

Université de Sherbrooke

Caractérisation des interactions entre le viroïde PLMVd et le mécanisme
d'interférence à l'ARN du pêcher.

par

M Patrick St-Pierre

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en biochimie

11 février 2009

Évalué par : Jean-Pierre Perreault, Biochimie, Université de Sherbrooke

Marcel Bastin, Biochimie, Université de Sherbrooke

Kamal Bouarab, Biologie, Université de Sherbrooke

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS	X
RESUME	1
INTRODUCTION	4
A Les viroïdes	4
A.1 Historique	4
A.1.1 Virus	4
A.1.2 Viroïdes	5
A.2 Pathogénèse	6
A.2.1 Infection et propagation	6
A.2.2 Symptômes	6
A.2.3 Mécanismes de pathogenèse	9
A.3 Modes de réplication	11
A.4 Classification	13
A.4.1 <i>Pospiviroidae</i>	13
A.4.2 <i>Avsunviroidae</i>	17

B. PLMVD	19
B.1 Séquence	19
B.2 Mode de réplication	21
B.3 Pathogénicité	22
C. Interférence à l'ARN	23
C.1 Historique	23
C.2 Interférence à l'ARN chez les plantes	25
C.3 Interférence à l'ARN et viroïdes	29
D. Hypothèse	33
D.1 Contexte	33
D.2 Objectifs	33
CHAPITRE 1 : CARACTERISATION DES PETITS ARN ASSOCIES A L'INFECTION DE PLMVD	35
1.1 Article : Characterization of the siRNA associated with peach latent mosaic viroid infection	35
Abstract	36
Introduction	37
Results and Discussion	38
Characterization of the small ncRNA	39
PLMVd specific siRNAs	43
PLMVd conformers as putative substrates for DCL enzymes	45
Concluding remarks	49

Material and Methods	50
RNA extraction and Northern blot hybridization	50
Cloning and analysis of small ncRNAs	50
Acknowledgements	51
Supplementary data	55
RESULTATS ET DISCUSSION	66
Séquençage des siARN	66
Une banque de siARN	66
siARN et PLMVd	73
Interaction entre PLMVd et des protéines	78
PERSPECTIVE	80
Séquençage à haut débit	80
Variation du niveau d'ARN dans le temps	80
Préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit	86
CONCLUSION	91
REMERCIEMENTS	92
RÉFÉRENCES	93
ANNEXES	104

Annexe 1. Matériels et méthodes supplémentaires	104
Extraction d'ARN au phénol chaud	104
Migration sur gel de polyacrylamide	105
Transcription de PLMVd	105
Buvar dage de type Northern	107
Séquençage à haut débit	108

Liste des figures

INTRODUCITON

- Figure 1 : Exemples de symptômes causés par des viroïdes. 7
- Figure 2 : Réplication en cercle roulant. 12
- Figure 3 : Classification des viroïdes en familles, sous-familles et espèces. 14
- Figure 4 : Structure secondaire des *Pospiviroidae*. 16
- Figure 5 : Séquence et structure secondaire du PLMVd 20
- Figure 6 : Résumé des voies d'interférence à l'ARN chez les plantes 26

CHAPITRE 1

- Figure 7 : Analysis of PLMVd-associated siRNA sequences and small ncRNAs retrieved in RNA samples extracted from peach leaves 41

Figure 8 : Localization of the observed PLMVd-associated siRNA on the PLMVd molecule.	47
--	----

DISCUSSION

Figure 9 : Pourcentage des petits ARN homologues à PLMVd ayant une longueur donnée.	74
--	----

Figure 10 : Déphosphorylation des ARNnc homologues à PLMVd.	76
---	----

Figure 11 : Variation de la quantité de PLMVd et de ARNnc homologues à PLMVd dans le temps.	82
--	----

ANNEXES

Figure 12 : Théorie du séquençage à haut débit par la technologie Solexa	108
---	-----

Liste des tableaux

CHAPITRE 1

Tableau 1 : Number of sequenced small ncRNA by plant. 38

Tableau 2 : Origin and sequence of sequenced small ncRNA. 55

DISCUSSION

Tableau 3 : Origine et séquence des petits ARN homologues à
des miARN et leur fonction potentielle 71

Tableau 4 : Origine et séquences des petits ARN homologues
à des ARN viraux 71

Tableau 5 : Concentration d'ARN et ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} pour
tous les extraits d'ARN des plants sains. 79

Tableau 6 : Concentration d'ARN et ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} pour
tous les extraits d'ARN des plants infectés. 80

Tableau 7 : Séquence des inserts provenant de la préparation
des échantillons pour le séquençage à haut débit. 88

Liste des symboles et abréviations

A	adénosine
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non-codant (<i>non-coding RNA</i>)
ASBVd	<i>Avocado sunblotch viroid</i>
C	cytidine
°C	dégré Celcius
CCCVd	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>
CChMVd	<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>
CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>
Ci	curie
CVd-III	Citrus viroid III
DCL	homologue à Dicer (<i>Dicer-like</i>)
DO	densité optique
dsRBP	protéine à domaine de liaison à l'ARN double-brin (<i>double-stranded RNA-binding domain protein</i>)
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique

	<i>(ethylenediamine tetraacetic acid)</i>
g	gramme
G	guanosine
GFP	protéine fluorescente verte <i>(green fluorescent protein)</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HCl	acide chloridrique
HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>
KCl	chlorure de potassium
KOH	hydroxyde de potassium
L	région d'ARN boucle <i>(loop region)</i>
LiCl	chlorure de lithium
M	molaire
miARN	micro-ARN
min	minute
MgCl ₂	chlorure de magnésium
MgSO ₄	sulfate de magnésium
mL	millilitre
mM	millimolaire
mmol	millimole
NaCl	chlorure de sodium
natsiARN	siARN naturel <i>(natural siRNA)</i>
NEP	polymérase encodée au noyau

	<i>(nuclear encoded polymerase)</i>
nm	nanomètre
nt	nucléotide
NTP	ribonucléotide triphosphate
P	région de pathogénèse
P	région d'ARN double-brin en tige <i>(paired-base region)</i>
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide <i>(polyacrylamide gel electrophoresis)</i>
pb	paire de base
PC	calicot du pêcher <i>(peach calico)</i>
PCR	réaction de polymérisation en chaîne <i>(polymerisation chain reaction)</i>
PEP	polymérase encodée au plaste <i>(plastid encoded polymerase)</i>
PLMVd	viroïde de la mosaïque latente du pêcher <i>(Peach latent mosaic viroid)</i>
Pol II	Polymérase II
Pol IV	Polymérase IV
PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>
PTGS	répression post-transcriptionnel des gènes <i>(post-transcriptionnal gene silencing)</i>
PVP	polyvinyl-pyrrolidone
rasiARN	siARN associé aux répétition

	<i>(repeat-associated siRNA)</i>
RCC	région centrale conservée
RCR	réplication en cercle roulant
RISC	complexe de silençage induit par l'ARN <i>(RNA-induced silencing complexe)</i>
RdDM	Méthylation de l'ADN dirigé par l'ARN <i>(RNA-directed DNA methylation)</i>
RdRp	ARN polymérase dépendante de l'ARN <i>(RNA dependant RNA polymerase)</i>
RNAi	Interférence à l'ARN <i>(RNA inteference)</i>
RNAse	ribonucléase
RT	transcription inverse <i>(reverse transcription)</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
siARN	petit ARN interférents <i>(small interfering RNA)</i>
tasiARN	siARN agissant en trans <i>(trans-acting siRNA)</i>
TBE	tampon tris-borate-EDTA
TD	boucle terminale droite
TG	boucle terminale gauche
TGS	répression transcriptionnel des gènes <i>(transcriptionnal gene silencing)</i>
U	unité

U	uridine
UTP	uridine triphosphate
UV	ultraviolet
VAR	région variable
W	Watt
(+)	brin d'ARN de polarité positive
(-)	brin d'ARN de polarité négative
µg	microgramme
µl	microlitre

Résumé

Caractérisation des interactions entre le viroïde PLMVd et le mécanisme d'ARN interférence du pêcher.

Par

M Patrick St-Pierre

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.) en biochimie

11 février 2008

Les viroïdes sont les pathogènes les plus simples connus à ce jour. Ils possèdent un génome d'ARN simple brin, circulaire, qui n'encode aucune protéine et qui n'est pas encapsidé. Malgré tout, ils sont capables d'infecter des plantes supérieures et de causer des symptômes suffisamment sévères pour amener d'importantes pertes économiques dans les domaines agro-alimentaire et horticole. Depuis quelques années, plusieurs études ont été réalisées pour mieux comprendre ces pathogènes obligatoires mais, jusqu'à maintenant, peu de données sont disponibles sur les petits ARN interférents (siARN) produits par les plantes à la suite d'une infection par un viroïde. Le

but de ce travail est de recueillir le plus d'informations possible sur les siARN produits par le pêcher à la suite d'une infection par le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd).

Les petits ARN non-codants de 18 à 26 nucléotides de plants de pêcher sains et infectés par PLMVd ont été clonés et séquencés. Les observations faites à partir de ces séquences montrent que seul le plant infecté produit des petits ARN homologues à PLMVd. Aussi, certaines régions du génome du viroïde semblent être plus enclines à produire des siARN. De plus, les deux polarités du génome de PLMVd semblent être susceptibles à l'interférence à l'ARN. Ensuite, certaines observations montrent que les molécules circulaires de PLMVd ainsi qu'un duplex d'ARN formé des deux polarités du génome de PLMVd sont des cibles potentielles de l'interférence à l'ARN. Enfin, à la suite de l'analyse des résultats, on peut supposer que les siARN homologues à PLMVd peuvent modifier l'expression de certains gènes végétaux.

À la suite de ces observations et aux questions qu'elles ont soulevées, nous avons préparé une expérience de séquençage à haut débit des petits ARN d'un plant de pêcher sain et d'un plant infecté par PLMVd. Les résultats préliminaires montrent que le niveau d'expression de PLMVd et des petits ARN homologues à PLMVd varient selon les plants étudiés et selon le mois dans lequel les feuilles de pêcher ont été cueillies. L'ARN extrait des feuilles qui semblaient contenir la plus forte concentration de siARN a été utilisé pour les expériences suivantes. Les premiers tests pour la préparation des petits ARN pour le séquençage par la technologie Solexa d'Illumina montrent que le kit de préparation des petits ARN est efficace.

En conclusion, ces résultats ouvrent la voie à un séquençage à haut débit des siARN de pêcheur, plus particulièrement ceux qui sont associés à l'infection par PLMVd. Ils permettent aussi d'énoncer certaines hypothèses qu'il sera intéressant de vérifier dans le futur.

Mots Clés : Viroïde ; ARN interférence ; séquençage ; petits ARN interférents ;

Régulation post-transcriptionnel

Introduction

A Les viroïdes

A.1 Historique

A.1.1 Virus

Les observations de Dmitri Iwanowski en 1892 (Johnston, 1942b) et les travaux de Martinus Beijerinck en 1898 (Johnston, 1942a) sur la mosaïque du tabac ont permis l'identification d'un « *contagium vivum fluidum* ». Ils décrivaient cette substance en ces mots : « ... c'est contagieux, infectieux, beaucoup plus petits qu'une bactérie, reproductible, diffusable, soluble dans l'eau et résistant à la sécheresse, mais pas à l'ébullition ». On a su plus tard que cette substance contenait en fait des virus. À ce moment, la communauté ne pensait pas retrouver de virus chez l'humain en raison de leur très petite taille. Pourtant, les scientifiques ont été obligés de changer d'opinion en 1902 après la publication des expériences de Walter Reed et James Carroll sur la fièvre jaune (Reed et Carroll, 2001). Ils ont repris les expériences de Iwanowski et Beijerinck avec des inoculums contenant l'agent infectieux de la fièvre jaune et ils ont démontré que ce pathogène souvent mortel avait les mêmes caractéristiques que celui de la mosaïque du tabac. Ces découvertes ont convaincu les chercheurs de la simplicité déroutante des virus et ont ouvert une nouvelle branche d'étude sur les agents pathogènes.

A.1.2 Viroïdes

La découverte, en 1967, d'entités infectieuses de plants de tomates ayant des propriétés incompatibles à celles des particules virales conventionnelles (Diener et Raymer, 1967) soulève de nouvelles interrogations. Ces pathogènes sont caractérisés par un génome en acide ribonucléique (ARN), circulaire et non-encapsidé. En 1971, Theodor O. Diener propose officiellement le terme viroïde (Diener, 1971) pour cette nouvelle classe d'agents pathogènes. Trente ans plus tard, la recherche épidémiologique sur les viroïdes est toujours actuelle puisqu'on découvre couramment de nouvelles espèces (Fadda *et al.*, 2003; Nakaune et Nakano, 2008), de nouvelles maladies associées (Amari *et al.*, 2007), de nouveaux hôtes (Vadamalai *et al.*, 2006; Verhoeven *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007) et de nouvelles régions du monde touchées (Candresse *et al.*, 2007; Yang *et al.* 2007; Arezou *et al.*, 2008). Malgré toutes les études faites jusqu'à présent, les viroïdes n'ont été retrouvés que chez les plantes supérieures. Les viroïdes décrits à ce jour, possèdent un génome variant de 246 à 475 nucléotides (nt) (Rocheleau et Pelchat, 2006) et sont connus pour n'encoder aucune protéine (Côté, 2000; Davies *et al.*, 1974; Hall *et al.*, 1974; Semancik *et al.*, 1977). Malgré cette simplicité, certains de ces agents pathogènes causent des maladies chez leurs hôtes spécifiques alors que d'autres ont un répertoire de plantes infectables plus vaste. Par exemple, les hôtes naturels du *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), le premier viroïde découvert, sont les tomates et les pommes de terre (Tsagris et Tabler, 2004), alors que le *Hop stunt viroid* (HSVd) peut infecter beaucoup plus de plantes (Kofalvi *et al.*, 1997). La simplicité des viroïdes et le fait qu'ils n'encodent aucune protéine en font

d'excellents modèles pour les études structurales, catalytiques et pathogéniques de l'ARN.

A.2 Pathogénèse

A.2.1 Infection et propagation

La transmission des viroïdes se fait par des moyens qui leur sont généralement communs. Souvent, les infections systémiques ont lieu suite à une transmission mécanique, par exemple par bouturage, par utilisation d'instruments souillés ou par greffe de tissus infectés (Desvignes, 1986; Gross, 1926; Hadidi *et al.*, 1997; Merriam et Bondes, 1954). Il a aussi été démontré que certains viroïdes peuvent être transmis par les insectes, par la dissémination des graines de plants infectés, par le pollen ou par co-encapsulation avec un virus (Antigus *et al.*, 2007; Barba *et al.*, 2007; Desvignes, 1986; Flores *et al.*, 1992; Goss, 1926; Querci *et al.*, 1997). Parfois, il arrive que plusieurs viroïdes soient présents dans un seul plant, tel que le *Citrus exocortis viroid* (CEVd), le HSVd et le Citrus viroid-III (CVd-III) qui ont déjà été recensés dans le même *Citrus reticulata* var. *clementine* (Elleuch *et al.*, 2006). Une fois le viroïde implanté dans la plante, une panoplie de symptômes peut être observée.

A.2.2 Symptômes

Les symptômes varient en sévérité et en nature selon l'espèce infectée et le variant du viroïde (Diener *et al.*, 1993). Suite à l'infection par un viroïde, on peut observer un retard de croissance, un dérèglement dans la synthèse

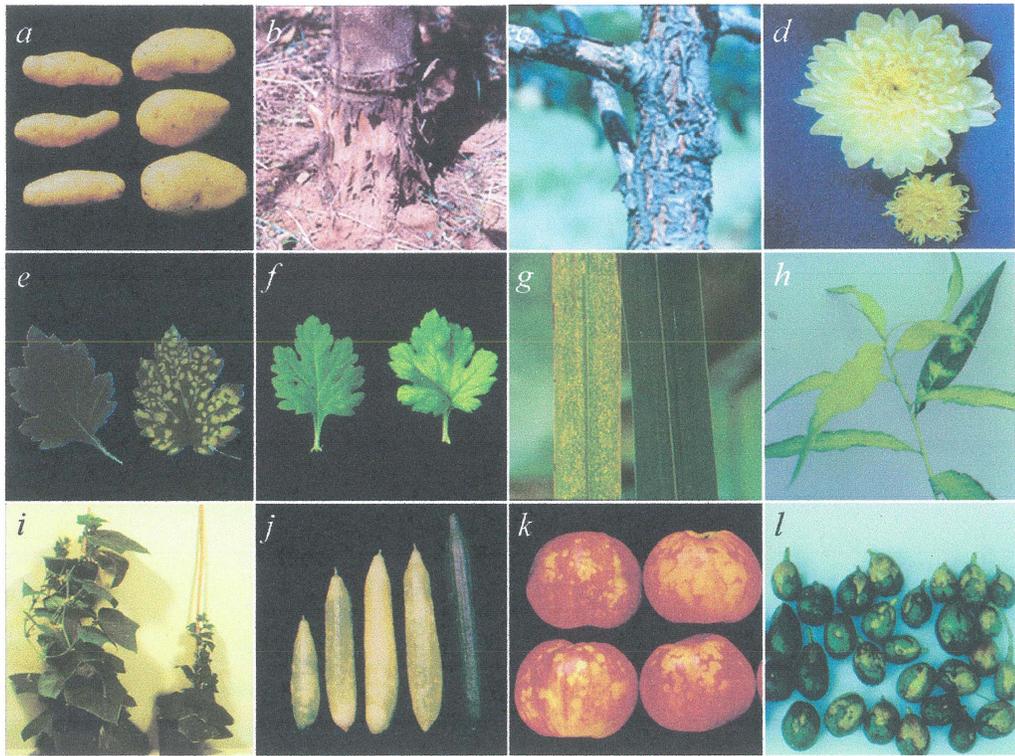


Figure adaptée de Flores et al., 2005

Figure 1. Exemples de symptômes causés par des viroïdes. (a) Tubercule de pomme de terre sain (droite) et symptômes de PSTVd sur des tubercules de pomme de terre (gauche). (b) Symptômes de CEVd sur un citronnier épineux. (c) Symptômes causés par PBCVd sur un poirier. (d) Fleur de chrysanthème saine (haut) et infectée par CSVd (bas). (e) Feuille de chrysanthème saine (gauche) et infectée par CSVd (droite). (f) Feuille de chrysanthème saine (gauche) et infectée par CChMVd (droite). (g) Symptômes causés par CCCVd sur une feuille de cocotier (gauche) et témoin sain (droite). (h) Feuille de pêcher atteint de chlorose extrême (calicot du pêcher) suite à l'infection par PLMVd. (i) Raccourcissement de l'espace inter-nœud induit par HSVd chez le comcombre (droite) et le contrôle sain (gauche). (j) Symptômes induits par HSVd sur les fruits de comcombre (gauche) et le contrôle sain (droite). (k) Symptômes causés par ASSVd chez les pommes. (l) Symptômes causés par ASBVd chez les fruits d'avocat.

de la chlorophylle, une déformation des fruits et une altération des feuilles (Figure 1). Évidemment, la destruction des arbres et la modification de l'apparence des fruits et des légumes suite à l'infection des cultures par un viroïde ont un impact économique majeur dans les domaines horticole et agro-alimentaire. Dans certains cas, la pathologie engendrée peut mener à une nécrose partielle de l'organisme et parfois même à sa mort. L'exemple le plus saisissant est sans nul doute la mort de presque tous les 250 000 palmiers de l'île de San Miguel aux Philippines en 1962 suite à l'épidémie causée par le *Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd) (Haseloff *et al.*, 1982). Les symptômes observables sont provoqués par l'interférence des viroïdes avec les voies de développement normales de l'hôte.

A.2.3 Mécanismes de pathogenèse

Bien que la pathogenèse ne soit pas connue, il est généralement accepté que les viroïdes agissent en modifiant l'expression des gènes de l'hôte. D'ailleurs, l'étude de plusieurs infections aux viroïdes a montré une modification du niveau de certaines protéines cellulaires pouvant être impliquées dans la défense de l'hôte ou dans la pathologie (Domingo *et al.*, 1994; Itaya *et al.*, 2002; Jakob *et al.* 1997; Tessitori *et al.*, 2007; Wassenegger *et al.*, 1994). Ainsi, l'influence du viroïde sur le niveau cellulaire de certaines protéines de l'hôte pourrait causer la maladie.

Les viroïdes interagissent aussi avec les protéines de la plante, certaines pouvant être impliquées dans la dissémination du viroïde au sein de l'hôte et d'autres dans les symptômes. Par exemple, il a été démontré que CsPP2, une lectine du phloème de concombre qui parcourt de longues

distances dans la plante, lie *in vivo* HSVd (Gómez et Pállas, 2004). Aussi, une étude a montré l'interaction spécifique *in vivo* entre le PSTVd et Virp1, un régulateur de la transcription associé au remodelage de la chromatine (Martinez de Alba *et al.*, 2003). Il a plus tard été démontré que Virp1 est nécessaire à la réplication de PSTVd (Kalantidis *et al.*, 2007).

Il est aussi possible que les viroïdes oeuvrent via une interaction avec l'ARN de l'hôte, activant ainsi les mécanismes d'atténuation de l'ARN (*RNA silencing*) qui régulent l'expression des gènes. En effet, suite à l'infection par différents viroïdes, une accumulation de petits ARN responsables de ce phénomène, les petits ARN interférents (siARN), a été observée à plusieurs reprises (Itaya *et al.*, 2001; Landry *et al.*, 2004; Machida *et al.*, 2007; Markarian *et al.*, 2004; Martinez de Alba *et al.*, 2002; Matousek *et al.*, 2007; Papaefthimiou *et al.*, 2001). On sait aussi que certains de ces agents pathogènes peuvent servir de substrat à Dicer, une enzyme de l'hôte impliquée dans les premières étapes de l'interférence à l'ARN (RNAi) (Landry et Perreault, 2005), sans toutefois diminuer les symptômes (Matousek *et al.*, 2007). En fait, les viroïdes semblent eux même résistants au mécanisme d'interférence à l'ARN via leur forte structure secondaire (Itaya *et al.*, 2007).

Bien que beaucoup de travaux cherchent à éclaircir le mécanisme utilisé par les viroïdes pour créer des symptômes, il reste certainement beaucoup de travail à faire avant de confirmer laquelle des hypothèses s'avère la bonne. Il n'est pas exclu que celles-ci soient combinées ou différentes selon l'espèce étudiée.

D'ailleurs, la pathogénicité d'un viroïde peut différer au sein même d'une espèce selon le variant. Plus précisément, chez plusieurs espèces,

certaines mutations d'aussi peu que 1 à 6 nucléotides peuvent transformer radicalement les symptômes observables (De la Pena *et al.*, 1999; De la Pena et Flores, 2002; Gago *et al.*, 2005; Gross *et al.*, 1981; Reanwarakorn et Semancik, 1998; Sano *et al.*, 1992; Schnell *et al.*, 2001; Semancik et Szychowski, 1994; Serra *et al.*, 2008; Visvader et Symons, 1986; Wassenegger *et al.*, 1996).

A.3 Modes de réplication

Afin de causer toute cette variété de symptômes, le viroïde doit d'abord se répliquer efficacement au sein de l'hôte. De par leur nature circulaire, les viroïdes se répliquent selon le mode de réplication en cercle roulant. Les matrices circulaires de polarité positive, sont transcrites en multimères de polarité négative. Ceux-ci peuvent soit être clivés puis ligaturés en unité circulaire permettant la polymérisation de brins de polarité positive telle que décrite (symétrique), ou être utilisés directement pour la transcription de multimères de polarité positive qui eux devront être clivés puis circularisés (asymétrique) (Figure 2). Cette méthode de réplication est donc indépendante de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et permettra la détection d'unités multimériques (Branch et Robertson, 1984; Grill et Semancik, 1978), alors que le mode symétrique se distingue par la détection d'intermédiaires circulaires de polarité négative. Suite à l'observation de l'accumulation de transcrits matures et d'intermédiaires de réplication, il a été établi que l'endroit dans la cellule où on observe le plus de viroïdes est également l'endroit où se situe la réplication (Navarro *et al.*, 1999; Spiesmacher *et al.*, 1983). Le lieu ainsi que le

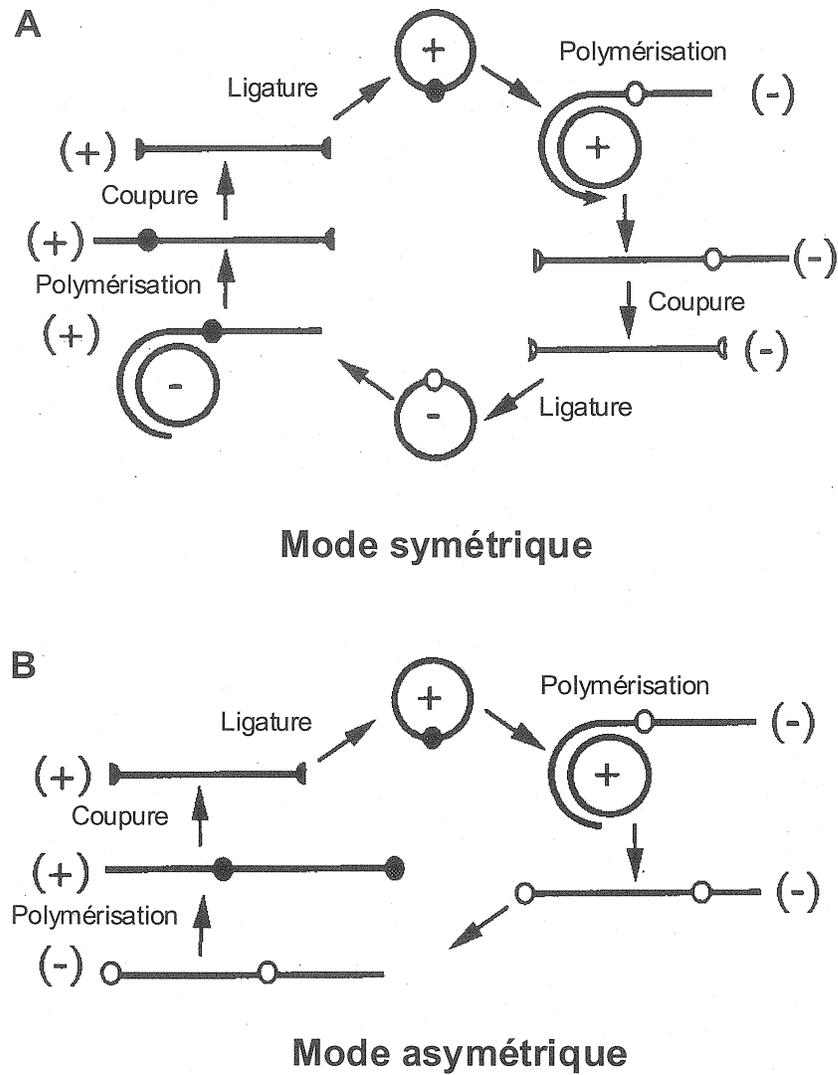


Figure 2 : Mode de répllication en cercle roulant symétrique (A) et asymétrique (B). La polarité des brins est indiquée entre parenthèses et les cercles représentent les sites de coupures pour la polarité + (noir) et polarité - (blanc).

mode précis de réplication différent entre les familles de viroïdes

A.4 Classification

Les deux familles de viroïdes, divisées en plusieurs sous-familles, regroupent la trentaine de quasi-espèces découvertes, pour lesquelles plusieurs variants ont généralement été recensés (Rocheleau et Pelchat, 2006) (Figure 3). On qualifie les viroïdes de quasi-espèces en raison de la variation génétique retrouvée au sein d'un même isolat suite à l'inoculation d'une seule souche (Gandia *et al.*, 2005). Leur classification a été effectuée selon leurs caractéristiques physiques, telles que leur structure secondaire, leur localisation cellulaire (nucléaire ou chloroplastique) et leur mode de réplication (asymétrique ou symétrique).

