

Évaluation de la diversité génétique et biologique générée au sein d'une population virale durant un cycle unique d'infection de l'hôte

Stéphane BLANC^{(1)*}, Rémy FROISSART^(1, 3), Marilyne UZEST⁽¹⁾,
Paul GRATRAUD⁽¹⁾, Yannis MICHALAKIS⁽²⁾

⁽¹⁾ UMR Biologie et Génétique des Interaction Plante-Parasite, Cirad-INRA-ENSAM, TA 41/K, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

⁽²⁾ IRD-Montpellier, Génétique et Évolution des Maladies Infectieuses, 911 av. Agropolis, BP 5045, 34032 Montpellier, France

⁽³⁾ INSERM, Équipe « Écologie et Évolution des micro-organismes » E 0339, 16 rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

Abstract: Evaluation of the genetic and biological diversity generated in a population of *Cauliflower mosaic virus* during a single passage in a host plant. Cauliflower mosaic virus (CaMV) is a dsDNA virus replicated *via* reverse transcription of a pre-genomic 35S RNA. Reverse transcriptases are believed to have a high error rate during DNA synthesis and to rapidly generate many variants in a virus population. An exhaustive characterization of genetic and biological diversity within a plant virus population has never been reported from a single infected host. Using CaMV as a biological model, we have initiated a research program to evaluate both genetic and biological diversity appearing within a virus population during a single passage in a host plant (*Brassica rapa*, cv: "Just Right"). The CaMV is particularly suited for such experiments because full-length genomic clones are obtained very easily and are potentially infectious by simple and direct mechanical inoculation of cloned DNA into plants. A host plant was inoculated with the reference clone pCa37, hence with a unique viral sequence, and the virus population was purified from one single newly formed young leaf after development of systemic infection. The DNA genomes were extracted from this sample and directly cloned into pUC19.

* Correspondance et tirés à part : blanc@ensam.inra.fr

We have initiated the complete sequencing of 100 clones and tested their individual biological properties: infectivity, transmissibility and symptoms expression. This project is still in progress but preliminary results allow some striking conclusions. From the partial sequencing of 70 clones, we can predict that all genomes harbour one or several mutations, including point mutations, insertions, or deletions. This indicates that the originally introduced sequence may have rapidly disappeared from the population. The biological characterization of all 100 clones demonstrates that about half of the encapsidated genomes within the population are not infectious when inoculated individually and that, among those effectively infecting the host plant, very different symptoms can be observed.

plant virus / CaMV / mutation / quasi-species / virus evolution

Résumé : Durant la réplication, les ARN polymérases et les transcriptases inverses virales font de très nombreuses erreurs, engendrant l'apparition d'autant de mutations au sein des génomes viraux. En conséquence, une population virale devient rapidement un ensemble hétérogène de variants apparentés, centré sur une séquence moyenne ou consensus (concept de « quasi-espèce »). Bien que ce concept ait été partiellement vérifié chez des virus de bactéries, d'animaux et de plantes, aucune caractérisation exhaustive n'a été effectuée à ce jour. Ce que nous entendons par caractérisation exhaustive signifie la détermination des séquences totales d'un grand nombre de génomes viraux d'une même population, où chaque séquence puisse être testée pour ses propriétés biologiques. Nous avons entrepris de caractériser la structure d'une population du *Cauliflower mosaic virus* après l'infection d'une plante hôte (navet, *Brassica rapa*, cv : « Just Right »), initialement infectée par un clone viral (séquence unique). Une fois l'infection développée, nous avons extrait l'ADN de la population virale et directement cloné une centaine de génomes viraux dans le plasmide bactérien pUC19. Ces clones sont en cours de séquençage total et leurs propriétés biologiques individuelles ont été testées par inoculation mécanique de l'ADN cloné à des plantes hôtes. Nous présentons ici les résultats partiels du séquençage de 100 génomes viraux complets et la caractérisation de leurs propriétés biologiques. Bien que préliminaires, les données issues de ce projet permettent de prédire que chaque clone porte une ou plusieurs mutations qui peuvent être des substitutions de nucléotides, des insertions ou des délétions de taille variable. La caractérisation biologique de ces clones isolés montre que près de la moitié ne sont plus infectieux et que des clones aux propriétés biologiques extrêmement variables apparaissent durant un seul cycle d'infection de l'hôte et coexistent dans la population.

