

RAPPORT D'ACTIVITE

**MISE AU POINT D'OUTILS IMMUNOLOGIQUES ET
MOLECULAIRES POUR LA DETECTION ET LA
CARACTERISATION DES POTYVIRUS INFECTANT
L'IGNAME**

**CARACTERISATION MOLECULAIRE PRELIMINAIRE
DE L'ISOLAT BFC 56 DU YAM MOSAIC VIRUS**

Mustapha BOUSALEM

Maître assistant à l'Université de Blida

septembre 95

Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (LPRC)

CIRAD-ORSTOM

INTRODUCTION

La culture de l'igname (*Dioscorea spp.*) est répandue dans toutes les régions tropicales. C'est un facteur socioculturel important dans les principales zones de production. La production mondiale est estimée à 28 millions de tonnes par an (FAO, 1993) et environ 95% de cette production revient à l'Afrique de l'Ouest. Une cinquantaine d'espèces sont impliquées; les plus connues sont: *Dioscorea cayenensis-rotundata* d'origine africaines, *D. alata* et *D. esculenta* largement distribuées dans les différentes zones de cultures, *D. bubifera* d'origine asiatico-africaine et *D. trifida* originaire d'Amérique tropicale humide.

L'igname est infectée par des virus dont l'impact sur la production semble considérable du fait de la multiplication végétative de l'espèce. La plupart des virus infectant l'igname appartiennent à la famille des potyvirus; 5 sont actuellement décrits: Yam Mosaic potyvirus, *Dioscorea alata* potyvirus, *Dioscorea trifida* potyvirus, *Dioscorea alata* ring mottle potyvirus, *Dioscorea* greenbanding mosaic potyvirus. La caractérisation de ces différents potyvirus est encore limitée pour la plupart à une caractérisation biologique et la classification en virus ou en souches est aléatoire. Parmi ces potyvirus le yam mosaic potyvirus (YMV) est sans doute le plus étudié.

L'étude du YMV démarrée en 1991 au LPRC (programme CEE-STD2, Amélioration et Valorisation de l'Igname), a été axée sur la variabilité du virus et les aspects épidémiologiques de la maladie au Burkina Faso (GOUDOU-SINHA, 1995). Des isolats semblables au YMV ont été identifiés par symptomatologie et par sérologie. La variabilité de ce/ces potyvirus a été étudiée sur 69 isolats d'origines variées (cutivars, espèce, géographie) en comparant la symptomatologie (*N. benthamiana* L.), la mobilité électrophorétique et les propriétés immunologiques de la protéine capsidiale (anticorps monoclonaux): six groupes ont été ainsi déterminés. L'un des isolat (BFC 56) n'a pu être transmis par pucerons en conditions de laboratoire et n'est pas détecté par l'un des MAB. En outre, dans des Ignames d'une autre région du Burkina Faso présentant les même symptômes, l'YMV n'a pu être détecté par les outils immunologiques disponibles. Ces données confirment la nécessité d'approfondir la connaissance de ces potyvirus.

Par ailleurs, les études menées dans d'autres domaines (sélection variétale, transformation génétique, sanitation, épidémiologie nécessitent la disposition de kits de diagnostic à la fois très sensibles et très précis. Actuellement, seuls demeurent disponibles des Kits immunologiques aux performances limitées.

OBJECTIFS

Ce travail réalisé au Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (LPRC CIRAD-ORSTOM), s'inscrit dans le programme "Valorisation et Amélioration de l'Igname" dirigé par J. DUBERN. La partie moléculaire a été réalisée au laboratoire BIOTROP IGEPAM CIRAD avec la collaboration de R. FRUTOS. Le financement a été assuré pour une durée de six mois par l'ORSTOM dans le cadre d'un accueil chercheur.

Notre première tâche a été d'élaborer avec J. DUBERN un programme de recherche en tenant compte de l'état d'avancement des travaux menés sur le YMV au LPRC. Nous avons privilégié la mise en place d'un projet de recherche large dans lequel s'inscrit notre programme de six mois.

- Mise au point d'un kit de détection immunologique à partir d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine capsidiale de la souche de référence YMV 112, préparés par L. GIVORD (IBMC-CNRS Strasbourg) et évalués par GOUDOU-URBINO au LPRC. Ce travail a été réalisé par K.D. ADJATA (stagiaire Togolais) et A. PINEL (assistante ingénieur au LPRC), j'ai assuré la définition des différents paramètres expérimentaux, le suivi de l'expérimentation et l'analyse des résultats obtenus. Les principaux résultats sont présentés dans ce document.

- Production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine capsidiale de l'isolat BFC 56. Cette étude a été menée essentiellement par G. ADJATA et A. PINEL et s'inscrit dans le stage de DEA de K.D. ADJATA. Les résultats très partiels ne sont pas rapportés ici.

- Mise au point d'outils moléculaires pour la détection par Immunocapture/RT/PCR du YMV et pour la caractérisation moléculaire des potyvirus infectant l'igname. A été affecté pour ce programme pour 2 mois et à temps partiel, A. VAILLANT, technicien C.E.S.

- Etude de la variabilité moléculaire des isolats du YMV, notamment de l'isolat BFC 56.

MISE AU POINT D'OUTILS DE DETECTION IMMUNOLOGIQUES

L'étude réalisée au LPRC par GOUDOU-URBINO (GOUDOU-URBINO, 1995; GOUDOU-URBINO *et al.*, 1995 (a); GOUDOU-URBINO *et al.*, 1995 (b)), a montré les limites de l'utilisation des anticorps polyclonaux dirigés contre l'isolat YMV 112. Le test mis au point ne permet pas en effet la détection des isolats provenant de la Région Centre du Burkina Faso. Cette même étude a montré que l'ensemble des isolats étudiés était détectés par les anticorps monoclonaux 3.5.1. et 11.1.2.. Ceci a permis de développer un test de diagnostic utilisant en (DAS ELISA) le MAb 351 en "coating" et un sérum polyclonal en conjugué.

Malgré de bonnes performances en détection, ce test présente des limites liées à la qualité du sérum polyclonal utilisé. Ce sérum présente des réactions protéines normales importantes rendant nécessaire son épuisement avec des protéines de la plante avant toute utilisation.

Notre premier objectif a donc été la mise au point d'un kit de détection immunologique à partir d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine capsidiale de la souche YMV 112 (souche de référence) préparés par L. GIVORD (IBMC-CNRS Strasbourg) et évalués par GOUDOU-URBINO au LPRC.

Il s'agit de développer un test de diagnostic MAb-MAB ("coating"-conjugué), et de comparer ses performances avec le test MAb-polyclonal actuellement utilisé.

Comparaison des différents monoclonaux en DAS ELISA dans un système MAb-MAB

Les performances des quatre MABs disponibles au laboratoire ont été comparées en DAS-ELISA MAb-MAB. Pour l'ensemble des tests seul le MAb 351 a été utilisé en conjugué en raison de sa polyvalence déjà démontrée. Cette étude intègre en comparaison le test MAb-poly .

Paramètres étudiés:

- Test effectué à partir de feuilles d'igname.
- dilution de l'extrait de plante évaluée: 1/20, 1/50 et 1/100.
- MABs évalués en "coating": 351, 743 et 1112 (dilution 1/2000)
- Conjugué: MAb 351 utilisé à une dilution de 1/2000
- Le test MAb-poly est utilisé dans les conditions suivantes: MAb 351 en "coating" à une dilution de 1/2000 et le polyclonal YMV 112 en conjugué à une dilution de 1/1000 (ces paramètres ont été retenus après une optimisation préalable).

La représentation graphique montre clairement que les MABs 743 et 1112 (fig. 1A, 2A) ne sont pas utilisables en détection. Par contre, le test utilisant en coating et en conjugué le MAb 351 se révèle très compétitif par rapport au test de référence MAb-Poly (fig. 1A, 1B, 2A, 2B).