A.4.1 *Pospiviroidae*

La structure en forme de bâtonnet des *Pospiviroidae* contient cinq domaines : les boucles terminales de gauche et de droite (TG et TD) la région de pathogénicité (P), la région variable (VAR) et la région centrale conservée (RCC) (revus dans Diener, 1993) (Figure 4). Les 30 espèces connues de *Pospiviroidae* sont divisées en 5 sous-familles (Figure 3). Il a été démontré par fractionnement cellulaire (Harders *et al.*, 1989) et par hybridation *in situ* soutenue par microscopie confocale et électronique (Bonfiglioli *et al.*, 1996; Qi et Ding, 2003) qu'on retrouve les *Pospiviroidae* surtout au noyau. Leur réplication en cercle roulant (RCR) se fait donc au noyau, de manière

VIROÏDES

Avsunviroidae

Avsunviroïde	Avocado sunblotch viroid (ASBVd)
Pelamoviroïdes	Peach latent mosaic viroid (PLMVd) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)
Elaviroïde	Eggplant latent viroid (ELVd)

Pospiviroidae

Pospiviroïdes	Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) Citrus exocortis viroid (CEVd) Columnea latent viroid (CLVd) Iresine viroid (IrVd) Mexican papita viroid (MPVd) Potato spindle tuber viroid (PSTVd) Tomato apical stunt viroid (TASVd) Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) Tomato planta macho viroid (TPMVd)
Hostuviroïdes	Hop stunt viroid (HSVd)
Cocadviroïdes	Citrus viroid IV (CVd-IV) Coconut cadang-cadang viroid (CCCVd) Coconut tinangaja viroid (CTiVd) Hop latent viroid (HLVd)
Apscaviroïdes	Apple scar skin viroid (ASSVd) Apple fruit crinkle viroid (AFCVd) Apple dimple fruit viroid (ADFVd) Australian grapevine viroid (AGVd) Citrus bent leaf viroid (CBLVd) Citrus viroid III (CVd-III) Citrus viroid-LSS (CVd-LSS) Citrus viroid-OS (CVd-OS) Japanese citrus viroid (JCVd) Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1) Grapevine yellow speckle viroid 2 (GYSVd-2) Pear blister canker viroid (PBCVd)
Coleviroïdes	Coleus blumei viroid (CbVd) Coleus blumei viroid 1 (CbVd-1) Coleus blumei viroid 2 (CbVd-2) Coleus blumei viroid 3 (CbVd-3)

Figure 3 : Classification des viroïdes en familles, sous-familles et espèces.

asymétrique (Branch *et al.*, 1981; Branch *et al.*, 1988; Feldstein *et al.*, 1998; Owens et Diener, 1982).

Il semble que la réplication des *Pospiviroidae* nécessite une enzyme de l'hôte pour chacune des étapes catalytiques, c'est-à-dire la polymérisation, le clivage et la ligature. L'observation de l'inhibition de la réplication par l' α -amanitine, un inhibiteur spécifique de l'ARN polymérase II (une ARN polymérase ADN dépendante) montre que cette enzyme est responsable de la polymérisation des *Pospiviroidae* (Flores et Semancik, 1982; Münhlbach et Sängler, 1979; Rackwitz *et al.*, 1981; Schindler et Mühlbach, 1992). De plus, il a été montré que sa grande sous-unité s'associe *in vivo* à un viroïde membre de cette famille, le CEVd (Warrilow et Symons, 1999). L'initiation de la réplication *in vivo* sur PSTVd semble se faire spécifiquement au sein du domaine TG (Kolonko *et al.*, 2006), alors que le domaine TD modulerait l'efficacité de réplication du CEVd et du HSVd (Sano et Ishiguro, 1998). Il a été démontré que, *in vitro*, la ribonucléase (RNase) T1 peut cliver les multimères en monomères de façon spécifique (Tsagris *et al.*, 1991). Aussi, on sait que l'ARN ligase de germe de blé peut quant à elle s'occuper de la circularisation des unités ainsi séparées (Branch *et al.*, 1982; Konarska *et al.*, 1981; Konarska *et al.*, 1982; Lafontaine *et al.*, 1995). Cependant, l'étude *in vivo* des extrémités des monomères linéaires de CEVd suggère qu'une RNase de type III catalyse le clivage de ce viroïde alors qu'une ligase distincte de la ligase des ARN de transfert (ARNt) s'occupe de ligaturer ces extrémités (Gas *et al.*, 2008). Enfin, on sait que les transcrits du PSTVd sont clivés et ligaturés dans des suspensions cellulaires de plants de pommes de terre non infectés (Baumstark et Riesner, 1995)

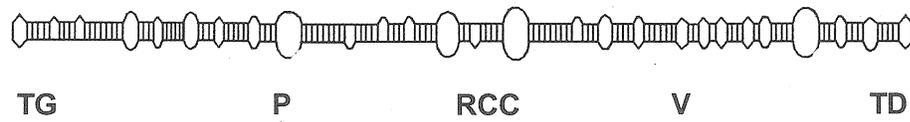


Figure 4 : Structure secondaire des *Pospiviroidae*. Représentation schématique de la structure de PSTVd avec les 5 domaines caractéristiques aux viroïdes de la famille des *Pospiviroidae*.

A.4.2 *Avsunviroidae*

Les membres de la famille des *Avsunviroidae* sont beaucoup moins nombreux, on en connaît quatre. Ils sont séparés en trois sous-familles (avsunviroïde, pelamoviroïde et elaviroïde) selon leurs caractéristiques physiques (Figure 3). Des études utilisant l'hybridation *in situ* et la détection des intermédiaires de réplication par buvardage de type Northern ont montré que les *Avsunviroidae* se répliquent au chloroplaste de façon symétrique (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Bussière *et al.*, 1999; Daros *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994)

La caractéristique principale des *Avsunviroidae* est l'utilisation d'une région d'ARN autocatalytique qui assure deux des trois étapes de leur cycle de vie. Ce motif particulier, appelé motif en tête de marteau (*hammerhead*), adopte une structure tridimensionnelle qui permet l'autocoupure des multimères des *Avsunviroidae* suivi de l'autoligature des monomères. Les viroïdes appartenant à cette famille peuvent se répliquer par un mécanisme en cercle roulant symétrique puisque les deux polarités de leur génome possèdent le motif en tête de marteau (Flores *et al.*, 2004). Des études de séquençage à grande échelle suggèrent que les nucléotides impliqués dans la formation du motif en tête de marteau démontrent des mutations compensatoires qui serviraient à maintenir la structure stable du motif (Fekih Hassen, 2007; Navarro et Flores, 1997; Pelchat *et al.*, 2000). Le fait que très peu de multimères soient détectables *in vivo*, laisse croire que la coupure par le *hammerhead* est très efficace (Bussière *et al.*, 1999; Navarro et Flores, 1997). La présence d'un lien phosphodiester 2'-5' détecté *in vitro* (Lafontaine *et al.*, 1995) et *in vivo* (Côté *et al.*, 2001), démontre l'activité d'autoligature

puisque les ligases protéiques connues forment toujours des liens phosphodiester 3'-5'. L'étape la plus importante du cycle de réplication des *Avsunviroidae*, c'est-à-dire la réplication, doit se faire par une ARN polymérase qui se retrouve dans les chloroplastes. Certaines évidences pointent vers une ARN polymérase d'une seule sous-unité encodée au noyau (NEP) pour remplir ce rôle, notamment dans le cas de ASBVd (Navarro et Flores, 2000; Navarro *et al.*, 2000). Par contre, dans le cas de viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd), il est suggéré que ce soit plutôt une ARN polymérase possédant plusieurs sous-unités et encodée dans le plaste (PEP) qui permet la réplication du viroïde (Pelchat *et al.*, 2001). Enfin, il n'est pas exclu qu'une des nombreuses ARN polymérase dépendantes de l'ARN (RdRp) de plante soit impliquée dans la réplication des *Avsunviroidae*, bien qu'aucune d'entre elle n'ait été localisée au chloroplaste.

Étant donné la forme circulaire des viroïdes, on peut s'attendre à ce que la réplication de ceux-ci puisse débuter n'importe où sur leur génome. Cependant, la nécessité de recruter une polymérase de l'hôte suggère qu'il existe un site spécifique pour l'initiation de la réplication. Un consensus a difficilement été établi pour les *Avsunviroidae*, dont le PLMVd.

B. PLMVd

PLMVd est un des viroïdes modèles sur lequel le plus de travaux ont été publiés. Sa structure particulière ainsi que sa grande efficacité catalytique ont particulièrement attiré l'attention des chercheurs. Aussi, les dommages qu'il a causés dans les vergers de pêcher sont considérables.

B.1 Séquence

Généralement, le génome de PLMVd est composé de 336 à 338 nt. On connaît cependant certains variants qui contiennent une insertion de 11 à 14 nt (Malfitano *et al.*, 2003) qui peuvent adopter une alternative de deux structures en tige grâce à leur palindrome (Fekih Hassen *et al.*, 2007). PLMVd fait parti de la famille de pelamoviroïde avec le *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) (Navarro et Flores, 1997). PLMVd adopte une structure branchée, possédant 11 tiges (P) et 11 boucles (L) (Figure 5), qui a la caractéristique de le rendre insoluble dans une solution de chlorure de lithium 2 M (Navarro et Flores, 1997). Cette structure secondaire a été démontrée à l'aide de cartographie aux ARNases (Bussièrre *et al.*, 2000) et à des études de co-variations faites sur une large banque de séquences (Pelchat *et al.*, 2000). Ces variations sont explicables par le haut degré de polymorphisme observable suite à l'infection d'un plant sain avec PLMVd (Ambros et Flores, 1998; Ambros *et al.*, 1999; Fekih Hassen *et al.*, 2007; Hernandez et Flores, 1992; Malfitano *et al.*, 2003; Rodio *et al.*, 2006; Shamloul

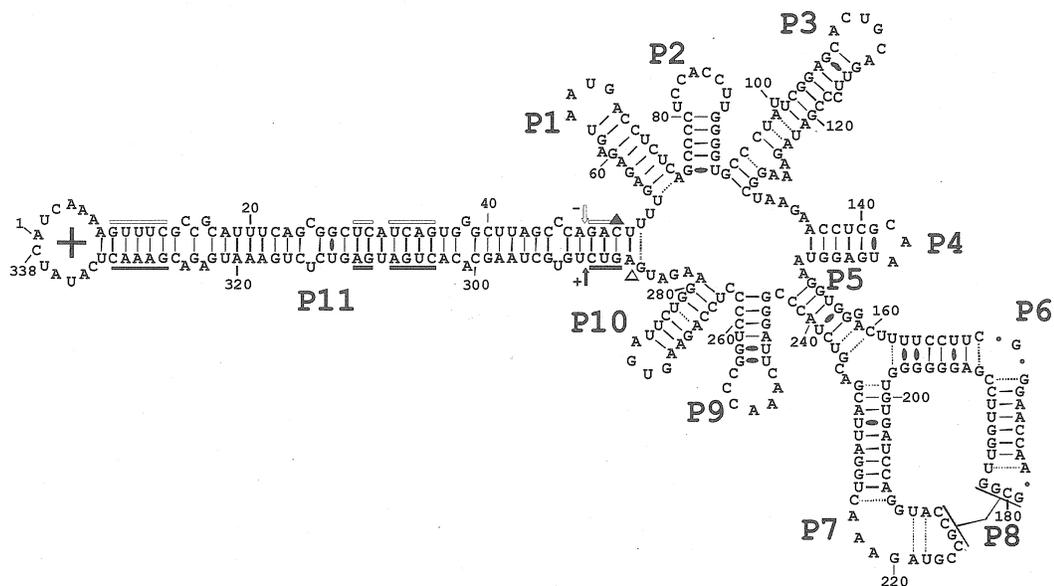


Figure 5 : Séquence et structure secondaire de PLMVd. Les paires de bases Watson-Crick sont indiquées par un trait plein, les paires de bases GU de type Wooble sont représentées par des ovales noirs alors que les paires de bases Watson-Crick instables ou pour lesquelles les formes simple brin et double brin peuvent coexister sont illustrées par des lignes pointillées. Les rectangles vides et pleins représentent les séquences conservées des motifs catalytiques en tête de marteau pour la polarité négative et positive respectivement. Les flèches vides et pleines montrent les sites de coupure du motif *hammerhead* pour la polarité négative et positive respectivement. Les triangle vide et plein identifient les sites d'initiation de la réplication rapportés *in vivo* pour la polarité négative et positive respectivement. Les régions tiges-boucles de la structure branchée de PLMVd sont identifiées de P1 à P11

et al., 1995). Il a été observé que l'hétérogénéité de PLMVd n'est pas répartie également sur la molécule. Par exemple, les tiges P2 à P5 ainsi que la tige P8 semblent moins variables que les autres régions du génome (Fekih Hassen *et al.*, 2007). Il est surprenant de constater que les nucléotides formant le motif en tête de marteau peuvent aussi être très variables tout en maintenant l'activité catalytique de la molécule (Ambros et Flores, 1998; Fekih Hassen *et al.*, 2007). D'autant plus que ce motif joue un rôle central dans la réplication de PLMVd.

B.2 Mode de réplication

Le site d'initiation de la réplication de PLMVd a été difficile à identifier. Il semblerait qu'*in vitro* la portion terminale gauche de la P11 contienne ce site (Pelchat *et al.*, 2002) alors qu'*in vivo* ce dernier apparaît plutôt situé dans la partie terminale droite (Delgado *et al.*, 2005). Un SELEX (Évolution systématique de ligand par enrichissement exponentiel) a permis de trouver un promoteur en ARN pour l'ARN polymérase (ARNP) de *Escherichia coli* qui se retrouve également dans le génome de PLMVd (Motard *et al.*, 2008). L'ARNP utilisé pour ce SELEX se rapproche de la PEP qui est une des enzymes potentiellement responsable de la réplication de PLMVd. Malheureusement, cette hypothèse n'a pu être confirmée par des observations *in vivo*. Il est aussi fort probable qu'il existe plus d'un site d'initiation de la réplication pour PLMVd et comme l'enzyme responsable de la réplication *in vivo* de PLMVd est encore inconnue, il est impossible de faire les expériences *in vitro* nécessaires pour résoudre ce mystère.

Il faudra pourtant identifier l'enzyme responsable de la réplication de ce pathogène pour mieux comprendre sa pathogénicité.

B.3 Pathogénicité

Il faut noter que les pêchers (*Prunus persica*) ne sont pas les seuls hôtes potentiels de PLMVd. On l'a aussi identifié chez l'abricotier (*Prunus armeniaca*), le prunier (*Prunus domestica*), le cerisier cultivé (*Prunus avium*), le poirier cultivé (*Pyrus communis*), le poirier sauvage (*Pyrus amygdaliformis*), l'abricotier du Japon (*Prunus mume*) et l'amandier (*Prunus amygdalus*) (Faggioli *et al.*, 1997; Fekih Hassen *et al.*, 2004; Fekih Hassen *et al.*, 2005; Guinchedi *et al.*, 1998; Hadidi *et al.*, 1997; Kyriakopoulou *et al.*, 2001; Osaki *et al.*, 1999; Pelchat *et al.*, 2000). Mais, le PLMVd a d'abord été identifié comme étant le pathogène responsable de la mosaïque latente du pêcher (Desvignes, 1986) qui a été décrite pour la première fois en 1976 (Desvignes, 1976). On dit que cette maladie est latente puisque, pour la plupart des variants, les symptômes apparaissent deux ans après l'infection. On peut alors observer un retard dans la floraison, la foliation et le mûrissement des fruits, la déformation des fruits, la nécrose des bourgeons, un vieillissement prématuré des arbres et la chlorose, la décoloration et la nécrose des feuilles (Desvignes, 1986; Llacer, 1998; Malfitano *et al.*, 2003). Ces symptômes sont généralement instables et même réversibles. Au niveau cellulaire, le PLMVd cause une augmentation de la quantité d'eau et une diminution de la quantité de sucre, du nombre de chloroplastes et de la quantité de lumière absorbée (Jakob *et al.*, 1997). Les symptômes peuvent être très différents d'un plant à l'autre

selon la séquence du variant de PLMVd. Par exemple, une insertion de 11 à 14 nt peut causer le calicot du pêcher (PC), caractérisé par une chlorose extrême des feuilles et des marbrures sur les fruits (Blodgett, 1944; Willison, 1946), alors qu'une insertion différente rend le viroïde latent (Rodio *et al.*, 2006).

Il a été démontré que le motif d'ARN en tête de marteau contenu dans la séquence du génome de PLMVd n'est pas la cause des symptômes. En effet, on sait que son activité en *trans*, c'est-à-dire sa capacité à cliver une autre molécule que lui-même, est très faible. De plus, aucune séquence chloroplastique pouvant lui servir de substrat n'a été identifiée (Côté, 2000). Enfin, l'augmentation des petits ARN impliqués dans le phénomène de l'interférence à l'ARN a été observée suite à l'infection par PLMVd dans tous les cultivars de pêcher testés (Landry *et al.*, 2004), ce qui semble indiquer que c'est grâce au mécanisme d'interférence à l'ARN que les pêchers sont protégés de l'infection par les viroïdes.

C. Interférence à l'ARN

C.1 Historique

L'interférence à l'ARN, ou *post-transcriptionnal gene silencing* (PTGS), a été découverte de façon fortuite au début des années 1990. Des chercheurs voulant étudier l'effet de la surexpression de gènes de la pigmentation des pétunias sont à l'origine de cette découverte qui s'avéra être une révolution dans le domaine de la biologie moléculaire (Napoli *et al.*, 1990; van der Krol *et*

al., 1990). Ils furent surpris de constater que la majorité des plants transformés ne montraient aucun phénotype particulier, alors que pour 25% d'entre eux il y avait une baisse de la pigmentation, ce qui allait à l'encontre des résultats attendus. De plus, la faible coloration des plants transformés était accompagnée d'une diminution de l'expression des gènes étudiés (van der Krol *et al.*, 1990). Après quelques années passées à réfuter plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce phénomène, les scientifiques se sont rendus compte en 1998, à la suite d'observations faites chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998), les plantes (Waterhouse *et al.*, 1998), les insectes (Kennerdell et Carthew, 1998) et les protozoaires (Ngo *et al.*, 1998), que la présence d'ARN double brin déclenchait l'ARN interférence (revue dans Eamens *et al.*, 2008). L'année suivante, soit en 1999, la production de petits ARN d'environ 25 nt de long, spécifiques à la séquence des gènes dont l'expression était inhibée a été démontrée dans des plantes (Hamilton et Baulcombe 1999). À partir de ce moment, l'étude de l'interférence à l'ARN n'a cessé de croître. Entre autres, de nouveaux organismes exhibant le mécanisme d'interférence à l'ARN, tel la grenouille (Oelgeschlager *et al.*, 2000), la souris et l'humain (Svoboda *et al.*, 2000; Chiu et Rana 2002) sont découverts. Dicer, la protéine responsable du clivage des ARN double-brin, chez la drosophile (Bernstein *et al.*, 2001), de même que ses quatre homologues, *Dicer-like1* à 4 (DCL1-DCL4), chez *Arabidopsis thaliana* (Finnegan *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2004; Margis *et al.*, 2006) et la protéine ARGONAUTE1 (AGO1), qui utilise les petits ARN guides pour cibler les ARN messagers (ARNm) complémentaires à couper chez *Arabidopsis*, ont aussi été caractérisés (Baumberger et Baulcombe, 2005). Avec l'identification

d'AGO1, un mécanisme simpliste de l'interférence à l'ARN chez *Arabidopsis* pouvait être décrit comme suit : reconnaissance d'un ARN double-brin (db) par une des DCL et coupure en duplex de petits ARN interférents (siARN) d'environ 21-25 nt dont un des brins, appelé le brin guide, sera utilisé par AGO1 pour cibler et dégrader un ARNm. À ce jour, on en connaît maintenant beaucoup plus sur l'interférence à l'ARN chez les plantes et on peut en dresser un portrait plus détaillé.

C.2 Interférence à l'ARN chez les plantes

La complexité de l'interférence à l'ARN chez les plantes est mise en évidence par la présence de quatre membres de la famille protéique des DCL, dix de la famille de AGO, six de la famille des ARN polymérasés dépendantes de l'ARN (RdRp) et cinq de la famille des protéines à domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBP) encodés dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Toutes ces protéines font parties des voies d'interférence à l'ARN parallèles qui remplissent plusieurs rôles importants dans les plantes tels que, le contrôle de l'expression de gènes de développement, la répression de l'activité d'éléments génétiques répétés et la protection du génome contre les virus ou les ARN envahissants. Toutes ces voies sont représentées dans la figure 6.

Il y a tout d'abord la voie des micro-ARN (miARN) qui englobe deux catégories : les petits ARN interférents (siARN), qui proviennent de longs ARN parfaitement double-brin, et les miARN qui sont encodés par les gènes MIR et transcrits par la polymérase II (Pol II) qui se replie sur eux-mêmes pour

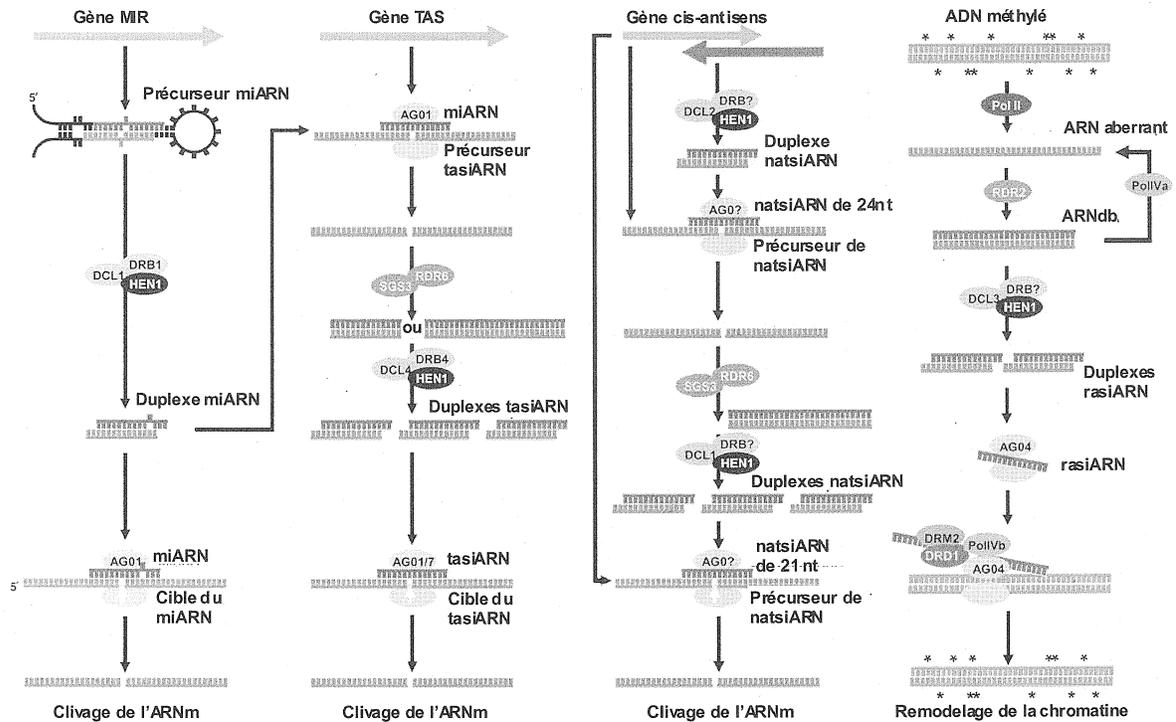


Figure adapté de Eamens et al., 2008

Figure 6: Résumé des voies d'interférence à l'ARN chez les plantes. Représentation schématique des différentes voies parallèles d'interférence à l'ARN dépendantes des DCL et des petits ARN non-codants (ARNnc) chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les différentes étapes importantes des mécanismes d'interférence à l'ARN sont indiquées et les protéines mentionnées dans le texte sont indiquées.

former des structures tige-boucles double-brin imparfaites. Les précurseurs de miARN (pri-miARN) sont clivés au noyau par DCL1 avec l'aide de la protéine HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1) ce qui produit des précurseurs plus courts, les pré-miARN (Lu et Fedoroff, 2000). Un deuxième clivage par le complexe DCL1-HYL1 libère un duplex d'ARN dont les deux extrémités 3' sont saillantes de 2 nucléotides (Vazquez *et al.*, 2004). HUA ENHANCER1 (HEN1), une méthyl-transférase, vient ensuite méthyler ces deux extrémités, possiblement pour protéger les miARN contre la dégradation, (Chen *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005) avant que le duplex ne soit exporté du noyau. La sortie du noyau peut se faire avec l'aide de HASTY (HST), un orthologue de l'Exportine-5 de la drosophile, ou de façon indépendante (Park *et al.*, 2002). Une fois au cytoplasme, le micro-ARN simple-brin mature est chargé sur AGO1 qui est la protéine centrale du complexe de silençage induit par l'ARN (RISC) (Hutvagner et Simard, 2008). Généralement, chez les plantes, le RISC réprime l'expression des gènes en clivant les ARNm complémentaires aux miARN. Ce mécanisme est différent de celui utilisé chez les mammifères et les insectes, où les miARN sont souvent partiellement complémentaire aux régions non-traduites (UTR) en 3' des ARNm. Dans ces cas, le RISC se lie sur les ARNm et empêche leur traduction sans toutefois entraîner leur dégradation (Mallory et Vaucheret, 2006).

