

Le virus de la mosaïque de la laitue en Tunisie

Détection et étude par voies biologique
et moléculaire

H. Fakhfakh¹

O. Legall²

T. Candresse²

M. Marrakchi¹

Introduction

Le virus de la mosaïque de la laitue (LMV) est un virus très important du point de vue économique. Il est considéré parmi les virus les plus dommageables sur les cultures de laitue à travers le monde (Dinant et Lot, 1992). Plusieurs familles de plantes, autres que les Asteraceae, à laquelle appartient la laitue : *Lactuca sativa*, sont susceptibles d'être attaquées par le LMV. Parmi ces plantes cultivées on trouve le pois, le pois chiche, l'épinard, la chicorée et le carthame, mais aussi plusieurs autres plantes sauvages dont le pois de senteur sauvage et la plupart des composées adventices (Horvath, 1980). Ces plantes réservoirs peuvent constituer des foyers de contamina-

¹ Laboratoire de Génétique moléculaire, immunologie et biotechnologie, faculté des Sciences de Tunis, Elmanar 2092, Tunisie.

² Laboratoire de Virologie végétale, IBVM, Inra Bordeaux BP 81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France.

tion primaire pour les cultures de laitue situées à proximité. En effet, le LMV est transmis par les pucerons selon le mode non persistant et par les graines de laitue (Tomlinson, 1970 ; Dinant et Lot, 1992). Les symptômes provoqués par ce virus sont du type mosaïque avec éclaircissement des nervures, nécroses généralisées et déformation foliaire ce qui induit, en cas d'épidémie, des pertes économiques importantes. Le LMV peut être sous contrôle dans les régions où des mesures de routine sont réalisées telles que la certification des semences, l'éradication systématique des mauvaises herbes et le traitement des champs réservoirs. Cependant, ce virus continue à ravager les cultures de laitue dans les régions où la sélection sanitaire des semences ainsi que les tests de certification font défaut.

Le LMV est membre du genre *Potyvirus* de la famille des *Potyviridae*. Les particules virales sont flexueuses à symétrie hélicoïdale d'environ 750 x 13 nm (Tomlinson, 1964). L'infection par un Potyvirus s'accompagne de la présence, dans le cytoplasme des cellules infectées, d'inclusions cytoplasmiques caractéristiques, en roue à aube ou « pinwheels » (Edwardson, 1974). Le génome des potyvirus est sous forme d'un ARN simple brin, de polarité positive et d'environ 10 Kb. Cet ARN est polyadénylé à son extrémité 3' (Hari, 1979) et est lié de façon covalente à une protéine virale VPg à son extrémité 5' (Hari, 1981). Il contient un cadre ouvert de lecture unique codant pour une polyprotéine qui subit un clivage autocatalytique par trois protéinases virales P1-Pro, HC-Pro et NIa-Pro en dix protéines (Carrington *et al.*, 1990 ; Riechman *et al.*, 1992). Le génome du LMV est constitué de 10 080 nucléotides sans la queue polyA, et code pour une polyprotéine de 3 255 acides aminés (Revers *et al.*, 1997 b).

Les isolats de LMV montrent une large gamme de variabilité biologique associée à : une variation dans la sévérité des symptômes induits ; la transmission par les graines et la capacité de contourner les trois gènes de résistance décrits chez la laitue (Pink *et al.*, 1992). Quatre groupes ou pathotypes sont actuellement attribués aux isolats de LMV selon leur virulence (Pink *et al.*, 1992 ; Dinant et Lot, 1992 ; Bos *et al.*, 1994 ; Revers *et al.*, 1997 a). Au début, la résistance génétique de la laitue a été associée à deux gènes récessifs *g* (Bannerot *et al.*, 1969) et *mo* (Ryder, 1970) isolés respectivement d'un cultivar Argentin « Gallega de Invierno » (Von der Pahlen et

