec laquelle de nouveaux agents sont découverts et caractérisés. Cette augmentation constante du nombre d'agents viraux connus (48), qui s'ajoute à la nécessité de pouvoir, dans certains cas, détecter des agents inconnus, a accru la complexité du diagnostic viral, en particulier dans les études de certification et d'étiologie. D'autre part, la disponibilité d'une mine d'informations sur les séquences génomiques a conduit au développement généralement simple d'essais de détection ciblés sur des séquences basés sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) pour de nombreux virus (pour une revue, voir la citation dans la littérature). 4) Une stratégie alternative mais un peu moins développée est le développement

d'analyses basées sur la PCR utilisant des amorces ciblant des régions conservées des génomes viraux, permettant ainsi la détection simultanée de plusieurs virus différents dans une seule analyse PCR. Après la démonstration initiale que les amorces dégénérées peuvent amplifier une gamme de potyvirus (29), de nombreux laboratoires ont mené à la mise au point de nombreux tests PCR à large spectre permettant l'amplification de quelques virus, voire de la plupart, voire de la totalité des membres appartenant à un genre, notamment les closterovirus (26), les tymovirus et les marafivirus (41), les mastrevirus (49), les bégomovirus (3,38), les cucumovirus (7), les carmovirus (34), les badnavirus (44), les tobamovirus (42), 10) ou des potyvirus (8,37). Malgré leur utilité potentielle, il existe cependant peu d'exemples de paires d'amorces ou de tests d'amplification basés sur la PCR avec une spécificité dépassant le niveau du genre, une exception notable étant le développement de tests visant à amplifier tous les membres de la famille des Potyviridae, y compris membres des genres Potyvirus, Macluravirus, Ipomovirus, Rymovirus, Tritimovirus et Bymovirus (6,17). Une analyse permettant d'amplifier les membres de la famille des Comoviridae a également été rapportée (31).

La capacité à amplifier des séquences d'ADNc partielles d'un groupe entier de virus de plantes dans un seul test trouve des applications évidentes dans le diagnostic car elle offre des possibilités de réduction des coûts en permettant la détection simultanée de plusieurs agents dans un seul test. Il a également d'importantes applications potentielles dans la caractérisation d'agents viraux inconnus ou peu connus (31,40, 41,46), pour l'analyse de la variabilité moléculaire des agents viraux (49) et pour l'évaluation des relations phylogénétiques de virus, genres ou groupes taxonomiques d'ordre supérieur mal connus (18).

La famille Flexiviridae (1), récemment approuvée, regroupe une série de genres de virus de plantes caractérisés par une ascendance commune évidente dans leurs protéines associées à la réplication et leurs protéines d'enveloppe, ainsi que par leur morphologie de particule allongée et flexueuse. Il comprend les genres Potexvirus, Carlavirus, Alexivirus, Capillovirus, Fovivirus, Trichovirus et Vitivirus, ainsi que le nouveau genre Mandarivirus et plusieurs virus apparentés non attribués à aucun genre, comme le virus de la mosaïque douce de banane, Virus de la moelle d'anneau vert cerise (CGRMV) (52), virus de la moelle rouillée nécrotique du cerisier (CNRMV) (39), virus de la soude citronnée (CLBV) (12), ou virus de la mosaïque associée à la mosaïque (SCSMaV) (45).

Beaucoup de virus impliqués sont encore mal caractérisés et de nouveaux agents appartenant à la famille sont découverts chaque année. Cela tient en partie au fait que, pour plusieurs genres, les hôtes naturels sont souvent des plantes pérennes ligneuses telles que les arbres fruitiers, tandis que les autres hôtes herbacés sont difficiles à trouver et que les particules virales sont très difficiles à obtenir sous forme purifiée. Cela est particulièrement vrai d'un groupe de genres étroitement apparentés, notamment les trichovirus, les capillovirus et les fovévirs, dont la plupart des membres infectent les arbres fruitiers tempérés de la famille des Prunoidae (pêche, abricot, prunier, prunier japonais, abricot japonais et cerisier) la famille Maloidae (pomme, poire et poire japonaise). Parmi les principaux virus d'arbres fruitiers impliqués, on peut citer le virus de la tache chlorotique de la pomme (ACLSV) et le virus de la feuille de vachette (CMLV), membres du genre Trichovirus (22,32), le virus de la gorge à tige de la pomme (ASGV) et le virus de la cerise A CVA), membres du genre Capillovirus (25,51), et du virus de la souche de la pomme (ASPV) et du virus latent de l'abricot (ALV), membres du genre Foveavirus (24, 33, 35).