Une deuxième voie a été découverte lorsque deux miARN ont révélé un autre niveau de complexité au développement normal des plantes (Axtell *et al.*, 2007). Ces micro-ARN sont produits de la même façon que décrite précédemment, mais plutôt que de servir à cliver une cible, ces petits ARN servent d'amorce pour la synthèse d'ARN double-brin par l'ARN polymérase

ARN dépendant 6 (RDR6) aidé de la protéine SGS3 (Figure 6). L'ARN db produit est ensuite clivé régulièrement à tous les 21 nt par DCL4 avec l'aide de DRB4. Les petits ARN ainsi produits sont nommés siARN agissant en *trans* (tasiARN). Ce mécanisme permet d'amplifier le nombre de siARN ciblant un ARN particulier ce qui augmente grandement le potentiel répressif d'un siARN. On sait que plusieurs éléments répondant aux auxines impliquées dans le développement des plantes sont régulés de cette façon (Howell *et al.*, 2007).

La troisième voie implique des paires de gènes naturellement antisens (Figure 6). Il est connu que la région 3' de l'ARN d'un gène encodé sur un brin d'ADN peut être complémentaire à la région 3' de l'ARN d'un gène encodé sur l'autre brin d'ADN (Borsani *et al.*, 2005). L'ARN double-brin ainsi formé est alors clivé par DCL2 pour former un siARN naturel (natsiARN) de 24 nt. Ce natsiARN guide alors le clivage de l'ARN de l'un des gènes de départ et entraîne la formation de longs ARN double-brins par la voie des tasiARN à la différence que cette fois c'est DCL1 qui est responsable de la production des siARN de 21 nt.

La dernière voie de régulation de l'expression des gènes par des petits ARN est différente des précédentes puisqu'elle contrôle l'expression des gènes au niveau transcriptionnel (TGS) par un mécanisme épigénétique impliquant la méthylation de l'ADN (Figure 6). Cette voie, nommé méthylation de l'ADN dirigé par l'ARN (RdDM), cible particulièrement les régions d'ADN répétées tel les transposons (Wassenegger, 2005). Il semblerait que l'ADN méthylé puisse servir de matrice pour la production d'ARN aberrant par la Pol II, RDR2 ou la polymérase IVa (Pol IVa), spécifique aux plantes. Cet ARN aberrant est ensuite convertit en ARN double-brin par RDR2 ou Pol IVa pour

produire plus d'ARN aberrants (Vaucheret, 2005). DCL3 entre alors en action et clive les ARN aberrants en segments de 24 nt, appelés siARN associés aux répétitions (rasiARN), qui sont méthylés par HEN1 et utilisés par AGO4 pour médier la méthylation de l'ADN de façon séquence-spécifique avec l'aide de DRD1, DRM2 et une forme alternative de la Pol IV, Pol IVb (Cao *et al.*, 2003; Zilberman *et al.*, 2003; Kanno *et al.*, 2004; Kanno *et al.*, 2005). Par la suite, deux protéines sont responsables du maintien de la méthylation, MET1 et CMT3.

On constate qu'à plusieurs endroits, il y a une possibilité que ces voies de régulation s'entrecroisent, ce qui augmente le niveau de complexité et de précision avec lesquelles les plantes peuvent moduler l'expression de leurs gènes. On remarque aussi que, par leur nature, les viroïdes peuvent intervenir dans ces mécanismes.

C.3 Interférence à l'ARN et viroïdes

Les chercheurs ont rapidement voulu savoir si les plantes se protègent contre les viroïdes grâce au phénomène du PTGS. La présence de petits ARN d'environ 25 nt homologues à un viroïde a d'abord été démontré chez des plants de tomates infectés par PSTVd (Itaya *et al.*, 2001). La même démonstration a été faite pour les membres de la famille des *Avsunviroidae* PLMVd, CChMVd (Martinez deAlba *et al.*, 2002) et ASBVd (Markarian *et al.*, 2004). Ces petits ARN peuvent être une réponse des plantes à l'infection par des viroïdes. Ces derniers n'étant pas encapsidés ils sont alors très vulnérables au PTGS lorsqu'ils se retrouvent dans le cytoplasme pour se

propager d'une cellule à l'autre et devraient donc être éliminés. Cependant, dans les mêmes études ayant montré l'accumulation des siARN dans les plants infectés par des viroïdes, il a souvent été constaté que le titre des viroïdes variait peu même si la quantité de siARN augmentait. Il a été supposé que la structure secondaire très compacte et très stable des viroïdes, de même que leur accumulation au noyau ou aux chloroplastes, les protège contre le PTGS. Suite à ces observations, une hypothèse intéressante a été soulevée : les siARN produits en réponse à l'infection par un viroïde peuvent être la cause des symptômes observés chez les plantes. Cette suggestion est basée sur la possibilité qu'une région de plusieurs nucléotides consécutifs du génome d'un viroïde puisse avoir une homologie avec un ARNm de la plante infectée. Ce qui est tout à fait possible d'autant plus qu'on sait maintenant que la complémentarité entre un siARN et sa cible n'a pas besoin d'être parfaite. C'est ce qu'a vérifié le groupe de Waterhouse en construisant des plants de tomates transgéniques exprimant des parties du génome de PSTVd formant des structures tige-boucles pouvant être reconnues par le mécanisme de PTGS et des plants contrôles qui expriment des parties du génome de PSTVd linéaires (Wang *et al.*, 2004). Seuls les plants dans lesquels le génome de PSTVd pouvait être reconnu par Dicer ont montré des symptômes. Il semble donc plausible que les siARN dérivés de viroïdes causent des symptômes chez les plants infectés. Parallèlement, une étude faite chez le tabac a permis de démontrer que des siARN homologues à PSTVd pouvaient diriger la méthylation de l'ADN d'un transgène contenant une fusion d'une partie du génome de PSTVd et le gène encodant la protéine fluorescente verte (GFP), cependant la méthylation de l'ADN était limitée à la région contenant la

séquence de PSTVd (Vogt *et al.*, 2004) suggérant que les siARN provenant d'un viroïde peuvent entraîner seulement la méthylation d'une région de l'ADN homologue à la séquence du viroïde. Quelques années plus tard, des chercheurs ont constaté que la structure secondaire de PSTVd était un déclencheur de l'ARN interférence. Ils ont suggéré cependant, que cette même structure permet à PSTVd de résister au clivage par le complexe RISC (Itaya *et al.*, 2007). Cette hypothèse est supportée par des observations faites dans des plants de *Nicotiana benthamiana* transformés pour pouvoir exprimer HSVd où il semblerait que la forme mature et circulaire du viroïde, mais pas les formes linéaires, peuvent résister à l'interférence à l'ARN (Gómez et Pállas, 2007). Une autre étude propose que CEVd active une voie endogène qui régule négativement l'activité d'interférence à l'ARN (Tessitori *et al.*, 2007). Par la suite, une étude de caractérisation des petits ARN dérivés de CEVd chez la tomate a permis de constater qu'une enzyme semblable à Dicer (DCL) était responsable du clivage du viroïde et que cela n'affectait pas la voie endogène des miARN (Martín *et al.*, 2007). Malheureusement, cette étude n'était pas faite chez un hôte naturel de CEVd. Il a aussi été démontré que l'infection d'un plant de tomate avec PSTVd permettait l'accumulation de petits ARN de 21 et 24 nt de façon successive chez cette plante (Machida *et al.*, 2007). Du côté des *Avsunviroidae*, il a été démontré *in vitro* que la tige P11 de la structure secondaire de PLMVd peut être reconnue et clivée par une préparation commerciale de Dicer (Landry et Perreault, 2005). En 2008, il a été suggéré que les viroïdes des deux familles peuvent être coupés par les enzymes DCL et que les petits ARN produits suite à ces coupures sont incorporés dans le RISC dans le but de réprimer l'expression des viroïdes *in*

vivo (Carbonell *et al.*, 2008). Les auteurs de l'article suggèrent aussi que la structure secondaire des viroïdes est un compromis entre la résistance aux DCL et au RISC (Carbonell *et al.*, 2008). Un groupe de chercheurs semble avoir fait le lien entre l'apparition de symptômes suite à l'infection par un viroïde et l'interférence à l'ARN (Gómez *et al.*, 2008). Ils ont démontré que les plants de *Nicotiana benthamiana* qui n'exprimaient pas la protéine RDR6 (une ARN polymérase dépendante de l'ARN impliquée dans l'interférence à l'ARN) n'avaient pas de symptôme lorsqu'ils étaient infectés par HSVd contrairement aux plants normaux (Gómez *et al.*, 2008).

La caractérisation des petits ARN produits en réponse à l'infection par un viroïde permettrait de mieux comprendre comment les plantes tentent de se protéger contre ce type de pathogène. Elle pourrait aussi renseigner sur la façon dont les viroïdes évadent ces mécanismes de défense et comment ils peuvent causer des symptômes chez leurs hôtes. Cette caractérisation a déjà été entamée chez les *Pospiviroidae* (Martin *et al.*, 2007), mais rien n'a encore été fait pour les *Avsunviroidae*.

D. Hypothèse

D.1 Contexte

L'interférence à l'ARN a deux rôles chez les plantes ; c'est un mécanisme de régulation séquence-spécifique de l'expression des gènes et un mécanisme de défense contre les ARN pathogènes. Des études ont démontré que les viroïdes déclenchent le RNAi chez leurs hôtes (Itaya *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004; Martinez deAlba *et al.*, 2002). Par contre, il semble que l'interférence à l'ARN ne permet pas d'éliminer les viroïdes contrairement à ce que l'on pourrait penser. (Gómez et Pállas, 2007; Itaya *et al.*, 2007). PLMVd est le membre de la famille de *Avsunviroidae* le plus étudié et il a été démontré que, suite à une infection par ce viroïde, le pêcher produit des petits ARN homologues à PLMVd (Landry *et al.*, 2004). Il est donc intéressant de caractériser les petits ARN produits en réponse à l'infection par PLMVd pour mieux comprendre comment ce pathogène résiste à l'interférence à l'ARN et s'il peut l'exploiter pour causer des symptômes chez le pêcher.

D.2 Objectifs

Dans l'optique de mieux comprendre les interactions entre PLMVd et le mécanisme d'interférence à l'ARN du pêcher les objectifs spécifiques suivants ont été identifiés :

1. Cloner et séquencer les petits ARN présents dans des plants de pêcher sains et infectés (Chapitre 1)
2. Caractériser les petits ARN produits par les pêchers (Chapitre 1)
3. Déterminer si des régions particulières du génome de PLMVd sont plus susceptibles à l'interférence à l'ARN (Chapitre 1)

Chapitre 1 : Caractérisation des petits ARN associés à l'infection de PLMVd

1.1 Article : Characterization of the siRNA associated with peach latent mosaic viroid infection

Patrick St-Pierre#, I. Fekih Hassen#, D. Thompson, J.P. Perreault

#Ces auteurs ont une contribution équivalente au travail

Article accepté dans Virology

Implication dans le travail

Imène Fekif Hassen est une stagiaire post-doctorale qui a mis au point le protocole de clonage des petits ARN et a cloné la moitié des siARN que nous avons obtenu. De mon côté, j'ai obtenu l'autre moitié des séquences présentées, j'ai préparé l'ensemble des figures et j'ai participé à la rédaction de l'article avec le docteur Perreault.

Abstract

The peach latent mosaic viroid (PLMVd) is a small, circular RNA species that has been shown to induce RNA silencing in plants. With the goal of better understanding the biological mechanism underlying this process, the siRNA found in PLMVd infected peach leaves were isolated and sequenced. Analysis of the resulting data prompted several conclusions, including: i. PLMVd strands of both polarities are substrates for the Dicer-like enzymes found in peach leaves; ii. the more highly structured regions of PLMVd trigger the activity of the Dicer-Like enzymes; and, iii. the circular PLMVd conformers appear to be favored for transport into the cytoplasm.

Keywords: Viroid; RNA Silencing; Post-transcriptional gene silencing; Sequencing; Small non-coding RNA

Abbreviations: DCL, Dicer-like; dsRNA, double-stranded RNA; ncRNA, non-coding RNA; PLMVd, peach latent mosaic viroid; PSTVd, potato spindle tuber viroid; PTGS, post-transcriptional gene silencing; RdRp, RNAdependent RNA polymerase; RISC, RNA-induced silencing complex; siRNA, small interfering RNA.

Introduction

Plants have developed a highly adaptable mechanism in order to protect themselves against exogenous RNAs such as viroids. This mechanism, called post-transcriptional gene silencing (PTGS), is induced by the presence of either double-stranded RNAs (dsRNA) or structured single-stranded RNAs [1]. These RNAs are cleaved into small interfering RNAs (siRNAs) 21 to 26 nucleotides (nt) in length by an RNase III-like enzyme, more specifically a Dicer-Like enzyme (DCL). siRNAs are incorporated into RNA-induced silencing complexes (RISC) and subsequently guide the sequence specific degradation of target mRNAs. In addition, siRNAs can serve as primers for an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), thereby causing an amplification phenomenon. Based on the detection of siRNAs of 21 to 25 nt in length, several viroids have been shown to induce PTGS [2-6]. Moreover, it has been suggested that the production of siRNAs from viroids could explain how these pathogens cause symptoms in their hosts [7].

In the case of peach latent mosaic viroid (PLMVd), characterization using wheat germ extract shed light on the silencing mechanism. First, it was shown that the long hairpin structure implicated in the replication of the viroid has the ability to preferentially trigger DCL enzyme(s) activity(ies), a much more likely situation than the highly improbable formation of a double-stranded RNA structure including PLMVd strands of both plus (+) and minus (-) polarities [8]. Second, these experiments showed that the RdRp could use siRNA as primers for the production of dsRNAs that should be susceptible to DCL activity, thereby leading to amplification of the RNA silencing

phenomenon as well as propagation of the PLMVd derived small RNA species [8].

Though these experiments were instructive, they were based on *in vitro* enzymatic assays, and, consequently, needed to be confirmed *in vivo*. With the goal of better understanding this silencing mechanism, a sequencing effort of the siRNAs associated with PLMVd infection in peach leaves was performed.

Results and Discussion

Leaves were collected from one healthy and one PLMVd-infected peach trees from both the west coast of Canada and the north of Tunisia (Tableau 1).

Tableau 1

Country	State	Number of small RNAs total	Number of unique small RNAs
Tunisia	Healthy	189	165
Tunisia	Infected	156	156
Canada	Healthy	128	112
Canada	Infected	142	128

After RNA extraction, PLMVd infection was confirmed by both RT-PCR amplification and Northern blot hybridization using a full-length PLMVd probe of either (+) or (-) polarity as described previously (data not shown) [9,10]. It is known that PLMVd replicates in chloroplasts via a symmetric rolling circle mechanism in which there are mainly linear monomers of both polarities, almost no detectable multimeric strands and only a small amount of circular monomers present [9]. Equivalent banding patterns were obtained for the

samples derived from the two infected peach trees. The content, in terms of PLMVd-related small ncRNAs which are the most likely to be siRNAs, was analyzed by Northern blot hybridization after fractionation of the RNA samples on denaturing 15% PAGE gels (Figure. 7A). Appropriate bands were detected only in the RNA samples isolated from infected leaves, in agreement with previous reports [4,5].

Characterization of the small ncRNA

In order to analyze the composition in terms of the small ncRNAs, more specifically that of the PLMVd-associated siRNAs, the RNA samples were fractionated on denaturing 15% PAGE gels, the bands possessing electrophoretic mobilities that corresponded to RNAs of 18 to 26 nt in length were cut out of the gel and the RNA extracted. After the addition of linkers to the ends of the purified ncRNAs, the resulting molecules were reverse transcribed, PCR amplified, multimerized and finally cloned into pGEM-T vector according to the procedure developed for microRNA sequencing [11]. A total of 615 unambiguous sequences (i.e. without any unspecified nucleotides) were obtained (see Tableau 1). It is not clear if the sequences found more than once represented a higher cellular abundance, or were the result of technical artifacts. In order to prevent any erroneous interpretations, all species were considered only once per sample in all subsequent analyses. This yielded a total of 561 different small RNA species, meaning that 9% of the original sequences were repeated (see Supplementary data). Initially, ncRNAs were analyzed as a function of their size. In the samples derived from the

healthy trees the 21 nt RNA species were found to be less abundant than those of 24 nt (19.7% versus 33.3%, respectively). Conversely, the 21 nt ncRNAs were slightly more abundant than the 24 nt ones in the samples derived from infected leaves (29.2% versus 26.8%) (Figure. 7B). This variation in the ncRNA levels was a good indication that the antiviral RNA silencing process, which produces 21 nt long ncRNAs, was active in PLMVd-infected leaves. Sequence homology searches were performed for each ncRNA found using the available *Arabidopsis thaliana* plant databases since the *Prunus persica* sequence is incomplete. Additional homology searches were performed using both the available viroid subviral and miRNA databases. In all cases, the sequences were considered to be homologous when three or less mismatches existed between an ncRNA and a given reported sequence (Figure. 7C). When sequence homologies were found for more than one RNA species, the higher homology was considered for unique assignment, if possible. Briefly, most of the ncRNAs retrieved do not have any known homologous sequences reported (i.e. >70%), reflecting the fact that to date none of the peach genomes (i.e. nuclear, plastid and mitochondrial) have been sequenced. Interestingly, we noted that the proportion of the rRNA sequences was relatively low regardless of the origin of the samples. This low proportion of rRNA is a good indication of the quality of the samples. If random degradation or contamination occurred during the preparation of the ncRNA libraries, a higher ratio of rRNA would be expected due to the fact that rRNA represents >80% of the total cellular RNA. We also detected a small but significant proportion that possessed homology to the mRNA and miRNA fractions, in addition to the fact that ~20% of the ncRNA sequences possessed

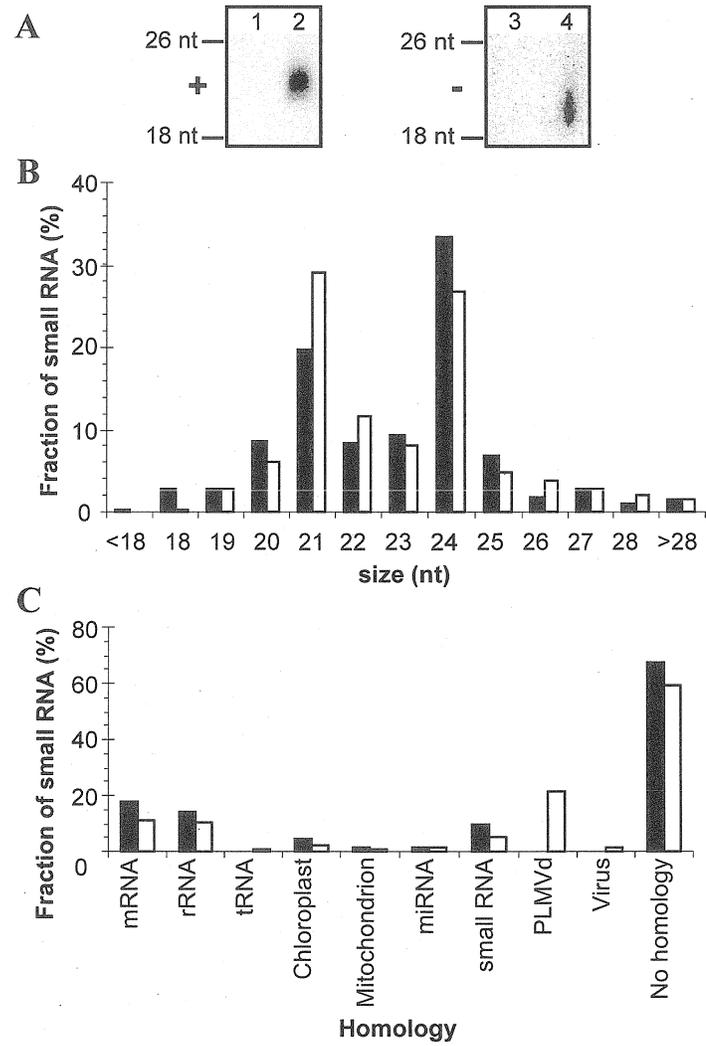


Figure. 7. Analysis of PLMVd-associated siRNA sequences and small ncRNAs retrieved in RNA samples extracted from peach leaves. (A) A representative autoradiogram of a Northern blot hybridization of RNA samples isolated from peach trees located on the West coast of Canada. RNA samples were fractionated on a denaturing 15% PAGE gel prior being transferred to a nylon filter. The hybridization was performed with ³²P-labelled PLMVd linear strands of either (-) or (+) polarity (i.e. left and right panels, respectively). Lanes 1 and 3 are RNA samples isolated from a healthy peach tree, while lanes 2 and 4 are RNA samples isolated from an infected peach tree. Only the portions showing the small RNA species are shown. Adjacent to the gel, the positions of the synthetic transcripts of 18 and 26 nt used as markers are indicated. (B) Histogram illustrating the size distribution of the sequenced small ncRNAs. (C) Representation of the small ncRNAs identities based on homology searches. In (B) and (C) the black and white bars represent the species retrieved from the healthy and PLMVd-infected RNA samples, respectively.

homology with reported DNA sequences (data not shown). A certain proportion of the small RNA sequences (~10%) exhibited homology to already reported sequences, suggesting conservation of small RNA species between organisms (Figure. 7C). Some sequences belong to two clusters, resulting in a total of 115% fractions when all are added up. For example, all miRNA were also part of the small RNA cluster. This type of result is typical of several other studies (e.g. see ref. [6]). Importantly, no PLMVd homologous sequences were retrieved from the samples derived from the healthy leaves supporting, once again, the integrity of the samples and confirming the results from the initial Northern blot hybridizations (Figure. 7A). Conversely, 20.5% of the ncRNA sequences retrieved from the infected samples were homologous to PLMVd sequences, confirming that RNA silencing was triggered by the viroid infection (i.e. 60 out of 293 ncRNA obtained from the infected samples). This percentage is higher than those reported for both Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and Citrus exocortis viroid (<5%), two viroids that accumulate in the nucleus [6,12]. Finally, no significant bias was observed in these analyses in terms of the origin of the sample (i.e. Tunisia or Canada).

PLMVd specific siRNAs

The majority of the PLMVd-derived siRNA sequences (75%) were perfectly complementary to reported PLMVd variants. Only 20% of these siRNAs exhibited a single point mutation and only 5% two mismatches. Because the level of homology between the siRNAs and the PLMVd variants is very high, it is unlikely that the association between these species is a

mistake. These siRNAs were primarily 21 nt in size (61.3%), corresponding to the action of the DCL1 enzyme that is involved in both the antiviral silencing as well as the miRNA production [1]. The siRNAs of 20 and 22 nt corresponded to 8.1% and 19.4%, respectively, of the siRNA population. The residual fraction (11.2%) included siRNAs of 19, 23, 24 and 26 nt. Interestingly, a significant bias for the presence of a U residue at the 5' end (i.e. 35.5% of PLMVd like siRNA), as it is expected for siRNAs [13], was observed. Finally, the presence of a phosphate at the 5'-end of the ncRNA, produced by DCL enzymes, was confirmed by the detection of a band shift in Northern blot hybridization if the samples were treated with alkaline phosphatase prior to electrophoresis (data not shown). The collection of PLMVd-specific siRNAs was further analyzed in order to clarify exactly how the silencing takes place in the plant. Added together, these siRNAs contain 1368 nt, 3.9 times the length of the model PLMVd genome (338 nt). There are 35 and 25 siRNAs complementary to the PLMVd strands of (+) and (-) polarities, respectively (see Figure. 8A). It has been shown that the PLMVd strands of (+) polarity are slightly more abundant in cells than are their counterparts of (-) polarity, regardless the conformation (i.e. circular and linear monomers as well as linear multimers) [9]. An average of 3 (+) strand molecules for every 2 (-) strands has been estimated. Therefore, the slightly higher abundance of siRNA of (+) polarity observed (i.e. 58.3% compared to 41.7% for (+) and (-) polarities, respectively), likely reflects the difference in PLMVd strand abundance, indicating that strands of both polarities similarly trigger DCL enzymes. To date, there has been no DCL enzyme reported to be located within the chloroplast, consequently, this observation constitutes the first

evidence that PLMVd strands of both polarities are present at some point in the cytoplasm as this is required for the RNA silencing to occur.