Crnko, 1965) et d'un cultivar « Egyptian » sauvage (Pink *et al.*, 1992 ; Ryder, 1976). Ces deux gènes, notés *mol*¹ *mol*², confèrent une tolérance (multiplication virale, peu ou pas de symptômes) ou une résistance (ni multiplication, ni symptômes) selon le cultivar de laitue, de la souche virale et des conditions environnementales (Dinant et Lot, 1992). L'étude génétique a montré qu'il s'agissait de deux allèles ou de gènes très liés (Pink *et al.*, 1992). Une troisième source de résistance a été découverte dans le cultivar « Ithaca ». Elle émane de l'expression d'un gène dominant, *Mo2*, qui confère, malheureusement, la résistance à un nombre très limité d'isolats (Pink *et al.*, 1992). Cependant, pour des raisons pratiques, les gènes *mol*¹ et *mol*² sont les seuls utilisés en agriculture pour le contrôle du LMV à travers le monde (Dinant et Lot, 1992). Toutefois, la capacité d'un certain nombre d'isolats de LMV à se multiplier dans les cultivars de laitue portant les gènes *mol*¹ et *mol*² constitue une évolution pour ces virus (Pink *et al.*, 1992). En effet, l'existence d'une pression de sélection est à l'origine de l'apparition d'isolats capables de contourner ces résistances. Ces isolats sont dénommés Most pour « *mo*-breaking, seed-transmitted ». Ils ont provoqué de graves pertes chez la laitue tolérante à partir de lots de graines contaminées (Dinant et Lot, 1992).

La caractérisation moléculaire d'une collection de 10 isolats de LMV qui diffèrent par leur origine géographique et leur pathogénicité a permis de comparer la séquence de trois régions génomiques et d'obtenir trois groupes phylogénétiques. La comparaison de ces données avec les propriétés de contournement des gènes de résistance des isolats montre que la variabilité moléculaire est plutôt corrélée à l'origine géographique des isolats qu'à leur pathogénicité (Revers *et al.*, 1997 a). Le séquençage de la région entière de la protéine capsidique a confirmé le groupement des isolats de LMV en trois groupes phylogénétiques/géographiques à savoir : Europe de l'Ouest/Californie (WE/C), Yemen et Grèce (Revers *et al.*, 1999).

En Tunisie, la production de laitue a enregistré une augmentation très importante durant ces dernières années. Ceci est dû à l'extension des surfaces cultivées en plein champs ou sous abri. Cette production est toutefois sujette à d'énormes pertes, surtout en plein champ, dues essentiellement aux techniques culturales et particulièrement le semi des pépinières réalisé souvent pendant l'hiver sans

prendre de précautions contre les vecteurs de maladies. La gravité des pertes semble aussi être en corrélation avec l'absence de programmes de certification des graines. Suite aux problèmes enregistrés, les principales régions de culture de la laitue ont été prospectées. Dans ce travail, nous rapportons les techniques de diagnostic sérologique, de caractérisation biologique et moléculaire utilisées pour étudier différents isolats de LMV couvrant les différentes régions géographiques de la Tunisie. Les résultats montrent, pour la première fois, la présence en Tunisie des isolats Most. Ils représentent une menace réelle pour la culture de la laitue et annoncent d'importantes baisses de production dans le cas où des mesures de contrôle des semences ne seraient pas prises en considération

Matériel et méthodes

Isolats de LMV

Les isolats de LMV utilisés dans ce travail ont été collectés dans les régions du Nord de la Tunisie : Manouba, Mornag et Cap Bon (Lebna). Le tableau 1 présente la liste des différents isolats ainsi que leur origine. La propagation des isolats étudiés a été réalisée par inoculation mécanique d'un cultivar de laitue susceptible (Trocadéro) obtenu à partir de graines indemnes de toute contamination. La propriété de contourner le gène de résistance *mo1*¹ a été vérifiée par inoculation du cultivar Mantilia, contenant ce gène. L'inoculum est obtenu en broyant une feuille de laitue infectée par le LMV (1/5, p/v) dans une solution de phosphate de sodium (Na_2HPO_4) 0,03 M contenant 0,25 % (p/v) de diéthylthiocarbamate de sodium (Dieca) et du charbon actif. L'extrait obtenu est étalé sur deux à trois feuilles des plantules de laitue (stade 4 à 6 feuilles), préalablement saupoudrées avec un abrasif (carborundum). Pour chaque isolat viral, deux plantules de chaque cultivar sont inoculées et gardées entre 18 et 25 °C dans une serre indemne de vecteurs. Comme référence, deux isolats de LMV ont été utilisés pour l'indexage biologique ainsi que pour l'analyse par RT-PCR-

RFLP. Il s'agit de l'isolat LMV-0, qui ne contourne pas les gènes de résistance et représente le groupe géographique WE/C. Cet isolat a été décrit pour la première fois en France (Dinant et Lot, 1992). L'isolat LMV-Gr5, décrit en Grèce, contourne les gènes de résistance. Il est représentatif du groupe phylogénétique Grec (Kyriakopoulou, 1985). Cet isolat a été gracieusement fourni par le Dr van der Vlugt (IPO, Wageningen, Hollande).