Le développement d'un test de PCR inverse imbriqué polyvalent (RT) pour la détection des virus tricho-, capillo et fovea pouvant détecter plusieurs autres membres de la famille des Flexiviridae est présenté ici. Un compte rendu préliminaire du développement de cette technique a été publié sous la forme de actes de conférence (11). Outre ses applications potentielles dans le domaine du diagnostic, ce test peut être utilisé, en combinaison avec l'analyse de séquence, pour la caractérisation et l'analyse des affinités phylogénétiques de virus filamenteux connus et inconnus appartenant à ces trois genres de virus de la plante. entités taxonomiques associées.

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Isolats viraux. Les isolats d'ACLSV faisaient partie d'une collection de virus d'arbres fruitiers à noyaux propagés par greffage (greffage sur puce) sur des semis de pêches GF305. Virus de la mosaïque des pêches (PcMV) et CMLV (de D. James, Centre pour la santé des végétaux, Agence canadienne d'inspection des aliments, Sidney, C.-B., Canada), virus de type sharka (PPLV) (20,23) (de A. Hadidi, USDA, Beltsville, MD) et des échantillons d'une collection de maladies d'arbres fruitiers à noyaux tempérées d'étiologie inconnue conservées au centre CTIFL de Lanxade (France) ont été propagés de manière similaire sur des semis de GF305. Toutes les plantes ont été conservées dans des conditions de serre standard. Les échantillons de feuilles de pomme et de tabac infectés par l'ASPV et / ou l'ASGV ont été fournis par J. Kummert (Faculté des sciences

agronomiques de Gembloux, Belgique). En outre, tous les isolats de virus de la cerise (dont certains ont été fournis par M. Rott et W. Jelkmann, BBA, de l'Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, à Dossenheim, en Allemagne) ou de maladies à cerisier d'étiologie inconnue ont été greffés sur sweet cherry cv. Sam dans des conditions de verger à CTIFL Lanxade.

Extractions d'acide nucléique. Les acides nucléiques totaux (TNA) ont été extraits d'échantillons de plantes saines ou infectées en utilisant l'une des deux procédures d'extraction basées sur la capture de silice modifiées à partir de la procédure de Boom et al. (2). La première procédure était généralement utilisée, mais la seconde (M. Rott, communication personnelle) était préférée pour les échantillons de pomme.

Procédure d'extraction 1. Les feuilles (0,5 g) ont été broyées dans 2 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) -Topeen-PVP-Dieca (tampon PBS [NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM et Na₂HPO₄ 8 mM, pH 7,2] additionné de 0,05% de Tween 20, de diéthylthiocarbamate de sodium 20 mM et de 2% de poids moléculaire de polyvinylpyrrolidone (PVP) [PM] 25 000) et l'homogénat a été éliminé par centrifugation pendant 10 minutes à 13 000 × g. Vingt microlitres de dodécylsulfate de sodium à 10% ont été ajoutés à 200 pi de surnageant et transférés dans un nouveau tube, et le mélange a été incubé pendant 15 min à 55 ° C. On a ensuite ajouté 100 microlitres d'acétate de potassium 3 M en mélangeant soigneusement, puis en incubant pendant 5 minutes sur de la glace. Après centrifugation à 13 000 xg pendant 5 min, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et mélangé avec 700 pi de NaI 6 M (préparé dans 1,87% de Na₂SO₃) et 10 pi d'une suspension de poudre de silice autoclavée (Sigma-Aldrich, Saint -Quentin Fallavier, France) dans de l'eau stérile (1 g de poudre de silice par ml, pH ajusté à 2,0). Après incubation à la température ambiante pendant 10 min avec agitation intermittente et Après centrifugation à 5000 xg pendant 1 min, le culot de silice a été lavé deux fois par remise en suspension dans 0,5 ml de solution de lavage (Tris 20 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM, NaCl 100 mM et 50% d'éthanol). Le culot lavé a été séché brièvement et les TNA ont été élués par remise en suspension dans 400 ul d'eau exempte de nucléase et incubées pendant 5 minutes à 50 ° C. La silice a été recueillie par centrifugation à 13 000 xg pendant 2 min et 300 pi de l'échantillon de TNA élué ont été transférés dans un nouveau tube et conservés à -20 ° C jusqu'à utilisation.