Fig. 1A: Comparaison des D.O obtenues en DAS-ELISA:

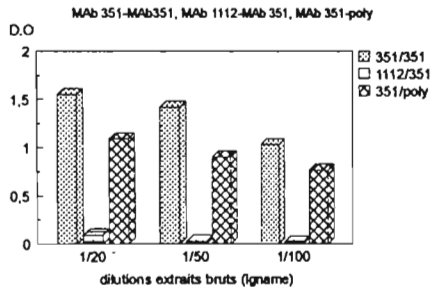


Fig. 1B: Comparaison D.O extrait virosé/D.O extrait sain

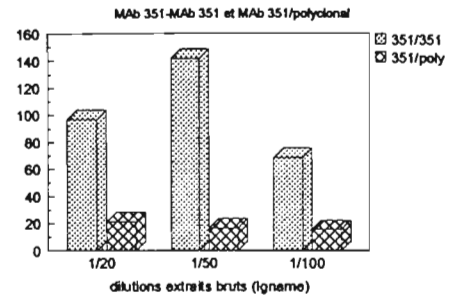


Fig. 2A: Comparaison des D.O obtenues en DAS-ELISA:

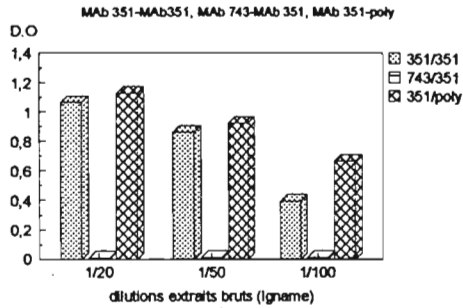


Fig. 2B: Comparaison D.O extrait virosé/D.O extrait sain

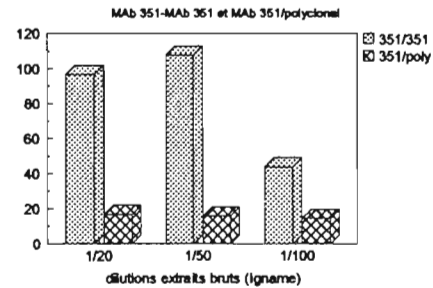


Fig. 3A: Comparaison des D.O obtenues en DAS-ELISA:

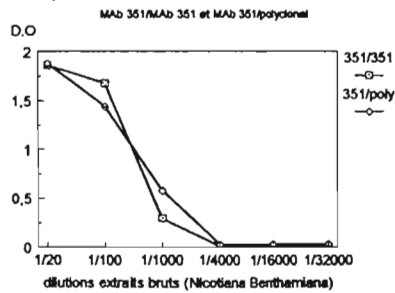


Fig. 3B: Comparaison D.O extrait virosé/ D.O extrait sain

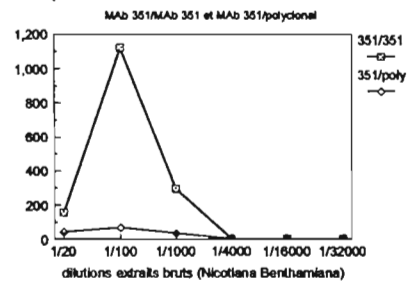


Figure 1A, 1B, 2A, 2B, 3A et 3B: Représentations graphiques des données obtenues en DAS-ELISA MAb-MAb et MAb-Polyclonal.

Comparaison des performances des tests DAS-ELISA MAb 351-Mab 351 et DAS-ELISA MAb 351-polyclonal.

La sensibilité et la spécificité des deux tests sont estimées à partir d'une série de dilutions d'extraits bruts de plantes infectées et saines. Les D.O. obtenues après 1 heure d'incubation sont dans les deux cas suffisamment élevées pour des tests utilisables en routine (D.O. > à 1). Les D.O. obtenues pour le test Mab-poly peuvent être inférieures ou supérieures au test MAb-MAb. Cette non-répétitivité serait due au fait que le polyclonal doit subir avant chaque test un épuisement avec un extrait de plante. Malgré l'épuisement, l'effet "protéine normale" reste important. Le rapport extrait virosé/extrait sain (étudié sur Igname) reste inférieur à 20 dans le meilleur des cas pour le test MAb-polyclonal et varie de 45 à 140 pour le test MAb-MAb (fig. 1B, 2B). A partir d'extrait de tabac, les rapports sont encore plus importants pour le test MAb-MAb (supérieur à 1000) et extrêmement faibles pour le test MAb-Polyclonal.

La sensibilité des deux tests, établie à partir d'une série de dilutions de l'extrait brut (de 1/20 à 1/32000), montre un seuil de détection en D.O. brute voisin pour les deux tests (fig 3A) mais largement supérieur en rapport extrait virosé/extrait sain pour le test Mab-Mab (fig. 3B). Cependant la sensibilité des deux tests doit aussi être évaluée à partir de différentes concentrations de virus purifié.

Pour évaluer la polyvalence du test, 95 isolats provenant d'espèces et de cultivars d'igname différents ont été testés avec les deux procédures. Les échantillons présentant des résultats douteux ont fait l'objet de deux tests supplémentaires avec deux manipulateurs différents. D'une manière générale, les D.O. obtenues avec le test MAb-poly sont supérieures à celles obtenues avec le test MAb_MAb, avec cependant des rapports de D.O. des extraits virosés/extraits sains bien inférieures. Dans l'ensemble, les résultats de la détection sont concordants sauf pour un isolat qui est détecté uniquement par le test MAb_Poly.

Le MAb 351 est dirigé contre un épitope situé sur la partie centrale de la protéine capsidique (L. GIVORD). Cette région étant chez les potyvirus très conservée par rapport à la partie N-terminale, le MAb pourrait ainsi détecter des potyvirus différents du YMV. Une évaluation préliminaire a donc été effectuée sur une collection de 7 potyvirus: SCMV (sugarcane mosaic virus), PRSV (papaya ringspot virus), BBrMV (banana bract mosaic virus), PSTV (peanut stripe virus), WMV (watermelon mosaic virus), PPV (plum pox virus) et un potyvirus identifié sur *Passiflora edulis*. Aucune réaction hétérologue n'a été observée.

MISE AU POINT D'OUTILS MOLECULAIRES ET CARACTERISATION MOLECULAIRE PRELIMINAIRE DE L'ISOLAT BFC 56

STRATEGIE DEVELOPPEE

Les travaux menés précédemment au LPRC ont permis d'identifier un isolat (BFC 56) présentant des propriétés sérologiques et biologiques particulières. Cet isolat récolté dans la Région Centre du Burkina Faso (hors des zones climatiques habituelles de l'igname et sur un cultivar adapté aux conditions climatiques locales, (Ignose du Pilimpikou) diffère par sa non transmissibilité par puceron et par l'absence de réactivité avec le MAb 15.3.3. (GOUDOU-URBINO *et al.*, 1996). Une des hypothèses retenue a été de considérer cet isolat comme un potyvirus distinct du YMV.

L'approche moléculaire fut développée pour essentiellement vérifier cette hypothèse. Cependant, pour ne pas se limiter à une action ponctuelle, nous avons adopté une démarche de recherche hiérarchisée comme suit.

- Intégrer l'analyse moléculaire de l'isolat BFC 56 dans le cadre d'une étude de la variabilité moléculaire des isolats identifiés jusqu'à présent comme étant du YMV. Les conclusions de l'étude menée par GOUDOU-URBINO, (1995) n'ont pas permis de définir plus précisément les isolats de potyvirus infectant l'igname. Un programme moléculaire plus large intégrant des isolats d'origines différentes permettrait une meilleure compréhension de la situation.

- Mettre au point des outils moléculaires permettant de constituer une base non seulement pour l'étude de la variabilité moléculaire mais aussi pour la mise au point de techniques de détection (Immunocapture/RT/PCR) et de caractérisation (analyse par RFLP des fragments amplifiés par PCR).

- Définir une méthodologie d'évaluation de la variabilité moléculaire. En conditions naturelles, les virus se présentent sous forme de populations où prédominent une ou plusieurs souches en plus d'un certain nombre de particules mutées prêtes à constituer une nouvelle population mieux adaptée à son nouvel environnement (OHK1, 1992). Cette variabilité peut revêtir un aspect immunologique, moléculaire, biologique et son évaluation dépend de la sensibilité et de la fiabilité des techniques de caractérisation employées. Pour tenir compte de l'aspect "population virale" et afin de définir une méthode à la fois fiable et rapide, nous avons entrepris de comparer les séquences obtenues par séquençage direct du produit PCR avec celles obtenus par clonage de ce même produit. Cette étude menée sur l'isolat BFC 56 permettra de retenir une méthodologie applicable à l'ensemble de l'étude.

- La caractérisation moléculaire des isolats du YMV impose le choix de régions du génomes ayant un intérêt taxonomique. Les nouvelles approches tiennent compte essentiellement de deux marqueurs moléculaires: la

protéine capsidiale (SHUKLA et WARD, 1989 a, b; WARD et SHUKLA, 1991; RYBICKI et SHUKLA, 1992) et la région 3' non codante (FRENKEL *et al.*, 1992).