virus de plante / CaMV / mutation / quasi-espèce / évolution virale

1. INTRODUCTION

Le concept théorique de la « quasi-espèce » [5] a été appliqué à la virologie pour illustrer une population virale issue d'un seul et unique génome initial [3], [6], [10]. Du fait d'un taux d'erreur très élevé des répliques virales, en particulier les ARN polymérase-ARN dépendantes et les transcriptases inverses [4], la réplication virale générerait une multitude de génomes « fils » ayant subi des mutations et la population virale serait alors constituée d'un ensemble hétérogène de variants apparentés. Les données expérimentales, obtenues sur les virus de bactéries, d'animaux et de plantes, semblent en accord avec l'existence des quasi-espèces [3], [6]. Cependant la caractérisation de cette structure populationnelle reste fragmentaire puisque : i) toutes les données disponibles concernent l'analyse de la variabilité génétique d'une région génomique et non pas de génomes complets (voir par exemple [7] et [2] et ii) les études de la variabilité biologique qui pourrait être associée à cette variabilité génétique sont quasi inexistantes (pour exemple [14]). De cette situation résulte une méconnaissance flagrante des relations biologiques et génétiques qui existent entre clone et population (ou quasi-espèce) virale.

Chez les virus de plantes, les données expérimentales relatives à la variabilité intra-quasi-espèce sont rares et se résument à quelques séquences de portions de génome [15]. Des résultats préliminaires publiés sur le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) portaient sur l'analyse de onze clones d'une même population pour lesquels les propriétés biologiques ont été déterminées ainsi que la séquence d'un des six gènes de ce virus [1]. Bien que la taille de l'échantillon analysé ait été beaucoup trop faible pour pouvoir prétendre avoir une image fiable de la structure populationnelle, cette étude a clairement démontré une variabilité extrêmement élevée à la fois génétique et biologique. Les résultats présentés ici sont un prolongement de cette étude préliminaire.

Le CaMV est un virus à ADN double brin circulaire de 8 000 paires de bases qui est transcrit en un ARN polycistronique de taille génomique, l'ARN 35S. Cet ARN 35S sert à la fois d'ARN messenger pour la traduction de 5 gènes viraux et de matrice pour la synthèse de nouveaux génomes ADN, donc pour la réplication, lors d'une étape de transcription inverse [11]. Les transcriptases inverses sont des ADN polymérase-ARN dépendantes dont le taux d'erreur est du même ordre que celui des ARN polymérase-ARN dépendantes [4]. Il est ainsi

prévisible qu'une diversité importante se développe rapidement au sein des populations de CaMV. Si des mutations sont très souvent détectées au sein des génomes viraux d'une même population, les conséquences de ces mutations sur les propriétés biologiques des génomes correspondants sont le plus souvent très difficiles à analyser. En effet, dans le cas des virus à ARN, les clones complets de génomes infectieux s'obtiennent en plusieurs mois de travail et, dans le cas des virus d'animaux (et surtout humain) à ADN, des considérations éthiques évidentes interdisent l'infection systématique d'hôtes pour la caractérisation des clones.

Le CaMV est le membre type du genre *Caulimovirus* qui appartient au groupe des Pararétrovirus. Ce groupe comprend aussi les genres *Badnavirus* (virus de plantes) et *Hepadnavirus* (virus d'animaux tels que l'hépatite B) qui ont un cycle de réplication très similaire à celui des *Caulimovirus* [11]. Il est vraisemblable que les résultats que nous présentons sur le CaMV soient, au moins en partie, extrapolables à l'ensemble des virus de ce groupe. Le CaMV est dans ce sens un modèle unique pour ce type d'expérimentations. En effet, il est codé par un petit génome d'ADN bicaténaire qui est directement clonable dans un plasmide bactérien classique où il se maintient de manière très stable. Un génome ainsi cloné est directement infectieux sous forme plasmidique par simple inoculation mécanique à la plante hôte. Ce système de clonage/infection de l'hôte nous a permis d'initier la première caractérisation à la fois génétique et biologique à grande d'échelle d'une quasi-espèce virale.