Immuno-empreinte sur membrane

La détection primaire de l'infection par le LMV sur les échantillons ramenés de plein champ a été réalisée par le test d'immuno-empreinte sur membrane (Lin *et al.*, 1990). L'empreinte d'une feuille est réalisée en pressant une section fraîche tout au long de la nervure centrale contre une membrane de nitrocellulose (Protran, Schleicher et Schuell). Après séchage à l'air libre, la membrane est saturée pendant 30 mn à température ambiante dans le tampon de blocage constitué de 0,35 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 et 1 % (p/v) de gélatine. La membrane est par la suite incubée 2 h, à température ambiante, avec des IgG spécifiques du LMV conjugués à la phosphatase alcaline obtenus à partir d'un anticorps polyclonal anti-LMV. L'anticorps dilué au 1/1000 est utilisé dans le tampon RIA composé de 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150 mM NaCl ; 0,1 % (w/v) SDS et 1 % (w/v) de Triton X-100. La dilution de l'anticorps est la même que celle utilisée pour le test Elisa. Après un lavage de 10 mn dans le tampon RIA, la réaction enzymatique est réalisée par l'incubation de la membrane dans le tampon phosphatase alcaline : 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ et 100 mM Tris-HCl pH 9,5 additionné de substrats NBT et BCIP. La coloration de la membrane est arrêtée par lavage à l'eau et par séchage. Les empreintes des tissus végétaux sont évalués par observation à l'œil nu ou sous microscope.

Extraction des acides nucléiques

Les feuilles de laitue sont broyées (1/5, p/v) dans le tampon PBS-Tween composé de 8 g NaCl ; 0,2 g KH₂PO₄ ; 2,9 g Na₂HPO₄ (12H₂O) et de 0,5 ml de Tween 20 par litre de solution contenant

2 % (p/v) de polyvinylpyrrolidone K25 et de 20 mM Dieca. Après centrifugation à 13,000 tpm pendant 10 mn, 200 µl du surnageant sont transférés dans un nouveau microtube et incubés à 55 °C pendant 15 mn en présence de SDS à une concentration finale de 1 % (p/v). Après addition de 100 µl d'acétate de potassium 3 M, le mélange est vigoureusement agité et incubé dans la glace pendant 5 mn. Après centrifugation pendant 5 mn, à 13,000 tpm et à 4 °C, le surnageant est ajusté à 4,2 M de NaI et additionné de 5 µl d'une suspension de particules de silice (Sigma, France). Après agitation douce et incubation à température ambiante pendant 5 mn, le mélange est centrifugé pendant 1 mn à température ambiante et le surnageant est écarté. Le culot est alors lavé deux fois par resuspension dans 500 µl de tampon formé de 20 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 1 mM EDTA ; 100 mM NaCl ; 50 % (v/v) éthanol. Les particules de silice sont ensuite resuspendues dans 400 µl d'eau stérile, chauffées à 55 °C pendant 5 mn. 300 µl de surnageant contenant les acides nucléiques sont récupérés dans un nouveau tube par centrifugation. Ces acides nucléiques sont directement utilisés pour l'amplification par RT-PCR ou bien conservés à -20 °C.

Réactions de transcription inverse-polymérisation en chaîne et séquençage direct

Les oligonucléotides spécifiques du LMV sont : l'oligo sens N1b correspondant aux nucléotides 8894-8915 du génome du LMV (Revers *et al.*, 1997 a, 1999). Sa séquence est la suivante : 5'CCGTACATAGCIGARTGTGCT 3' avec I = Inosine, R = (A or G). Deux oligonucléotides antisens P4 (Revers *et al.*, 1999) et P4Gr ont été utilisés. Ils sont tous les deux complémentaires des nucléotides 9151-9171 du génome du LMV avec une spécificité d'isolat. La séquence de l'amorce P4Gr est : 5'GCGTTGATGTCCTCATCYTT 3' avec Y = (C or T).

Les réactions de transcription inverse et de polymérisation en chaîne (RT-PCR) sont réalisées dans une même étape en utilisant le même tampon et le même tube réactionnel (Revers *et al.* 1997 a). 3 µl d'acides nucléiques totaux sont soumis à une amplification dans un mélange réactionnel de 50 µl formé de : 10 mM Tris-HCl,

pH 8,8 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 50 mM KCl ; 0,3 % (p/v) Triton X100 ; 250 µM de chaque nucléotide ; 1 µM de chaque amorce (N1b/P4 ou bien N1b/P4Gr) ; 2,5 µl de formamide ; 0,25 unités d'AMV transcriptase inverse (Stratagene, France) et 0,5 unités d'ADN *Taq* polymérase (Appligen-Oncor, France). Le mélange est submergé de 50 µl d'huile minérale et les tubes sont incubés pendant 45 mn à 42 °C pour la transcription inverse suivie d'une incubation pendant 5 mn à 95 °C pour la dénaturation des hybrides ARN-ADN ainsi que de la transcriptase inverse. Cette étape est suivie de 40 cycles d'amplification par PCR selon le programme suivant : 20 s à 92 °C, 20 s à 56 °C et 40 s à 72 °C. Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 % dans le tampon TBE, coloré au bromure d'Ethidium et visualisé sous lumière ultraviolette. Le matériel amplifié a été directement séquencé en présence de l'amorce N1b en utilisant un séquenceur automatique (Genome Express, Grenoble, France).