Les régions choisies sont amplifiées par PCR, l'ADN est purifié, séquencé directement ou cloné et séquencé.

CHOIX DES ISOLATS

Des isolats représentatifs des différents groupes du YMV mis en évidence par GOUDOU-URBINO *et al.*, (1995) ont été sélectionnés. Ces groupes ont été définis en fonction de la migration électrophorétique et de la variabilité antigénique (tableau 1). Ils proviennent de différentes régions géographiques et de différentes espèces et cultivars d'igname.

Tableau 1: origine des isolats étudiés

ISOLATS	ESPECES	CULTIVARS	GROUPES	PAYS
Cam2	<i>D. cay-rot</i>	Tii	A	Cameroun
TDR 608	<i>D. cay-rot</i>	TDR 608	B	Nigéria
Divin	<i>D. alata</i>	Divin 1	B	Guadeloupe
G13	<i>D. trifida</i>	Cousse Couche Violet	B	Guyane
Trifida	<i>D. trifida</i>	INRA 5-20	B	Guadeloupe
SOA1	<i>D. alata</i>	Florido	D	Burkina Faso
BFC 54	<i>D.cay-rot/D.abys</i>	Pilimpikou	F	Burkina Faso
BFC 56	<i>D.cay-rot/D.abys</i>	Pilimpikou	F	Burkina Faso
YMV 112	<i>D. cay-rot</i>	Nandokaka	D	Côte d'Ivoire

Les isolats sont soit conservés sur l'hôte d'origine soit multipliés sur *Nicotiana benthamiana* L.

MISE AU POINT D'OUTILS MOLECULAIRES

OPTIMISATION DES CONDITIONS DE MISE EN OEUVRE DE L'IMMUNOCAPTURE/RT/PCR

Nous avons opté dès le départ pour l'immunocapture/RT/PCR. Cette technique ne nécessite pas de purification des acides nucléiques et permet dans un seul tube la dégradation de la particule virale, la transcription réverse de l'ARN viral et l'amplification par PCR de l'ADNc (WETZEL *et al.*, 1992). Nous l'avons utilisée en routine dans la détection et la caractérisation des isolats du Plum Pox Virus (BOUSALEM, *et al.*, 1994). Les essais de mise au point sont effectués avec l'isolat BFC 56 et l'isolat de référence YMV 112.

Afin de séquencer l'extrémité 3' du génome du YMV, nous avons utilisé dans un premier temps des amorces dégénérées spécifiques aux potyvirus.

Les amorces définies par COLINET *et al.*, 1993 et PAPPU *et al.*, 1993 ont été testées en premier en association avec une amorce polyT.

- Le couple polyT-P3 (CN48, PAPPU *et al.*, 1993) amplifie une région de 700 pb correspondant à une partie de la CP et à la région 3' non codante.

- Le couple polyT-P2 (pot 2, COLINET *et al.*, 1993) amplifie une région de 1700 pb correspondant à la partie C-terminale de la polymérase NIB, la CP et la région 3' non codante.

- Le couple P1-P2 (pot1, pot 2, COLINET *et al.*, 1993) amplifie une région de 700 pb correspondant à la partie C-terminale de la polymérase NIB et à la partie N-terminale de la CP.

L'optimisation des conditions expérimentales a porté sur plusieurs paramètres :

- "coating" avec du sérum polyclonal ou monoclonal utilisés a différentes dilutions,
- évaluation de l'effet de la concentration en triton (utilisé dans la phase de décapsidation du virus),
- modification des paramètres de la réverse transcription: dNTP, réverse transcriptase, amorces,
- modification des paramètres de l'amplification: dNTP, VENT polymérase, amorces en appliquant différents programmes d'incubation.

Ces essais ont abouti à l'amplification d'un fragment de 700 pb correspondant aux régions centrale et C-terminale de la CP et à la région 3' non codante, bordées par les amorces polyT et P3. Un "coating" avec le MAb à une dilution de 1/1000 à 1/2000 et une augmentation de la quantité du produit de réverse transcriptase (de 5 µl à 20 µl) ont amené une amélioration notable de l'amplification (annexe 1).

Cependant, aucune amplification n'a pu être obtenue avec les amorces P1 et P2, ce qui nous a conduit à mettre au point de nouvelles amorces.

CHOIX DE NOUVELLES AMORCES

Dans un premier temps, nous avons utilisé des amorces dégénérées conçues par LANGEVELD *et al.*, 1991). Ces amorces sont situées dans des régions conservées du génome.

Par la suite, nous avons synthétisé des amorces spécifiques au YMV. Ces amorces ont été conçues à partir de la séquence du génome de l'isolat d'origine, mise à notre disposition par C. FAUQUET (ILTAB). Le logiciel oligo 4 a été utilisé pour raisonner le choix de ces amorces (Tm, % G+C, possibilité d'hybridation entre amorces ou dans d'autres régions du génome); le fait que ces amorces sont destinées à être utilisées comme amorces d'élongation dans le séquençage direct, a été pris en compte.

Par ailleurs l'amorce PolyT a été remplacée par une amorce PolyT ayant en position 3' de l'adénine, de la cytosine ou de la guanine ce qui permet un meilleur amorçage au niveau de la queue polyadénylée tout en maintenant une bonne polyvalence.

Amorces Dégénérées (LANGEVELD *et al.* 1991).

- U100, située approximativement à la même position que l'amorce P3 (CN48, PAPPU *et al.*, 1993).

- P3U, correspond à une modification de l'amorce U335 de LANGEVELD *et al.* 1991.

Amorces spécifiques de YMV

Ces amorces sont conçues le plus souvent dans des régions conservées du génome, ce qui permet une meilleure polyvalence.

P3/2YMV: choisie dans la région correspondant à l'amorce dégénérée P3.

P1/YMV: complémentaire de P3/ YMV

P2/1 YMV: choisi dans la région correspondant à l'amorce P2.

P2/2 YMV: correspondant à la région C-terminale du Nib. Cette amorce permet l'amplification de toute la CP et de la région non-codante avec un amorçage à la fin du gène N1b.

P4/ YMV: correspondant à l'extrémité 3' du génome (région non codante et queue polyadénylée).

La position et les séquences des différentes amorces sont données dans la figures 4 et annexe 2.

RT/PCR A PARTIR D'ARN VIRAL PURIFIE

Etant donné les difficultés rencontrées lors de l'optimisation de l'immunocapture pour les amorces permettant d'amplifier la région comprenant la CP complète et la partie 3' non codante, nous avons opté pour évaluer les nouvelles amorces pour une RT/PCR effectuée à partir d'ARN purifié. Les conditions de la PCR ont été optimisées (annexe 3). La température d'hybridation a été adaptée pour chaque type d'amorce en fonction du Tm correspondant, corrigé pour obtenir la meilleure spécificité possible.

L'ARN est extrait à partir de virus semi-purifié (annexe 4). Deux protocoles de semi-purification du virus ont été évalués: un protocole adapté de la méthode de purification du YMV (GOUDOU-URBINO, 1995) et un protocole mis au point par BEN LOCKHART (BEN LOCKHART et CARUANA, communication personnelle). Ce dernier protocole a été retenu, et a été appliqué à l'ensemble des isolats (annexe 5).

L'état de la matrice (ARN) semble être déterminant pour la réussite de la RT/PCR. Pour chaque isolat, nous avons ainsi effectué plusieurs semi-purifications de virus à partir desquelles l'ARN a été extrait. Les résultats de l'amplification peuvent varier pour un même isolat et un même couple d'amorces. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2: Principaux résultats obtenus en RT/PCR

ISOLATS	PRODUITS PCR		
	700 pb	1187 pb	1700 pb
	AMORCES	AMORCES	AMORCES
BFC56	P3-P4/2 P3U-P4/2 P3/2 YMV-P4/2	P2/2-P4/2 P2/2/P4 YMV	P2/1-P4/2 P2/1-P4/YMV
112	P3-P4/2 P3U-P4/2 P3/2 YMV-P4/2	P2/2-P4/2 P2/2/P4 YMV	P2/1-P4/2 P2/1-P4/YMV
608	P3/2YMV-P4/2 P3U-P4/2	P2/2-P4/2 -	- -
DIVIN	P3/2YMV-P4/2 P3U-P4/2	P2/2-P4/2	-
SOA1	P3U-P4/2	-	-
G13	P3U-P4/2	-	-
BFC54	P3/2YMV-P4/2 P3U-P4/2	P2/2-P4/2	-
CAM2	P3/2YMV-P4/2	-	-
TRIFIDA	-	-	-