2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. Isolat viral, plante hôte et puceron vecteur

Le clone de référence du CaMV est dénommé pCa37 [8] et correspond à un génome complet de l'isolat Cabb-S cloné à l'aide du site unique *Sal I* dans le plasmide bactérien pBR322. Les symptômes induits lors de l'infection d'une plante hôte par ce clone sont visibles dans la figure 2. Ils correspondent à un éclaircissement des nervures qui engendre un patron de mosaïque caractéristique, où les nervures sont jaune clair et les zones limbiques internervaires restent longtemps vert sombre. Toutefois, sur les feuilles vieillissantes, ou en fin d'infection aussi sur les jeunes feuilles, les régions claires autour des nervures

s'élargissent et fusionnent pour aboutir au jaunissement quasi total des feuilles. Le clone Cabb-S induit un léger « gauffrage » des feuilles jeunes qui s'estompe par la suite sur les feuilles épanouies et un nanisme modéré de la plante est aussi observable.

Les plantes hôtes pour le CaMV se trouvent dans la famille des *Brassicaceae* et quelquefois des *Solanaceae*. L'isolat Cabb-S est strictement inféodé aux *Brassicaceae* et l'espèce modèle utilisée est le navet (*Brassica rapa*) de la variété hybride F1 « Just Right ».

Le puceron vecteur est *Myzus persicae* (clone Montpellier) maintenu sur des plants de navet sains, dans des cages « insect proof » ventilées. La température et la photopériode sont contrôlées pour induire une reproduction asexuée chez les pucerons afin de maintenir une base génétique uniforme.

2.2. Inoculation d'ADN viral cloné

L'ADN viral cloné dans un plasmide bactérien (pUC 19 ou pBR322) est libéré par digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *Sal I*. Suite à la digestion et donc à l'excision du génome viral, l'ADN total est extrait par la technique classique de « phénol/chloroforme ». Après ajout de 0,1 µg final d'ARNt et d'ADN de sperme de saumon (protégeant contre les nucléases), l'ensemble est précipité dans de l'éthanol 70 % additionné de sel d'acétate de sodium, à -20 °C. L'ADN ainsi précipité est resuspendu dans du tampon TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) de telle sorte que la concentration finale de l'ADN viral soit de 0,20 mg.ml⁻¹. Cette solution est alors déposée sur chacune des deux feuilles de jeunes plantules, à raison de 20 µl par plante soit 4 µg, préalablement saupoudrée avec un abrasif (Carborundum). La solution est alors étalée avec un doigt ganté sur la totalité de la surface des feuilles, avec une pression très modérée. Cet exercice blesse légèrement l'épiderme et crée de multiples points d'entrée pour l'ADN viral sans pour autant endommager les feuilles. L'ADN viral est ainsi directement infectieux et les symptômes généralisés de la maladie apparaissent sur les feuilles néoformées à partir de deux semaines post-inoculation.

2.3. Clonage de l'ADN viral

La plus jeune feuille néoformée est prélevée sur une plante infectée. L'ADN viral est extrait, comme décrit précédemment [9] et une étape supplémentaire de purification avec le kit d'extraction « Wizard »

(Promega) est ajoutée. Il est important de noter ici que la technique de purification de l'ADN utilisée consiste en une pré purification des particules virales (permettant d'éliminer l'ADN chromosomique des plantes), suivie d'une extraction des génomes viraux. En conséquence, l'ADN qui est purifié correspond à de l'ADN qui était encapsidé dans des particules virales matures.

La population de génomes purifiés est linéarisée à l'aide de l'enzyme *Sal I* et directement clonée au site correspondant dans le plasmide bactérien pUC19. Les très nombreux clones obtenus sont isolés, le plasmide est purifié et digéré par *Sal I*, pour une analyse sur gel d'électrophorèse. Les clones avec un insert de la taille approximative du génome du CaMV (8 000 paires de bases) sont conservés. Ceux, très rares, dont l'insert est clairement différents (< 6 000 paires de bases) sont éliminés.

2.4. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN viral est sous-traité par les sociétés MWG et Genome Express. Les clones complets du CaMV sont séquencés à l'aide de quatorze amorces réparties sur l'ensemble du génome. Chaque amorce est distante d'environ 600 pb de la précédente et de la suivante de sorte que les séquences obtenues pour un clone donné soient chevauchantes et puissent être assemblées.