PLMVd conformers as putative substrates for DCL enzymes

In vitro experiments using a wheat germ extract have shown that the long P11 stem of PLMVd can trigger the DCL enzyme(s) [8]. However, the amplification phenomenon observed to be associated with the RNA silencing mechanism, and based on the RdRp activity, should produce a similar coverage of the PLMVd genome in terms of siRNA species. Surprisingly, the alignment of the siRNAs along the PLMVd structure showed that this was in fact not the case (Figure 8A and 8B). Instead, the siRNAs appeared to be concentrated around the P2-P3 stems, the P5- P7 stems and the lower strand of the P11 stem (bold regions in Figure 8B). While the P11 is sufficiently long, most likely the P2-P3 and P5-P7 stems have to stack together in order to form the 21 base pair helical region required for recognition by the DCL enzyme [13]. Conversely, the regions including smaller hairpins (P1, P2, P4, P8, P9 and P10) were less represented, in accordance with the dsRNA prerequisite for DCL activity. Similarly structured regions of PSTVd were shown to be preferentially hydrolyzed by the DCL enzymes [12]. Differential accumulation of siRNAs for a virus has also been reported (i.e. the *Cymbidium ringspot virus*) [14]. Surprisingly, the upper strand of the P11 stem was less represented for both polarities, even though it respects the requirements for DCL activity. The reason for this phenomenon remains unclear. Further analysis of the PLMVd-associated siRNAs revealed that there are four species

that overlap the hammerhead cleavage site of (+) polarity, and only one that ends precisely at the cleavage site (see Figure 8A and 8C). The cloned siRNAs were most likely protected by proteins implicated in the RNA silencing mechanism (e.g. DCL and Argonaute). Thus, their molecular stabilities should be relatively similar and, consequently, there should be no bias in terms of stability that would explain the finding of more abundant siRNA species. Three methods that explain the production of the siRNA overlapping the cleavage site can be envisioned. The first possibility is that multimeric strands of both polarities interact together, forming a long dsRNA substrate for the DCL enzyme. However, if this is indeed the method, there should be no bias in terms of the PLMVd region susceptible to DCL activity, which is not the case. The second possibility is that the dsRNA substrates for DCL activity resulted from RdRp activity using an siRNA derived from a previous PLMVd cleavage. Again, the nonuniform distribution of siRNAs is most likely an indication that this is not the explanation. The third possibility, and the most probable one, is that the PLMVd circular conformers are the preferred substrate for the DCL enzyme. The high abundance of siRNA covering the hammerhead cleavage site (4 out of 35) support this idea, especially when one considers the results from a previous quantitative analysis of the accumulation of PLMVd conformers showed that there is an average ratio of 1:11 of circular to linear strands of (+) polarity that accumulate in the leaves [9]. If the targeting of linear and circular conformer was equal, 1 siRNA coming from circular molecule would be expected for every 11 siRNAs coming from linear one. Experimentally 4 siRNA out of 35 are derived from the (+) circular genome of PLMVd, a slightly higher ratio than expected. It may be an indication that the

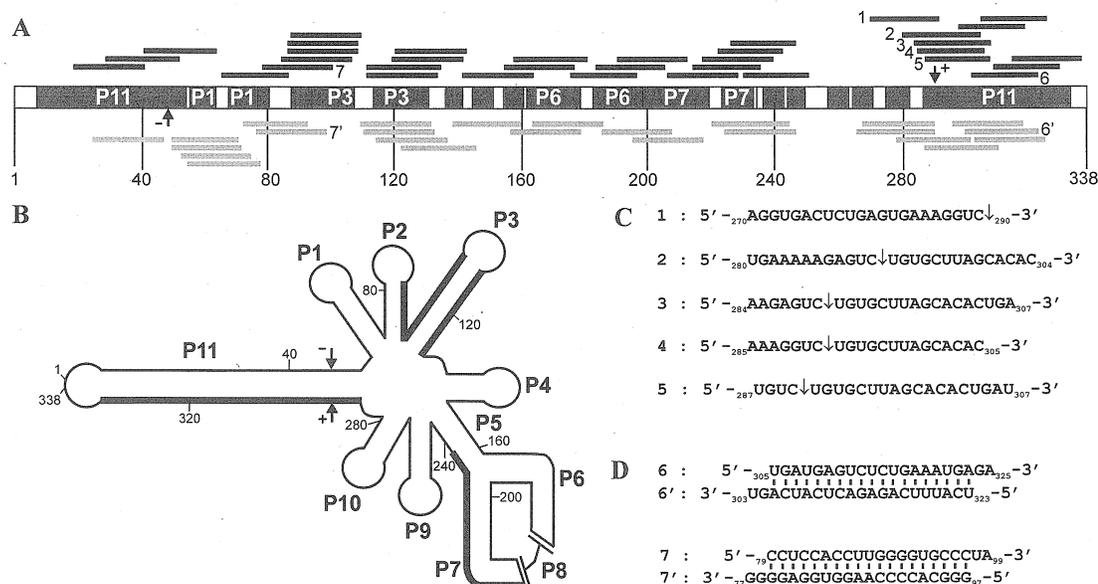


Figure 8. Localization of the observed PLMVd-associated siRNAs on the PLMVd molecule. (A) Linear representation of the PLMVd genome upon which all of the RNAs homologous to PLMVd are represented. Paired regions (P) in the secondary structure (see panel B) are shown in black, while single-stranded regions (i.e. bulges and loops) are shown in white. Due to space constraints only some paired regions are indicated. The siRNAs complementary to the PLMVd strands of (+) polarity are indicated above the genome (black lines), while those of (-) polarity are indicated below the genome (grey lines). The siRNAs covering the cleavage site are numbered 1 to 5, while those forming RNA duplexes with a 2 nt overhang at the 3' end are labeled 6, 6' and 7, 7'. (B) Schematic secondary structure of PLMVd according to Bussière et al. [20]. The bold lines indicate sequences covered by at least 7 siRNAs. (C) Sequences of the siRNAs covering the hammerhead cleavage site of (+) polarity. In (A), (B) and (C) arrows indicate the hammerhead cleavage sites of both polarities. (D) Sequences of pairs of siRNAs forming perfect Dicer products.

circular conformers are selectively chosen for transport within the cytoplasm and that, once there, they become substrates for the DCL. However, it is improbable that only circular conformers are transported within the cytoplasm. The observation of an siRNA that terminates precisely at the hammerhead self-cleavage site suggests that the linear conformer is also targeted, since the cleavage of the circular one would require hydrolysis of the unusual 2'-5'-phosphodiester bond found at the self-ligation site [15] by the DCL enzyme, a highly unlikely scenario. Thus, it seems that both PLMVd circular and linear conformers of (+) polarity are present in the cytoplasm, but with a predominance of the circular conformer. This hypothesis cannot receive physical support from the analysis of the siRNAs originating from the (-) polarity PLMVd strands as no PLMVd-associated RNA was produced from the (-) strands that either overlapped with, or terminated precisely at, the hammerhead cleavage site. This might result from the fact that the number of siRNAs from the upper strand of PLMVd was limited for unknown reasons as mentioned above. Clearly, additional studies will be required in order to clarify this unexpected accumulation of fragments covering the hammered cleavage site of (+) polarity.

Finally, we wondered if the collection of sequences contains any pair(s) of either partially or perfectly complementary RNAs that could form dsRNA harboring 2 nt overhangs on their 3' end corresponding to an ideal DCL cleavage. Two such pairs were found (Figure 8D), one in the P11 stem and the other in the P2-P3 stems. Both cases were perfectly homologous, indicating that the DCL substrate could result from the RdRp activity. Further biochemical experiments should help in solving this inconsistency. In

opposition to what was suggested previously, this observation supports the involvement of the RdRp activity in the RNA silencing amplification. Of course, the RNAs forming the perfect duplexes could originate from two different cleavage activities and been found solely by chance. However, it is surprising that no duplex coming from the P11 stem and possessing the corresponding mismatches, was not also found.

Concluding remarks

This sequencing effort and the analysis of the PLMVd-associated siRNAs reveal several aspects of the silencing defense mechanism in plants. Specifically, PLMVd strands of both polarities are substrates for the DCL enzymes that preferentially recognize the most structured region of the viroid. Moreover, considering that DCL1 is associated with antiviral RNA silencing, and that it is found in the cytoplasm, the data presented here indicate that although PLMVd strands of both polarities are transported within the cytoplasm, the circular conformers are significantly more efficiently transported. It is not known if it is the presence of a sequence that could be juxtaposed with the circular conformer ligation site, or the presence of the unusual 2',5'-phosphodiester bond at that position, that provides the selective advantage to the circular conformers. Furthermore, it is not impossible that the circular conformers adopt a different structure, as compared to the linear ones, which would favour their exportation. This collection of ncRNAs sequences sheds light on several aspects of silencing of a viroid; however, it also raises several questions. The availability of high-throughput sequencing technology

will certainly be an important tool in answering several of these intriguing questions.

Material and Methods

RNA extraction and Northern blot hybridization

Total RNA (40 µg) was extracted from both infected and healthy peach leaves grown on the west coast of Canada (Sidney, British Columbia) and in the north of Tunisia using TRIzol as recommended by the manufacturer (Invitrogen). These RNA samples were quantified by UV spectroscopy, and their quality verified by 1% agarose gel electrophoresis. The replication of PLMVd was verified by both RT-PCR amplification and Northern blot hybridization as described previously [9,10]. PLMVd-associated siRNAs were detected by Northern blot hybridization as reported previously [5].

Cloning and analysis of small ncRNAs

Cloning and sequencing of the small ncRNAs was performed as described previously with only minor modifications [11,16]. Briefly, RNA samples were fractionated on denaturing 15% PAGE gels. The gel bands corresponding to the region located between the 18 and 26 nt long RNA species markers were visualized by UV shadowing, excised, the RNA eluted overnight at 4°C, ethanol precipitated and dried. Linkers were then ligated to both ends of the small ncRNA as described previously [8,11]. The 3'-linker (5'PO4-**CUGUAGGATCCATCAA**-NH₂-3', the bold letters represent ribonucleotides, while the other positions are deoxyribonucleotides) includes a

5' phosphate (PO₄) and a 3' NH₂ in order to avoid multimerization between the monomers, while the 5'-linker (5'ATCGTAGGAUCCUGAAA-3') did not possess any special modification. The resulting products were reverse transcribed, PCR amplified, multimerized, ligated into pGEM-T vector (Promega), transformed into *E. coli* XL1-Blue bacteria and the resulting recombinant plasmids purified and then inserts sequenced at the McGill Genome Center. Sequence homology searches were performed for each ncRNA found using the available *Arabidopsis thaliana* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/static/MVPlantBlast.shtml?2>), viroid subviral (<http://subviral.med.uottawa.ca/cgi-bin/home.cgi>) [17], viral (<http://gib-v.genes.nig.ac.jp>), [18] and miRNA (<http://microna.sanger.ac.uk/sequences>) [19] databases.

Acknowledgements

The authors would like to thank Olivier Parisi for the greenhouse work. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, grant 155219-07) of Canada. The RNA group is supported by grants from both the Université de Sherbrooke and the Canadian Institute for Health Research. J.P.P. holds the Canada Research Chair in Genomics and Catalytic RNA and is member of the Centre de Recherche Clinique Etienne-Lebel.

References

- [1] Eamens, A., Wang, M. B., Smith, N. A., Waterhouse, P. (2008) RNA silencing in plants: yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiol.* 146,456-468
- [2] Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R. S., Ding, B. 2001. Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1332-1334.
- [3] Papaefthimiou I., Hamilton A., Denti M., Baulcombe D., Tsagris M., Tabler M. 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29, 2395-2400.
- [4] Martinez de Alba, A. E., Flores, R., Hernández, C. 2002. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76, 13094-13096.
- [5] Landry, P., Thompson, D., Perreault, J. P. 2004. The role of viroids in gene silencing: the model case of Peach latent mosaic viroid. *J. Plant Pathol.* 26, 31-38.
- [6] Martin, R., Arenas, C., Daros, J. A., Covarrubias, A., Reyes, J. L., Chua, N. H. 2007. Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology* 367, 135-146.
- [7] Wang, M. B., Bian, X. Y., Wu, L. M., Liu, X. L., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R. M., Masut, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., Waterhouse, P. M. 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3275-3280.

- [8] Landry, P., Perreault, J. P. 2005. Identification of a peach latent mosaic viroid hairpin able to act as a Dicer-like substrate. *J. Virol.* 79, 6540-6543.
- [9] Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J., Perreault, J. P. 1999. Subcellular localization and rolling circle replication of Peach Latent Mosaic Viroid: Hallmarks of Group A viroids. *J Virol.* 73, 6353-6360.
- [10] Fekih Hassen I., Massart, S., Motard, J., Roussel, S., Parisi, O., Kummert, J., Fakhfakh, H., Marrakchi, M., Perreault, J. P., Jijakli, M. J. 2007. Molecular features of new peach latent mosaic viroid variants suggest that recombination may have contributed to the evolution of this infectious RNA. *Virology* 36, 50-57.
- [11] Lau, N. C., Lim, L. P., Weinstein, E. G., Bartel, D. P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294, 858-856.
- [12] Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S., Ding, B. 2007. A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol.* 81,2980-2994.
- [13] Vaucheret, H. 2006. Post-transcriptional small RNA pathways in plant: mechanism and regulation. *Gene Dev.* 20, 759-771.
- [14] Molnar, A., Csorba, T., Varallyay, E., Lacomme, C., Burgyan, J. 2005. Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *J. Virol.* 79, 7812-7818.

- [15] Côté, F., Lévesque, D., Perreault, J. P. 2001. Natural 2'-5'-phosphodiester bonds found at the cleavage sites of peach latent mosaic viroid. *J. Virol.* 75, 19-25.
- [16] Motard, J., Bolduc, F., Thompson, D., Perreault, J. P. 2008. The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appears to be defined by a conserved sequence. *Virology* 373, 362-375.
- [17] Rocheleau, L., Pelchat, M. 2006. The subviral RNA database: A toolbox for viroids, the hepatitis delta virus and satellite RNAs research. *BMC Microbiol.* 6, 24.
- [18] Hirahata M., Abe, T., Tanaka, N., Kuwana, Y., Shigemoto, Y., Miyazaki, S., Suzuki, Y. O., Sugawara, H. 2007. Genome information broker for viruses (GIBV): database for comparative analysis of virus genomes. *Nucleic Acids Res.* 35, D339-D442.
- [19] Griffiths-Jones S., Saini, H. K., van Dongen, S., Enright, A. J. 2004. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36, D154-D158.
- [20] Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D., Perreault, J. P. 2000. Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.* 74, 2647-2654.

Supplementary data

Tableau 2. Origin and sequence of obtained small ncRNA

Country of origin	tree status	sequence	P1MVd-like
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Canada	healthy	acagatcaggaccagaagtcttt	
Canada	healthy	tgttgcgttctcagatatataga	
Canada	healthy	tccgaccaggcttcattcccc	
Canada	healthy	actctcacaaaaggagaggtgaa	
Canada	healthy	tttggtgtcctgactgcactga	
Canada	healthy	aaaactgctttcagaagaagcaaa	
Canada	healthy	cacaccaaaaacttgagccaca	
Canada	healthy	ggcgagcgaaccgggaatagc	
Canada	healthy	atagggatctcacatcacctt	
Canada	healthy	ccgatgctgattgctgctggggcc	
Canada	healthy	tgaagctgccagcatgat	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Canada	healthy	cgctatccatcctgagtttc	
Canada	healthy	tcgaactctcatagcatattgggt	
Canada	healthy	accttaggttgctacgtaccctt	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Canada	healthy	ttcggctccttgctgacctt	
Canada	healthy	ggtagttcgaccgtggaatta	
Canada	healthy	atagggctacaactttgtgtttac	
Canada	healthy	tagtgctcctcttgatgatt	
Canada	healthy	tgagttggtatctaaagttgg	
Canada	healthy	tgacctcaaaataacaggggtc	
Canada	healthy	tgaatgaagctgccagcatgatctga	
Canada	healthy	gacagagttggatggcaggac	
Canada	healthy	ttactcacctgttgatgtaaatc	
Canada	healthy	tgaaacagtcgagatgtaataaaa	
Canada	healthy	ttgaccgtgagctcctggggtaa	
Canada	healthy	ctttaagatggatcactaagc	
Canada	healthy	gggaactcatatcatcaaaagttctg	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Canada	healthy	ttccaataagcatggttatca	
Canada	healthy	tccgggtaaaattcctgaacc	
Canada	healthy	ttagccagacttgagcaccgaat	
Canada	healthy	cttctagatccttcaacct	
Canada	healthy	ccatggcaatccaagagcaatca	
Canada	healthy	aactccgaataaccgaagagtg	
Canada	healthy	ggtagttcgaccgtggaattt	
Canada	healthy	agtgatttgaagtagttgtttcca	
Canada	healthy	aggaggagtggcctttataggca	
Canada	healthy	agttgagtcctttacctgattgct	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Canada	healthy	tgtcagtttgcaaatcccc	
Canada	healthy	tggggtactgactgcactgagctgt	
Canada	healthy	aggaaagcagatttgactctttca	
Canada	healthy	ttcggctccttgctgacctt	
Canada	healthy	tctcaacagttcatctaattttc	
Canada	healthy	tagggcgtatcttctgtctt	
Canada	healthy	taactgcgacaactagacctg	
Canada	healthy	gagtcgaaatatctgtggtaaaga	
Canada	healthy	aaggggtccaagagatttgtggtca	
Canada	healthy	gaggcgaacgctagtgaaccata	

Canada	healthy	ctgaagtgtttggggggaccc	
Canada	healthy	tttcggtccttggtgcacctt	
Canada	healthy	agtgactgattccttggatgtcaa	
Canada	healthy	tgacaacgagagagagcacgcctg	
Canada	healthy	agtttcaattctgtcaattttga	
Canada	healthy	tgagtacaccctataatcgtacac	
Canada	healthy	aataggaccgaaatcctatga	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtgcctatt	
Canada	healthy	ttggggacgaattgaagatgt	
Canada	healthy	aaaaaatactggaagcacattatgt	
Canada	healthy	agagtctaagtaagttggctagag	
Canada	healthy	tacctggttgatcctgccagt	
Canada	healthy	ttcggaggttcgaatccttcgaa	
Canada	healthy	ttggtgcctgactgcactga	
Canada	healthy	cctggctctgataccataac	
Canada	healthy	acacagattatgtgactgtggtaa	
Canada	healthy	ataacacgttatcagcacaac	
Canada	healthy	ccaatgaaaggactacacgtgtaa	
Canada	healthy	agtgtgtgtatgagagaaatcctc	
Canada	healthy	taatcatttgcaaacaccctt	
Canada	healthy	agggagattcactattatacccaa	
Canada	healthy	ggaactcatatcatcaaaagttctg	
Canada	healthy	gcgagcgggtgagtaacgcg	
Canada	healthy	acctggctctgataccataac	
Canada	healthy	ggagcatgtggtttaattcg	
Canada	healthy	cgtagggatctaataatattatcac	
Canada	healthy	tccaaaaaaaaagaaacacacaacat	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtgcctatt	
Canada	healthy	tgaagctgccagcatgatctg	
Canada	healthy	gacgacttacaataaaatgac	
Canada	healthy	cggaggtagggtccagcggct	
Canada	healthy	attcaggtgggacactttogaaccc	
Canada	healthy	atftaaagtagctaaatgaaaag	
Canada	healthy	gggttgctaactcaacgg	
Canada	healthy	aacagaccggtagatcctgaac	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtgcctatt	
Canada	healthy	atccagcgaaccacagccaa	
Canada	healthy	ataacgcactgtaattgaaac	
Canada	healthy	ttgatgtgtttagtgcctatt	
Canada	healthy	tcaacaagataatgtctgatttga	
Canada	healthy	aaccacagcctcaacttatagcaa	
Canada	healthy	gagtcacagctcgcgttgactac	
Canada	healthy	tgtcagtttgtcaaatacc	
Canada	healthy	tgctgtgttgactgcttctgcc	
Canada	healthy	ccgggggacggactggg	
Canada	healthy	gcttgaaattgtcgggagg	
Canada	healthy	agtccttgatgacattggaa	
Canada	healthy	aatcatttatgcatgtatcggcga	
Canada	healthy	tgtgcacaatgacttgtcggccata	
Canada	healthy	tgaacgtgagaccattataatagc	
Canada	healthy	tacctggttgatcctgccagta	
Canada	healthy	tgagtttacatccttattcga	
Canada	healthy	ctttattcatgtgaacttcacttc	
Canada	healthy	gaaataatggcactgttcaagttc	
Canada	healthy	ggaaggttggtgaggttgag	
Canada	healthy	cagtcctgtatgtgtgacgaat	
Canada	healthy	tccgggttaaaattcctgaacc	
Canada	healthy	ttgtgaggtgtcctaaacttg	
Canada	healthy	tgaatcacggtacttcaaaaagt	

Canada	healthy	tgggtttaaaacgtcgtg	
Canada	healthy	agggaggattagctagtcctata	
Canada	healthy	aagagaggtcataaggtctca	
Canada	healthy	gggggtacttccttattt	
Canada	healthy	gagaggggcaataataactaagt	
Canada	healthy	aatagcttttcctttcttg	
Canada	healthy	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	healthy	cgtatggaaatggcattgtct	
Canada	healthy	cttgagcccaattaggcttgtage	
Canada	healthy	ggtagttcgaccgtggaattt	
Canada	healthy	aaaaatagataagaaagcatac	
Canada	healthy	ttcggtccttgttgcacctt	
Canada	healthy	tgtcagtttgtaaatacccc	
Canada	healthy	aagcaggttttattaggccatcca	
Canada	healthy	tgtcagtttgtcaaatacccc	
Canada	healthy	agacaaccagcataacttaga	
Canada	infected	ataagcaatctgtgtttaaataga	
Canada	infected	accctagatggcgagagtccag	
Canada	infected	tcgggtggactgctcgagctgct	
Canada	infected	ttcaaacagtacattcgcaag	
Canada	infected	ttcgggaagttgttattgatct	
Canada	infected	gtaaaggagcaataataaatttcttg	
Canada	infected	gcatcggtaaagttactcttc	
Canada	infected	gaaatcaaagtttttgggttcc	
Canada	infected	cagagactcatcagtggtgta	√
Canada	infected	ctgaagtgtttggggaact	
Canada	infected	ctgaaatgagacgaaactctac	√
Canada	infected	aacactcttgtgtctatacacccc	
Canada	infected	aggagtataaggaaatagacacacc	
Canada	infected	agaacttttagtaagccaatagtt	
Canada	infected	aaaagaatagagcaacagcaa	
Canada	infected	taatcatttgcaaaccctt	
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	atagaaaggctaaggacctcg	√
Canada	infected	aggtaccgccgtagaaactgg	√
Canada	infected	gagtctctgaaatgagacgaa	√
Canada	infected	agctctcctctcaacttgggta	
Canada	infected	ttcggtccttgttgcacctt	
Canada	infected	cctgaaccgggacgtgggtgg	
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	tgcttagcctttctaccgaaa	√
Canada	infected	aatgccggtgcccattgtcctt	
Canada	infected	cgggtagacgtcgtaatcca	
Canada	infected	taacagaccggtagacttgaac	
Canada	infected	gattacgagctottaccggga	√
Canada	infected	cctgaaaagcggttgggtccgagggggg	
Canada	infected	ctcaaagttcctcaggaa	
Canada	infected	ctgacattctagactctgttgt	
Canada	infected	atatacttgataacgcaacatctt	
Canada	infected	tgtttctagaaccagtatcaa	
Canada	infected	ttaaccgtgtcgtcagaggcaac	
Canada	infected	ataacaagttaagtgttctga	
Canada	infected	ctttcgtcagagtcacctctga	√
Canada	infected	ttggggtgccctattcgaggc	√
Canada	infected	tgatgtgttttagtcgctat	
Canada	infected	gtgatgactctgaataactgag	
Canada	infected	aaatgggaaacatcaggaagtt	
Canada	infected	cccaccttacctcattgcca	√
Canada	infected	atgcactcatttcaaggggtgcaac	