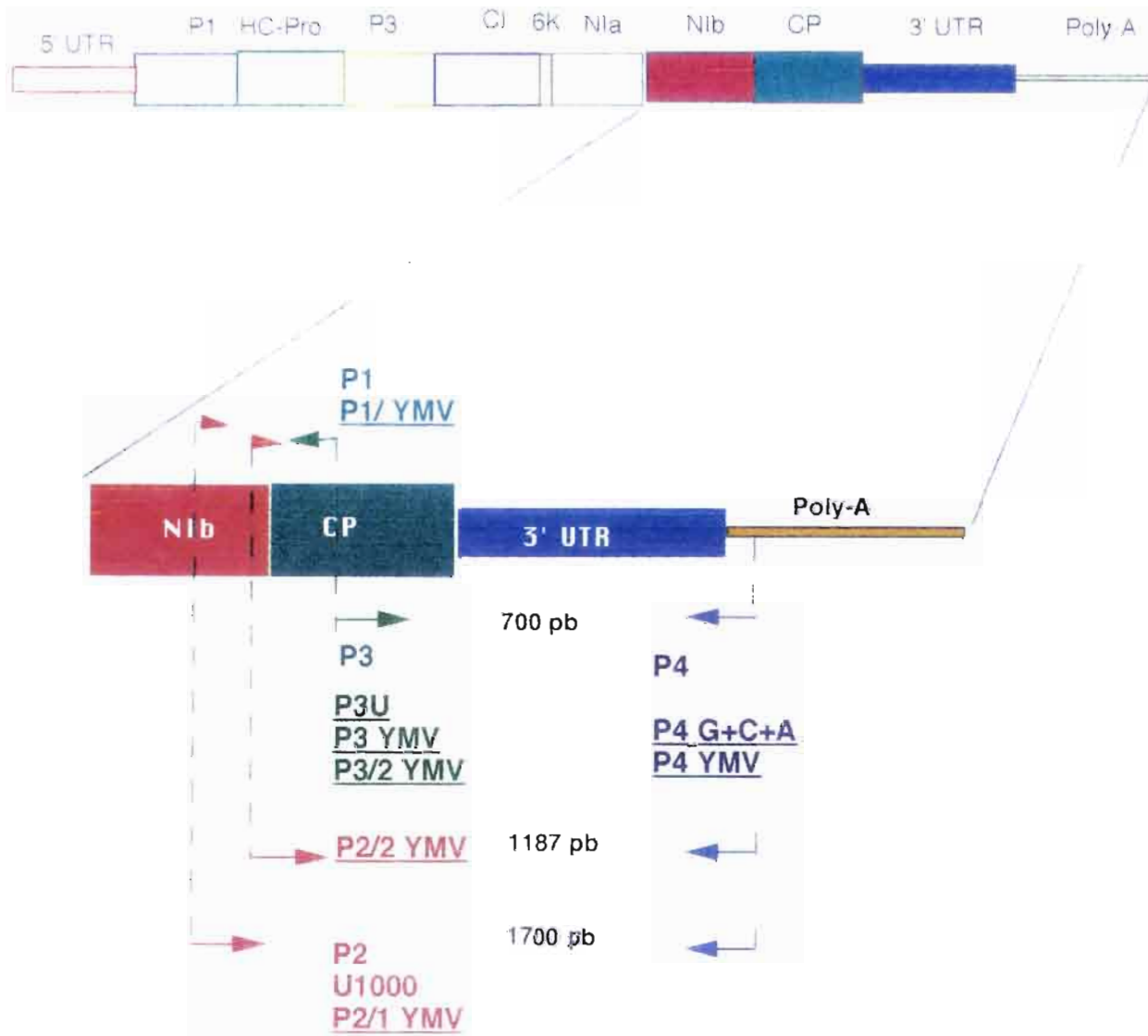


Fig. 4 : Position des amorces oligonucléotidiques sur le génome du YMV

CARACTERISATION MOLECULAIRE PRELIMINAIRE DE L'ISOLAT BFC 56 DU YMV

Séquençage direct des produits de PCR correspondant aux régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale et à la région 3'non-codante.

Les essais de séquençage direct sont effectués sur des produits PCR de 700 pb correspondant aux régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale et à la région 3' non-codante. Le séquençage a été assuré par le laboratoire "OLIGO-EXPRESS". Plusieurs couples d'amorces ont été testés comme amorces d'élongation pour le séquençage, l'objectif étant de faire un séquençage en 5'-3' et en 3'-5' pour un même produit.

Les amorces suivantes ont été testées:

- En 3': P4, P4/2 et P4 YMV
- En 5': P3, et P3 YMV

Le séquençage n'a pu être effectué qu'avec l'amorce P4 YMV ((annexe 6).

Séquençage après clonage des régions centrale et c-terminale de la protéine capsidiale et de la région 3' non-codante.

Le produit PCR de 700 pb correspondant aux régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale et à la région 3'non codante a été purifié par "Gene Clean", et cloné dans le plasmide Bluescript II KS.

Un seul clone a été séquencé dans le sens 5'-3' et 3'-5' (annexe 7).

Comparaison des séquences obtenues après clonage et par séquençage direct

L'alignement des séquences obtenues par séquençage direct et par clonage révèle une homologie en nucléotides de 99,16% (fig. 5). Ces résultats ne sont que préliminaires car la comparaison a été faite sur un clone uniquement.

Comparaison des séquences du génome de l'isolat BFC 56 et de l'isolat de référence YMV 112.

L'alignement de l'ensemble de la séquence du BFC 56 avec la séquence correspondante de l'isolat de référence YMV 112 montre une homologie de 84,1% (fig. 6) Les homologies sont de 86,8% en nucléotides (fig. 7) et 91,39% en acides aminés pour la région de la protéine séquencée (fig. 8) et de 80,1% pour la région non codante (fig.9).

```

GGTGTGGTGCATCGATAATGGACCTCACCCAATTTATCCGGGATGTGGACAATGATGGCCGGTCCGGAGC
      10      20      30      40      50      60      70
BFC56 (A) GGTGTGGTGCATCGATAATGGACCTCACCCAATTTATCCGGGATGTGGACAATGATGGCCGGTCCGGAGC 70
BFC56/P4  GGTGTGGTGCATCGATAATGGACCTCACCCAATTTATCCGGGATGTGGACAATGATGGCCGGTCCGGAGC 70

CCGTGGAATATCCATTGAAGCCGGTCATAGAGAATGCCAAGCCCACATTTTCGTCAAATAATGATGCATTT
      80      90      100     110     120     130     140
BFC56 (A) CCGTGGAATATCCATTGAAGCCGGTCATAGAGAATGCCAAGCCCACATTTTCGTCAAATAATGATGCATTT 140
BFC56/P4  AAGTGGAATATCCATTGAAACCCGGTCATAGAGAATGCCAAGCCCACATTTTCGTCAAATAATGATGCATTT 140

TAGTGACGCAGCTGAAGCGTACATTGAAITGCGGAACCTCGAAAGAACCGTATATGCCCCGATACGGTATT
      150     160     170     180     190     200     210
BFC56 (A) TAGTGACGCAGCTGAAGCGTACATTGAAITGCGGAACCTCGAAAGAACCGTATATGCCCCGATACGGTATT 210
BFC56/P4  TAGTGACGCAGCTGAAGCGTACATTGAAITGCGGAACCTCGAAAGAACCGTATATGCCCCGATACGGTATT 210

CAGCGAAATTTGAGGGATTACTCACTGGCTAGATACGCGTTTTGATTTCTTGGAAATCACTTCTAAAACAC
      220     230     240     250     260     270     280
BFC56 (A) CAGCGAAATTTGAGGGATTACTCACTGGCTAGATACGCGTTTTGATTTCTTGGAAATCACTTCTAAAACAC 280
BFC56/P4  CAGCGAAATTTGAGGGATTACTCACTGGCTAGATACGCGTTTTGATTTCTTGGAAATCACTTCTAAAACAC 280

CAATTCGAGCGCGTGAAGCACACCATCAGATGAAAGCAGCAGCTATTGGGAATAAGGTTTCCAAAATGTT
      290     300     310     320     330     340     350
BFC56 (A) CAATTCGAGCGCGTGAAGCACACCATCAGATGAAAGCAGCAGCTATTGGGAATAAGGTTTCCAAAATGTT 350
BFC56/P4  CAATTCGAGCGCGTGAAGCACACCATCAGATGAAAGCAGCAGCTATTGGGAATAAGGTTTCCAAAATGTT 350

TGGATTTGATGGCAAAGTGGGGTCTCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCTGGTGATGTCGCGAGA
      360     370     380     390     400     410     420
BFC56 (A) TGGATTTGATGGCAAAGTGGGGTCTCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCTGGTGATGTCGCGAGA 420
BFC56/P4  TGGATTTGATGGCAAAGTGGGGTCTCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCTGGTGATGTCGCGAGA 420

GACATGCACAGCCTCTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTAGTTATATATCATATATATATAA ACTC
      430     440     450     460     470     480     490
BFC56 (A) GACATGCACAGCCTCTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTAGTTATATATCATATATATATAA ACTC 490
BFC56/P4  GACATGCACAGCCTCTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTAGTTATATATCATATATATATAA ACTC 490

TGTTACGCCTACCTATAATATGTTGGTTGCAAGCATTCTGTTCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGC
      500     510     520     530     540     550     560
BFC56 (A) TGTTACGCCTACCTATAATATGTTGGTTGCAAGCATTCTGTTCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGC 560
BFC56/P4  TGTTACGCCTACCTATAATATGTTGGTTGCAAGCATTCTGTTCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGC 560

ATTTTGGAGAAGCTTGAGAGTGTCTATGAC
      570     580     590
BFC56 (A) ATTTTGGAGAAGCTTGAGAGTGTCTATGAC 590
BFC56/P4  ATTTTGGAGAAGCTTGAGAGTGTCTATGAC 590