Procédure d'extraction 1. Les feuilles (0,5 g) ont été broyées dans 2 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS) -Topeen-PVP-Dieca (tampon PBS [NaCl 137 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM et Na₂HPO₄ 8 mM, pH 7,2] additionné de 0,05% de Tween 20, de diéthylthiocarbamate de sodium 20 mM et de 2% de poids moléculaire de polyvinylpyrrolidone (PVP) [PM] 25 000) et l'homogénat a été éliminé par centrifugation pendant 10 minutes à 13 000 × g. Vingt microlitres de dodécylsulfate de sodium à 10% ont été ajoutés à 200 pi de surnageant et transférés dans un nouveau tube, et le mélange a été incubé pendant 15 min à 55 ° C. On a ensuite ajouté 100 microlitres d'acétate de potassium 3 M en mélangeant soigneusement, puis en incubant pendant 5 minutes sur de la glace. Après centrifugation à 13 000 xg pendant 5 min, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et mélangé avec 700 pi de NaI 6 M (préparé dans 1,87% de Na₂SO₃) et 10 pi d'une suspension de poudre de silice autoclavée (Sigma-Aldrich, Saint -Quentin Fallavier, France) dans de l'eau stérile (1 g de poudre de silice par ml, pH ajusté à 2,0). Après incubation à la température ambiante pendant 10 min avec agitation intermittente et Après centrifugation à 5000 xg pendant 1 min, le culot de silice a été lavé deux fois par remise en suspension dans 0,5 ml de solution de lavage (Tris 20 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM, NaCl 100 mM et 50% d'éthanol). Le culot lavé a été séché brièvement et les TNA ont été élués par remise en suspension dans 400 ul d'eau exempte de nucléase et incubées pendant 5 minutes à 50 ° C. La silice a été recueillie par centrifugation à 13 000 xg pendant 2 min et 300 pi de l'échantillon de TNA élué ont été transférés dans un nouveau tube et conservés à -20 ° C jusqu'à utilisation.

Procédure d'extraction 2 (pour les échantillons de pomme). Cette procédure était similaire à celle décrite précédemment, avec les différences suivantes. Les échantillons de plantes ont été homogénéisés (0,5 g dans 5 ml) dans un tampon de broyage (thiocyanate de guanidine 4 M, acétate de sodium 0,2 M, EDTA 25 mM, acétate de potassium 1 M, PVP MW 40 000 et 1% de β-mercaptoéthanol). Cent microlitres de lauroyl sarkosyl à 10% de N ont été ajoutés à 500 pi d'homogénat clarifié et incubés pendant 10 min à 70 ° C, suivis de 5 min sur de la glace. Après centrifugation à 13 000 xg pendant 10 min, on mélange 300 pi du surnageant avec 300 pi de NaI 6 M, 150 pi d'éthanol à 95% et 25 pi de suspension de poudre de silice autoclavée. Après avoir lavé le culot dans un tampon de lavage à moitié dilué (Tris 10 mM [pH 7,5], EDTA 0,5 mM, NaCl 50 mM et éthanol à 50%), on élue les TNA en remettant en suspension le culot lavé dans 200 pi d'eau sans nucléase. et incubé pendant 5 min à 70 ° C.

Amplification par RT-PCR nichée d'oligonucléotides dégénérés polyvalents (PDO). Chaque test a été conçu comme un test de RT-PCR combiné avec les amorces PDO-F1i, PDO-R3i et PDO-R4i,

à partir desquelles une portion aliquotée a été utilisée dans un second dosage PCR imbriqué utilisant les amorces PDO-F2i et PDO-R1i (Fig. 1). La première RT-PCR a été réalisée avec 4 µl d'extrait de TNA dans un volume final de 40 µl (Tris-HCl 10 mM [pH 8,8], KCl 50 mM, 0,19% de Triton X-100, MgCl 4 4 mM, 200 µM chacun). dNTP et 1 µM d'amorces PDO-F1i, PDO-R3i et PDO-R4i) avec 2 unités de la RTase du virus de la myéloblastose aviaire (AMV) (Amersham Biosciences Europe GmbH, Orsay, France) et 1 unité d'ADN Taq polymérase (Eurobio, Les Ulis, France). Les réactions ont été incubées à 42 ° C pendant 45 minutes et, après une étape de dénaturation de 3 minutes à 95 ° C, 35 cycles d'amplification (30 secondes à 95 ° C, 30 secondes à 42 ° C et 30 secondes à 72 ° C) ont été effectués. Les PCR nichées ont été réalisées en utilisant 4 µl de la première réaction d'amplification dans un volume final de 40 µl (Tris-HCl 10 mM [pH 8,8], KCl 50 mM, Triton X-100 à 0,19%, 4 mM MgCl₂, 200 µM chaque dNTP et 1 µM de chacune des amorces PDO-F2i et PDO-R1i) avec 1 unité de Taq polymérase. Après 3 min à 95 ° C, le schéma de cycle utilisé (30 cycles) était de 30 s à 95 ° C, 30 s à 42 ° C et 30 s à 72 ° C. Le volume de la première étape de RT-PCR transférée dans la seconde PCR imbriquée a parfois été réduit à 1 µl pour réduire le fond d'amplification non spécifique. Le produit de PCR final de 362 pb a été visualisé sous lumière UV après électrophorèse sur des gels d'agarose à 2% colorés au bromure d'éthidium.