Analyse RFLP

Les produits PCR ont été directement soumis à une analyse par la technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). Une aliquote (2 µl) de chaque amplification par RT-PCR a été soumise à une digestion par chacune des enzymes de restriction suivantes : *AluI*, *AccI*, *BamHI*, *DdeI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *RsaI*, *SacI* et *TaqI* selon les conditions du fournisseur (Gibco-BRL). L'analyse des produits de digestion a été réalisée par électrophorèse sur un gel vertical de polyacrylamide à 12 %. L'ADN est ensuite coloré avec le SYBR Green I (Molecular Probes, USA) et visualisé sous lumière ultraviolette.

Analyse phylogénétique

Après séquençage des produits PCR, les séquences obtenues ont été comparées entre elles et avec les séquences de référence du LMV (Revers *et al.* 1997 a, 1999) disponibles dans la banque de données EMBL. Les alignements multiples de séquence de la région comprise entre les nucléotides 8936 et 9151 de l'isolat LMV-0, ou bien

de la région correspondante pour les autres isolats ont été obtenus en utilisant le programme ClustalX (Thompson *et al.*, 1994). Les relations phylogénétiques ont été déterminées par la méthode de « Neighbour-joining » (Saitou et Nei, 1987).

I Résultats

Détection et indexage biologique

Plusieurs échantillons virosés de laitue ont été prélevés dans les régions de Manouba, Mornag et Lebna. Les symptômes observés varient entre mosaïque, éclaircissement de nervures, jaunisse, déformation du limbe foliaire et nanisme. Plusieurs échantillons asymptomatiques ont été collectés. En effet, les gènes *mo1*¹ et *mo1*² confèrent soit une résistance, soit une tolérance selon l'isolat viral en question (Dinant et Lot, 1992 ; Pink *et al.*, 1992 ; Bos *et al.*, 1994). L'empreinte des différents échantillons a été réalisée sur membrane de nitrocellulose et testée en présence de l'anticorps polyclonal anti-LMV couplé à la phosphatase alcaline. Dans une première expérience, les échantillons asymptomatiques ont été testés. Les résultats montrent l'absence totale de LMV dans ces échantillons représentant 7 combinaisons (cultivar/station) et un total de 174 plantes (tabl. 1). Une deuxième expérience a concerné les échantillons virosés représentés par 19 combinaisons cultivar/station, chaque combinaison étant représentée par un nombre variable d'échantillons, soit un total de 67 plantes. Le LMV a été clairement détecté dans 9 échantillons parmi les 19 stations (tabl. 1). Parmi les échantillons virosés, 6 combinaisons cultivar/station semblent être infectées par un ou plusieurs virus autres que le LMV et aucune donnée supplémentaire n'a pu être attribuée aux symptômes observés. Il est donc clair que le LMV est responsable de la moitié (34/67) des infections notées sur la laitue dans les régions prospectées.

Dans le but d'étudier : les propriétés biologiques des isolats de LMV identifiés, d'évaluer leur degré de sévérité, leur faculté de contourner ou non les gènes de résistance, les neuf isolats ont été