2.5. Transmission par le puceron vecteur

Un grand nombre de pucerons sont placés dans un bocal hermétique pour un jeûne de 2 h. Ils sont alors déposés sur la plante infectée, pour acquisition du virus durant quinze minutes, puis sont transférés par lots de dix sur des jeunes plantules durant une nuit, pour permettre l'inoculation du CaMV. Ces plantules sont traitées avec un insecticide puis placées dans nos chambres de culture durant six semaines pour le développement de l'infection.

3. RÉSULTATS

Une jeune plante a été inoculée à l'aide du plasmide pCa37 (clone du CaMV souche Cabb-S), comme indiqué dans Matériels et méthodes (M&M). Après 30 jours d'infection, une très jeune feuille néoformée,

apparue depuis moins de cinq jours, a été prélevée et l'ADN viral en a été extrait puis cloné (M&M). Plusieurs centaines de clones complets du génome du CaMV ont été obtenus à partir de cette unique feuille. Ils sont donc représentatifs d'une population du CaMV qui s'est développée durant trente jours dans un hôte unique suite à l'inoculation d'une séquence initiale unique. Cette population est dénommée : « pop0 ».

3.1. Analyse de la diversité génétique au sein de pop0

Le séquençage systématique de 100 génomes complets du CaMV de pop0 a été entrepris et est toujours en cours. Tous les clones sont séquencés de front depuis la position 0 vers la position 8024 (numérotation [8]). Actuellement les séquences disponibles s'étalent des nucléotides 1 à 3 000, ce qui représente environ 37 % du génome. À ce stade, nous ne pouvons présenter les données que de manière globale, sans détails de la position et de la nature de chaque mutation ni corrélation entre une mutation donnée et son impact sur les propriétés biologiques. En effet, une propriété observée pourrait être liée à une mutation dans des régions non encore séquencées. De même, une analyse poussée de ces séquences (taux de mutation en fonction des gènes ou séquences non codantes, rapport synonyme/non-synonyme, ...) devra attendre la collecte de la totalité des données. Il est néanmoins d'ores et déjà possible de tirer quelques conclusions générales qui apparaissent extrêmement intéressantes, parfois même inattendues.

La figure 1 présente une image globale de la population de génomes pop0 telle que nous pouvons la décrire actuellement. Sur un total de 100 clones, 61 présentent des mutations dans la région séquencée. Chacun de ces 61 clones comporte entre 1 et 3 mutations qui peuvent être des substitutions ponctuelles, synonymes ou non, des insertions et délétions de taille variable. Il semble que ces mutations apparaissent en des localisations aléatoires (différentes régions codantes ou non codantes) bien qu'aucune analyse statistique de ce point particulier n'ait été menée à ce stade. Si tel est le cas, tous les génomes comporteront une ou plusieurs mutations, puisque sur une zone séquencée ne représentant que 37 % du génome, nous avons déjà 61 % de mutants. La première conclusion est donc que le taux de mutation est tel, que la séquence initialement introduite est perdue en un seul passage dans l'hôte. Par contre, une analyse rapide de la figure 1 démontre que chaque mutation est rare et que la séquence consensus est conservée sur la partie séquencée.