Dosage immunosorbant lié à une enzyme et tests de RT-PCR pour la détection spécifique de ACLSV. Pour la détection de ACLSV par dosage immuno-absorbant lié à une enzyme (ELISA), les feuilles de pêche (0,5 g) ont été homogénéisées dans 2 ml de PBS additionné de 0,05% de Tween 20 et 2% de PVP (MW 25 000) et l'homogénat a été clarifié par centrifugation. à 13 000 × g pendant 10 min. Ensuite, le virus a été détecté par un test ELISA standard en sandwich double anticorps (DAS) - basé sur un antisérum polyclonal préparé contre l'isolat de prune P863 de ACLSV (15). La détection par RT-PCR spécifique de ACLSV a été réalisée en utilisant 4 µl d'échantillons TNA obtenus comme décrit précédemment et en utilisant la paire d'amorces A52-A53 et le schéma d'amplification décrit par Candresse et al. (5)

.Clonage et analyse de séquence. Pour la conception des amorces PDO, des séquences génomiques complètes ont été alignées à l'Institut européen de bioinformatique (EBI) (disponible en ligne par EBI) à l'aide de CLUSTALW (43). Les produits RT-PCR AOP ont été soit directement séquencés, soit séquencés après clonage dans pZERO-2 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ou dans des vecteurs Easy pGEM-T (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) lorsque des séquences ambiguës ont été obtenues. un produit de PCR a indiqué qu'il contenait un mélange de différents ADNc amplifiés. Toutes les séquences ont été déposées dans GenBank et les numéros d'accès sont indiqués dans les tableaux 1 et 2. Des alignements multiples et des reconstructions phylogénétiques (jonction entre voisins) ont été effectués sur une partie de 289 nucléotides du fragment PDO, disponible pour tous les isolats / séquences. en utilisant le programme CLUSTALX avec une évaluation bootstrap aléatoire de la validité de branchement (43). Les arbres phylogénétiques ont été visualisés en utilisant TREEVIEW (36). Les diversités moyennes, les distances génétiques, les taux de substitution synonyme / non synonyme et les autres reconstructions phylogénétiques ont été calculés à l'aide de Mega2 (28). Des tests pour évaluer la saturation du signal phylogénétique ont été réalisés avec DAMBE (50).

RÉSULTATS

Amplification PDO des tricho-, capillaires et foveariens d'arbres fruitiers et sensibilité du test PDO. L'alignement CLUSTALW des séquences génomiques de pleine longueur disponibles a été réalisé afin d'identifier de courtes séquences d'homologie dans le domaine codant pour l'ARN polymérase de l'ARN dépendant (RdRp) de virus représentatifs des genres Trichovirus, Capillovirus et Foveavirus, notamment ACLSV, ASPV, ASGV. et CVA. Le CGRMV, autrefois considéré comme un membre provisoire du genre Foveavirus, mais récemment reclassé comme non attribué à un genre de la famille des Flexiviridae, a également été utilisé. Cinq blocs de conservation de séquence substantielle ont été identifiés de cette manière, ce qui correspond aux motifs conservés I, II, V, VI (appelé motif GDD) et VII identifiés par Koonin (27) dans le RdRp de l'ARN à brin positif. virus (Fig. 1A). Les amorces contenant de l'inosine de faible dégénérescence ciblant ces cinq régions ont été conçues selon les critères suivants: (i) l'inosine a été préférée à la dégénérescence pour les sept derniers nucléotides 3' terminaux des amorces, (ii) l'inosine a été préférée aux positions dégénérescence plus de deux fois supérieure, et (iii) lorsque la dégénérescence possible a encore été réduite en tenant compte de la conservation de la séquence nucléotidique entre les divers virus. La séquence de ces amorces est donnée à la figure 1C.