Isolat ^a	Origine	Symptômes ^b	Immuno- empreinte	Type de l'isolat LMV
Tn1B	Manouba	Pas de symptômes (40 plantes)	-	-
Tn2R		Mosaïque	+ (14/16)	WE/C
Tn3R		Mosaïque	+ (2/2)	WE/C
Tn3B		Mosaïque	-	WE/C
Tn4B		Rabougrissement, Mosaïque	+ (1/1)	WE/C-Most
Tn7B		Chlorose	-	-
Tn8F		Rabougrissement, Chlorose	-	-
Tn9R		Mosaïque	+ (3/4)	WE/C
Tn9B		Mosaïque	-	-
Tn10B		Mornag	? (1 plante)	-
Tn10R	Rabougrissement ?		-	-
Tn11B	Pas de symptômes (40 plantes)		-	-
Tn12B	? (5 plantes)		-	-
Tn13B	Mosaïque		+ (5/5)	WE/C-Most
Tn14BR	Pas de symptômes (13 plantes)		-	-
Tn15R	Lebna	Pas de symptômes (7 plantes)	-	-
Tn16R		Pas de symptômes (9 plantes)	-	-
Tn16B		Mosaïque	-	-
Tn17R		Pas de symptômes (19 plantes)	-	-
Tn17R2		Mosaïque	-	-
Tn18I		Pas de symptômes (46 plantes)	-	-
Tn19R		Mosaïque	+ (2/2)	WE/C
Tn19B1		Mosaïque	+ (1/1)	WE/C
Tn19B2		? (1 plante)	-	-
Tn20R		Rabougrissement ?	-	-
Tn21R	Mosaïque	+ (5/10)	WE/C	
Tn21.4R	Mosaïque	+ (1/1)	WE/C	
Total plantes	Sans symptômes	174 plantes	0/174	
Total plantes	Avec symptômes	67 plantes	34/67	

^a Une plante représentative d'une combinaison cultivar/station est choisie pour constituer un isolat local. Lorsqu'un résultat positif et négatif est obtenu, la plante est choisie parmi les positifs.

^b Symptômes observés en plein champ.

Tableau 1

Origine, symptômes observés en plein champ et détection du LMV sur les échantillons étudiés par la technique de l'immuno-empreinte sur membrane. (+ : présence de LMV ; - absence de LMV). Le type accordé à chaque isolat est le résultat de l'indexage biologique sur différents hôtes.

mécaniquement inoculés aussi bien au cultivar de laitue Trocadéro qu'au cultivar résistant Mantilia portant le gène *mo1¹*. Deux semaines après inoculation, tous les isolats provoquent des éclaircissements de nervures ainsi que des mosaïques sur le cultivar Trocadéro. En revanche, seuls les isolats Tn4B and Tn13B sont capables d'induire des symptômes sur le cultivar Mantilia, témoignant de leur capacité à surmonter le gène *mo1¹*.

Étude par RT-PCR-RFLP

Les acides nucléiques totaux extraits en utilisant la technique de capture sur particules de silice à partir de neuf isolats infectés par le LMV, ont été utilisés, en une seule étape, pour l'amplification par RT-PCR, d'une région génomique du LMV délimitée par deux amorces spécifiques. Les oligonucléotides utilisés sont capables de s'hybrider avec tous les isolats connus de LMV et d'assurer l'amplification de la région comprise entre la fin de l'extrémité 3' du gène de la polymérase (NIb) et le début de l'extrémité 5' du gène de la protéine capsidale (Revers *et al.*, 1999). L'intérêt de cette région réside dans sa grande variabilité surtout dans la région N-terminale de la protéine capsidale, ce qui permet la discrimination entre différents isolats de LMV (Shukla *et al.*, 1994 ; Revers *et al.*, 1997 a). L'utilisation de l'amorce NIb en combinaison soit avec l'amorce P4 soit avec l'amorce P4Gr, a permis l'amplification d'un fragment de taille 278 pb pour les neuf isolats tunisiens de LMV (fig. 1). Les témoins positifs utilisés sont représentés par les fragments homologues amplifiés à partir des isolats LMV-0 et LMV-Gr5 représentant, respectivement, les groupes phylogénétiques WE/C et Grec (Revers *et al.*, 1997 a). Les produits PCR des isolats tunisiens ainsi que ceux des témoins, ont été soumis à une digestion avec chacune des enzymes de restriction suivantes : *AccI*, *AluI*, *BamHI*, *DdeI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *RsaI*, *SacI* et *TaqI*. Cette étude permettrait de classer les isolats tunisiens parmi les trois groupes phylogénétiques connus (Revers *et al.*, 1999). Les résultats obtenus (tabl. 2) montrent clairement que tous les isolats tunisiens appartiennent au groupe phylogénétique WE/C. À l'intérieur de ce groupe, les isolats peuvent être discriminés selon les profils de restriction obtenus avec *AccI*, *AluI*, *BamHI*, *DdeI*, *EcoRI*, *RsaI* et *SacI* (Revers *et al.*, 1999).