```

Figure 5: Aligement des séquences nucléotidiques des régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale et de la région 3' non-codante du génome du YMV BFC 56 obtenues par séquençage direct du produit PCR et après clonage.

BFC56 (A): séquençage après clonage, BFC/P4: séquençage direct du produit PCR

```

.....
GTGTGGTGCATCGATAATGGCACTTCACCCAATTTATCCGGGATGTGGACAATGATGGCCGGTGGGGAGC
      10      20      30      40      50      60      70
YMV BFC56 GTGTGGTGCATCGATAATGG-ACCTCACCCAATTTATCCGGGATGTGGACAATGATGGCCGGTCCGGGAGC 36
YMV 112    GTGTGGTGCATAGAAAACGGCACTTCACCAATTTATCCGGAATGTGGACAATGATAGACGGCCGGGGAGC 37

.....
CCGTGGAATATCCATTGAAGCCGGTCATAGAGAATGCCAAGCCACATTTTCGTCAGATAATGATGCATTT
      80      90      100     110     120     130     140
YMV BFC56 CCGTGGAATATCCATTGAAGCCGGTCATAGAGAATGCCAAGCCACATTTTCGTCAAAATAATGATGCATTT 106
YMV 112    AAGTGGAATATCCATTAAAGCCGATCATAGAAAATGCCAAACCCACATTTTCGTCAGATAATGATGCATTT 107

.....
TAGTGACGCAGCTGAAGCGTACATTGAATTGCGGAACTCGAAAGAACCGTATATTGCCCCGATACGGTAT
      150     160     170     180     190     200     210
YMV BFC56 TAGTGACGCAGCTGAAGCGTACATTGAATTGCGGAACTCGAAAGAACCGTATAT-GCCCCGATACGGTAT 176
YMV 112    CAGTGACGCAGCTGAAGCGTACATTGAATTGCGGAACTCAAAGAACCGTATATTGCCCCGATACGGTAT 177

.....
TCAGCGCAATTTGAGGGATTACTCACTTGCTAGGTACGCGTTTGATTCTTGGAGATCACTTCTAAAACT
      220     230     240     250     260     270     280
YMV BFC56 TCAGCGAAATTTGAGGGATTACTCACTGGCTAGATACGCGTTTGATTCTTGGAAATCACTTCTAAAACA 245
YMV 112    TCAGCGCAACTTGAGGGATTACTCACTTGCAAGGTACGCATTCGATTCTTAGAGATAACCTCTAAAACT 247

.....
CCAGTTCGAGCGCGTGAAGCACACCATCAGATGAAGGCAGCAGCTATTGGGAATAAGGTTTCCAAAATGT
      290     300     310     320     330     340     350
YMV BFC56 CCAATTCGAGCGCGTGAAGCACACCATCAGATGAAAGCAGCAGCTATTGGGAATAAGGTTTCCAAAATGT 315
YMV 112    CCAGTTCGAGCGCGTGAAGCACACCATCAGATGAAGGCAGCAATTGGAAACAAGGTTAACAAAATGT 317

.....
TTGGATTTGATGGCAAAGTGGGGTTTCCGGAAGAGGATACAGAGAGGCACGCTGCTGGTGATGTCGCGAG
      360     370     380     390     400     410     420
YMV BFC56 TTGGATTTGATGGCAAAGTGGGGTCTCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACGCTGCTGGTGATGTCGCGAG 385
YMV 112    TTGGATTTGATGGCAAAGTGGGCCTCCAGAAGAGGATACAGAAAGGCACGCTGCGGGTGATGTCACAAA 387

.....
AGACATGCACAGCCTCTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTAGTTATATATCATTTATATATATAAATT
      430     440     450     460     470     480     490
YMV BFC56 AGACATGCACAGCCTCTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTAGTTATATATCATATATATATATAACT 455
YMV 112    AGACATGCACAGCCTCTTAGGCATGAGAGGTATGTAGAGTGTTAATTATATATCAGTTATATATATAAATT 457

.....
CTGTTATGCCTACCTATAATATGTTGGTTGCAAGCATTCTGTTTTTGTGAGAGGACGATTCTAATGTTG
      500     510     520     530     540     550     560
YMV BFC56 CTGTTACGCCTACCTATAATATGTTGGTTGCAAGCATTCTGTTCTTGTGAGAAGACGATTCTAATGTTG 525
YMV 112    CTGTTATGCCTACCTATA-TATGTTGGTTGCAACATTCTGTTTGTGAGAGGACATATTCTAAAGTTG 526

.....
CATTTTGGAGGAGCTTGAGAGTGTCTATGACACGGAGGTCTCTTTGATGTGGCGGAGGXX
      570     580     590     600     610     620
YMV BFC56 CATTTTGGAGAAGCTTGAGAGTGTCTATGACACGGAGATCTCTTTGATGTGGCGGAGG 595
YMV 112    CATTTTGGAGGAGCTCAAGAG-GTCTATGACACGGAGGTCTCTTTGAT-TGGCGGAGGAG 595

```

Figure 6: Alignement des séquences nucléotidiques des régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale et de la région 3' non-codante du génome du YMV BFC 56 et du YMV 112.