Les premières tentatives d'utilisation de combinaisons de ces amorces dans des tests de RT-PCR standard ont indiqué que, bien que l'on puisse parfois obtenir une amplification des virus cibles, les

résultats étaient souvent incohérents et montraient un manque général de sensibilité (données non présentées). Un test RT-PCR imbriqué a donc été mis en place (test PDO) (Fig. 2), dans lequel une combinaison de trois amorces (PDO-Fli, PDO-R3i et PDO-R4i) a été utilisée pour la RT et le premier tour de amplification et deux amorces internes (PDO-F2i et PDO-R1i) ont été utilisés pour la seconde amplification imbriquée. Tel que présenté à la figure 2A, avec le système d'amplification PDO niché, les cinq virus ciblés ont été détectés de manière efficace et reproductible dans les tissus de feuilles de pêcher, de pommier ou de cerisier, donnant le produit PCR attendu de 362 pb. En utilisant la souche P863 ACLSV propagée dans des semis de pêche GF305 comme système modèle, la sensibilité du test PDO a été comparée à celle d'un test de détection RT-PCR par DAS-ELISA ou spécifique à ACLSV (5) en testant 10- plis en série de l'homogénat clarifié de feuilles (ELISA) ou d'extraits de TNA préparés à partir de ces dilutions (analyses PCR). Toutes les dilutions ont été préparées dans un homogénat de plante en bonne santé. Les trois tests ont donné des résultats similaires, permettant

une détection positive du virus jusqu'à la dilution au 1/100 de l'extrait de tissu infecté (Fig. 2B). Détection d'une large gamme d'isolats ACLSV et analyse de la variabilité ACLSV par RT-PCR imbriquée PDO. L'analyse des quatre séquences génomiques complètes ACLSV disponibles a montré que ce virus présentait une variabilité significative (16). Une collection de 26 isolats de ACLSV représentant différents hôtes d'isolement et différents pays d'origine a donc été analysée en parallèle par RT-PCR imbriquée avec PDO et par l'analyse de RT-PCR spécifique à AC50V A52-A53 (5). Un DAS-ELISA basé sur un antisérum polyclonal contre l'isolat P863 ACLSV a été utilisé comme contrôle. Les tests ELISA et PDO RT-PCR ont détecté les 26 isolats, alors que tous les isolats sauf trois, à savoir Commun A337 (A1), Pollizo-Liria 487 (S4) et P3099 (P5), ont été détectés par la RT-PCR A52-A53. test (données non présentées). Ces résultats indiquent que le test PDO a montré une polyvalence plus grande que le test spécifique à ACLSV précédemment rapporté. Tous les fragments d'ADNc amplifiés par PDO ont été clonés et séquencés. Dans le cas de l'isolat Rouge du Roussillon D08 (A4), le clone d'ADNc obtenu a divergé de manière significative par rapport aux autres séquences ACLSV obtenues (décrites ci-dessous).

cependant, L'analyse de séquence d'un deuxième clone d'ADNc obtenu à partir de la même source ACLSV propagée dans *Chenopodium quinoa* a donné une séquence ACLSV plus typique, indiquant la présence dans l'infection mixte de deux agents divergents dans la source A4 d'origine. L'analyse des séquences des fragments de PDO a révélé un très haut niveau de variabilité, le niveau moyen de divergence entre les isolats (diversité) atteignant 18,9% pour les séquences de nucléotides et 5,8% pour les séquences d'acides aminés. Cette variabilité est concentrée sur la troisième base des codons, seules trois des 96 troisièmes bases du fragment séquencé étant conservées dans l'ensemble de données. Ces trois bases correspondent en fait à des codons non dégénérés (une méthionine et deux tryptophane), de sorte que des mutations à ces positions affectent la protéine codée. Une autre preuve que les mutations observées entre les isolats se concentrent sur la troisième base des codons provient de calculs séparés de la diversité des séquences sur les trois bases, qui donnaient des valeurs de 6.1, 3.3 et 47% pour les première, deuxième et troisième bases. respectivement. La plupart des mutations ne codent pas, comme l'indique la comparaison de la moyenne génétique

distances entre isolats calculées pour les substitutions synonymes et non synonymes. Les distances Ney-Gojobori modifiées sont 0,579 (synonyme) et 0,040 (non synonyme), ce qui indique un excès de plus de 10 fois des mutations non codantes par rapport à celles codantes. Les tests de saturation ont indiqué que le signal phylogénétique n'est pas saturé à la première et à la deuxième base des codons, mais qu'il est saturé à la troisième. Ainsi, l'utilisation de la séquence complète pour les reconstructions physiologiques n'est pas appropriée car, sur la troisième base, il existe un risque élevé que la présence de nucléotides identiques ne reflète pas une ascendance commune, mais plutôt des mutations convergentes (homoplasy). Ceci est illustré dans la figure 3 qui compare les arbres phy- logénétiques obtenus en utilisant la séquence complète (Fig. 3A) ou uniquement les première et deuxième bases des codons, qui, non saturés, fournissent un signal phylo- génétique plus précis ou plus significatif (Fig. 3B). La différence la plus remarquable entre les deux arbres réside dans le fait que lors de l'analyse de la séquence complète, les grappes CMLV au sein de l'arbre ACLSV, bien que le virus CMLV soit clairement un virus distinct (1), tandis que l'arbre reconstruit n'utilisant que les première et deuxième bases, on sépare clairement le CMLV du ACLSV avec une valeur d'amorçage très élevée (des résultats similaires sont obtenus lors de la reconstruction de la phylogénie à l'aide des séquences d'acides aminés codées; données non présentées). Étonnamment, la même situation s'applique à la séquence obtenue à partir de la pêche GF305 pour l'isolat A4. Cela indique qu'en plus de l'isolat ACLSV dont la séquence a été récupérée à partir du matériel A4 propagé dans *C. quinoa* (A4 quinoa) et qui se