Canada	infected	agctacttttggttaaaaagaagga	
Canada	infected	tttcggtccttggtgcacctt	
Canada	infected	atgtactttgtagaagtgttatca	
Canada	infected	tggagcacttagaggtcttctta	
Canada	infected	agaggtgactattctctcaaa	√
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	tcatcagtggttagcccaag	√
Canada	infected	tgaaaaagagattatgtgagattagctcc	
Canada	infected	tgatgagtctctgaaatgaga	√
Canada	infected	gtcatcactctctcataagt	√
Canada	infected	atcgggtagatgcgtccaccaaga	
Canada	infected	ttgcgttaggtcgaaagttac	
Canada	infected	gggacccaaggtggagggg	√
Canada	infected	actaggatgggtgacctcctgggaagt	
Canada	infected	cttcaccacaccacttttctcaaa	
Canada	infected	agccgttgatgcatgtgtgacct	
Canada	infected	aataccgggctcttagagtctggaattg	
Canada	infected	tcagagagctttagtggaagaaa	
Canada	infected	agtggaagtgcagtgatgatgcagct	
Canada	infected	gaaagcatcactagcttacgct	
Canada	infected	tagtggacattatttttcaca	
Canada	infected	ggtgaataattcgtgctgataac	
Canada	infected	cctccaccttgggggtgcccta	√
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	cctgaaactatttataggcataagactgt	
Canada	infected	cggcgttacctggatcacacc	√
Canada	infected	tgaaaaagagctctgtgcttagcacac	√
Canada	infected	tgtagtgccaatccaacacaagt	
Canada	infected	tctcaacggctcatcagtggt	√
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	tagaaaggctaaggacctcgc	√
Canada	infected	cctgttgagcttgactcta	
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	actcacaaaagcgcagggaggtag	
Canada	infected	gccattcacgcccgtcgta	
Canada	infected	gacgcagcaccaaacgtaggtag	
Canada	infected	taactgcgacaactagacctg	
Canada	infected	cgaaacttatgatgaatagag	
Canada	infected	tatttgagattagttgggtcac	
Canada	infected	agttcgagcgggtcggactcaga	
Canada	infected	aggcgagtgtctctacacatacaa	
Canada	infected	tgagaggtgactattctctcaa	√
Canada	infected	aggcgagtgtctctacacatacaa	
Canada	infected	tgagaggtgactattctctcaa	√
Canada	infected	atgtaatgtgtgtgtgagtttag	
Canada	infected	aagagtctgtgcttagcacactga	√
Canada	infected	gctagggagaccaactttagatac	
Canada	infected	tgaagtgtttgggggaactc	
Canada	infected	tggattctcaaaaaggcaaa	
Canada	infected	attggactgataaaacattgg	
Canada	infected	tcaaagtcactgaagaccgga	
Canada	infected	ggggatgtagctcagatggt	
Canada	infected	ttgcagacgacttactgt	
Canada	infected	tgaataatgggtgatagccccgta	
Canada	infected	ttaataggatgtatgcttg	
Canada	infected	ctgaagtgtttgggggggaccc	
Canada	infected	acctctgagagggggcggggtt	
Canada	infected	ctgaaaggttgagtataaaaa	
Canada	infected	acggaccaaggagtctgac	

Canada	infected	aggacttgaaaagagagtca	
Canada	infected	aaagttcgagctcatgttatcaat	
Canada	infected	gaactttgaaggccgaagaggggaaag	
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	ggcgaattgaaataccac	
Canada	infected	ttaaataaaactaacatggta	
Canada	infected	aggaactccgaagttaagcgagtt	
Canada	infected	agaacagatgacggaagcaatcga	
Canada	infected	tattatgcatggagccgccaaca	
Canada	infected	tgggttgggtcgaccggtcc	
Canada	infected	agagagttggccgtttgacccaaa	
Canada	infected	ttccagtagcaatacga	
Canada	infected	acaaaaactgattatttcatttgt	
Canada	infected	cagcgttggctttattgctt	
Canada	infected	tgacctctcagcccctccac	√
Canada	infected	agcggttggttccgagggg	√
Canada	infected	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Canada	infected	tggcgaacccaaaattttgtagc	
Canada	infected	tttcggtccttgttgcacctt	
Canada	infected	ctggaccagaagcttctcaagctcaagc	
Canada	infected	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Canada	infected	gataaacacatgataattgtatg	
Canada	infected	taagcccagacttatgagagag	√
Canada	infected	cgtagaaactggattacgac	√
Canada	infected	gacactgatgagtctctgaaat	√
Canada	infected	aaagatctgaaaaatgttcgtg	
Canada	infected	atgctaagaacagtcgttcac	
Canada	infected	ccaaggtggaggggctga	√
Canada	infected	agcctttctatcgagactgca	√
Canada	infected	tgacctgttgagatagtcgaaa	
Canada	infected	ttactccatattttatgatgtggaagta	
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	tgaatatagacgtcgtaatccagtt	
Canada	infected	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Canada	infected	accatctctttgaaatttaac	
Canada	infected	acacattactttgaccaactgac	
Canada	infected	ctgaagtgtttggggggacc	
Canada	infected	tattctggtgtcctagggcgtagagg	
Canada	infected	ttaaattacaatttctaccga	
Canada	infected	actggattacgagctctac	√
Tunisia	healthy	gcgattattttcacagcacaacaactg	
Tunisia	healthy	tttacgtgcagctcaatattcgca	
Tunisia	healthy	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	healthy	gctgacgtcagcgtgacaaaaac	
Tunisia	healthy	tgacttgcagatctgaggcttaa	
Tunisia	healthy	tccgagatagctgaggatttaac	
Tunisia	healthy	aatttataggggagactctgccga	
Tunisia	healthy	atccaactgggggactaactttct	
Tunisia	healthy	gaaggtcacggcgagacgagccgttt	
Tunisia	healthy	atccggttaagatcgatctaaccagc	
Tunisia	healthy	cttaaagagggggttttagtcctt	
Tunisia	healthy	aatgtcaaagtgaagaaattcaacc	
Tunisia	healthy	cctgaaagtgcccaactgocgctaacctaga	
Tunisia	healthy	ccgtagtaattctagagctaatacgtg	
Tunisia	healthy	atggaatctgaatctgagattatt	
Tunisia	healthy	agagagttggtacacaagttagta	
Tunisia	healthy	tggcggcgggcgtcataatgggaa	
Tunisia	healthy	ctttgtggtcagggaaagccgaat	
Tunisia	healthy	cattgtaaggtgocgctcagggc	

Tunisia	healthy	tcgggagacatggtccaagcccggt	
Tunisia	healthy	atgactctcggcaacggatatcta	
Tunisia	healthy	caaattgctttctctcatagctga	
Tunisia	healthy	aaaattgttacgggtggtgtttcaa	
Tunisia	healthy	ggcagtaggaaaatgacgtagcatt	
Tunisia	healthy	acggtaaaaaaattttgaatcag	
Tunisia	healthy	agagtgagtgaccacaaatttctt	
Tunisia	healthy	acagaagggtggttcttgcaag	
Tunisia	healthy	tcaacctagtagcagaggaaccgt	
Tunisia	healthy	actccaaatgtcatcaagaatcaa	
Tunisia	healthy	ttcgcataatcatagattgttcaa	
Tunisia	healthy	tgatggtgtcgagacatacttcac	
Tunisia	healthy	atcgccttgtaaaaatagagggt	
Tunisia	healthy	tcaaacagttttccaagcccaac	
Tunisia	healthy	gaaggtcacggcgagacgagccgtta	
Tunisia	healthy	cacacacacacaaaactatgatgt	
Tunisia	healthy	tccttaaggttatcctatgcacat	
Tunisia	healthy	gccgctcgctcatctcgtgacaaa	
Tunisia	healthy	accagcagcgtggagggtgctctaa	
Tunisia	healthy	atttggcaccttagttgctatgta	
Tunisia	healthy	agtaaaaaatgatattaacttgca	
Tunisia	healthy	caccaaatacagtcgtgtgaggtaa	
Tunisia	healthy	ttggttccgagatttttcgaccac	
Tunisia	healthy	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	healthy	tattctggtgtcctaggcgtagagg	
Tunisia	healthy	tgccggccgggggacggactggga	
Tunisia	healthy	gcgacgggggtattgtaagtggcag	
Tunisia	healthy	tcgttttcgtagaatcgattaca	
Tunisia	healthy	agcagaaaacaaataatggcaca	
Tunisia	healthy	tctgaaatgaagtggttggtgat	
Tunisia	healthy	ctgaaaatagccataactccaatatgattct	
Tunisia	healthy	gaaggtcacggcgagacgagccgtttat	
Tunisia	healthy	tgaaggaagattttgtggaaag	
Tunisia	healthy	ctgaaaaactcatatcatcaaa	
Tunisia	healthy	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	acctggctctgataccataac	
Tunisia	healthy	gattaacgagattcccactg	
Tunisia	healthy	tggtgatgtttttctcgtaact	
Tunisia	healthy	tacatctggtccctacatat	
Tunisia	healthy	aaggcttggtgctcgaggaa	
Tunisia	healthy	taccaaatagtgcatagtggg	
Tunisia	healthy	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	agagaactcagccggtat	
Tunisia	healthy	gactctcggcaacggatatctc	
Tunisia	healthy	aacagtccaacctatcgaac	
Tunisia	healthy	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	tctttcctactccaccattcc	
Tunisia	healthy	cgaccacccatattataacacgt	
Tunisia	healthy	gcacgggcttaattctac	
Tunisia	healthy	cgacttcccctgggggtacca	
Tunisia	healthy	ttgatgtgttttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	ttgcctattcctcccagccaa	
Tunisia	healthy	gcgagtttgggagagtagt	
Tunisia	healthy	tagtgcatgaacaaagactttct	
Tunisia	healthy	gcggtatagtttagtggtta	
Tunisia	healthy	ctggatatagtcggggtgcttt	
Tunisia	healthy	cggatgctaacgcaatgtgatt	
Tunisia	healthy	aaccggaacggggttacgggt	
Tunisia	healthy	acctggctctgataccataac	

Tunisia	healthy	cgctgggtagccaagtgcg	
Tunisia	healthy	caggtgcacaatgacttgtc	
Tunisia	healthy	acctggctctgataccataac	
Tunisia	healthy	gcgagagtagtactagga	
Tunisia	healthy	ggcggaagctaccgtgcgctg	
Tunisia	healthy	acgagaacagaaatctcgtgt	
Tunisia	healthy	gtggagcgatttgtctggtt	
Tunisia	healthy	acctggctctgataccataac	
Tunisia	healthy	accggcgatacgtcctggcct	
Tunisia	healthy	tgctgagcatataactcttgc	
Tunisia	healthy	accgattccaccattccga	
Tunisia	healthy	tataataccggacaaagtcac	
Tunisia	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	aacgactctcggcaacggata	
Tunisia	healthy	cagccaagcgttcatagcgac	
Tunisia	healthy	ccagggatcggcggatggt	
Tunisia	healthy	tgagtttacatccttattcga	
Tunisia	healthy	aaccgggtttacctacaggc	
Tunisia	healthy	gggctagaagcgacgcatgc	
Tunisia	healthy	tctcatgcctacacttaccaaac	
Tunisia	healthy	gagacgaggaagggcgtagt	
Tunisia	healthy	agggtagagcgcgacacctgt	
Tunisia	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	cccagtcgccgaaccgctcggt	
Tunisia	healthy	tattctgggtgtcctaggcg	
Tunisia	healthy	aggtgcaagtgtgaagtgcaga	
Tunisia	healthy	tcggaccaggttcattcccc	
Tunisia	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	aaaacaaagttcactcacaag	
Tunisia	healthy	atgatcagtagctgggtccga	
Tunisia	healthy	tttcggctccttggtgcacctt	
Tunisia	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	ctattccaaccccggaagcac	
Tunisia	healthy	acctggctctgataccata	
Tunisia	healthy	ttgaagcacctacaatgggt	
Tunisia	healthy	cggtaggactgctcgagctgc	
Tunisia	healthy	acggagaattagggttcgatt	
Tunisia	healthy	ggtagccaagtgcggagcgg	
Tunisia	healthy	tagtgcgctcccttgatgatt	
Tunisia	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	cgaaccgggaatagcccagc	
Tunisia	healthy	ccacagggataactggcttggtg	
Tunisia	healthy	accggcgatacgtcctggcct	
Tunisia	healthy	acgccgtcgacgcatcgt	
Tunisia	healthy	tgtgcgtatcgaccctgca	
Tunisia	healthy	gaggacttggatattatgccat	
Tunisia	healthy	attcctgacttcccctgtgtttac	
Tunisia	healthy	gccagcttcttagagggga	
Tunisia	healthy	tgacttgggtatagggcgaaa	
Tunisia	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	aaccggaagocgggttacggt	
Tunisia	healthy	gcggtaccaaactcgaggca	
Tunisia	healthy	ttgatgtgtttagtcgctatt	
Tunisia	healthy	gggagcacaccaaagcttga	
Tunisia	healthy	taactgagtcgtgagttggagg	
Tunisia	healthy	acggctgttagtgtaatcagaac	
Tunisia	healthy	agcaagctgctctggaggtgatgt	
Tunisia	healthy	gatcatgtgcacctcacgtgacag	
Tunisia	healthy	tcaaacgaggaaaggcttacgggtg	

Tunisia	healthy	cttatatgtgcacatccgcatcca	
Tunisia	healthy	atcactaggtatggagtaaaactgg	
Tunisia	healthy	cgaacatgagattactggctaca	
Tunisia	healthy	actgaaccttatcatttagaggaagg	
Tunisia	healthy	tgagtaagtcacggtcacacaaa	
Tunisia	healthy	tagagcaatccaagatgggtga	
Tunisia	healthy	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	healthy	aagtcaatggctctacaagtcacgc	
Tunisia	healthy	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	healthy	ggggagtatggctcgcaaggctgaa	
Tunisia	healthy	caccggctcggctcgtcccttctaccggc	
Tunisia	healthy	ataataacgctcgaatatccgcat	
Tunisia	healthy	gaaggtcacggcgagacgagccggt	
Tunisia	healthy	cccttcagaagtcgggggttggtg	
Tunisia	healthy	agtgaactggtgaatttacatcta	
Tunisia	healthy	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	healthy	gaatgtcaaagtgaagaaattcaaccaa	
Tunisia	healthy	gcgggagtaactatgactctctta	
Tunisia	healthy	gacagagagggagaaaattgata	
Tunisia	healthy	gtggcgaaatgtgtgttcgcttc	
Tunisia	healthy	attgctcattgaccgggatagc	
Tunisia	healthy	ctgatgattcatgataactcgacgg	
Tunisia	healthy	gagagaggtgataatacactgaac	
Tunisia	healthy	caacctagtagagaggaaccggtg	
Tunisia	healthy	gaatgtcaaagtgaagaaattcaaccaa	
Tunisia	healthy	actttcaagcctaacacgtagaca	
Tunisia	healthy	tcacattgatagatggtctctgtg	
Tunisia	healthy	tgggcccacgcgcgtacactgatgt	
Tunisia	healthy	agaagtcacagcaccagaggaaac	
Tunisia	healthy	tactatctctgtaatagatgtgag	
Tunisia	healthy	agtgtgcgtgtgtgagaaacacc	
Tunisia	healthy	acggctgggtttcaagacacctc	
Tunisia	healthy	ccctccgttagttagatcttcaa	
Tunisia	healthy	accacaaaaatataggaggtgaa	
Tunisia	healthy	acttcgacactccttatcttgaac	
Tunisia	healthy	aatgtgtaatgagttgaacgtgg	
Tunisia	healthy	gtgtcgcaatagtaattcaacctagtagc	
Tunisia	healthy	cgaagggaaaaagagtacaacaag	
Tunisia	healthy	tagcagattcttctggttggtgt	
Tunisia	healthy	caggcaagagacaacctggcgaactgaaa	
Tunisia	healthy	gaaggtcacggcgagacgagccgttat	
Tunisia	healthy	acagcagtggaaatagcggaccctt	
Tunisia	healthy	caaaacgactctcggcaacggatatct	
Tunisia	healthy	tagccgaacctcgttaaatactgtc	
Tunisia	healthy	atggtctgggccgcgcgcgct	
Tunisia	healthy	gtgggagcttcggcgaaattgaaat	
Tunisia	healthy	tcagtttcgagagaaagtgtgaa	
Tunisia	healthy	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	healthy	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	healthy	tgccggccgggggacggactggga	
Tunisia	healthy	gaccgatgcggattgcggcggcggcc	
Tunisia	healthy	aaagaagaactagatgatggcagcaag	
Tunisia	infected	tagaaaggctaagcacgtcgc	√
Tunisia	infected	catttatgctgctgagtgaca	
Tunisia	infected	ccgtcgggtcagatcttgg	
Tunisia	infected	cagtttcggtagaaaggctaa	√
Tunisia	infected	gcagaacaactccatctctc	
Tunisia	infected	tgtaatggcgtgcattttgct	
Tunisia	infected	cgggcggtaaattctgtccea	

Tunisia	infected	tggttgccggtggagttagcag	
Tunisia	infected	tttcaggaactcatcagtgtgc	√
Tunisia	infected	taacaggctgataccgcca	
Tunisia	infected	attaacaccaccaacggcag	
Tunisia	infected	aaagcaaacactcaattgctcat	
Tunisia	infected	aatggaacgaaacctttctaa	
Tunisia	infected	aatcatcaagggagcgacta	
Tunisia	infected	aaagaacaactcaagggaaag	
Tunisia	infected	ttgtaagcctataaatagggtg	
Tunisia	infected	tgggacttttcccttcgggaac	√
Tunisia	infected	ccttggggtgcccctatccgaa	√
Tunisia	infected	ttctcagcaaatgtttcgctc	
Tunisia	infected	tagcctttctaccgaaactgc	√
Tunisia	infected	ttgatgtgttagtcgctatt	
Tunisia	infected	atgcgacatctggatgaataat	
Tunisia	infected	tcgcagtaacgtttcttgccct	
Tunisia	infected	tcgtgtgcctaaatcgaagaa	
Tunisia	infected	gtaaccactctctcataagtt	√
Tunisia	infected	tggaatgagtacaatctaaatcc	
Tunisia	infected	acctggctctgataccataac	
Tunisia	infected	tctttcctactccaccattcc	
Tunisia	infected	atttataaagatgctactcttctg	
Tunisia	infected	ttatgtcaatagacatgtgcc	
Tunisia	infected	atgagtacaatctaaatcccttaacgag	
Tunisia	infected	tataggaatcacgtaaatgaacaa	
Tunisia	infected	ctctcggcaacggatatctcggctctcgc	
Tunisia	infected	atcagggtcaaagttcagggactaa	
Tunisia	infected	gtgtcgcgaatagtaattcaacctag	
Tunisia	infected	atztatcatgtcggtttggtgta	
Tunisia	infected	aaagatcaagaaacgtaagtcaat	
Tunisia	infected	gggcaagtctggtgccagcagccg	
Tunisia	infected	aacaattagctcatgcataggtca	
Tunisia	infected	gcggtccgacctttgcatgcggttc	
Tunisia	infected	aatacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	infected	agatttaccttcagtatttctaac	
Tunisia	infected	ctaaggctttttacttagattgac	
Tunisia	infected	ttttcgaattgaaaatcggccgaa	
Tunisia	infected	agggagatttctaggagcctctaa	
Tunisia	infected	taagaaatcaagaatcacactcat	
Tunisia	infected	agcctgccaaaaacaactttcgcc	
Tunisia	infected	aggttgcgtgttttttgtgtcatt	
Tunisia	infected	gaagggtcacggcgagacgagccgtttat	√
Tunisia	infected	atagacgaaagacatatggaatat	
Tunisia	infected	gaagtagattaaagctctgcctaaa	
Tunisia	infected	atcaagtaagctgatgtgttgact	
Tunisia	infected	gtagtgtgtgcaatgacggagcca	
Tunisia	infected	ttcgcaagaatgaaactcaaaggaat	
Tunisia	infected	atcaactagccccgaaaatggatggc	
Tunisia	infected	cgattgaatggtcgggtgaagtgtt	
Tunisia	infected	ctcacacctagagattcattaggc	
Tunisia	infected	gggaactcatatcatcaaaagttctga	
Tunisia	infected	gaacagtacctgtcgtgggagag	
Tunisia	infected	ccggtcaataccgtactgtaccga	
Tunisia	infected	agagttgcataatctgaaagccct	
Tunisia	infected	gtacaagtaggtggatatttcaaa	
Tunisia	infected	gagtgaaccggtgaatttacatcc	
Tunisia	infected	aataaactcacactgctatacggaa	
Tunisia	infected	attatcagattgcatccttaaagt	
Tunisia	infected	tattctggtgtcctaggcgtagagg	

Tunisia	infected	gcgagtttggcgagagtagtactagg	
Tunisia	infected	agtgaaggttgtggttttctaagc	
Tunisia	infected	cttagattataggggtgactcagt	
Tunisia	infected	tgtccttttacactcgagttcgat	
Tunisia	infected	attcttcagaaatgacatgagaaa	
Tunisia	infected	gctcgcggttgactacgtccctgcc	
Tunisia	infected	aagggaaactctgtcagtttttcgg	
Tunisia	infected	aactacactagtgggtgctttggt	
Tunisia	infected	tgcagagacagccaggaggtttgcc	
Tunisia	infected	cttcataattaggcacacttaggc	
Tunisia	infected	taccaaatagtgcatagtggg	
Tunisia	infected	cggcgaaacttttgatcagaag	
Tunisia	infected	acgtgggtggttcgctgcccgca	
Tunisia	infected	tttcggtccttggtgcacctt	
Tunisia	infected	catactaccagcctggactgag	
Tunisia	infected	aagcacagacctttcactcagt	
Tunisia	infected	cagtttcggtagaaaggctaag	√
Tunisia	infected	acgggtaggcgtcgtaaccctag	√
Tunisia	infected	cttctccagaatcacttctg	√
Tunisia	infected	caatgacgtaaggtgggactt	√
Tunisia	infected	ggattgcattcataattcagtca	
Tunisia	infected	tgtctgtgcttagcacactgat	√
Tunisia	infected	gcgctcttagttcagttcggtag	
Tunisia	infected	cggcaacggatatctcggctc	
Tunisia	infected	tccgaccaggcttcattcccc	
Tunisia	infected	gtcacagAACaccacaataggca	
Tunisia	infected	ccacacgagatttctgttctc	
Tunisia	infected	cgcaggcagatttgggtgtctt	
Tunisia	infected	tcatttcagagactcatcagt	√
Tunisia	infected	gacttttccttcgggaaccaag	√
Tunisia	infected	gaaactgggttacgacgccta	√
Tunisia	infected	tcatacagatgctaagcacaga	√
Tunisia	infected	tggggtgcctatccgaagca	√
Tunisia	infected	ttagatgaccatcaacaaca	
Tunisia	infected	aactggcgaactactactctagc	
Tunisia	infected	aggggggtgtgatccaggta	√
Tunisia	infected	ttacagtcagaaccgaaccac	
Tunisia	infected	tacgacgcctaccaggattc	√
Tunisia	infected	aaccagggggagtgtagcc	√
Tunisia	infected	tgggggtgccctatccgaagc	√
Tunisia	infected	aaggctaaatacgggagagag	
Tunisia	infected	tgcgctcctggacgtagcctt	
Tunisia	infected	aaaggtctgtgcttagcacac	√
Tunisia	infected	aaaccctagggaaaagtcca	√
Tunisia	infected	ctgggtcacactccccctggg	√
Tunisia	infected	tccgacagggccgacaaagta	
Tunisia	infected	attgacgagtgcttagccttc	√
Tunisia	infected	tagcacactgatgagttcctg	√
Tunisia	infected	aaacagattcttgagaacatc	
Tunisia	infected	accgctcaaacctagggaaa	√
Tunisia	infected	tttgctttcactgcaactaag	
Tunisia	infected	accgttgatactactgttcaca	
Tunisia	infected	taagccactgatgagccgaa	√
Tunisia	infected	tatggagaagcacatgacagacgc	
Tunisia	infected	aggaaccgttgattcgcacaattggtca	
Tunisia	infected	accagctaagaaaagttagaggaa	
Tunisia	infected	aagtoaccacataaaggatgaaga	
Tunisia	infected	aggtgactctgagtgaaaggtca	√
Tunisia	infected	agaaaggaagaagatgaacagctt	

Tunisia	infected	aaggggaaaataaacaacaactggcc	
Tunisia	infected	ctcatgactccgaagccagtgagc	
Tunisia	infected	tgccgtagcacgatattgtccgct	
Tunisia	infected	tacctggttgatcctgccagtagtc	
Tunisia	infected	gggaactcatatcatcaaaagtctg	
Tunisia	infected	aaacaaggtctagtccaatggaat	
Tunisia	infected	acctatccatttcatgtgttagaa	
Tunisia	infected	aagtgtggttcaccttggaggagt	
Tunisia	infected	actcacaatgcatcaacggtcaga	
Tunisia	infected	cggttcaaaccgataaggggctcca	
Tunisia	infected	atgcgacgattaataaagagttgg	
Tunisia	infected	gggaactcatatcatcaaaagtctgg	
Tunisia	infected	accgggttacggtgcccactgcg	
Tunisia	infected	aatttcatgccgaatttgtgaaa	
Tunisia	infected	ttttagcttcaaggctatctaaa	
Tunisia	infected	cgacgttaaagtctgacgtggcaa	
Tunisia	infected	atgaccacttaagagcacattaaa	
Tunisia	infected	agccagtggcggaagctaccgtgcg	
Tunisia	infected	catgtagaaacagaaacagcact	
Tunisia	infected	ccgttgctctgatgattcatgataac	
Tunisia	infected	agggcacgcctgcctggcgctcacac	
Tunisia	infected	aaagatgtcattgggagttcgaaa	
Tunisia	infected	aacaaaagggtaaaagctcggt	
Tunisia	infected	tcttgagaagctttaatgtgttg	
Tunisia	infected	accaagaatggcgggtgtctagaat	
Tunisia	infected	gtcatggattaacaagagagtccaa	
Tunisia	infected	tactaggatgggtgacctcctggc	
Tunisia	infected	tacctggttgattcgctgcccgcgag	
Tunisia	infected	tcaggagtgtctgcggtaccaa	
Tunisia	infected	gttacggaatcgtttggtacacaa	
Tunisia	infected	aagagaatttaggaatcagggagt	

Résultats et Discussion

Séquençage des siARN

Une banque de siARN

L'interférence à l'ARN est un phénomène essentiel chez les plantes. Il permet la régulation de l'expression de plusieurs gènes et il est un mécanisme de défense contre différents pathogènes comme les viroïdes, les virus et même les bactéries (Navarro *et al.*, 2008). Il a été démontré que les membres des deux grandes familles de viroïdes peuvent induire l'interférence à l'ARN chez leurs hôtes. Entre autres, les plants de pêchers infectés par PLMVd, un représentant de la famille des *Avsunviroidae*, produisent des petits ARN d'environ 21 à 26 nucléotides caractéristiques de l'interférence à l'ARN (Landry *et al.*, 2004). Ces petits ARN semblent provenir de toutes les régions du génome de PLMVd. Par contre, il a été démontré *in vitro* que la région de la tige P11 de PLMVd peut être coupée par Dicer alors que son domaine branché n'était pas reconnu par cette enzyme (Landry et Perreault, 2005). Ces observations laissaient croire qu'il pouvait y avoir formation, *in vivo*, d'une molécule d'ARN double brin à partir des deux polarités du génome de PLMVd (Landry, 2004). Cependant, à ce moment, l'existence d'un mécanisme d'amplification de l'interférence à l'ARN par une RdRp n'était pas connue. Il est donc possible que Dicer ne reconnaisse que la tige P11 et qu'un phénomène d'amplification de la réponse d'interférence à l'ARN dirigé par une

RdRp permette de détecter par buvardage de type Northern des petits ARN homologues à tout le génome de PLMVd. Les analyses par buvardage de type Northern étaient insuffisantes pour bien comprendre les liens entre PLMVd et l'interférence à l'ARN (Landry, 2004), il devenait alors nécessaire de séquencer les petits ARN produits par les pêcheurs lors d'une infection par PLMVd (chapitre 1)

L'article présenté dans le chapitre 1, décrit la préparation d'une banque de petits ARN non-codants (ARNnc) à partir de plants de pêcheurs sains et infectés par PLMVd. L'analyse faite à partir de ces ARNnc y est aussi présentée, particulièrement en ce qui concerne les petits ARN homologues à PLMVd. Cependant, tous les résultats obtenus à partir de cette banque de ARNnc n'ont pas été publiés en raison de l'orientation donnée à l'article. Pourtant, d'autres observations intéressantes ont été faites dont il convient de discuter.