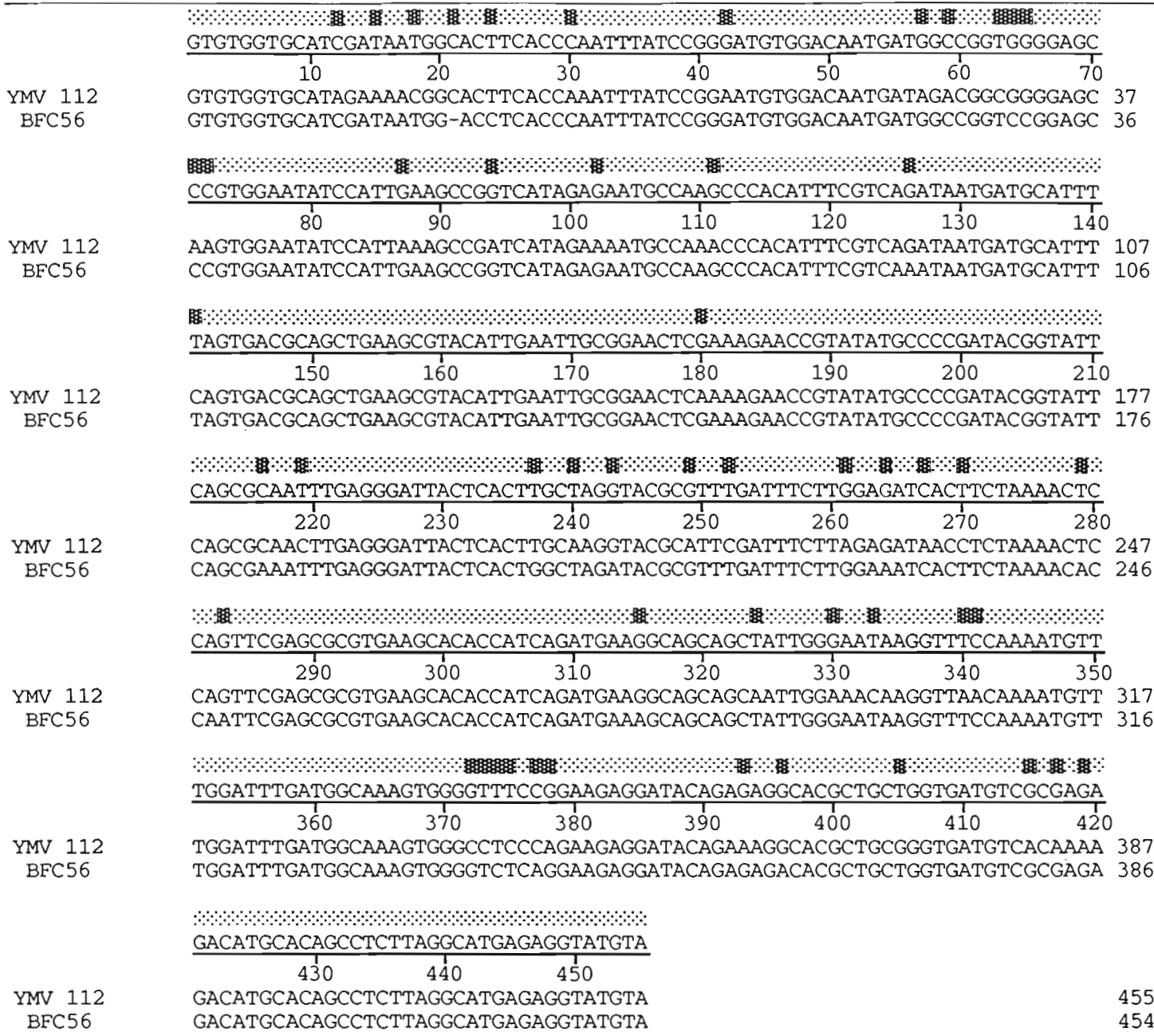


Figure 7: Alignement des séquences nucléotidiques des régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale du génome du YMV BFC 56 et du YMV 112.

VWCIDNXTSPNLSGMWTMIAGGEQVEYPLKPV IENAKPTFRQIMMHFSDAAEAYIELRNSKEPYMPRYGI
 10 20 30 40 50 60 70

YMV 112
BFC56

VWCIENGTSPNLSGMWTMIDGGEQVEYPLKPI IENAKPTFRQIMMHFSDAAEAYIELRNSKEPYMPRYGI 109
 VWCIDNXTSPNLSGMWTMMAGPEPVEYPLKPV IENAKPTFRQIMMHFSDAAEAYIELRNSKEPYMPRYGI 106

QRNLRDYSLARYAFDFLEITSKTPVRAREAHHQM KAAAIGNKVKMFGFDGKVG LQEEDTERHAAGDVAK
 80 90 100 110 120 130 140

YMV 112
BFC56

QRNLRDYSLARYAFDFLEITSKTPVRAREAHHQM KAAAIGNKVNKMFGFDGKVG LPEEDTERHAAGDVTK 319
 QRNLRDYSLARYAFDFLEITSKTPIRAREAHHQM KAAAIGNKVKMFGFDGKVG SQEEDTERHAAGDVAR 316

DMHSL LGMRGM-
 150

YMV 112
BFC56

DMHSL LGMRGM. 454
 DMHSL LGMRGM 454

Figure 8: Alignement des séquences en acides aminés des régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale du génome du YMV BFC 56 et du YMV 112.

```

.....
GAGTGTTAGTTATATATCATTATATATATAAATTCTGTTATGCCTACCTATAATATGTTGGTTGCAAGCA
      10      20      30      40      50      60      70
BFC56      GAGTGTTAGTTATATATCATATATATATATAACTCTGTTACGCCTACCTATAATATGTTGGTTGCAAGCA 37
YMV 112    GAGTGTTAATTATATATCAGTTATATATATAAATTCTGTTATGCCTACCTATA-TATGTTGGTTGCAAACA 37

.....
TTCTGTTTTGTGAGAGGACGTATTCTAATGTTGCATTTTGGAGGAGCTTGAGAGTGTCTATGACACGGA
      80      90      100      110      120      130      140
BFC56      TTCTGTCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGCATTTTGGAGAAGCTTGAGAGTGTCTATGACACGGA 107
YMV 112    TTCTGTGTTTGTGAGAGGACATATTCTAAAGTTGCATTTTGGAGGAGCTCAAGAG-GTCTATGACACGGA 106

.....
GGTCTCTTTGATGTGGCGGAGGXX
      150      160
BFC56      GATCTCTTTGATGTGGCGGAGG 162
YMV 112    GGTCTCTTTGAT-TGGCGGAGGAG 161

```

Figure 9 Alignement des Séquences nucléotidiques de la région 3' non codante du génome du YMV BFC 56 et du YMV 112.

CONCLUSION

Un outil de détection immunologique supplémentaire des isolats de YMV a été mis au point. Le test DAS-ELISA MAb351-MAb351 développé, présente de part ces performances une bonne alternative au test utilisé actuellement. Ce dernier malgré ces performances présente des réaction protéine normale qui limite son utilisation en routine. Le nouveau test est en voie d'être commercialisé sous forme d'un kit de détection par la firme SANOFI.

Au niveau moléculaire, nous avons mis au point des outils permettant le développement rapide de techniques de détection et de caractérisation moléculaire des isolats du YMV. Nous disposons d'ores et déjà d'amorces capables d'amplifier les régions taxonomiquement importantes.

Les méthodes et les outils d'évaluation de la variabilité moléculaire sont mis en place. Du point de vue méthodologique, des résultats préliminaires concernant la comparaison du séquençage directe du produit PCR avec le séquençage après clonage sont déjà acquis. Il reste à séquencer d'autres clones de manière à comparer les séquences de chaque clone et la séquence consensus résultante avec la séquence obtenue après séquençage directe. Si il y a confirmation des résultats obtenus (99,16 % d'homologie), le séquençage direct de produits PCR peut être développé en routine pour l'évaluation de la variabilité. Cet approche permet outre, le caractère de routine d'éviter la sélection de population particulière ou mineure lors du clonage. Ce genre "d'artefact" introduit des erreurs d'appréciation non négligeables.

La caractérisation moléculaire préliminaire de l'isolat BFC 56 amène déjà un élément de réponse concernant l'identité de cet isolat, considéré comme un probable potyvirus distinct du YMV.

Deux approches moléculaires peuvent être développées pour étayer notre analyse: l'approche basée sur les homologies de séquence de la CP (SHUKLA et WARD, 1989) et celle basée sur les homologies de séquence de la partie 3' non codante (FRENKEL *et al.*, 1989; FRENKEL *et al.*, 1992).

1- L'analyse des séquences en acides aminés de la CP de 17 souches appartenant à 8 potyvirus distincts a révélée une distribution bimodale des séquences homologues (SHUKLA et WARD, 1989 a et b). Dans cette analyse, les homologies de séquences en acides aminés entre des membres distincts sont compris entre 38% et 71%, alors qu'entre souches d'un même virus, elles sont comprises entre 90 et 99%.

L'alignement des séquences de la région de la CP de l'isolat BFC 56 que nous avons séquencé avec celle de l'isolat de référence permet de positionner cet isolat dans la distribution bimodale de SHUKLA et WARD (1989 a et b) dans la zone souche (86,8% d'homologie en acides nucléiques et 91,39% en acides aminés). Cette analyse n'est que provisoire car elle doit prendre en compte les données concernant la région N-terminale de CP, région considérée chez les potyvirus comme étant la plus variable. L'étude sérologique menée par GOUDOU-URBINO *et al.*, (1995 b) a montré que l'isolat BFC 56 constitue un sérotype particulier. Cette démonstration a été faite à l'aide d'un anticorps monoclonal (15.3.3.) dirigé contre la région N-terminale de la CP (L. GIVORD,

IBMC-ORSTOM-CNRS, Strasbourg). Chez les potyvirus, c'est justement au niveau de cette région que se situent les épitopes permettant la distinction entre souches et virus. Ces données laissent supposer l'existence d'une variabilité moléculaire plus importante au niveau de cette région. Nous avons mis au point des amorces capables d'amplifier toute la protéine capsidiale et la région 3' non codante. Des "amplifiats" sont déjà disponibles pour cet isolat, il convient de poursuivre le séquençage pour affiner notre analyse.