regroupe avec les isolats A1 et A2, la source A4 contient un agent significativement différent qui représente probablement membre distinct et nouveau du genre Trichovirus.

Détection et identification des genres Trichovirus, Capillovirus et Foveavirus dans du matériel de Prunus, y compris des troubles ressemblant à un virus de la pêche et de la cerise. Afin de confirmer davantage la capacité de l'analyse PDO RT-PCR d'amplifier largement les virus tricho-, capillaires et fovéariques, des amplifications ont été réalisées sur une gamme de matériaux Prunus infectés par des agents connus ou affectés par des affections analogues à des virus inconnus. Étiologie. Une liste détaillée des matériaux utilisés est donnée dans le tableau 2. Parmi les agents connus se trouvaient des isolats de PcMV et de CMLV (genre Trichovirus), de CVA et d'ASGV (genre Capillovirus), d'ASPV et d'ALV (genre Foveavirus), de CGRMV et de CNRMV (anciens membres du genre Foveavirus actuellement dans la famille Flexiviridae non attribués à un genre). Dans tous les cas, un signal d'amplification positif a été obtenu, confirmant en outre la grande spécificité du test PDO. Dans le cas de l'isolat ALV d'origine (ALV-Bulgarie) (35), une infection mixte a été mise en évidence par le fait que deux séquences très différentes ont été obtenues lors du séquençage du produit d'amplification (tableau 2; décrit ci-dessous). Dans le cas de deux des isolats du CNRMV, le séquençage du produit amplifié cloné a révélé des séquences présentant une grande homologie avec le CVA, indice d'une probable infection mixte du CNRMV et du CVA.

Les échantillons analysés contenaient également des isolats d'agents peu connus tels que PPLV, un virus dont le statut taxonomique est flou, qui serait responsable de réactions sérologiques croisées avec les antisérums du virus de la sharka (PPV) dans du plasma germinatif de Prunus d'origine asiatique (19,20, 23). Les six sources décrites à l'origine de cet agent ont fait l'objet d'une enquête, à savoir Bungo, Ting Ting, Ta Tao Q375-02, Ta Tao Q375-23, Ku Chu'a Hung et Agua (20). Quatre des six sources PPLV testées ont donné un produit d'amplification PDO, seuls Ting Ting et Ku Chu'a Hung n'ayant pas réussi à donner une amplification positive (données non présentées). Les produits d'ADNc de PDO provenant de trois de ces sources ont été clonés et séquencés, fournissant la preuve de la présence d'au moins trois agents distincts dans ces matériaux (décrits ci-dessous).

Enfin, les matériaux de Prunus affectés par deux maladies ressemblant au virus de la cerise et dont l'étiologie est inconnue ont également été évalués à l'aide de la RT-PCR à la PDO. Celles-ci comprenaient un échantillon atteint de la maladie de l'escroc nécrotique cerise (9) et deux échantillons infectés par la maladie de la feuille de lapin nécrotique cerise (9,14). De nouveau, des signaux d'amplification positifs ont été obtenus dans chaque cas (données non présentées).

L'analyse des fragments d'ADNc amplifiés a révélé la présence d'AVC dans deux des échantillons (griffe nécrotique cerise V590 et feuille de motte nécrotique cerise Flaville T6) et la présence de CNRMV dans les deux échantillons de maladie foliaire à feuilles de cerisier nécrotiques (décrit ci-dessous).