L'analyse de ces profils permet de classer les isolats tunisiens en trois sous-groupes. Le premier est formé des isolats Tn2R, Tn3R, Tn9R, Tn19R, Tn19B1 et Tn21R et se caractérise par des profils de restriction identiques à ceux de l'isolat LMV-0, membre type du groupe WE/C transmis par la graine mais ne contournant pas les gènes de résistance (Pink *et al.*, 1992 ; Revers *et al.*, 1997 a, 1999). Le deuxième est formé de l'isolat Tn21.4R, différent de l'isolat LMV-0 par l'absence du site de restriction *BamHI*. Le troisième est

composé des isolats Tn4B et Tn13B et se caractérise par des profils de restriction identiques à ceux des isolats Most : LMV-13 et LMV-Aud, connus par leur pouvoir de contournement des gènes de résistance (Pink *et al.*, 1992 ; Revers *et al.*, 1997 a, 1999).

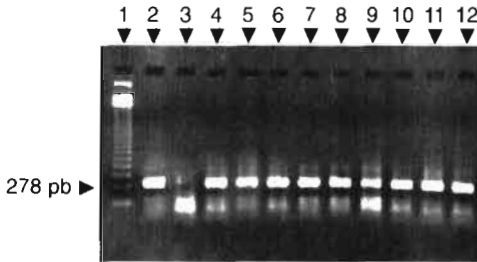


Figure 1

Amplification par RT-PCR de la région comprise entre la fin de la région polymérase et le début de la région capsidique pour les neuf isolats tunisiens de LMV. Les fragments d'ADN sont visualisés, après électrophorèse sur gel d'agarose 1,2 %, par coloration au bromure d'éthidium. Piste 1 : échelle 100 pb (Gibco-BRL).

Piste 2 : produit RT-PCR de l'isolat LMV-0 utilisé comme référence.

Piste 3 : témoin négatif, amplification à partir d'une plante saine.

Les pistes de 4 à 12 correspondent aux amplifiats des isolats tunisiens, respectivement, Tn2R, Tn3R, Tn4B, Tn13B, Tn9R, Tn19R, Tn19B1, Tn21R et Tn21.4R.

Enzymes		AccI		AluI					BamHI	DdeI	EcoRI	HaeIII	RsaI	SacI	TaqI	
Origine	Isolats	8927	9036	8942	8956	8975	9046	9135	9097	9091	9088	9057	8927	8979	8958	8958
Tunisie	Tn2R		+			+	+		+	+		+				
	Tn3R		+			+	+		+	+		+				
	Tn4B					+	+		+		+	+	+	+		
	Tn9R		+			+	+		+	+		+				
	Tn13B					+	+		+		+	+	+	+		
	Tn19R		+			+	+		+	+		+				
	Tn19B1		+			+	+		+	+		+				
	Tn21R		+			+	+		+	+		+				
	Tn21.4R		+			+	+		+	+		+				
Grèce	Gr5	+		+	+		+	+		+					+	+
WE/C *	0		+			+	+		+	+		+				
	13					+	+		+		+	+	+	+		

* Europe de l'Ouest/Californie

Tableau 2

Distribution des sites de restriction tout au long du fragment obtenu par RT-PCR des différents isolats de LMV tunisiens et de références. Les positions des nucléotides sont indiquées par rapport à la séquence complète de l'isolat LMV-0 réalisée par Revers *et al.* (1999). « + » indique présence d'un site de restriction.

Analyse de séquence

À l'exception de l'isolat Tn21R, la séquence des autres isolats tunisiens a été obtenue suite à un séquençage direct en présence de l'oligo N1b. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été alignées, et comparées à celles d'autres isolats de LMV de référence (Revers *et al.*, 1997 a et b, 1999) par le biais du programme ClustalX (Thompson *et al.*, 1994). La région analysée comprend les 33 derniers acides aminés de la protéine N1b et les 39 premiers acides aminés de la protéine de capsid (CP). L'analyse générale de ces séquences (fig. 2) montre, comme attendu, la présence du triplet DAG indispensable pour la transmission des potyvirus par les puceons chez tous les isolats tunisiens. De même, le site de clivage entre les protéines N1b et CP est bien le site Q/V comme décrit pour l'isolat LMV-0 (Dinant *et al.*, 1991). L'arbre phylogénétique obtenu, utilisant l'isolat LMV-Yar pour donner une racine, est en corrélation avec l'analyse par RFLP. En effet, les isolats tunisiens peuvent être classés en deux sous-groupes. Un premier est représenté par les isolats Tn4B et Tn13B dont la séquence est identique à celle des isolats Most (Revers *et al.*, 1997 a). Le second est représenté par le reste des isolats tunisiens, regroupés avec l'isolat LMV-0. Il faut également signaler que le maximum de divergence a été observé entre l'isolat Tn21.4R et l'isolat Tn9R. La divergence de l'isolat Tn21.4R est en corrélation avec les résultats de l'étude par RFLP.