2- L'analyse des séquences de la région 3' non-codante des potyvirus a suggéré l'utilisation des homologies de cette région pour la différenciation entre virus distincts et souches d'un même virus (FRENKEL *et al.*, 1989; 1992). Ainsi, les souches d'un même virus présentent des homologies de séquences de 83 à 99%, tandis que des virus distincts ne présentent que 39 à 53% d'homologie. La comparaison des séquences 3' non-codantes des isolats YMV112 et BFC 56 montre une homologie de 80,1%, homologie admise pour des souches d'un même virus.

Ces premières données moléculaires permettent de classer l'isolat BFC 56 comme une souche du YMV. Cependant, ces données encore partielles doivent être analysées avec l'ensemble des critères de caractérisation. Cet isolat récolté dans la région centre du Burkina Faso (hors des zones climatiques habituelles de l'igname et sur un cultivar adapté aux conditions climatiques (Igname du Pilimpikou)) diffère par sa non-transmissibilité par puceron (dans les conditions expérimentales de l'essai) et l'absence de réactivité avec le MAb 15.3.3. (GOUDOU-SINHA, 1995). La caractérisation biologique doit être affinée pour confirmer cette non transmissibilité par puceron et déterminer s'il s'agit d'un pathotype particulier lié au cultivar du Pilimpikou. Les données finales pourront être exploitées dans une étude épidémiologique du YMV.

Le manque de données sur d'autres isolats du YMV ne permet pas une bonne appréciation de la variabilité existante. Les outils moléculaires que nous avons développés permettent à très court terme le séquençage des 8 isolats sélectionnés. Nous disposons "d'amplifiats" de 700 pb (2/3 de la CP et région 3' non codante) pour 7 isolats et "d'amplifiats" de 1187 pb (CP complète et région 3' non codante) pour 5 isolats. D'ores et déjà, les réponses hétérogènes obtenues avec les différentes amorces mises au point suggèrent une variabilité plus importante, notamment avec les isolats Cam2 et trifida .

Si cette étude moléculaire aboutit à la mise en évidence de potyvirus distincts du YMV, le programme "igname" doit être relancé, vers la caractérisation de ces virus. Il sera alors impératif de développer à court terme des outils immunologiques et moléculaires spécifiques à chaque potyvirus pour permettre une meilleure connaissance de l'étiologie des maladies à virus de l'igname. La production d'anticorps monoclonaux et la mise au point d'amorces spécifiques utilisables en IC/RT/PCR constitueront les principaux outils de détection et de caractérisation. Dans le cas du YMV, l'alignement des séquences obtenu à partir des isolats reconnus comme appartenant à ce virus permettra de définir des séquences consensus, à partir desquelles seront conçues des amorces ayant une bonne polyvalence. Le typage de souches particulières ou de potyvirus distincts peut se faire soit par une analyse RFLP soit par le choix d'amorces très spécifiques, raisonnées à partir des séquences de la région N-terminale de la CP. Par ailleurs, le développement de sondes non radioactives produit par PCR peut constituer une autre alternative pour la détection et la caractérisation par hybridation moléculaire.

L'approche et les techniques développées représentent une "mise en chantier" importante pour l'étude moléculaire des potyvirus infectant l'igname. La poursuite de ce travail constituera un soutien au projet (FED) sur l'inventaire des ressources génétiques des ignames en Afrique de l'Ouest (S. TOSTAIN, LPGAPT, ORSTOM) et assurera la liaison avec le projet (4^{ème} PCRD) portant sur les viroses de l'igname (J. DUBERN, S. TOSTAIN).

En outre, la "technologie potyvirus" acquise peut être exploitée pour l'étude des potyvirus infectant les cultures tropicales, et peut à court terme être appliquée aux principaux potyvirus étudiés aux LPRC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUSALEM, M., CANDRESSE, T., QUIOT-DOUINE, L., QUIOT, J.B., 1994. Comparison of three methods for assessing plum pox variability: further evidence for the existence of two major groups of isolates. *J. Phytopathology* 142, 163-172.

COLINET, D., KUMMERT, 1993. Identification of sweet potato featherly mottle virus isolate from china (SPFMV-CH) by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of Virological Methods* 45, 149-159.

FRENKEL, M.J., WARD, C.W., SHUKLA, D.D., 1989. The use of 3' non-coding nucleotide sequence in the taxonomy of potyvirus: application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus N. *Journal of General Virology* 70, 2772-2783.

FRENKEL, M.J., JILKA, J.M., SHUKLA, D.D., WARD, C.W., 1992. Differentiation of potyvirus and their strains by hybridization with the 3' non coding region of the viral genome. *Journal of Virological Methods* 36, 51-62.

GOUDOU-URBINO, C., 1995. La mosaïque de l'igname: Aspects épidémiologiques au Burkina Faso et variabilité du virus. Doctorat de l'université de Montpellier II, 147 p.

GOUDOU-URBINO, C., KONATE, G., QUIOT J.B., DUBERN, J., 1995 (a). Etiology and ecology of Yam mosaic disease in Burkina Faso. *Tropical Sciences*, in press.

GOUDOU-URBINO, GIVORD, L., C., QUIOT J.B., BOEGLIN M., KONATE, G., DUBERN, J., 1995 (b). Differentiation of yam mosaic virus isolates, using symptomatology, western blot assay, and monoclonal antibodies. *J. of Phytopathology*, in press.

LANGEVELD, A., DORE, J.M., MEMELINKS, J., DERKS, A.F.L.M., VAN DER VLUGT, C. I.M., ASJES, C.J., BOL, J.F., 1991. Identification potyvirus using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of Genetal Virology* 72, 1531-1541.

OHKI, S.T., 1992. A potyvirus in nature: indistinct populations. In "potyvirus taxonomy" *Arch. Viro.* (Suppl) 5, Ed. BARNETT O.W. Springer, Wien New York, 217-219.

PAPPU, S.S., BRAND, R., PAPPU, H.R., RYBICKI, E.P., GOUGH, K.H., FRENKEL, M.J., NIBLETT, C.L., 1993. A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes: application to dasheen mosaic virus. *Journal of Virological Methods* 41, 9-20.

RYBICKI, E.P., SHUKLA, D.D., 1992. Coat protein phylogeny and systematics of potyvirus. In "potyvirus taxonomy" *Arch. Viro. (Suppl)* 5, Ed. BARNETT O.W. Springer, Wien New York, 139-172.

SHUKLA, D.D., WARD, C.W., 1989 (a). Amino acid sequence homology of coat protein as a basis for identification of potyvirus group. *Jornal of General Virology* 69, 2703-2710.

SHUKLA, D.D., WARD, C.W., 1989 (b). Structure of potyvirus coat protein and its application in the taxonomy and classification of potyvirus group. *Adv. virus res.* , 36, 273-313.

WARD, C.W., SHUKLA, D.D., 1991. Taxonomy of potyvirus: current problems and some solutions. *Intervirolgy* 32, 269-296.

WETZEL, T., CANDRESSE, T., MACQUAIRE, G., RAVELONANDRO, M., DUNEZ, J., 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of virological Methods* 39, 27-37.

ANNEXES

Annexe 1: PROTOCOLE D'IMMUNOCAPTURE RT/PCR-YMV

I- IMMUNOCAPTURE

1- Revêtement

Mab 351 dilué au 1/2000 dans du tampon carbonate:
100 µl/tube

2- Préparation des échantillons

Broyage: 1/6 dans PBS/PVP/ 2% DIECA 20 mM
Centrifugation 12 000 t/mn, 5 mn,
récupération du surnageant

3- Dépôt des échantillons

Centrifugation courte
1 rinçage avec PBS-T 0,05%
Dépôt de 100 µl d'échantillon
Incubation une nuit à 4°C.

