

Université de Sherbrooke

**Caractérisation des mécanismes de réplication et de pathogenèse  
du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd).**

Par

M. Fabien Côté

Département de Biochimie

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de  
*philosophiae doctor* (Ph.D.) en Biochimie

13 octobre 2000



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-61851-X

Canada

**TABLE DES MATIÈRES**

<b>LISTE DES FIGURES</b>	VIII
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	XIII
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS</b>	XV
<b>RÉSUMÉ</b>	1
<b>INTRODUCTION</b>	4
<b>1. LES VIROÏDES ET LES ARN CATALYTIQUES</b>	4
1.1. Les viroïdes (généralités)	4
1.2. Motifs autocatalytiques d'ARN	6
1.2.1. Introduction	6
1.2.2. L'autocoupure	7
1.2.3. L'autoligation	10
<b>2. CARACTÉRISTIQUES DES VIROÏDES</b>	13
2.1. Classification des viroïdes	13
2.2. Localisation cellulaire des viroïdes	16
2.3. Réplication des viroïdes	16
2.3.1. Mécanismes de réplication	16
2.3.2. Étape de polymérisation	17
2.3.3. Étape de coupure et de circularisation	18

3. PATHOGENÈSE DES VIROÏDES	22
3.1. Infection et propagation	22
3.2. Mécanismes de pathogenèse	24
3.3. Mécanismes de défense de l'hôte	27
4. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	28
4.1. Réplication des viroïdes de la famille des <i>Avsunviroidae</i>	28
4.1.1. Contexte	28
4.1.2. Le problème de la circularisation des monomères	28
4.1.3. Le problème de la polymérisation	29
4.1.4. Objectif général	29
4.1.5. Objectifs spécifiques	30
4.2. Structure secondaire des viroïdes	30
4.2.1. Contexte	30
4.2.2. Objectif général	31
4.2.3. Objectifs spécifiques	31
4.3. Pathogenèse des viroïdes	31
4.3.1. Contexte	31
4.3.2. Objectif général	32
4.3.3. Objectifs spécifiques	32

## RÉSULTATS

1. CHAPITRE 1: Caractérisation <i>in vitro</i> de la réaction d'autoligation chez PLMVd.	33
1.1. ARTICLE: Peach Latent Mosaic Viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by <i>in vitro</i> self-ligation.	33
summary	34
Introduction	35
Results	37
Discussion	49
Materials and methods	56
Acknowledgements	60
References	61
Description du travail	65
2. CHAPITRE 2: Implication de l'autoligation dans le cycle de réplication de PLMVd.	66
2.1. ARTICLE: Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of Peach Latent Mosaic Viroid.	66
Abstract	67
Introduction	68
Materials and methods	71
Results	75
Discussion	82
Acknowledgements	87
References	88
Description du travail	92

3. CHAPITRE 3: Études de l'étape de polymérisation du cycle de réplication de PLMVd.	93
3.1. ARTICLE: The RNA self-catalytic hammerhead sequences of a viroid act as promoters for <i>Escherichia coli</i> RNA polymerase.	93
Abstract	94
Introduction	95
Results	96
Discussion	103
Materials and methods	107
Acknowledgements	110
References	111
Description du travail	113
4. CHAPITRE 4: Études structurales de PLMVd.	114
4.1. ARTICLE: Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure.	114
Abstract	115
Introduction	116
Materials and methods	117
Results	121
Discussion	136
Acknowledgements	138
References	139
Description de travail	141

5. CHAPITRE 5: Études des mécanismes de pathogenèse de PLMVd.	142
5.1. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS (Essais de traduction.)	
Introduction	143
Matériels et méthodes	143
Résultats et discussion	144
5.2. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS (Essais de coupure <i>en trans</i> .)	147
Introduction	147
Matériels et méthodes	148
Résultats et discussion	152
Conclusion	163
<b>DISCUSSION</b>	164
1. STRUCTURE ET RÉPLICATION DE PLMVd.	164
1.1. La structure secondaire et tertiaire de PLMVd	164
1.2. Le cycle de réplication de PLMVd	168
1.2.1. Mécanismes d'autoligation chez PLMVd	168
1.2.2. Autoligation de PLMVd <i>in vivo</i>	170
1.2.3. Étape de polymérisation	175
2. MÉCANISMES DE PATHOGENÈSE	179
3. CONCLUSIONS	181

<b>REMERCIEMENTS</b>	189
<b>RÉFÉRENCES</b>	190
<b>ANNEXES</b>	203
1. ARTICLE: Evidence for a model ancestral viroid.	
2. CHAPITRE DE LIVRE: Ribozyme reactions of viroids.	
3. Lettres d'approbation des co-auteurs	