D'abord, il y avait, dans le protocole utilisé, une étape de multimérisation des ARNnc avant leur insertion dans le vecteur pGEM-T. Cette manipulation avait pour but d'augmenter le nombre de séquences disponibles par clone séquencé. En effet, il est possible d'obtenir des séquences de plus de 700 paires de bases (pb) à partir d'un plasmide. Les petits ARN d'intérêts ont en moyenne 22 nucléotides et si l'on ajoute la séquence des adaptateurs on obtient des séquences de 56 nt en moyenne. Il serait donc possible d'obtenir, dans le meilleur des cas, jusqu'à douze ARNnc par clone séquencé. Or, on a remarqué que la majorité de ceux-ci contenait des dimères (35 % des clones) et des trimères (28 % des clones) alors qu'une certaine proportion ne possédait qu'un seul petit ARN (5 % des clones). Le

multimère le plus long obtenu provenait d'un plant sain du Canada et contenait 8 ARNnc. Malgré plusieurs tentatives, il a été impossible d'améliorer l'efficacité de cette étape du protocole. Tout de même, le nombre de ARNnc obtenus est quand même doublé comparativement au nombre de plasmides séquencés.

Ensuite, il était nécessaire de comparer les petits ARN obtenus à partir de plants de pêchers sains et infectés pour déterminer si les séquences des petits ARN homologues à PLMVd ne se retrouvaient pas naturellement chez le pêcher. C'est pourquoi les petits ARN de plants sains et infectés de Tunisie et du Canada ont été étudiés. Il était possible que les différents cultivars de pêchers retrouvés dans ces régions géographiquement distinctes expriment différents ARNnc. Cependant, la majorité des ARNnc obtenus étaient uniques et ceux qui ont été identifiés seulement chez les deux plants du Canada, mais pas en Tunisie et vice versa, n'ont pas fourni d'informations intéressantes par leur nature et à la suite de recherche d'homologie avec différents types d'ARN. Il faudrait donc une banque de ARNnc plus étendue provenant de ces cultivars de pêchers pour espérer voir l'expression de différents ARNnc.

Aussi, il est mentionné dans le texte du chapitre 1 qu'il était impossible de dire si les petits ARN retrouvés plusieurs fois dans un même échantillon provenaient d'un biais dans la technique utilisée, ou s'ils étaient plus présents dès le départ dans les échantillons. Il a effectivement été tenté d'éliminer l'une ou l'autre de ces hypothèses, mais sans succès. En effet, les séquences des ARNnc retrouvés de multiples fois étaient variées et ne possédaient pas de dénominateur commun. De plus, il ne semblait pas y avoir de préférence pour un type de nucléotides à leurs extrémités, ce qui aurait pu indiquer un biais

lors du clonage des ARNnc. Leur structure prédite informatiquement par l'application MFOLD (Walter *et al.*, 1994) ont été comparées et aucune structure commune n'a été observée. La majorité des ARNnc présents plus d'une fois par échantillon ont été détectés seulement deux fois. Ces ARN avaient des homologies avec divers types d'ARN comme : PLMVd, des ARNm, des ARN ribosomiaux et des miARN. Par contre, rien ne permettait d'expliquer leur surreprésentation par rapport aux autres ARNnc. Un petit ARN attirait particulièrement l'attention parce qu'il était retrouvé plusieurs fois dans tous les échantillons. Cette séquence (5'-ttgatgtgttagtcgctatt-3') composée de 21 nt n'a pas d'homologie avec des ARN contenus dans les banques d'ARN utilisées pour faire les analyses au Chapitre 1. Il est donc impossible d'indiquer sa provenance, ce qui permettrait d'expliquer son abondance particulière dans la banque de ARNnc. Après ces observations, il a été convenu qu'il était impossible d'expliquer la surreprésentation de certains ARNnc.

Enfin, la banque de ARNnc a été comparée à plusieurs banques d'ARN connus. Ceci a permis de classer les ARNnc en fonction de leur homologie avec ces ARN. L'étude des ARNnc de quelques groupes n'a pas été décrite au chapitre 1. Par exemple, une certaine proportion des petits ARN avait déjà été identifiée dans d'autres études de séquençage à grande échelle des petits ARN comme le démontre la colonne « small RNA » de la figure 7C. Tous les petits ARN présents dans ce groupe ont une homologie avec des petits ARN retrouvés chez *Arabidopsis thaliana*. Ceci démontre qu'il y a une conservation au point de vue des petits ARNnc entre *Prunus persica* et *Arabidopsis thaliana*. Les ARNnc de ce groupe proviennent de façon équivalente des

plants sains et infectés par PLMVd. Bien qu'aucune fonction n'avait été attribuée à la majorité de ces petits ARN, certains d'entre eux ont été identifiés comme des miARN, eux aussi représentés dans la figure 7C. Les petits ARN ayant une homologie avec des miARN provenaient eux aussi de tous les plants étudiés (Tableau 3). Les micro-ARN identifiés dans la banque de ARNnc réguleraient trois fonctions majeures : le développement apical et floral des plantes, la différenciation cellulaire et la réponse en carence de soufre. Les deux premiers types de miARN ont été identifiés chez les plants des deux régions alors que les miARN produits en réponse à une carence en soufre n'ont été détecté que chez les plants provenant du Canada. Cette observation pourrait indiquer que les plants de cette région souffrent d'une carence en soufre, d'autant plus que plusieurs miARN régulant cette fonction y ont été retrouvés. Étrangement, tous les miARN identifiés provenant du plant infecté du Canada avait cette fonction (Tableau 3). Cependant, il n'est pas exclu que ces miARN soit exprimés à un niveau basal dans les plants de pêcher, mais qu'ils n'aient pas été retrouvés dans les plants de Tunisie en raison du faible nombre de miARN identifiés. Les miARN régulant la différenciation cellulaire ciblent plus précisément un facteur de réponse à l'hormone auxine qui est connue pour avoir des rôles majeurs dans la différenciation cellulaire.

Un autre groupe de ARNnc a été négligé dans le chapitre 1, celui des virus. Les ARNnc homologues à des séquences virales représentent une très faible proportion de tous les ARNnc obtenus. Comme il était connu que le plant de Tunisie infecté par PLMVd était aussi infecté par deux virus, il était intéressant de vérifier si des petits ARN homologues à ces virus pouvaient être retrouvés. Les petits ARN appartenant au groupe virus (Tableau 4)

Tableau 3 : Origine et séquence des petits ARN homologues à des miARN et leur fonction potentielle

Plant d'origine		Séquence	miARN	Fonction
Pays	État			
Canada	Sain	tccgaccaggcttcattcccc	MIR166G	Développement apical et floral
Canada	Sain	tgaagctgccagcatgat	MIR167B	Différenciation cellulaire
Canada	Sain	ctgaagtgtttggggggaccc	MIR395F	Carence en sulfate
Canada	Sain	tgaagctgccagcatgatctg	MIR167D	Différenciation cellulaire
Canada	Infecté	ctgaagtgtttgggggaact	MIR395E	Carence en sulfate
Canada	Infecté	tgaagtgtttgggggaactc	MIR395E	Carence en sulfate
Canada	Infecté	ctgaagtgtttggggggaccc	MIR395F	Carence en sulfate
Tunisie	Sain	tccgaccaggcttcattcccc	MIR166G	Développement apical et floral
Tunisie	Infecté	tccgaccaggcttcattcccc	MIR166G	Développement apical et floral
Tunisie	Infecté	ttagatgaccatcaacaaca	MIR827A	Inconnue

Tableau 4 : Origine et séquences des petits ARN homologues à des ARN viraux

Plant d'origine		Séquence	Virus
Pays	État		
Canada	Infecté	aaagatctgaaaaatgttcgtg	Peach chlorotic mottle virus
Tunisie	Infecté	atttataaagatgctactcttcgt	Enterobacteriophage T4
Tunisie	Infecté	cttcttccagaatcacttctg	Cyanophage P-SSM2
Tunisie	Infecté	aactggcgaactacttactctagc	Enterobacteriophage T7
Tunisie	Infecté	tccgacaggccgacaaagta	Prunus necrotic ringspot virus

proviennent des plants infectés de Tunisie et du Canada. La découverte de ARNnc homologue au « *Prunus necrotic ringspot virus* » et au « *Peach chlorotic mottle virus* » dans les extraits d'ARN des plants infectés par PLMVd laisse supposer que ces plants sont aussi infectés par ces virus. Il est normal de pouvoir trouver des petits ARN provenant d'autres organismes que PLMVd et le pêcher puisque les plants ne sont pas cultivés dans un environnement stérile. Cependant, ces observations proposent que les symptômes observés sur ces arbres ne sont peut-être pas uniquement dus à PLMVd. Les autres séquences avaient une homologie avec des enterobacteriophages et un cyanophage. Il serait surprenant que des phages aient infecté les plants de pêchers pour déclencher l'interférence à l'ARN. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer cette observation est que ces phages aient été présents sur les feuilles lorsque l'ARN a été extrait. Des fragments d'acides nucléiques provenant de ces phages se seraient alors retrouvés mélangés à l'extrait d'ARN total du plant infecté de Tunisie et il a été possible de les cloner en même temps que les ARNnc. Ces observations suggèrent que quelques ARNnc ne soient pas d'origine cellulaire. Cependant, cette contamination n'était probablement pas significative étant donné la faible proportion retrouvée.

Au moment d'écrire l'article, l'idée de rechercher des séquences homologues à des bactéries n'avait pas été soulevée. Pourtant, il est connu que plusieurs bactéries vivent sur les feuilles des plantes. Avec la méthode utilisée pour isoler l'ARN des feuilles de pêcher, il serait possible de retrouver des acides nucléiques bactériens qui pourraient être clonés et séquencés. Une recherche rapide, en utilisant le programme Blast, a permis de constater

qu'effectivement certains ARNnc avaient une homologie avec des ARN et des génomes bactériens. Par contre, la quantité de ARNnc appartenant à ce groupe est limitée quoique plus importante que celle appartenant au groupe des virus. De plus, ce type de petit ARN n'avait pas d'importance dans l'étude présentée au Chapitre 1 puisque l'on s'intéressait particulièrement aux petits ARN homologues à PLMVd.

siARN et PLMVd

Un intérêt particulier a été porté aux ARNnc homologues à PLMVd pour tenter de répondre à plusieurs questions concernant ce viroïde et l'interférence à l'ARN. Tout d'abord, on constate que les trois quarts des petits ARN homologues à PLMVd étaient parfaitement complémentaires à au moins une séquence connue du viroïde. Les 25 % restant, possédaient un ou deux mésappariements, ce qui indique que, malgré de nombreux efforts de séquençage, tous les variants de PLMVd n'ont pas encore été identifiés. Ce n'est pas très surprenant étant donné que PLMVd est une quasi-espèce et que certaines mutations peuvent survenir dans son génome sans nuire à la réplication de ce viroïde. Ensuite, la majorité des ARNnc homologues à PLMVd étaient de 21 nt (Figure 9) ce qui suggère que ces ARN n'étaient pas des produits de dégradation puisque si c'était le cas, des séquences de toutes les longueurs auraient été retrouvées dans des proportions plus ou moins égales. De plus, 35,5 % des ARNnc homologues à PLMVd avaient une uridine (U) à leur extrémité 5' alors que seulement 12,9 % possédaient une guanosine (G) à cette position. Les adénosines (A) et les cytidines (C) occupaient tous

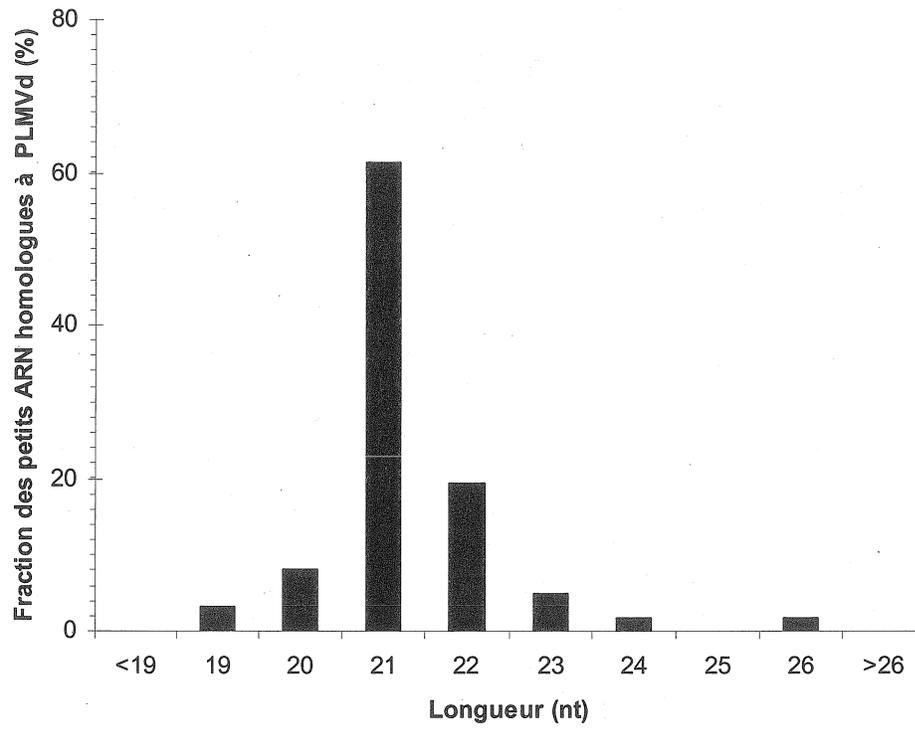


Figure 9. Pourcentage des petits ARN homologues à PLMVd ayant une longueur donnée

les deux environ 25 % des extrémités 5' de ces ARNnc. Il est connu que le brin d'ARN provenant d'un ARN double-brin clivé par une DCL et incorporé dans le RISC est celui qui est le moins stable en 5'. Ce petit ARN est appelé le brin guide. Une fois incorporé dans le RISC, le brin guide se retrouve protégé des ARNases cellulaires et pourra être identifié dans un extrait d'ARN. L'autre brin du duplex d'ARN, appelé brin passager, sera dégradé (Eamens *et al.*, 2008) et il sera impossible de le retrouver dans un extrait d'ARN. Dans une molécule d'ARN, les uridines forment des paires de bases Watson-Crick avec les adénosines grâce à deux ponts hydrogène alors que les paires de bases formées par les cytidines et les guanosines sont plus stables puisqu'elles possèdent trois ponts hydrogènes (Voet et Voet, 2002). Ceci semble indiquer que les petits ARN homologues à PLMVd passent par le RISC et qu'il y a un enrichissement en petits ARN ayant un U en 5'. Toutes ces observations présentées dans l'article du chapitre 1 suggèrent que PLMVd enclenche le mécanisme d'interférence à l'ARN. Une autre observation qui n'a pas été publiée supporte cette idée; la détection d'un phosphate en 5' des petits ARN homologues à PLMVd (Figure 10). La dégradation des ARN par des nucléases ou de façon non spécifique, ne laisse pas de phosphate en 5' (Voet et Voet, 2002). Lors de cette expérience, l'enzyme Antartic phosphatase (New England Biolabs) a été utilisée pour vérifier la présence de phosphate en 5'. Cette enzyme a la capacité d'enlever les groupements phosphates sur les molécules d'ARN. Le groupement phosphate étant très électronégatif, l'utilisation de l'Antartic phosphatase devrait entraîner un retard de migration des molécules d'ARN contenant ce groupement. En comparant la migration de l'ARN dans les puits 3 et 4 de la figure 10, on constate effectivement un retard

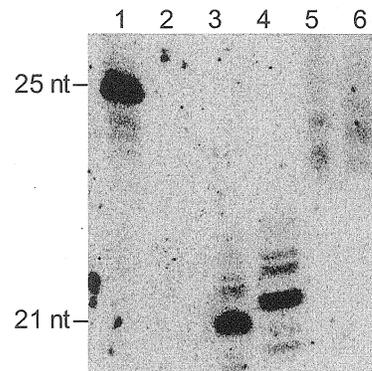


Figure 10. Buvarbage de type Northern effectué avec une sonde PLMVd +. Les puits 1 et 2 sont des oligonucléotides d'ADN de 25 nt homologues à PLMVd (-) et (+) respectivement. Les puits 3 et 4 contiennent des transcriptions d'un ARN de 21 nt marqués avec du [α - 32 P UTP]. Ces ARN radioactifs ont été non-traité et traité à l'Antartic phosphatase pour les puits 3 et 4 respectivement. Les puits 5 et 6 sont des extraits d'ARN totaux du plant de pêcher 1860-01A1 infecté par PLMVd traité et non traité à l'Antartic phosphatase respectivement. Les poids moléculaires sont donnés à titre comparatif uniquement puisque la migration de 25 nt est basée sur une molécule d'ADN et que celle de 21 nt est basée sur une molécule d'ARN.

de migration des molécules d'ARN dans un gel de polyacrylamide 20 %. La même observation est faite avec les puits 5 et 6 qui contiennent l'ARN extrait du plant infecté 1860-01A1 traité et non traité avec l'Antartic phosphatase respectivement. La présence d'un phosphate en 5' suggère donc que ces ARN ont été coupés par une ARNase de type III comme Dicer. Il est donc plausible que ces ARNnc soient bel et bien des siARN produits par la plante pour se protéger contre PLMVd.

Par contre, ce résultat n'a pas été publié en raison d'une observation inattendue. En effet, selon la banque de données obtenue par séquençage des petits ARN, la majorité des siARN homologues à PLMVd devrait avoir une longueur de 21 nt. Or, d'après ce buvardage, les petits ARN homologues à PLMVd détectés seraient de plus de 21 nt. Cependant, il existe un mécanisme de méthylation des ARNnc chez les plantes qui servirait à augmenter leur stabilité. L'ajout d'un groupement méthyle sur de petites molécules d'ARN peut retarder leur migration sur un gel de polyacrylamide. Il est donc possible que les siARN homologues à PLMVd aient été méthylés, ce qui expliquerait que leur poids moléculaire semble plus élevé que celui des ARN de 21 nt contrôles qui ne possèdent pas de groupement méthyle. La longueur des molécules d'ARN contenues dans les puits 5 et 6 est donc difficile à déterminer.

Toutes les observations du Chapitre 1 ont été faites sur des molécules d'ARN. Pourtant, l'interférence à l'ARN implique la participation de beaucoup de protéines, notamment des enzymes qui interagissent avec l'ARN double-brin pour produire et utiliser les siARN comme les DCL et les AGO (Figure 6) par exemple. La démonstration de l'interaction entre PLMVd et ces protéines

confirmerait de façon élégante que PLMVd déclenche l'interférence à l'ARN chez le pêcher.

Interaction entre PLMVd et des protéines

Des tentatives ont été faites pour isoler des protéines impliquées dans l'interférence à l'ARN interagissant avec PLMVd. La première d'entre elles était l'utilisation d'un gradient de sucrose pour isoler un complexe contenant PLMVd et quelques protéines d'interférence à l'ARN. Un des problèmes de cette technique est que les protéines d'intérêt, comme les DCL, sont des enzymes qui n'ont pas comme fonction de rester attachées à leur substrat. L'interaction entre PLMVd et ces protéines n'était donc pas très stable et il a été impossible d'obtenir des complexes natifs de cette façon. Par la suite, il a été imaginé qu'en pontant l'ARN et les protéines à l'aide du formaldéhyde ce problème serait contourné. Malheureusement, il semble que les feuilles de pêchers soient difficilement perméables au formaldéhyde, ce qui rend le pontage *in vivo* difficile et empêche l'obtention d'une quantité suffisante de complexes. Enfin, des essais ont été faits *in vitro* avec des extraits protéiques de feuilles de pêchers et des transcriptions de PLMVd. Dans ces cas, l'ARN était très instable, probablement en raison d'ARNases présentes dans les extraits de protéines, et les complexes obtenus à la suite du pontage étaient de très haut poids moléculaire suggérant que plusieurs protéines interagissent ensemble de façon plus ou moins spécifique *in vitro* et qu'il est possible de les ponter au formaldéhyde. Il est donc impossible, pour l'instant, de confirmer

que PLMVd interagit directement avec les enzymes du mécanisme d'interférence à l'ARN. De plus, une collègue de laboratoire, Audrey Dubé, a identifié des protéines interagissant avec PLMVd par des approches utilisant les buvardages de type Northern et NorthWestern, mais aucune d'entre elles n'était impliquée dans l'interférence à l'ARN. Il pourrait être intéressant de purifier les complexes RISC, ou à tout le moins une protéine AGO, et d'analyser les pARN associés avec ces protéines. Comme les protéines AGO conservent les siARN et s'en servent pour cibler des ARNm, on peut s'attendre à retrouver des siARN homologues à PLMVd liés sur les protéines Argonautes. Malheureusement, il n'existe pas d'anticorps contre les AGO et les études où de telles protéines sont purifiées chez des plantes, utilisent des protéines recombinantes chez *Arabidopsis thaliana*. Comme le pêcher n'est pas séquencé et que PLMVd ne peut pas infecter *Arabidopsis*, il faudra attendre la disponibilité d'anticorps anti-AGO avant de pouvoir réaliser cette expérience.

Dans un avenir rapproché, une approche semblable à celle utilisée dans le chapitre 1, mais beaucoup plus puissante, pourra être utilisée pour obtenir des informations supplémentaires sur PLMVd et l'interférence à l'ARN. Cette approche est basée sur le séquençage à haut débit.

Perspective

La limite majeure de l'approche utilisée au chapitre 1 est la quantité réduite de séquences obtenues. Par exemple, il est possible qu'il existe des petits ARN homologues aux régions apparemment non ciblées par l'interférence à l'ARN du génome de PLMVd. Ils n'ont peut-être pas été clonés en raison de leur faible concentration en cellule. Dans le même ordre d'idées, c'est potentiellement par malchance qu'il n'a pas été possible de retrouver des ARNnc chevauchant le site de coupure du motif catalytique en tête de marteau de polarité négative de PLMVd. Il semblait donc nécessaire de trouver une façon d'obtenir beaucoup plus de séquences avec lesquelles travailler. Le séquençage à haut débit de type Solexa s'est révélé être une solution idéale. Des travaux ont été faits dans le but de développer une telle approche et l'avancement de ces travaux sera présenté ici.