II- TRANSCRIPTION REVERSE

1- Dégradation de la particule virale

1 rinçage avec PBS-T 0,05%
Ajouter 7,5 µl/tube de triton X100 à 10% au 1/6
Agitation, incubation 10 mn à 65°C

2- Transcription reverse

Centrifugation courte
Ajouter 12,5 µl de milieu réactionnel (MRT)
Incubation 60 mn à 37°C.
Stopper la réaction: 5 mn à 95°C.
Mettre dans la glace

3- Préparation du "MRT" pour 1 tube

DDT 100 mM (Gibco BRL), 5 mM final	2 µl
RNAse inhibitor 20 U/µl (Böhringer)	0,5 µl
Tampon RT 5X (Gibco BRL)	4 µl
dNTP 2,5 mM chacun à 0,5 mM par dNTP	4 µl
Amorce 3'100 pmol/µl	1 µl
Enzyme M-MLV-RT (Gibco BRL) 200 U/µl	1 µl

III- AMPLIFICATION

1- Préparation du "MRA" pour 100 µl final/tube

Tampon PCR X10	10 µl
dNTP 2,5 mM chacun à 0,5 mM par dNTP	8 µl
Amorce 3'100 pmol/µl	2 µl
Amorce 5' 100 pmol/µl	2 µl
Enzyme Vent DNA pol (Biolabs) 2U/µl	1 µl
Produit réaction RT	20 µl

Mélanger, ajouter 2 gouttes d'huile de parafine

2- Cycles PCR

Dénaturation: 5 mn à 94°C

Dénaturation 30 sec à 94°C

37 cycles Hybridation 2 mn à 40 - 50- 60°C (selon le Tm)

Elongation 2 mn à 72°C

Elongation 15 mn à 72°C

Annexe 2: SEQUENCES DES AMORCES OLIGONUCLEOTIDIQUES

P1- 5'ATT BTC DAT RCA CCA 3'(pot1 COLINET *et al.*, 1993)

P2- 5'TGY GAY GCB GAT GGY TC3' (pot2, COLINET *et al.*, 1993)

P3- 5' TGG THY ATH GAV AAT 3"(CN 48 PAPPU *et al.*, 1993)

P4- 5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT3'

P4 A- 5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT A 3' (BOUSALEM)

P4 C- 5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT C 3' (BOUSALEM)

P4 G- 5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT G 3' (BOUSALEM)

P3U- 5' ATG RTN TGG TGY ATH GAN AAY 3' (U335, LANGEVELD *et al.*, 1991, modifiée par BOUSALEM)

U100- 5' ACI GTI GTI GAY AAY WSI YAT GG 3' (U100 (P2), LANGEVELD *et al.*, 1991)

P3/2YMV- 5'GAT GGT GTG GTG CAT AGA AAA C 3' (P3 spécifique YMV112, variante de P3YMV, BOUSALEM)

P1YMV: 5'GTTTTCTATGCACCACACCATC 3'(P1 spécifique YMV112, complémentaire à P3/2YMV, BOUSALEM)

P2/1YMV: 5'ATGGTCATGCTCGCCATG 3'(région moyenne du Nib, spécifique YMV112, BOUSALEM)

P2/2YMV: 5'GAGCTCTCTACACTAATCAAGC3' (région C-terminale du Nib, spécifique YMV112, BOUSALEM)

P4YMV: 5'TTTTCTCCTCCGCCACATC 3' (spécifique de la région 3' du génome de l'YMV112, BOUSALEM)

Annexe 3: PROTOCOLE: RT/PCR-YMV

I- TRANSCRIPTION REVERSE

1- Transcription reverse

Prélever 7,5 µl d'ARN purifié
Ajouter 12,5 µl de milieu réactionnel (MRT)
Incubation 60 mn à 37°C.
Stopper la réaction: 5 mn à 95°C.
Mettre dans la glace

2- Preparation du "MRT" pour 1 tube

DDT 100 mM (Gibco BRL), 5 mM final	2 µl
RNase inhibitor 20 U/µl (Böhringer)	0,5µl
Tampon RT 5X (Gibco BRL)	4 µl
dNTP 2,5 mM chacun à 0,5 mM par dNTP	4 µl
Amorce 3'100 pmol/µl	1 µl
Enzyme M-MLV-RT (Gibco BRL) 200 U/µl	1 µl

II- AMPLIFICATION

1- Préparation du "MRA" pour 100 µl final/tube

Tampon PCR X10	10 µl
dNTP 2,5 mM chacun à 0,5 mM par dNTP	8 µl
Amorce 3'100 pmol/µl	2 µl
Amorce 5' 100 pmol/µl	2 µl
Enzyme Vent DNA pol (Biolabs) 2U/µl	1 µl
Produit réaction RT	20 µl

Mélanger, ajouter 2 gouttes d'huile de parafine

2- Cycles PCR

Dénaturation: 5 mn à 94°C

Dénaturation 30 sec à 94°C

37 cycles Hybridation 2 mn à 40 - 50- 60°C (selon le Tm)

Elongation 2 mn à 72°C

Elongation 15 mn à 72°C

ANNEXE 4: PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ARN DU YMV

- Prendre 50 ml de virus purifié (soit 1 volume)
- Ajouter 500 ml (10 volumes) de tampon d'homogénéisation TEN+SDS (NaCl 50 mM-tampon Tris HCl 50 mM, pH7,5-EDTA 5 mM, pH 8-SDS 0,5%)
- Ajouter 11 ml de protéinase K à 10mg/ml.
- Incuber 1 heure à 37 °c au bain marie
- Ajouter 280,5 ml de phénol et 280,5 ml de chloroforme (soit au total un volume égal, 561 ml de phénol/chloroforme 1/1 v/v)
- "Vortexer" 1 min et centrifuger 10 min à 5000 rpm à 4°C
- Récupérer le surnageant (phase aqueuse) et recommencer un lavage au phénol/chloroforme.
- Récupérer le surnageant (phase aqueuse) et éliminer l'excès de phénol par un lavage avec 280,5 ml de chloroforme.
- Centrifuger 10 min à 5000 rpm à 4°C.
- Récupérer le surnageant (phase aqueuse)
- Ajouter 0,1 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et mélanger
- Ajouter 2,5 volumes d'éthanol à -20°C
- Mettre 30 min à -80°C ou quelques heures à -20°C minimum
- Centrifuger 30 min à 14000 rpm à 4°C
- Éliminer le surnageant et sécher le culot au "speed vacuum" à 4°C .
- Dissoudre le culot dans 50 ml de tampon Tris-EDTA (Tris 10 mM-EDTA 0,1M, pH 7,5)

ANNEXE 5: PROTOCOLE DE SEMI-PURIFICATION DU YMV

- Broyage de 10 g de feuilles dans 19 ml de tampon: Tris-HCl 0,2 M pH: 7,4
1% Na₂S₂O₃
0,2% 2-mercapto-éthanol
- Filtration à travers du "Miracloth"
- Centrifugation 15 min à 10000 rpm à 4°C (Sorvall, rotor SS 34)
- Récupération du surnageant
- Ajout de 319 ml de triton X100.
- Dépot de 6 ml de coussin de saccharose 30% dans le tampon tris-HCl 0,015 M.
- Ultracentrifugation 1 h à 30000 rpm (Beckmann, rotor TI 50.2).
- Reprise du culot dans 200 ml de tampon tris-HCl 0,015 M.
- Transfert du volume dans un tube eppendorf
- Clarification par 50 à 100 µl de chloroforme.
- Centrifugation 5 min à 13000 rpm
- Récupération du surnageant.

Annexe 6 : Séquence nucléotidique des régions centrale et C-terminale de la protéine capsidiale et de la région 3' non codante du génome du YMV BFC 56 obtenue par séquençage direct du produit PCR.

```

          10      20      30      40
┌──────────┬──────────┬──────────┬──────────┐
GGTGTGGTGCATCGATAATGGACCTCACCCAATTTATCCG 40
GGATGTGGACAATGATGGcCGGTCCGGAGCAAGTGAATA 80
TCCATTGAAACCGGTCATAGAGAATGCCAAGCCCACATTT 120
CGTCAAATAATGATGCATTTTAGTGACGCAGCTGAAGCGT 160
ACATTGAATTGCGGAACTCGAAAGAACCGTATATGCCCCG 200
          210      220      230      240
┌──────────┬──────────┬──────────┬──────────┐
ATmCGGTATTCAGCGAAATTTGAGGGATTACTCACTGGCT 240
AGATACGCGTTTGATTTCTTGAAATCACTTCTAAAACAC 280
CAATTCGAGCGCGTGAAGCACACCATCAGATGAAAGCAGC 320
AGCTATTGGGAATAAGGTTTCCAAAATGTTTGGATTTGAT 360
GGCAAAGTGGGGTCTCAGGAAGAGGATACAGAGAGACACG 400
          410      420      430      440
┌──────────┬──────────┬──────────┬──────────┐
CTGCTGGTGTATGTCACGAGAGACATGCACAGCCTCTTAGG 440
CATGAGAGGTATGTAGAGTGTTAGTTATATATCATATATA 480
TATATAACTCTGTTACGCCTACCTATAATATGTTGGTTGC 520
AAGCATTCTGTTCTTGTGAGAAGACGTATTCTAATGTTGC 560
ATTTTGGAGAAGCTTGAGAGTGTCTATGAC 590

```