La figure 4 montre un arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences d'acides aminés codées par tous les fragments d'ADNc séquences. À titre de comparaison, les séquences de référence présentes dans les banques de données pour les membres pertinents du genre Trichovirus (ACLSV, CMLV), Capillovirus (ASGV), CVA et Foveavirus (ASPV, ALV) ont également été incluses. Comme on peut le voir sur la figure 4, malgré sa courte longueur (96 acides aminés, à l'exception de l'ASGV, qui est de 98 acides aminés en raison d'une insertion dans le cadre de 6 nucléotides), la séquence codée par le fragment d'ADNc de PDO était un bon taxon. prédicteur économique et a fourni des données informatives phylogénétiques. En effet, les trois genres ont été facilement identifiés et ont été soutenus par des valeurs bootstrap élevées. Le fait que l'ASGV et le CVA ne se soient pas regroupés (et donc que le genre Capillovirus est polyphylétique) concorde bien avec les résultats dérivés de l'analyse du génome entier (1). De plus, la figure 4 confirme l'identification des divers agents amplifiés dérivés de l'analyse de séquence. Plusieurs points présentent un intérêt particulier dans ce contexte. Le premier concerne l'identité du second agent trouvé dans une infection mixte dans l'isolat original d'ALV. La séquence correspondante (NT ALV sur la figure 4) est groupée avec une valeur d'amorçage élevée avec la séquence divergente obtenue à partir de l'échantillon ACLSV A4 infecté par plusieurs infections et représente probablement un nouveau membre du genre Trichovirus. Le deuxième point concerne la position de la séquence obtenue à partir de l'échantillon de PcMV qui s'est regroupé (70% de bootstrap) avec la séquence de référence CMLV, confirmant la relation de ces deux agents (21). Le dernier point concerne les agents amplifiés par PDO à partir des trois sources de PPLV à partir desquelles des séquences ont été déterminées. Les trois agents détectés avaient des positions taxonomiques très différentes: la séquence Ta Tao Q375-23 groupée avec les isolats ACLSV (85% bootstrap), la séquence Agua groupée avec PcMV (96% bootstrap) et la séquence Bungo appartenant au genre

Foveavirus. (99% bootstrap), mais semble être distinct de tous les agents précédemment identifiés de ce genre et représente probablement un nouveau membre du genre Foveavirus.

DISCUSSION

Contrairement à d'autres agents pathogènes tels que des champignons ou des bactéries pour lesquels l'existence de régions génomiques hautement conservées a permis le développement d'analyses moléculaires de très grande spécificité, la très grande variabilité des génomes viraux à la fois en termes de structure et de séquence a empêché généralement le développement d'essais de détection à base d'acide nucléique pour détecter les virus supérieurs à l'espèce ou au genre. L'analyse électrophorétique des ARN double brin (47) constitue une exception notable. Elle a le potentiel de détecter essentiellement tous les virus à ARN, mais ses applications pratiques sont néanmoins limitées en raison de son manque de sensibilité. À quelques exceptions près, comme dans le cas des tests de détection spécifiques à Potyviridae (6,17), les tests à base de PCR polyvalents développés jusqu'à présent ne fournissent pas une plage de détection supérieure au niveau du genre. Les résultats présentés ici démontrent la possibilité d'utiliser des amorces hautement dégénérées contenant de l'inosine pour la détection simultanée des membres d'au moins trois genres viraux de la famille des Flexiviridae, le trichovirus, le capillovirus et le foveavirus. Une des conditions préalables à une telle approche est l'identification des régions génomiques conservées qui peuvent être ciblées par les amorces d'amplification. Au niveau des genres et au-dessus, il existe peu de régions de ce type, mais les motifs conservés autour du site actif supposé des protéines associées à la réplication (27) offrent une telle possibilité. En effet, l'utilisation d'amorces ciblant ces motifs pour la mise au point de tests de détection spécifiques au genre a été signalée pour les vitivirus (42), les carmovirus (34), les tymovirus (41) et les marafivirus (41). Même avec de tels motifs hautement conservés, la variabilité de la séquence d'acides aminés et la dégénérescence du code génétique peuvent toujours nécessiter l'utilisation d'oligo-nucléotides hautement dégénérés. Dans les travaux présentés ici, tout permettre, donnerait des oligonucléotides d'une dégénérescence comprise entre 24 576 fois (R3i) et 65 536 fois (F1i). L'introduction de quelques hypothèses restrictives et l'utilisation d'inosines, qui peuvent être couplées à n'importe quel nucléotide, réduisent la dégénérescence des oligonucléotides de 16 à 256 fois (R3i) à 256 fois (F1i). Avec ce niveau de dégénérescence, la sensibilité de la PCR est toujours considérablement réduite, mais ceci peut être compensé par l'utilisation d'une procédure imbriquée qui permet une amplification efficace des virus cibles. Cet effet peut également expliquer pourquoi la sensibilité de la détection de ACLSV à l'aide du test PDO semble se situer dans la même plage que la sensibilité du test RT-PCR A52-A53 direct lorsque les tests PCR imbriqués utilisant des amorces non dégénérées sont généralement rapportés. augmenter significativement la sensibilité par rapport aux dosages PCR directs (30). La sensibilité des tests de PDO devrait cependant s'avérer suffisante pour la plupart des diagnostics ou des caractérisations utilisant du matériel Prunus infecté. Il semble toutefois y avoir une limite potentielle à la sensibilité de la détection dans le cas d'infections mixtes. Par exemple, dans l'isolat A4, ACLSV n'a été détecté qu'après transmission à un autre hôte herbacé, C. quinoa, alors que la détection directe de PDO dans les semis de pêche d'origine GF305 n'a révélé que la présence d'un nouveau trichovirus. Dans d'autres cas d'échantillons connus pour avoir plusieurs infections, la détection par la PDO donnait des résultats variables: dans certains cas, une amplification des deux agents était observée (par exemple, détection conjointe du CGRMV et du CNRMV dans l'échantillon de feuille de motte de cerise P1C124), alors que dans d'autres cas, un seul des agents a été détecté. Cet effet reflète probablement une accumulation différentielle des agents présents et / ou une compétition entre les différents ADNc au cours du processus d'amplification. Etant donné que l'identification des virus amplifiés repose sur le séquençage des produits d'amplification, dans la plupart des cas, un agent représentant moins de 10 à 20% de la masse du matériel amplifié n'aurait probablement pas été détecté lors du séquençage du produit PCR non cloné. Il faut donc être prudent lors de l'interprétation des résultats d'une PDO-PCR lorsqu'un résultat positif est obtenu pour un virus, car d'autres virus pourraient être présents, mais non-détecté. L'utilisation de sondes fluorescentes moléculaires spécifiques au genre ou à l'espèce devrait permettre d'améliorer encore la sensibilité de la PDO et d'identifier simultanément le genre ou l'espèce du virus amplifié.