Séquençage à haut débit

Variation du niveau d'ARN dans le temps

Il était d'abord important de bien identifier les plants qui allaient être utilisés pour cette expérience. Les protocoles utilisés pour les expériences présentées dans cette section sont disponibles en annexe. L'ARN était facile à extraire pour les mois de mai et juin par la méthode du phénol chaud (Annexe 1), mais plus la saison avançait, plus il devenait difficile d'extraire l'ARN et plus la qualité de l'ARN extraite diminuait selon les ratios de la densité optique

Tableau 5. Concentration d'ARN et ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} pour tous les extraits d'ARN des plants sains

Plant	Mois	Concentration d'ARN total $\mu g/\mu l$	Ratio DO_{260nm}/DO_{280nm}
1829-12D4	mai	2,986	2,040
	juin	0,434	1,700
	juillet	0,656	1,970
	août	0,623	1,207
	septembre	0,841	1,339
	octobre	0,422	1,165
1291-11B6	mai	2,145	2,028
	juin	0,436	1,805
	juillet	0,655	1,143
	août	0,531	1,394
	septembre	0,471	1,299
	octobre	0,284	1,329
2015-04B3	mai	2,655	2,041
	juin	0,479	1,959
	juillet	0,799	1,695
	août	0,486	1,972
	septembre	0,535	1,099
	octobre	0,447	1,317
1828-02B3	mai	2,626	2,044
	juin	0,433	2,004
	juillet	0,644	1,845
	août	0,726	1,833
	septembre	0,590	1,343
	octobre	0,425	1,246
1857-06D3	mai	0,135	1,649
	juin	0,611	0,928
	juillet	0,819	1,278
	août	0,378	0,682
	septembre	0,910	0,806
	octobre	0,512	0,928

Tableau 6. Concentration d'ARN et ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} pour tous les extraits d'ARN des plants infectés

Plant	Mois	Concentration d'ARN total $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Ratio DO_{260nm}/DO_{280nm}
1922-01B1	mai	3,090	2,020
	juin	3,438	2,035
	juillet	1,013	2,049
	août	0,941	1,754
	septembre	0,930	1,600
	octobre	0,511	1,506
1271-01A5	mai	2,670	2,066
	juin	1,586	2,034
	juillet	0,845	2,130
	août	0,878	2,056
	septembre	0,631	1,439
	octobre	0,387	1,461
1188-01D4	mai	3,358	2,065
	juin	1,052	2,047
	juillet	0,830	2,079
	août	0,819	1,842
	septembre	0,597	1,486
	octobre	0,348	1,508
1860-01A1	mai	2,442	2,066
	juin	1,786	2,117
	juillet	0,899	1,875
	août	0,562	1,817
	septembre	0,642	1,633
	octobre	0,434	1,532
1922-03B1	mai	2,562	2,025
	juin	3,125	2,127
	juillet	0,964	1,981
	août	1,030	1,985
	septembre	0,743	1,589
	octobre	0,534	1,269

(DO) à 260 nanomètres(nm) sur la DO à 280 nm obtenus (Tableau 5 et 6). En effet, une extraction d'ARN sans impureté devrait donner un ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} entre 1.8 et 2.0 ce qui n'est pas le cas pour tous les plants à partir du mois de juillet L'ARN du plant sain 1857-06D3 n'était pas utilisable puisqu'il n'a pas été possible d'obtenir d'ARN pour tous les mois. Pour vérifier l'infection, un buvardage de type Northern (Annexe 1) a été fait pour l'ARN extrait au mois de mai pour chacun des plants (Figure 11A). Ce buvardage permettait aussi de déterminer que le plant 1188-01D4 répliquait le plus de PLMVd. Un buvardage de type Northern a été fait avec les extraits d'ARN du plant 1188-01D4 pour les mois de mai à août afin de vérifier la variation du niveau d'expression de PLMVd dans le temps (Figure 11B). Il semblerait que la concentration de PLMVd diminue plus on avance dans l'année. Ensuite, un dernier buvardage a été effectué pour suivre l'évolution de l'expression des petits ARN homologues à PLMVd à des mois de mai à août (Figure 11C). Afin de vérifier si la quantité d'ARN chargée dans chaque puits était constante, la sonde permettant de détecter PLMVd sur cette membrane a été retiré et une seconde hybridation a été faite avec une sonde détectant l'ARN ribosomal 5.8S (Figure 11C).

Avec ces quelques essais, il a été déterminé que les extraits d'ARN réalisés au mois de mai des plants 1829-12D4 et 1188-01D4 devraient être utilisés pour le séquençage à haut débit. Ces extraits d'ARN étaient de meilleure qualité si l'on tient compte de l'apparence des ARN sur gel d'agarose et des rapports DO_{260nm}/DO_{280nm} (Tableau 3 et Tableau 4). Aussi, la quantité d'ARN disponible pour les expériences était plus élevée pour ce mois de l'année. De plus, le plant 1188-01D4 exprimait un niveau intéressant de

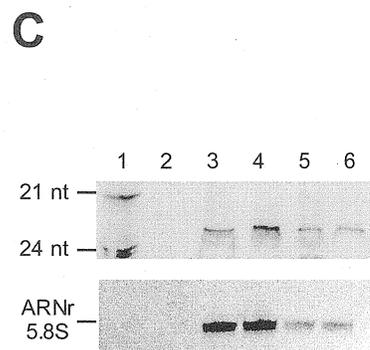
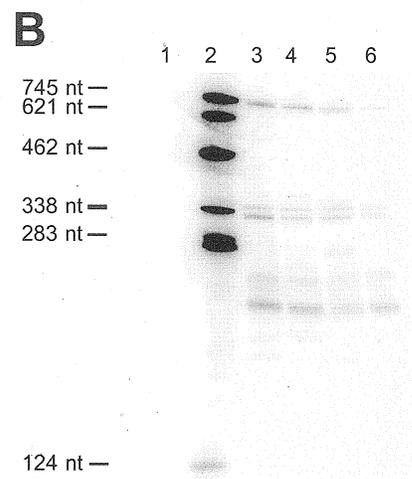
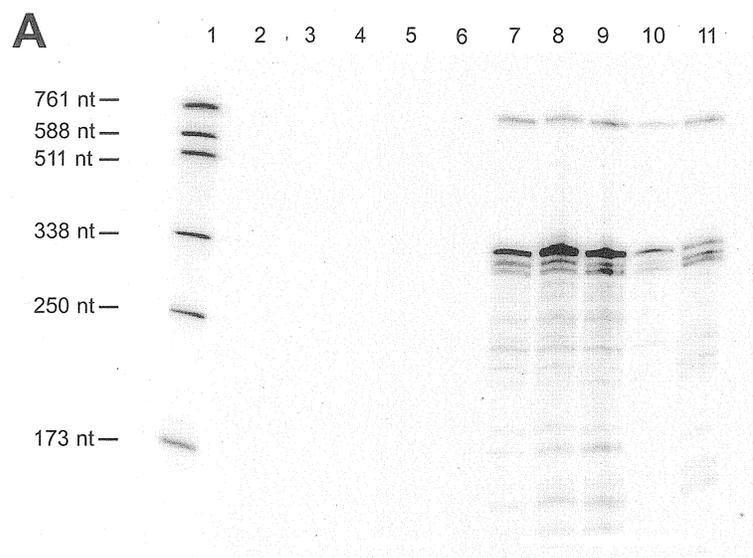


Figure 11. Buvardages de type Northern servant à vérifier la présence d'ARN homologues à PLMVd dans différents extraits d'ARN. Panneau A, extraits d'ARN du mois de mai des plants 1291-11B6, 1828-02B3, 1829-12D4, 2015-04B3, 1922-01B1, 1188-01D4, 1271-01A5, 1860-01A1 et 1922-03B1 correspondant aux puits 3 à 11 respectivement. Les puits 1 et 2 sont des transcriptions du plasmide pPD1 pour obtenir PLMVd de polarité positive et négative respectivement. La sonde utilisée est PLMVd de polarité négative marqué radioactivement avec du [α - 32 P UTP]. La sonde utilisée pour le panneau B est PLMVd de polarité positive marqué à la radioactivité au [α - 32 P UTP] et les extraits d'ARN proviennent du plant 1188-01D4 pour les mois de mai (3), juin (4), juillet (5) et août (6). Les puits 1 et 2 correspondent à des transcriptions de PLMVd de polarité positive et négative respectivement. En C, la sonde utilisée pour la partie supérieure est PLMVd de polarité positive marqué au [α - 32 P UTP]. Les puits 1 et 2 contiennent deux oligonucléotides synthétiques de 21 et 24 nt homologues à PLMVd de polarité positive (1) et négative (2). Les extraits d'ARN proviennent du plant 1188-01D4 pour les mois de mai (3), juin (4), juillet (5) et août (6). Pour la partie inférieure, il s'agit de la même membrane mais la sonde radiocative utilisée est en partie complémentaire à l'ARN 5.8S. Lorsqu'il est connu, le nombre de nucléotides correspondant à chaque bande est indiqué à gauche des panneaux.

PLMVd et de siARN homologues à PLMVd (Figure 11). Enfin, la variation de la concentration de PLMVd et des siARN dans le temps n'était pas assez importante pour justifier l'utilisation d'extraits d'ARN d'un autre mois. En effet, si l'on regarde uniquement le niveau d'expression des petits ARN homologues à PLMVd dans le temps (Figure 11C), il semble que celui-ci augmente jusqu'au mois de juin avant de redescendre à un niveau plus faible au mois d'août. Cependant, le niveau d'expression de l'ARN 5.8S suit la même tendance (Figure 11C), ce qui indique plutôt que le chargement des puits lors de cette expérience n'était pas constant. Pour vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de répéter cette expérience. Par contre, cela signifierait d'utiliser l'ARN qui pourrait être nécessaire pour des expériences futures, après l'obtention des résultats de séquençage à haut débit. C'est pourquoi un duplicata n'a pas été fait. Cependant, il serait important de répéter cette manipulation s'il reste de l'ARN une fois que les expériences nécessaires auront été faites.

Préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit

La préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit a été réalisée en suivant les instructions fournies pour le kit de préparation des échantillons de petits ARN distribué par Illumina (Annexe 1). Étant donné les coûts élevés que représente un séquençage à haut débit, il fallait vérifier l'efficacité des préparations. Cela a été fait en clonant des petits ARN à partir de la préparation d'échantillons d'ARN du plant 1829-12D4. Les clones ont été obtenus de la même façon qu'au chapitre 1, mais en omettant l'étape de

multimérisation pour économiser du temps. Plusieurs clones ont été obtenus et dix d'entre eux ont été envoyés séquencer à La Plateforme de Séquençage et Génotypage des Génomes de l'Université Laval. La séquence d'un clone n'était pas utilisable. Deux clones ne contenaient que le vecteur pGEM-T ligaturé sur lui-même. Les séquences des inserts des 7 clones restants ont été analysées et les incertitudes dans l'identification des bases ont été corrigées par observation des chromatogrammes. Une fois les séquences des inserts remises dans la même orientation (Tableau 7), les séquences des adaptateurs 5' et 3' ont été déterminées puisqu'elles ont été retrouvées à chaque extrémité d'une séquence variable pour tous les clones. Les séquences associées à chacun des adaptateurs sont les suivantes :

Adaptateur 5' : 5' -CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3'

Adaptateur 3' : 5' -GATCGTCGGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT-3'

Le clonage utilise une quantité non négligeable d'échantillon et il était intéressant de trouver une manipulation utilisant moins d'ADNc pour vérifier l'efficacité de préparation des échantillons. La séquence des adaptateurs, que la compagnie Illumina refusait de nous fournir au départ a pu être déterminée à partir des clones obtenus. Avec ces séquences, il sera désormais possible de faire une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur une quantité minimale d'échantillon final. L'ADN obtenu suite à ce PCR pourra être utilisé pour vérifier l'efficacité de préparation des échantillons par migration sur gel d'agarose et par clonage, si nécessaire, sans affecter la quantité d'échantillon disponible pour le séquençage à haut débit de façon significative.

Tableau 7. Séquences des inserts contenus dans les plasmides des différents clones obtenus à partir de la préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit.

Clone	Séquence
1	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTCCGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT
2	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTCCGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT
3	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTCCGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT
4	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAATGTAGGGTGTAAACCGGGTGGCCGATCGTCCGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT
5	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAAGAACTCTGTTCTTTATTTCTCTGATCGTCCGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT
6	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGTCCGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT
7	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGGAAACCCATGGATCCAAGTATATGATCCGACTGTAGAACTCTGAACCTGTCGGTGGTCGCCGTATCATT

Comme les deux échantillons ont été préparés de la même manière, et que le poids moléculaire du produit final était le même pour les deux échantillons, on peut conclure que la préparation des échantillons des petits ARN d'un plant sain et d'un plant infecté a fonctionné. Ces deux échantillons ont été envoyés au « The Center for Applied Genomic (TCAG) of the Hospital for Sick Children » de Toronto pour être séquencés par la technologie Solexa d'Illumina. Un résumé des principes utilisés par cette technologie est présenté à l'annexe 1.

Avec le séquençage de plus d'un million de petits ARN d'un plant sain et d'un plant infecté, il sera possible de répondre à quelques questions soulevées dans les travaux précédents et de diriger les expériences futures pour mieux comprendre l'interférence à l'ARN et l'infection par PLMVd. Cette expérience permettra sans doute de confirmer que le génome de PLMVd n'est pas ciblé équitablement par l'interférence à l'ARN. On peut s'attendre aussi à obtenir des petits ARN chevauchant le site de coupure du motif catalytique en tête de marteau de la polarité négative de PLMVd, ce qui supportera l'hypothèse que les deux molécules circulaires de PLMVd sont ciblées par l'interférence à l'ARN. En effet, des ARNnc chevauchant le site de la coupure du *hammerhead* de polarité positive de PLMVd ont déjà été identifiés au chapitre 1 et il en a été déduit que ces petits ARN provenaient sans doute du clivage de la molécule circulaire de polarité positive du viroïde. Aussi, la détection de duplex d'ARN provenant de la tige P11 de PLMVd et contenant les mésappariements attendus serait une preuve supplémentaire que les monomères de PLMVd sont ciblées par l'interférence à l'ARN. D'un autre côté, si de tels duplex d'ARN ne sont pas retrouvés alors que des duplex parfaits le

sont, cela signifierait que les ARNnc homologues à PLMVd proviennent d'un ARN double-brin composé des deux polarités de son génome. Ces ARN double-brins peuvent être formés lors de la réplication du viroïde ou par appariement de deux molécules génomiques linéaires dans le cytoplasme. Cette hypothèse est improbable étant donné ce qui a été observé à la suite de ce travail, mais ne peut pas être éliminée avec les résultats disponibles à ce jour. De plus, une variation dans l'expression de petits ARN non homologues à PLMVd pourrait aussi être observée suggérant que l'infection par un viroïde modifie la régulation de l'expression de certains gènes. Enfin, il serait sans doute possible de trouver quelques homologies entre les petits ARN séquencés du pêcher et ceux obtenus dans d'autres séquençages à haut débit, notamment chez *Arabidopsis thaliana*. Malheureusement, ces résultats seront disponibles après le dépôt de ce mémoire et on ne peut qu'émettre des hypothèses pour l'instant.

Conclusion

Ce travail a démontré que, *in vivo*, les deux polarités du génome de PLMVd sont clivées en petits ARN non-codant dans le pêcher. La nature de ces ARNnc et leur alignement sur la molécule de PLMVd suggèrent que ces ARNnc sont des petits ARN interférents produits par la plante pour se protéger contre ce pathogène. D'après les observations faites, il semble que les molécules circulaires de PLMVd soient préférentiellement ciblées par l'interférence à l'ARN. Ces observations combinées aux informations disponibles sur l'interférence à l'ARN permettent de dire que les molécules circulaires de PLMVd se retrouvent à un moment ou à un autre dans le cytoplasme des cellules végétales. L'analyse de la composition des petits ARN séquencés a permis de faire quelques constatations intéressantes qui ont mené à certaines hypothèses. Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas de confirmer la véracité de ces hypothèses principalement en raison de la quantité limitée de petits ARN séquencés. C'est pourquoi il a été entrepris de séquencer à grande échelle les petits ARN de plants de pêchers. Les résultats préliminaires ont été présentés, mais la partie la plus intéressante de ce travail n'est pas encore disponible puisque les millions de séquences n'ont pas encore été obtenues. Une fois ces résultats disponibles, il faudra les analyser de façon bioinformatique et confirmer les observations faites avec des techniques biochimiques ce qui demandera beaucoup de temps et d'effort afin de tirer le plus d'informations possibles de cette expérience d'une puissance remarquable.

Remerciements

J'aimerais remercier le docteur Jean-Pierre Perreault pour m'avoir permis de continuer ma formation dans son laboratoire, de même que tous les membres du laboratoire pour l'aide qu'ils m'ont apporté par leurs commentaires, leurs questions et leurs savoir faire. Je dois aussi remercier mes parents, Réjean St-Pierre et Louise Fiset, pour le support qu'ils m'ont manifesté tout au long de mes études et pour toujours avoir cru en moi.

Références

- Amari, K., Ruiz, D., Gómez, G., Sánchez-Pina, MA., Pallás, V. & Egea, J. (2007) An important new apricot disease in Spain is associated with Hop stunt viroid infection. *Eur. J. Plant Pathol.*, **118**, 173-181
- Ambros, S., Hernandez, C. & Flores, R. (1999) Rapid generation of genetic heterogeneity in progenies from individual cDNA clones of peach latent mosaic viroid in its natural host. *J. Gen. Virol.*, **80**, 2239-2252.
- Ambros, S. & Flores, R. (1998) In vitro and in vivo self-cleavage of a viroid RNA with a mutation in the hammerhead catalytic pocket. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 1877-1883.
- Antigus, Y., Lachman, O. & Pearlsman, M. (2007) Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in green house tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Dis.*, **91**, 47-50
- Arezou, Y., Jafarpour, B., Rastegar MF. & Javadmanesh, A. (2008) Molecular detection of potato spindle tuber viroid in Razavi and Northern Khorasan provinces. *Pak J Biol Sci.*, **11**, 1642-1645
- Barba, M., Ragazzino, E. & Faggioli, F. (2007) Pollen transmission of peach latent mosaic viroid. *J. Plant Pathol.*, **89**, 287-289
- Baumstark, T. & Riesner, D. (1995) Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4246-4254.
- Blodgett, EC. (1944) Peach calico. *Phytopathology*, **34**, 650-657.
- Bonfiglioli, RG., McFadden, GI. & Symons, RH. (1994) In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant J.*, **6**, 99-103.
- Bonfiglioli, RG., Webb, DR. & Symons, RH. (1996) Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by in situ hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.*, **9**, 457-465.
- Branch, AD., Benenfeld, BJ. & Robertson, HD. (1988) Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 9128-9132.
- Branch, AD., Robertson, HD., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C. & Abelson, J. (1982) Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science*, **217**, 1147-1149.

Branch, AD., Robertson, HD. & Dickson, E. (1981) Longer-than-unit-length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 6381-6385.

Branch, AD. & Robertson, HD. (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*, **223**, 450-455.

Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, DA., Skrzeczkowski, LJ. & Perreault, JP. (1999) Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: Hallmarks of group A viroids. *J. Virol.*, **73**, 6353-6360.

Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D. & Perreault, JP. (2000) Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.*, **74**, 2647-2654.

Candresse, T., Marais, A., Olliver, F., Verdin, E. & Blanchard, D. (2007) First report of the presence of tomato apical stunt viroid on tomato in S n gal. *Plant Dis.*, **91**, 330

Carbonell, A., Martinez de Alba, AE., Flores, R. & Gago, S. (2008) Double-stranded RNA interferes in a sequence-specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology.*, **371**, 44-53

Côté, F. (2000) Caractérisation des mécanismes de réplication et de pathog n se du viro ides de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd). Thèse de l'Université de Sherbrooke, Médecine, Biochimie, Sherbrooke

Côté, F., Lévesque, D. & Perreault, JP. (2001) Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. *J. Virol.*, **75**, 19-25.

Côté, F. & Perreault, JP. (1997) Peach latent mosaic viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by in vitro self-ligation. *J. Mol. Biol.*, **273**, 533-543.

Daros, JA., Marcos, JF., Hernandez, C. & Flores, R. (1994) Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 12813-12817.

Davies, JW., Kaesberg, P. & Diener TO. (1974) Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for proteins synthesis. *Virology*, **61**, 281-286

De la Peña, M., Navarro, B. & Flores, R. (1999) Mapping the molecular determinant of pathogenicity in a hammerhead viroid: A tetraloop within the in vivo branched RNA conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 9960-9965.

De la Peña, M. & Flores, R. (2002) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid RNA: Dissection of the pathogenicity determinant and comparative fitness of symptomatic and non-symptomatic variants. *J. Mol. Biol.*, **321**, 411-421.

Delgado, S., Martinez de Alba, AE., Hernandez, C. & Flores, R. (2005) A short double-stranded RNA motif of Peach latent mosaic viroid contains the initiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J. Virol.*, **79**, 12934-12943.

Desvignes, JC. (1976) The virus diseases detected in greenhouse and in field by the peach seedling GF 305 indicator. *Acta Hortic.*, **67**, 315-323.

Desvignes, JC. (1986) Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow mosaic virus diseases. *Acta Hortic.*, **193**, 51-57

Diener, T.O. (1971) Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, **45**, 411-428

Diener, T.O. (1993) The viroid: big punch in a small package. *Trends Microbiol.*, **1**, 289-294.

Diener, TO & Raymer, W.B. (1967) Potato spindle tuber viroid: A plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science*, **158**, 378-381

Domingo, C., Conejero, V. & Vera, P. (1994) Genes encoding acidic and basic class III beta-1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Mol. Biol.*, **24**, 725-732.

Eamens, A., Wang., MB., Smith, NA. & Waterhouse, P. (2008) RNA Silencing in Plants : Yesterday, Today and Tomorrow. *Plant Physiol.*, **147**, 456-468

Elleuch, A., Khouaja, FD., Hamdi, I., Bsais, N., Perreault, JP., Marrakchi, M. & Fakhfakh, H. (2006) Sequence analysis of three citrus viroids infecting a single Tunisian citrus tree (*Citrus, reticulata*, Clementine). *Genet. Mol. Biol.*, **296**, 705-710.

Fadda, Z., Daros, JA., Fagoaga, C., Flores, R. & Duran-Vila, N. (2003) Eggplant latent mosaic viroid, the candidate type species for a new genus within the family Avsunviroidae (Hammerhead viroids). *J. Virol.*, **77**, 6528-6532

Faggioli, F., Loreti, S. & Barba, M. (1997) Occurrence of peach latent mosaic viroid (PLMVd) on plum in Italy. *Plant Dis.*, **81**, 423.

Fekih Hassen, I., Massart, S., Motard, J., Roussel, S., Parisi, O., Kummert, J., Fakhfakh, H., Marrakchi, M., Perreault, JP. & Jijakli, MH. (2007) Molecular features of new peach latent mosaic viroid variants suggest that recombination may have contributed to the evolution of this infectious RNA. *Virology*, **360**, 50-57.

Fekih Hassen, I., Roussel, S., Kummert, J., Fakhfakh, H., Marrakchi, M. & Jijakli, MH. (2005) Peach latent mosaic viroid detected for the first time on almond trees in Tunisia. *Plant Dis.*, **89**, 1244.

Fekih Hassen, I., Roussel, S. & Kummert, J. (2004) First report of pear blister canker viroid, peach latent mosaic viroid, and hop stunt viroid Infecting fruit trees in Tunisia. *Plant Dis.*, **88**, 1164.

Feldstein, PA., Hu, Y. & Owens, RA. (1998) Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6560-6565.

Flores, R., Delgado, S., Gas, ME., Carbonell, A., Molinà, D., Gago, S, & De La Peña, M. (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Lett.*, **567**, 42-48

Flores, R., Hernández, C., Avinent, L., Hermoso, A., Llácer, G., Juárez, J., Arregui, JM., Navarro, L. & Desvignes, JC. (1992) Studies on the detection, transmission and distribution of peach latent mosaic viroid in peach trees. *Acta Hortic.*, **309**, 325-330.

Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, AE., Daròs, JA. & Di Serio, F. (2005) Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, **43**, 117-139

Flores, R. & Semancik, JS. (1982) Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 6285-6288.

Gago, S., De la Peña, M. & Flores, R. (2005) A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its in vitro folding and in vivo viability. *RNA*, **11**, 1073-1083.

Gandia, M., Rubio, L., Palacio, A. & Duran-Vila, N. (2005) Genetic variation and population structure of an isolate of Citrus exocortis viroid (CEVd) and of the progenies of two infectious sequence variants. *Arch. Virol.*, **150**, 1945-1957.

Gas, ME., Molina-Serrano, D., Hernandez, C., Flores, R. & Daros, JA. (2008) Monomeric linear RNA of citrus exocortis viroid resulting from processing in vivo has 5'-phosphomonoester and 3'-hydroxyl termini: implications for the RNase and RNA ligase involved in replication. *J. Virol.*, **82**, 10321-10325

Giunchedi, L., Gentit, P., Nemchinov, L., Poggi-Pollini, C. & Hadidi, A. (1998) Plum spotted fruit : A disease associated with peach latent mosaic viroid. *Acta Hortic.*, **472**, 571-579.

Gómez, G., Martínez, G. & Pállas V. (2008) Viroid-induced symptoms in *Nicotiana benthamiana* plants are dependent on RDR6 activity. *Plant Physiol.*, **148**, 414-423

Gómez, G. & Pállas, V. (2004) A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *J. Virol.*, **78**, 10104-10110.

Gómez, G. & Pállas V. (2007) Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J.*, **51**, 1041-1049

Goss, RW. (1926) Transmission of potato spindle tuber by cutting knives and seed piece contact. *Phytopathology*, **16**, 299-303.

Grill, LK. & Semancik, JS. (1978) RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 896-900.

Gross, HJ., Liebl, U., Albery, H., Krupp, G., Domdey, H., Ramm, K. & Sanger, HL. (1981) A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. *Biosci. Rep.*, **1**, 235-241.

Hadidi, A., Giunchedi, L., Shamoul, AM., Poggi-Pollini, C. & Amer, AM. (1997) Occurrence of peach latent mosaic viroid in stone fruit and its transmission with contaminated blades. *Plant Dis.*, **81**, 154-158

Hall, TC., Wepprich, RK., Davies, JW., Weathers, LG & Semancik, JS. (1974) Functional distinction between the ribonucleic acids from citrus exocortis viroid and plant viruses: Cell-free translation and aminoacylation reactions. *Virology*, **61**, 486-492

Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, TM. & Riesner, D. (1989) Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.*, **8**, 3941-3949.

Haseloff, J., Mohamed, N.A. & Symons, R.H. (1982) Viroid RNAs of cadang-cadang disease of coconuts. *Nature*, **299**, 316-332.