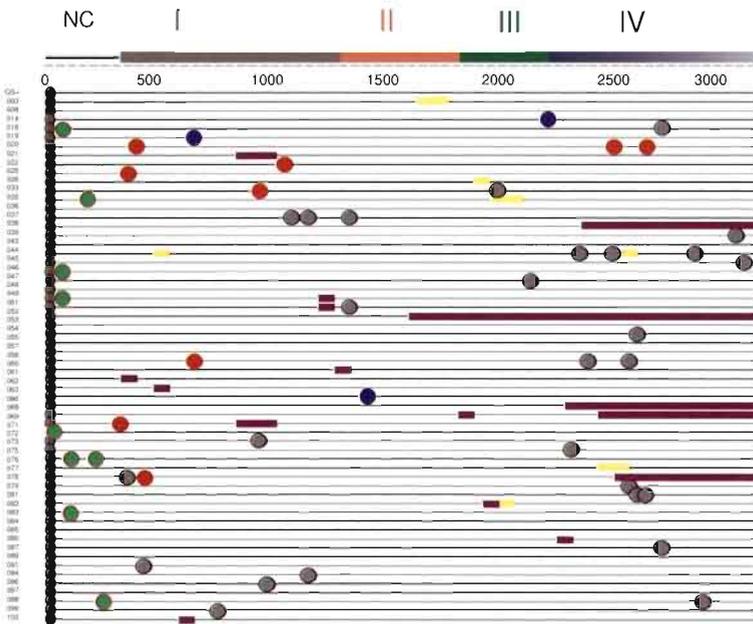


Figure 1 : Représentation schématique des mutations identifiées dans pop0. Sur 100 clones séquencés entre les nucléotides 0 et 3000, les 61 pour lesquels des mutations ont été détectées sont représentés par des lignes horizontales, et numérotés sur la gauche. En haut, la région du génome du CaMV concernée est schématisée, avec la région non codante (NC) et les cadres de lecture ouverts I, II, III et IV en couleur. La numérotation des nucléotides est indiquée au-dessous. Les mutations identifiées se retrouvent aussi bien dans la région non codante (cercles verts) ou dans les cadres de lecture ouverts, et peuvent être des substitutions synonymes (cercles rouges), non synonymes (cercles bleus) ou encore des délétions (barres violettes) ou des insertions (barres jaunes) de taille variable. Les cercles gris correspondent à des substitutions ponctuelles récemment détectées sur des alignements, mais qui n'ont pas encore été caractérisées. La position 0 de chaque génome est représentée par un petit cercle gris foncé.

3.2. Analyse de la diversité biologique au sein de pop0

La totalité des 100 clones de pop0 a été analysée. L'inoculation mécanique de chacun des clones, aux plantes tests, est effectuée comme indiqué dans le M&M. Ces plantes sont alors contrôlées visuellement jusqu'à 6 semaines post-inoculation pour l'apparition des symptômes. Dans les cas où aucune infection n'apparaît après 6 semaines, les plantes sont éliminées et le test est répété 3 fois avant que le clone correspondant soit déclaré non infectieux. Tous les clones infectieux sont testés pour leur transmissibilité par pucerons (M&M) avant que les plantes soient

éliminées. Sur un total de 53 clones ayant engendré une infection systémique de l'hôte inoculé, tous ont pu être ultérieurement transmis par pucerons à une nouvelle série de plantes. Ce résultat indique que les mutations présentes dans ces 53 clones n'affectent pas la transmissibilité du CaMV par son insecte vecteur.

Le résultat le plus marquant de cette partie du projet est le fait que 47 % des clones ne sont pas infectieux dans nos conditions expérimentales. Il faut rappeler que ces clones dérivent chacun d'un génome encapsidé de pop0. Ceci signifie que, dans une population de CaMV, près de la moitié des particules virales matures, contiennent en fait un génome qui n'est pas infectieux s'il est inoculé individuellement.

Une autre observation importante porte sur la nature des symptômes associés à différents clones. Si la plupart ont un phénotype qui ressemble, en première analyse, à celui du clone parental pCa37, deux exhibent des phénotypes atypiques soit atténués, soit très sévères (fig. 2).

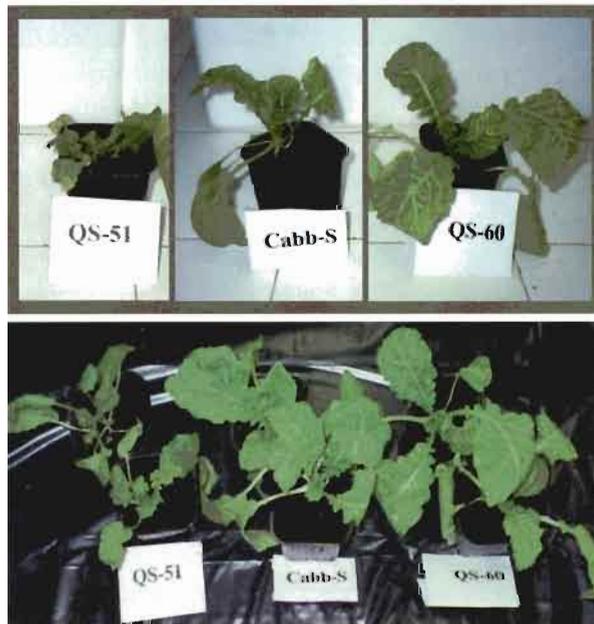


Figure 2 : Exemple de clones associés à un phénotype atypique. Les plantes infectées par le clone de référence pCa37 sont notées Cabb-S. Le clone n° 60 exhibe un phénotype atténué et le clone n° 51 un phénotype sévère, comme explicité dans le texte. Le panneau du haut rend bien compte du nanisme marqué et faible des clones n° 51 et 60, respectivement. Le panneau du bas permet de bien visualiser la mosaïque plus distincte pour le clone n° 60 que pour les clones n° 51 et pCa37.