Malgré ses limites potentielles actuelles, le test PDO a démontré sa polyvalence pour la détection des genres Foveavirus, Capillovirus et Trichovirus. Les efforts pour évaluer la possibilité d'amplifier d'autres membres de la famille des Flexiviridae avec ce test ont donné des résultats mitigés; aucune amplification n'a été obtenue dans le cas de plusieurs vitivirus ou allexivirus, mais des résultats positifs ont été obtenus avec BanMMV (13) et avec un virus apparemment nouveau chez

le bananier (données non publiées). Les comparaisons de séquences des motifs de polymérase ciblés sont en accord avec ces résultats

Malgré ses limites potentielles actuelles, le test PDO a démontré sa polyvalence pour la détection des genres Foveavirus, Capillovirus et Trichovirus. Les efforts pour évaluer la possibilité d'amplifier d'autres membres de la famille des Flexiviridae avec ce test ont donné des résultats mitigés; aucune amplification n'a été obtenue dans le cas de plusieurs vitivirus ou allexivirus, mais des résultats positifs ont été obtenus avec BanMMV (13) et avec un virus apparemment nouveau chez le bananier (données non publiées). Les comparaisons de séquences des motifs de polymérase ciblés sont en accord avec ces résultats et indiquent que deux autres virus non classifiés de la famille sont probablement détectables par PCR-PDO, SCSMaV (45) et CLBV (12). Les mêmes comparaisons indiquent que l'amplification des virus potex est très improbable, mais que l'amplification des caravirus est une forte possibilité qui reste à évaluer.

Dans les études d'étiologie, de caractérisation et de variabilité, la RT-PCR au PDO s'est révélée être un outil utile. Son potentiel de détection d'agents jusque-là inconnus devrait présenter un intérêt particulier. Dans cette étude, un nombre relativement limité d'échantillons affectés par des maladies d'étiologie inconnue ont été évalués et la présence de virus mal connus ou de membres apparemment nouveaux des genres Trichovirus et Foveavirus a été démontrée. Il est trop tôt pour spéculer sur le rôle potentiel de ces agents dans les maladies des plantes à partir desquelles ils ont été isolés, car ils ont souvent été observés lors d'infections mixtes avec d'autres virus.

Cependant, certaines hypothèses peuvent déjà être tirées des données disponibles dans quelques situations. En particulier, la détection systématique du CNRMV dans le matériel de cerise affecté par la maladie des feuilles à mastic nécrotique des cerises suggère clairement un rôle causal pour ce virus, tandis que la détection du nouveau Foveavirus dans une seule (Bungo) des six sources évaluées de PPLV semble régner. la responsabilité de ce nouvel agent dans les réactions croisées sérologiques observées avec les antisérums du VPP (20). Les séquences des produits PCR PDO fournissent les informations nécessaires au développement de tests PCR spécifiques à ces agents. Ces nouveaux tests devraient aider à étudier la prévalence de ces nouveaux virus dans les arbres fruitiers et à mettre au jour les relations précises entre ces virus nouveaux ou mal connus et les diverses maladies étudiées.