Hernandez, C. & Flores, R. (1992) Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 3711-3715.

Howell, MD., Fahlgren, N., Chapman, EJ., Cumbie, JS., Sullivan, CM., Givan, SA., Kasschau, KD. & Carrington, JC. (2007) Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in *Arabidopsis* reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell*, **19**, 926-942

Hutvagner, G. & Simard, MJ. (2008) Argonaute proteins : key player in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **9**, 22-32

Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, RS & Ding, B. (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**,1332-1334

Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, RA., Nelson, RS. & Ding, B. (2002) Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **15**, 990-999

Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris AR., Molina, C., Nelson, RS. & Ding, B. (2007) A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J Virol.*, **81**, 2980 -2994

Jakob, B., Gamalei, Y., Wolf, R., Heber, U. & Gross, HJ. (1997) Photooxidative damage in young leaves of declining grapevine: Does it result from a new and possibly viroid-related disease. *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1-9.

Johnston, J. (1942a) Concerning a contagium vivum fluidum as cause of the spot disease of tobacco leaves. In Anonymus *Phytopathological Classics n°7*. American Phytopathological Society, Saint Paul, USA, pp.33-52

Johnston, J. (1942b) Concerning the mosaic disease in tobacco plant. In Anonymus *Phytopathological Classics n°7*. American Phytopathological Society, Saint Paul, USA, pp.27-30

Kalantidis, K., Denti, MA., Tzortzakaki, S., Marinou, E., Tabler, M. & Tsagri, M. (2007) Virp1 is a host protein with a major role in Potato spindle tuber viroid infection in Nicotiana plants., *J. Virol.*, **81**, 12872-80

Kofalvi, SA., Marcos, JF., Canizares, MC., Pállas, V & Candresse, T. (1997) Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from Prunus species: evidence for recombination between HSVd isolates., *J. Gen. Virol.*, **78**, 3177-3186

Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, KH., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G. & Riesner, D. (2006) Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology*, **347**, 392-404.

Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H. & Gross, HJ. (1981) Formation of a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ. *Nature*, **293**, 112-116.

Konarska, M., Filipowicz, W. & Gross, HJ. (1982) RNA ligation via 2'-phosphomonoester, 3'5'-phosphodiester linkage: Requirement of 2',3'-cyclic phosphate termini and involvement of a 5'-hydroxyl polynucleotide kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 1474-1478.

Kyriakopoulou, PE., Giunchedi, L. & Hadidi, A. (2001) Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis*

and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region. *J. Plant Pathol.*, **83**, 51-62.

Lafontaine, D., Beaudry, D., Marquis, P. & Perreault, JP. (1995) Intra and intermolecular nonenzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology*, **212**, 705-709.

Landry, P. (2004) Interférence à l'ARN chez les pêcheurs infectés par le viroïdes de la mosaïque latente du pêcheur (PLMVd). Mémoire de l'Université de Sherbrooke, Médecine, Biochimie, Sherbrooke

Landry, P., Thompson, D. & Perreault, JP. (2004) The role of viroids in gene silencing: The model case of peach latent mosaic viroid. *Can. Plant Pathol.*, **26**, 31-38.

Landry, P. & Perreault, J.P. (2005) Identification of a peach latent mosaic viroid hairpin able to act as a Dicer-like substrate. *J. Virol.*, **79**, 6540-6543.

Lima, Ml., Fonseca, ME., Flores, R. & Kitajima, EW. (1994) Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch. Virol.*, **138**, 385-390.

Llacer, G. (1998) General aspect of peach latent mosaic disease. *Acta Hortic.*, **472**, 561-564.

Machida, S., Yamahata, N., Watanuki, H., Owens, RA. & Sano, T. (2007) Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *J. Gen. Virol.*, **88**, 3452-3457

Malfitano, M., Di Serio, F., Covelli, L., Ragozzino, A., Hernandez, C. & Flores, R. (2003) Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology*, **313**, 492-501.

Markarian, N., Li, HW., Ding, SW. & Semancik, JS. (2004) RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.*, **149**, 397-406

Martín, R., Arenas, C., Daròs, JA., Cavarrubias, A., Reyes, JL. & Chua NH. (2007) Characterization of small RNAs derived from Citrus exocortis viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology*, **367**, 135-46

Martinez de Alba, AE., Flores, R. & Hernandez C. (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J Virol.*, **76**, 13094-13096.

Martinez de Alba, AE., Sagesser, R., Tabler, M. & Tsagris, M. (2003) A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in vitro and in vivo. *J. Virol.*, **77**, 9685-9694.

Matousek, J., Kozlova, P., Orctova, L., Schmitz, A., Pesina, K., Bannach, O., Diermann, N., Steger, G. & Riesner, D. (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.*, **388**, 1-13.

Merriam, D. & Bonde, R., (1954) Dissemination of spindle tuber by contaminated tractor wheels and by foliage contact with diseased plants. *Phytopathology*, **44**, 111

Mühlbach, HP. & Sängler, HL. (1979) Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature*, **278**, 185-188.

Nakaune, R. & Nakano, M., (2008) Identification of a new Apscaviroid from Japanese persimmon. *Arch. Virol.* **153**, 969-972

Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell.*, **2**, 279-289

Navarro, B. & Flores, R. (1997) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid : Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 11262-11267.

Navarro, JA., Daros, JA. & Flores, R. (1999) Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: Identification in chloroplasts and characterization. *Virology*, **253**, 77-85.

Navarro, JA., Jay, F., Nomura, K., He, SY., Voinnet, O., (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science*, **321**, 964-967

Navarro, JA., Vera, A. & Flores, R. (2000) A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology*, **268**, 218-225.

Navarro, JA. & Flores, R. (2000) Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.*, **19**, 2662-2670.

Osaki, H., Yamaguchi, Y., Sato, Y., Tomita, Y., Kawai, Y., Miyamoto, Y. & Ohtsu, Y. (1999) Peach latent mosaic viroid isolated from stone fruits in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn*, **65**, 3-8.

Owens, RA. & Diener, TO. (1982) RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**, 113-117.

Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M., Baulcombe, D., Tsagris, M. & Tabler, M. (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2395-2400.

- Pelchat, M., Côté, F. & Perreault, JP. (2001) Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. *Arch. Virol.*, **146**, 1753-1763.
- Pelchat, M., Grenier, C. & Perreault, JP. (2002) Characterization of a viroid-derived RNA promoter for the DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **41**, 6561-6571.
- Pelchat, M., Lévesque, D., Ouellet, J., Laurendeau, S., Lévesque, S., Lehoux, J., Thompson, DA., Eastwell, KC., Skrzeczkowski, LJ. & Perreault, JP. (2000) Sequencing of peach latent mosaic viroid variants from nine north american peach cultivars shows that this RNA folds into a complex secondary structure. *Virology*, **271**, 37-45.
- Qi, Y. & Ding, B. (2003) Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell*, **15**, 2566-2577.
- Querci, M., Owens, RA., Bartolini, I., Lazarte, V. & Salazar, LF. (1997) Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1207-1211.
- Rackwitz, HR., Rohde, W. & Sanger, HL. (1981) DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature*, **291**, 297-301.
- Rana, TM. (2007) Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**, 23-36.
- Reanwarakorn, K. & Semancik, JS. (1998) Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. Gen. Virol.*, **79**, 3163-3171.
- Reed, W. & Carroll, J., (2001) The etiology of yellow fever: A supplemental note. 1902. *Mil. Med.*, **166**, 62-66
- Rocheleau, L. & Pelchat, M., (2006) The subviral database: A toolbox for viroids, the hepatitis delta virus and satellite RNA search. *BMC Microbiol.*, **6**, 24
- Rodio, ME., Delgado, S., Flores, R. & Di Serio, F. (2006) Variants of peach latent mosaic viroid inducing peach calico: Uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *J. Gen. Virol.*, **87**, 231-240.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, RW., Diener, TO. & Owens, RA. (1992) Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 10104-10108.

Sano, T. & Ishiguro, A. (1998) Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology*, **240**, 238-244.

Schindler, IM. & Mühlbach, HP. (1992) Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: A reevaluation. *Plant Sci.*, **84**, 221-229.

Schnell, RJ., Kuhn, DN., Olano, CT. & Quintanilla, WE. (2001) Sequence diversity among avocado sunblotch viroid isolated from single avocado trees. *Phytoparasitica*, **29**, 451-460.

Semancik, JS., Conejero, V. & Gerhart, J. (1977) Citrus exocortis viroid: Survey protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA, *Virology*, **80**, 218-221

Semancik, JS. & Szychowski, JA. (1994) Avocado sunblotch disease: A persistent viroid infection in which variants are associated with differential symptoms. *J. Gen. Virol.*, **75**, 1543-1549.

Serra, P., Gago, S. & Duran-Vila, N. (2008) A single nucleotide change in Hop stunt viroid modulates citrus cachexia symptoms. *Virus Res.* Epub ahead of print

Shamloul, AM., Minafra, A., Hadidi, A., Waterworth, HE., Giunchedi, L. & Allam, EK. (1995) Peach latent mosaic viroid : Nucleotide sequence of an italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. *Acta Hortic.*, **386**, 522-530.

Spiesmacher, E., Mühlbach, HP., Schnolzer, M., Haas, B. & Sanger, HL. (1983) Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTV) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci. Rep.*, **3**, 767-774.

Tessitori, M., Maria, G., Capasso, C., Rizza, S., De Lucas, V., Catara, A. & Carginal, V. (2007) Differential display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by Citrus viroid III. *Biochim. Biophys. Acta.* **1769**, 228-235

Tsagris, M., Tabler, M. & Sanger, HL. (1991) Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1605-1612.

Tsagris, M. & Tabler M. (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents *Trends in Plant Science.*, **9**, 339-348

Vadamalai, G., Hanold, D., Rezaian, MA. & Randles, JW (2006) Variants of coconut cadang-cadang viroid isolated from an African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Malaysia. *Arch. Virol.*, **151**, 1447-1456

van der Krol, AR., Mur, LA., Beld, M., Mol, JN. & Stuitje, AR. (1990) Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell.*, **2**, 291-299

Verhoeven, JTJ., Jansen, CCC., Werkman, JW & Roenhorst, JW. (2007) First report of tomato chlorotic dwarf viroid in petunia hybrida from the United State of America. *Plant. Dis.*, **91**, 324

Visvader, JE. & Symons, RH. (1986) Replication of in vitro constructed viroid mutants: Location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid. *EMBO J.*, **5**, 2051-2055.

Voet, D. & Voet, JG. (2002) *Biochimie, Traduction de la 2^e édition américaine*, De Boeck Université s.a., Espagne, John Wiley & Sons, Inc.

Vogt, U., Pélissier, T., Pütz, A., Razvi, F., Fischer, R. & Wassenegger, M. (2004) Viroid-induced RNA silencing of GFP-viroid fusion transgenes does not induce extensive spreading of methylation or transitive silencing. *Plant J.*, **38**, 107-118

Warrilow, D. & Symons, RH. (1999) Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. *Arch. Virol.*, **144**, 2367-2375.

Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. & Sanger, HL. (1994) RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**, 567-576.

Wassenegger, M., Spieker, RL., Thalmeir, S., Gast, FU., Riedel, L. & Sanger, HL. (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *Nicotiana tabacum*. *Virology*, **226**, 191-197.

Wang, MB., Bian, XY., Wu, LM., Smith, NA., Isenegger, D., Wu, RM., Masuta, C., Vance., VB., Watson, JM., Rezaian, A., Dennis, ES. & Waterhouse, PM. (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **101**, 3275–3280

Willison, R. S. (1946) Peach blotch. *Phytopathology*, **36**, 273-276.

Yang, YA., Wang, HQ., Cheng ZW., Sano, T. & Li, SF. (2007) First report of hop stunt viroid from plum in China. *Plant Pathol.*, **56**, 339

Annexes

Annexe 1. Matériels et méthodes supplémentaires

Extraction d'ARN au phénol chaud

L'ARN a été extrait des feuilles de 5 plants de pêchers sains (1829-12D4, 1291-11B6, 2015-04B3, 1828-02B3, 1857-06D3) (Table 3) et 5 plants infectés par PLMVd (1922-01B1, 1271-01A5, 1188-01D4, 1860-01A1, 1922-03B1), provenant de Sydney en Colombie-Britannique au Canada. Ces extraits ont été réalisés une fois par mois de mai 2008 à octobre 2008. Pour éviter de tuer les arbres en enlevant toutes leurs feuilles, une quantité limitée de feuilles, c'est-à-dire deux grammes (g), était recueillie chaque mois ce qui limite par le fait même la quantité d'ARN disponible pour les expériences. L'ARN des feuilles de pêchers a été extrait par la méthode du phénol chaud. Pour chaque extraction, 0,5 g de feuilles a été broyé dans l'azote liquide. La poudre obtenue a été resuspendue dans 4 fois 375 μ L de tampon d'extraction (100 millimolaires (mM) LiCl, 100 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 % (p/v) sulfate dodecyle de sodium (SDS), 1 % (p/v) polyvinyl-pyrrolidone (PVP), pH 9) auxquels ont été ajoutés 375 μ L de phénol chauffé à 65 degrés Celsius ($^{\circ}$ C). Après avoir laissé refroidir pendant 5 minutes (min), 375 μ L de chloroforme ont été ajoutés et le tout a été mélangé pendant 20 min. Par la suite, le mélange a été centrifugé 5 min à 16 000 g. Le surnageant a été récolté et a subi deux extractions au phénol/chloroforme en y ajoutant 0,5 volume de phénol et 0,5 volume de chloroforme pour ensuite vortexer le mélange et le centrifuger 5 min à 16 000 g. Enfin, l'ARN a été précipité en ajoutant 0,1

volume d'acétate de sodium 3 M pH 5.0 et 2 volumes d'éthanol 100 % (v/v) au surnageant pour ensuite centrifuger 10 min à 16 000 g. Le culot a été lavé avec de l'éthanol 70 % (v/v) et resuspendu dans 200 μ L d'eau.

L'ARN obtenu a été dosé au spectrophotomètre à des densités optiques (DO) de 230, 260, 280 et 320 nanomètres (nm). Le spectrophotomètre calcule automatiquement le ratio DO_{260nm}/DO_{280nm} et donne directement la concentration en acide nucléique dans les échantillons en tenant compte du facteur de dilution utilisé. Aussi, un aliquot a été migré sur un gel d'agarose 1 % (p/v) pour juger de la qualité des extraits.

Migration sur gel de polyacrylamide

Des gels de polyacrylamide dénaturants ont été faits à partir d'une solution d'acrylamide : bisacrylamide (19 : 1) dissous dans du tampon tampon tris-borate-EDTA (TBE) 1X 8 M urée et d'une solution de TBE 1X 8 M urée, ce qui a permis d'ajuster la concentration d'acrylamide au niveau désiré soit : 5 % (p/v) acrylamide pour séparer les molécules de PLMVd et 15 % (p/v) pour les petits ARN. La migration a été faite à 30 Watts (W) pendant 1 h pour PLMVd et 3 h pour les petits ARN. Les gels ont été observés aux rayons ultraviolets (UV) pour identifier les bandes d'intérêt grâce à une échelle de poids moléculaire qui a migré en même temps que l'ARN total.

Transcription de PLMVd

Des transcrits de PLMVd ont été obtenus à partir du plasmide pPD1. Ce plasmide contient une construction dimérique de PLMVd qui exploite le motif catalytique en tête de marteau du viroïde pour permettre la production de

monomères d'ARN des deux polarités du génome de PLMVd en fonction du promoteur utilisé pour transcrire le plasmide. Pour obtenir PLMVd de polarité positive, le plasmide pPD1 a été digéré avec l'enzyme *BamHI*. La digestion a été visualisée après migration d'un aliquot sur gel d'agarose 1 % (p/v) coloré au bromure d'éthidium. Une fois le plasmide digéré complètement, la forme linéaire du plasmide a été extraite une fois au phénol/chloroforme comme il a été décrit précédemment. L'ADN a ensuite été précipité à l'éthanol de la même façon que pour l'ARN et il a été resuspendu dans 30 à 50 microlitres (μl) d'eau avant d'être dosé au spectrophotomètre. La transcription a été effectuée dans un volume total de 100 μL contenant 5 microgrammes (μg) du plasmide digéré avec 4 mM de chaque ribonucléotide triphosphate (NTP), 15 Unités (U) de RNA guard (Amersham Biosciences), 0,01 U de pyrophosphatase de levure (Roche Diagnostic), 80 mM HEPES-KOH, pH 7,5 24 mM MgCl_2 , 2 mM Spermidine, 40 mM DTT et 2 μl d'ARN polymérase T3 purifiée. Le mélange a ensuite été incubé à 37 °C pendant 3 h. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 5 U d'ADNase RQ1 exempte d'ARNase (Promega) et une incubation de 30 min à 37 °C. L'ARN obtenu a ensuite été migré sur un gel de polyacrylamide 5 % (p/v) dénaturant et une bande de gel correspondant à 338 nt a été isolée. La bande obtenue a été incubée toute la nuit à la température de la pièce dans 400 μL de tampon d'extraction d'ARN (500 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA, 0,1 % (p/v) SDS, pH 8) avant d'être précipitée en ajoutant de 1 millilitre (mL) d'éthanol 100 % (v/v) et en centrifugeant 10 min à 16 000 g. Le culot d'ARN a été lavé à l'éthanol 70 % (v/v) et resuspendu dans 30 μL d'eau sans ARNases. Pour obtenir PLMVd de

polarité négative, le même protocole a été suivi, mais en utilisant une digestion *EcoRI* de pPD1 et l'ARN polymérase T7 plutôt que T3.

Buvarbage de type Northern

Pour confirmer la présence ou l'absence de PLMVd dans les feuilles utilisées, des buvardages de type Northern ont été effectués. 2,5 µg d'ARN total ont été migrés sur un gel de polyacrylamide 5 % (p/v), 8M urée en même temps qu'une transcription de PLMVd servant à surveiller la migration. Après la migration, l'ARN a été transféré par capillarité toute la nuit sur une membrane Nytran[®]N (Whatman). L'ARN a été photoponté à la membrane aux ultraviolets à une longueur d'onde de 254 nm. Par la suite, la membrane a été préhybridée 4 h à 65 °C dans 50 mL de tampon de préhybridation (50 % (v/v) formamide, 750 mM NaCl, 75 mM citrate de sodium, 1 % (p/v) SDS, 5 % (v/v) solution de Derrhardt, 100 µg/ml ADN de sperme de saumon). Les sondes utilisées étaient des transcriptions de PLMVd obtenues avec le « StripEZ transcription kit » (Ambion, Austin TX) en présence de 50 µCi de [α -³²P UTP] (3000 Ci/mmol Amersham Bioscience). L'utilisation du kit StripEZ permettait de facilement enlever la sonde de la membrane, en suivant les instructions du manufacturier, pour permettre l'hybridation de la membrane avec une autre sonde. Les sondes ont été ajoutées à 10 mL de tampon de préhybridation frais et la membrane a été hybridée toute la nuit. Après l'hybridation, la membrane a été lavée 3 fois 15 min avec un tampon contenant 150 mM NaCl, 15 mM citrate de sodium et 0,1 % (p/v) SDS à 65 °C et une fois 15 min avec un tampon 15 mM NaCl, 1,5 mM citrate de sodium 0,1 % (p/v) SDS à 65 °C. L'analyse était faite par autoradiographie sur une

cassette Phosphoscreen (GE Healthcare) révélée au Storm (Amersham Bioscience). Généralement, deux buvardages, chacun utilisant une sonde de polarité inverse de PLMVd, ont été faits pour chaque expérience et les résultats étaient semblables pour les deux polarités de PLMVd.

Pour les petits ARN, le même protocole a été suivi, mais 40 µg d'ARN total ont été utilisés et la migration s'est faite sur un gel de polyacrylamide 15 % (p/v).

Séquençage à haut débit

À l'origine, la technologie Solexa a été développée pour le reséquençage de génome, mais de nouvelles applications ont été trouvées à cette technique, dont la découverte de petits ARN régulateurs. La théorie de cette méthode de séquençage est relativement simple. Solexa est basé sur le séquençage massif et parallèle de millions de fragments d'ADN. Des adaptateurs de séquences connues sont attachés à chaque fragment d'ADN ce qui permet de les lier sur une surface plane et transparente contenant des amorces de séquence complémentaire aux adaptateurs. Une amplification en pont est effectuée (Figure 12), ce qui donne des millions de groupes contenant chacun environ 1000 séquences de la même matrice. Les groupes sont ensuite séquencés par synthèse avec des nucléotides bloqués de façon réversible en 3' et possédant un fluorophore qui peut lui aussi être enlevé de façon enzymatique. Chaque nucléotide possède un fluorophore de couleur unique. Il est ainsi possible de visualiser l'incorporation des nucléotides à chaque position en les excitant avec un laser. Les séquences sont donc obtenues une base à la fois pour tous les groupes en même temps par la

production d'images pour chaque position. Un logiciel regroupe ensuite chaque image obtenue et donne la séquence de chacun des groupes présents sur la surface. De cette façon, il est possible d'obtenir facilement un minimum de 1,5 million de séquences d'une longueur allant jusqu'à 35 pb.

La préparation des échantillons pour le séquençage à haut débit a été faite à l'aide du « DGE small RNA Sample Prep Kit » (Illumina). Le protocole du manufacturier a été suivi avec comme seule modification l'observation de la migration de l'ARN aux rayons ultraviolets plutôt qu'au bromure d'éthidium. Une fois les échantillons préparés ils ont été envoyés à « The Center for Applied Genomics » au « Hospital for Sick Children » de Toronto pour séquencer par la technologie Solexa. L'ARN extrait au mois de mai du plant sain 1829-12D4 et du plant infecté 1188-01D4 ont été utilisés comme échantillons de départ.

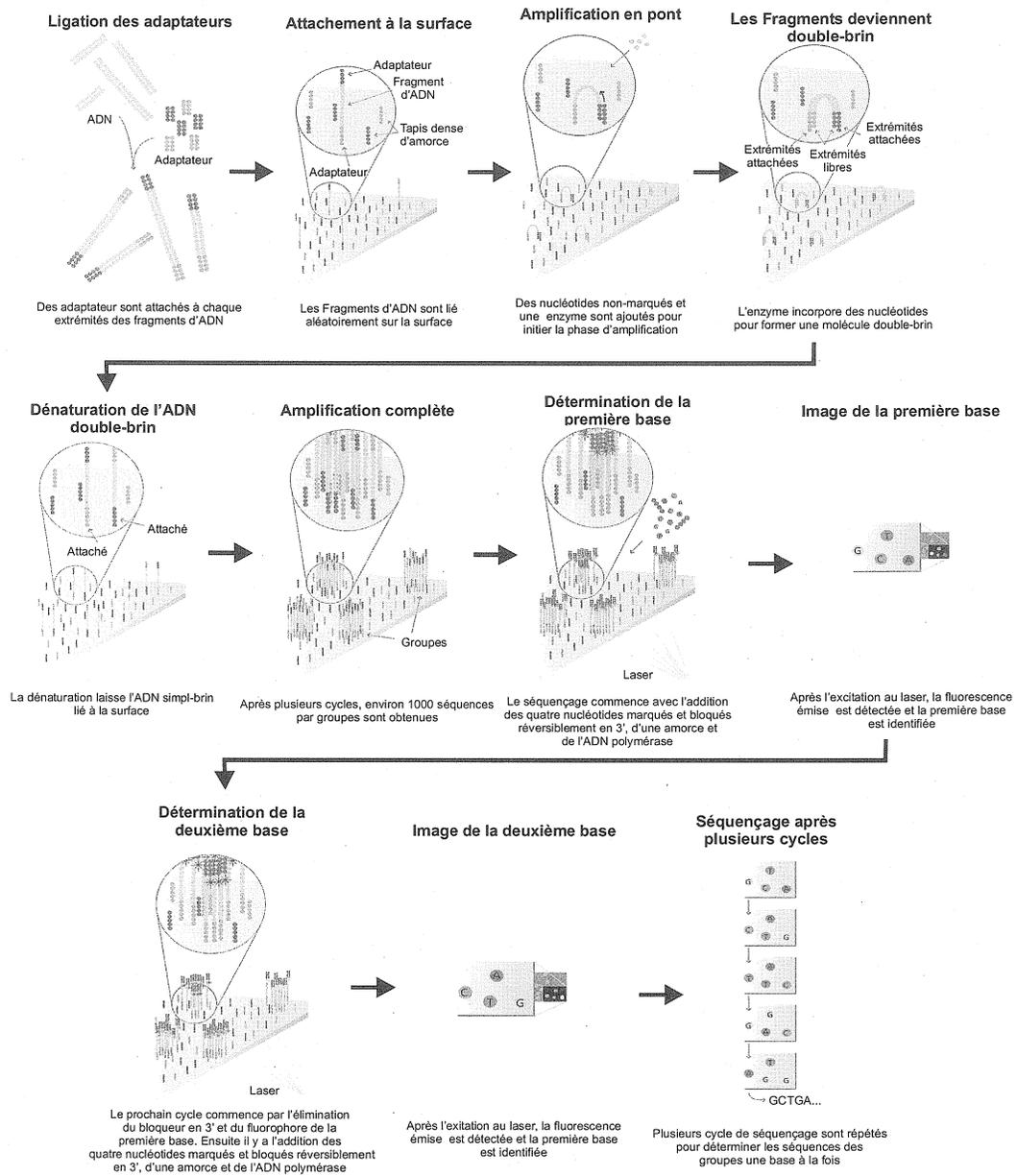


Figure adapté de *Technology Spolight: illumina® Sequencing*

Figure 12. Théorie du séquençage à haut débit par la technologie Solexa. Les étapes importantes du séquençage sont présentées avec de courtes explications.