Le clone 60 arbore un phénotype atténué dans la mesure où le nanisme des plantes est moins prononcé que chez le contrôle Cabb-S, et où les veines claires ne fusionnent jamais, maintenant une mosaïque très marquée même sur les feuilles âgées. À l'opposé, le clone 51 apparaît extrêmement sévère, les éclaircissements des nervures sont parfois nécrotiques, la totalité des feuilles est affectée par un gaufrage accentué et un nanisme beaucoup plus prononcé que chez le contrôle. Cette observation indique que des mutants ayant des propriétés biologiques très différentes, à la fois entre eux et par rapport aux propriétés du clone parental, apparaissent très rapidement et coexistent au sein de pop0. Le phénotype observé sur une plante infectée est donc une résultante de l'ensemble des propriétés des clones qui composent la population. Il est évident qu'un goulet d'étranglement extrême, tel que l'isolement d'un clone, peut fixer une ou plusieurs mutations et clairement révéler leur phénotype associé.

4. DISCUSSION

Les résultats présentés dans cet article, bien qu'encore incomplets, représentent la première caractérisation exhaustive de la diversité génétique et biologique générée au sein d'une population virale. Nous avons en effet contrôlé la diversité inoculée au départ (nulle), ce qui est impossible lors de collectes de populations au champ. Nous connaissons parfaitement l'histoire évolutive de notre population pop0 et nous nous sommes volontairement placés à une échelle de temps et d'espace qui nous apparaît très significative sur un plan biologique : l'infection d'un seul hôte. Ce projet a produit et produira des résultats très porteurs sur le plan fondamental, mais il génère surtout une quantité impressionnante de perspectives dont certaines seront évoquées ci-dessous.

Il apparaît que le concept de la quasi-espèce est totalement vérifié puisque la séquence initiale n'existe plus que sous forme de séquence consensus. Le nombre de mutations générées à cette échelle de temps est très élevé, et sera certainement bien supérieur à $1 \cdot \text{génomome}^{-1}$. Le fait que la plupart des mutations identifiées soient différentes prouve qu'elles sont apparues indépendamment. Quelques-unes sont retrouvées plusieurs fois et pourraient donc être issues de la réplication d'un seul événement de mutation. À terme, en considérant les régions du génome où les mutations sont les plus fréquentes, et en posant l'hypothèse conservatrice qu'elles ne sont pas contre-sélectionnées, nous pourrions

estimer expérimentalement et *a minima* le taux d'erreur associé à la transcriptase reverse du CaMV.

La nature des mutations, dont beaucoup sont de grandes ou petites insertions et délétions qui ne conservent pas la phase des régions codantes, indique que de nombreux génomes ne sont plus fonctionnels, ce qui est confirmé par notre analyse biologique. Ceci suggère que les mutations délétères qui apparaissent au sein des génomes ne semblent pas contre-sélectionnées à l'échelle de notre expérimentation [12]. Il s'agit là d'un point très important car l'unité de sélection chez les virus est un concept très disputé à l'heure actuelle. Au-delà des clones non infectieux, une analyse biologique plus précise que celle établie ici consistera à évaluer la valeur sélective et la virulence de chacun des clones pris indépendamment. Cette étude de longue haleine apportera des informations supplémentaires sur le spectre de mutants, à savoir sur la proportion relative des mutations délétères et bénéfiques qui se maintiennent dans la population à cette échelle de temps et d'espace.

L'ensemble des mutants, qui ne sont plus infectieux individuellement, pourrait être considéré comme un « fardeau » de virus défectifs interférant dans la population. Cependant, au cours d'un autre projet, nous avons pu déterminer le taux de recombinaison à la même échelle temporelle, et celui-ci s'avère aussi élevé que le taux de mutations : après infection d'un seul hôte, tous les génomes de la population ont subi au moins un événement de recombinaison. Dans ce contexte, les génomes non infectieux pourraient tout aussi bien participer à la population efficace. Les taux de mutation et de recombinaison étant très élevés chez le CaMV, la question de l'interaction entre différentes mutations devient particulièrement intéressante. Suite à l'analyse fine de l'effet des mutations identifiées ici sur la valeur sélective et la virulence du CaMV, il sera possible de les combiner afin de tester leurs interactions de type additives ou épistatiques.