Q/Tn2R	KEASEAELEKYMEAIRSLVNDDEDDDMDEVYHQ//VDAKLDAGQGSKTDDKQKNSADPKDNIITEKGGSGQMK
Tn9R/Tn3R/Tn19B1/Tn19R	-----N-----//-----
Tn21.4R	---T-TA-----//-----S---V-----
Aud/13/Tn4B/Tn13B	-----V-----T-----//-----V-
9	----V-----N--T-----//ES-----D--G-----P--S----- ---V-
E	-----//--T-----N-----S--S--V-----VR
1	-----//--T-----N-----S--S--V---R---V-
Yar	R-----D-----ISD--E-----//--T-----DN-A-N-L--T--S--SAV----- -
GrB/Gr5	R---E-----V--A-I--D--GA-----//--T-----DN-S-S--G--ES--IAT-----S-V-P-
Gr4	R---E-----HA-I--D--GA-----//--T-----DN-G-S--G--ES--ITT-----S-V-P-

■ Figure 2.

Alignement en acides aminés de la région analysée pour les isolats tunisiens ainsi que pour 10 isolats de référence (Revers *et al.*, 1997 a). Le site de clivage entre la protéine polymérase et la protéine de capsid est indiqué par des barres parallèles. Le triplet DAG, indispensable dans la transmission par les aphides, est souligné. Les acides aminés identiques à ceux de l'isolat LMV-0 dans cette région sont indiqués par des tirets.

Discussion

L'émergence d'isolats de LMV hautement pathogènes et capables de contourner les gènes de résistance décrits chez la laitue a suscité un intérêt particulier pour mieux comprendre les interactions moléculaires entre cet agent pathogène et son hôte. Le danger émanant de ces isolats est d'autant plus grand qu'ils sont capables de transmettre la maladie à de nouvelles régions via les lots de graines contaminées. Ainsi, le développement de moyens de diagnostic rapides et l'analyse des relations entre les propriétés biologiques et moléculaires permettraient de mieux contrôler ce virus.

Dans ce travail, nous avons testé, pour la présence du LMV, un nombre important d'échantillons de feuilles de laitue collectés à travers la Tunisie. La technique de détection par immunoempreinte sur membrane est un test rapide, fiable et très économique. Avec cette technique, un très grand nombre d'échantillons peut être testé très rapidement. Ce test sera sans doute un des moyens les plus efficaces pour une étude épidémiologique du LMV. Le seul critère qui conditionne l'efficacité de ce test est l'absence de réactions croisées avec les composants de la plante au cours de la préparation de l'anticorps. Ainsi, l'aspect sanitaire de la culture de la laitue en Tunisie semble être satisfaisant. Aucune infection par le LMV n'a pu être détectée sur 174 échantillons collectés au hasard. De plus, il semble que le LMV soit l'agent pathogène responsable de la moitié des infections de la laitue au cours de la période des prospections (novembre 1999). Il est probable que les gènes *mo1*¹ et *mo1*² que portent les variétés cultivées en Tunisie, assurent un certain degré de résistance contre ce virus. Toutefois, parmi les neuf isolats étudiés, deux, Tn4B et Tn13B, sont capables de surmonter le gène *mo1*¹ du cultivar Mantilia.

Les propriétés moléculaires des isolats tunisiens ont été analysées par deux techniques efficaces : la RT-PCR-RFLP et le séquençage direct. Les résultats montrent que tous les isolats appartiennent au groupe phylogénétique WE/C et qu'à l'intérieur de ce groupe les isolats Tn4B et Tn13B sont du type Most. L'isolat Tn21.4R diverge légèrement des autres isolats. Du moment où la majorité des isolats est du type LMV-0, l'utilisation de variétés portant les gènes *mo1* semble être efficace contre le LMV. En effet, il a été récemment montré que

cette résistance annule le pouvoir de transmission par la graine dans le cas d'infections asymptomatiques. Quant à l'origine des isolats du type Most en Tunisie, elle peut être attribuée à la persistance dans l'environnement de contaminations à travers les mauvaises herbes et aux techniques culturales, mais surtout à la contamination via les lots de graines. La variabilité moléculaire observée entre des isolats collectés dans une même station tels que Tn19B et Tn19R, ou bien Tn21R et Tn21.4R est en faveur de cette deuxième hypothèse.

La présence d'isolats du type Most en Tunisie constitue une menace réelle pour la culture de laitue. La grande homologie de séquence entre ce type d'isolats identifiés dans des régions géographiques différentes indique qu'ils sont propagés à travers des lots de graines. Ainsi, le développement de la production de la laitue en Tunisie est inhérent à la valorisation des programmes de certification des graines.

Remerciements

Ce travail est partiellement financé par le projet de collaboration du Comité franco-tunisien de coopération universitaire (CMCU 99/F0913) impliquant le ministère de l'Enseignement supérieur et le secrétariat d'État à la Recherche scientifique et à la Technologie de la Tunisie, le Centre national de la recherche scientifique de France.

La faculté des Sciences de Bizerte.

Nous remercions également des responsables du ministère de l'Agriculture de la Tunisie d'avoir facilité la collecte des échantillons.

Bibliographie

- Bannerot H, Boulidard L, Marrou J, Duteil M, 1969 — Étude de l'hérédité de la tolérance au virus de la mosaïque de la laitue chez la variété Gallega de Invernio. *Ann phytopathol* 1 : 219-226.
- Bos L, Huijberts N, Cuperus C, 1994 — Further observations on variation of lettuce mosaic virus in relation to lettuce (*Lactuca sativa*), and a discussion of resistance terminology. *Eur J Plant Pathol* 100 : 293-314.
- Carrington JC, Freed DD, Oh CS, 1990 — Expression of potyviral polyproteins in transgenic plants reveals three proteolytic activities required for complete processing. *EMBO J* 9 : 1347-1353.

- Dinant S., Lot H., Albouy J., Kuziak C., Meyer M., Astier-Manifacie RS 1991 — Nucleotide sequence of the 3' terminal region of lettuce mosaic potyvirus RNA shows a Gln/Val dipeptide at the cleavage site between the polymerase and the coat protein. *Archives of Virology* 116 : 235-252.
- Dinant S, Lot H, 1992. — Lettuce mosaic virus: a review. *Plant Pathol* 41 : 528-542.
- Horvath J, 1980 — Viruses of lettuce ; II. Host range of lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Acta Agron Acad Sci Hungaricae* 29 : 33-352
- Edwardson JR, 1974 — Some properties of the potato virus Y-group. Florida Agr Exp Station Monograph Ser 4 : 225p.
- Hari V, Siegel A, Rozek D, Timberlake WE, 1979 — The RNA of tobacco etch virus contains poly (A). *Virology* 92 : 568-571
- Hari V, 1979 — The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 112 : 391-399.
- Hari V, 1981 — The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 178 : 285-288.
- Kyriakopoulou PE, 1985 — A lethal strain of lettuce mosaic virus in Greece. *Phytoparasitica* 13 : 271.
- Lin NS, Hsu HY, Hsu HT, 1990 — Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology* 80 : 824-828.
- Pink DAC, Lot H, Johnson R, 1992 — Novel pathotypes of lettuce mosaic virus-breakdown of a durable resistance? *Euphytica* 63 : 169-174.
- Revers F, Lot H, Souche S, Le Gall O, Candresse T, Dunez J, 1997 a — Biological and Molecular Variability of Lettuce Mosaic Virus Isolates. *Phytopathology* 87 : 397-403.
- Revers F, Yang SJ, Walter J, Souche S, Lot H, Le Gall O, Candresse T, Dunez J, 1997 b — Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Res* 47 : 167-177.
- Revers F, Van der Vlugt RAA, Souche S, Lanneau M, Lot H, Candresse T, Le Gall O, 1999 — Nucleotide sequence of the 3'terminal region of the genome of four Lettuce mosaic virus isolates from Greece and Yemen. *Arch Virol* 144 : 1619-1626
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA, 1992 — Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73 : 1-16.
- Ryder JE, 1970 — Inheritance of resistance to common lettuce mosaic virus. *J Amer Soc Horti Science* 95 : 378-379.
- Ryder JE, 1976 — The nature of resistance to LMV. In : *Proceedings of the Eucarpia Meeting on Leafy Vegetables, Wageningen, the Netherlands* 1976, 110-118
- Saitou N, Nei M, 1987 — The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4 : 406-425.
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA, 1994 — Genome structure, variation and function. In : Shukla DD (ed.). *The Potyviridae*, CAB International, Wallington, UK 74-110 p.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W, 1994 — Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res* 22 : 4673-4680.
- Tomlinson JA, 1964 — Purification and properties of lettuce mosaic virus. *Ann appl Biol* 53 : 95-102.
- Tomlinson JA, 1970 — Lettuce mosaic virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant viruses* #9.
- Von der Pahlen A, Crnko J, 1965 — El virus del mosaico de la lechuga (*Marmor lactucae*) en Mendoza y Buenos Aires. *Rev de Investi Agrop (ser. 5, Patol., Veg.)* 2: 25-31.