Notre analyse démontre enfin que des « pathotypes » atypiques (clone 60 et 51), pouvant être atténués ou très sévères, apparaissent lors d'un seul passage du virus dans l'hôte. Les phénotypes atypiques semblent « moyennés » au sein d'une population pour laquelle le phénotype apparent semble plutôt attribuable à une séquence consensus (ici celle de pCa37). L'émergence d'un pathotype nouveau est très certainement liée à une modification de cette séquence consensus par

fixation ou augmentation de fréquence de certaines mutations, qui peuvent être le fait soit de la sélection, soit de la dérive génétique. De très nombreuses pratiques agricoles agissent clairement sur ces deux facteurs et il semble très probable que l'activité humaine participe à l'installation de ces pathotypes qui pourraient bien exister à faible fréquence et en permanence dans toutes populations virales.

REMERCIEMENTS

Ce projet de recherche a été financé par le BRG et le département Santé des plantes et environnement de l'INRA. Les graines de navet « Just Right » sont gracieusement fournies par la société TAKII (Japon).

RÉFÉRENCES

- [1] Al-Kaff N., Covey S.N., Variation in biological properties of cauliflower mosaic virus clones. *J. Gen. Virol.* 75 (1994) 3137-3145.
- [2] Allen T.M., O'Connor D.H., Jing P., Dzuris J.L., Mothe B.R., Vogel T.U., Dunphy E., Liebl M.E., Emerson C., Wilson N., Kunstman K.J., Wang X., Allison D.B., Hughes A.L., Desrosiers R.C., Altman J.D., Wolinsky S.M., Sette A., Watkins D.I., Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* 407 (2000) 386-90.
- [3] Domingo E., Viruses at the edge of adaptation. *Virology* 270 (2000) 251-3.
- [4] Drake J.W., Holland J.J., Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(1999) 13910-3.
- [5] Eigen M., McCaskill J., Schuster P., Molecular Quasi-species. *J. Phys. Chem.* 92 (1988) 6881-6891.
- [6] Elena S.F., Lenski R.E., Evolution experiments with microorganisms: dynamics and genetic basis of adaptation. *Nat Rev Genet* 4 (2003) 457-469.
- [7] Farci P., Shimoda A., Coiana A., Diaz G., Peddis G., Melpolder J.C., Strazzera A., Chien D.Y., Munoz S.J., Balestrieri A., Purcell R.H., Alter H.J., The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasi species. *Science* 288 (2000) 339-44.
- [8] Franck A., Guilley H., Jonard J., Richards K., Hirth L., Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell* 21 (1980) 285-294.
- [9] Gardner R.C., Shepherd R.J., A procedure for rapid isolation of Cauliflower mosaic virus DNA, *Virology* 106 (1980) 159-161.
- [10] Guyader S., GIBLOT-DUCRAY D., L'évolution des virus à ARN: rôle de la sélection et de la dérive génétique, *Virologie* (2004), Sous presse.

Caractérisation expérimentale d'une quasi-espèce virale

- [11] Hohn T., Fütterer J., The proteins and functions of plant pararetroviruses: knowns and unknowns. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16 (1997) 133-167.
- [12] Hull R., *Matthews' plant virology* 4th edition, 4 edn. Academic Press (2001) San Diego.
- [13] Hurst L.D., The Ka/Ks ratio: diagnosing from the sequence of evolution. *Trends Genet* 18 (2002) 486-487.
- [14] Martell M., Esteban J.I., Quer J., Genesca J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., Gomez J., Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66 (1992) 3225-9.
- [15] Roossinck M.J., Plant RNA virus evolution. *Curr Opin Microbiol* 6 (2003) 406-409.
- [16] Yang Z., Bielawski P., Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 15 (2000) 496-500.

Blanc S., Froissart R., Uzest M., Grataud P., Michalakis Yannis
Evaluation de la diversité génétique et biologique générée au
sein d'une population virale durant un cycle unique
d'infection de l'hôte

In : Un dialogue pour la diversité génétique. Paris : BRG, 2005,
p. 155-167

(Les Actes du BRG ; 5). ISBN 2-908-447-33-9 Colloque
National du BRG : Un Dialogue pour la Diversité Génétique, 5.