**LISTES DES FIGURES****INTRODUCTION**

Figure 1.	Organisation de la structure catalytique en tête de marteau ( <i>hammerhead</i> ).	5
Figure 2.	Organisation des structures catalytiques <i>hairpin</i> et en double <i>hammerhead</i> .	8
Figure 3.	Réaction de transestérification catalysée par certains ARN.	12
Figure 4.	Classification des viroïdes et ARN apparentés.	14
Figure 5.	L'organisation des 5 domaines génomiques chez les viroïdes de la famille des <i>Pospiviroidae</i> et structure secondaire de PLMVd.	15
Figure 6.	Réplication en cercle roulant.	19

**RÉSULTATS**

1.1. ARTICLE : Peach Latent Mosaic Viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by *in vitro* self-ligation.

Figure 7. Schematic representation of the plasmid construction. 38

Figure 8. Biochemical characterization of the nature of the phosphodiester bond produced by PLMVd intramolecular self-ligation. 41

Figure 9. Primer extension assays. 43

Figure 10. Self-cleavage assays. 46

Figure 11. Autoradiogram of the intron debranching enzyme assays. 48

Figure 12. Schematic representation of the sequence and secondary structure requirements for hammerhead self-cleavage and self-ligation. 54

2.1. ARTICLE : Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of Peach Latent Mosaic Viroid.

Figure 13. PLMVd rolling-circle replication. 69

Figure 14.	Autoradiogram of a 2D-PAGE gel and detection of a 2',5' phosphodiester bond in natural PLMVd transcripts.	76
Figure 15.	Self-cleavage experiments using either 2',5'- or 3',5'-linked C-PLMVd.	80
Figure 16.	Northern blot of RNA samples incubated under both self-cleaving and non-self-cleaving conditions.	83
3.1. ARTICLE :	The RNA self-catalytic hammerhead sequences of a viroid act as promoters for <i>Escherichia coli</i> RNA polymerase.	
Figure 17.	Rolling-circle replication and structure of PLMVd.	97
Figure 18.	Transcription assays using various PLMVd-derived RNAs.	101
Figure 19.	Characterization of the transcription assay using <i>E. coli</i> RNAP.	104
4.1. ARTICLE :	Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure.	
Figure 20.	Strategy of synthesis of the PLMVd strands.	118

Figure 21.	Autoradiogram of a PLMVd nuclease mapping assay under low salt conditions analyzed on a 12% PAGE gel.	123
Figure 22.	PLMVd sequence and proposed secondary structure based on nuclease mapping under low salt conditions.	126
Figure 23.	Characterization of the P8 pseudoknot and surrounding region.	130
Figure 24.	Alternative structure including the hairpin II of the hammerhead motif.	133
5.1. AUTRES RÉSULTATS : Études des mécanismes de pathogenèse de PLMVd.		
Figure 25.	Autoradiogramme des essais de traduction de PLMVd.	146
Figure 26.	Coupure du substrat par les différents ribozymes.	153
Figure 27.	Coupure du substrat pendant la transcription de PLMVd.	157
Figure 28.	Effets de la protéine A1 sur l'efficacité de coupure du substrat.	159
Figure 29.	Hybridation alternative entre les séquences hammerhead et le substrat synthétique.	160

Figure 30.	Représentation des sites de coupure potentiels de substrats cellulaires.	162
------------	--	-----

## DISCUSSION

Figure 31.	Comparaison de la structure secondaire de PLMVd et de CChMVd.	166
------------	---	-----

Figure 32.	Formation et fonction d'une liaison phosphodiester de type 2',5'.	173
------------	---	-----

Figure 33.	Mécanisme potentiel d'initiation de la réplication de PLMVd.	178
------------	--	-----

Figure 34.	Représentation des différentes fonctions des séquences <i>hammerhead</i> .	182
------------	--	-----

Figure 35.	Comparaison des différents mécanismes de réplication utilisés par les viroïdes.	185
------------	---	-----

**LISTE DES TABLEAUX****RÉSULTATS**

1.1. ARTICLE : Peach Latent Mosaic Viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by *in vitro* self-ligation.

Aucun tableau

2.1. ARTICLE : Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of Peach Latent Mosaic Viroid.

Table 1.	Detection of the 2',5'-linked dinucleotides	77
----------	---	----

3.1. ARTICLE : The RNA self-catalytic hammerhead sequences of a viroid act as promoters for *Escherichia coli* RNA polymerase.

Aucun tableau

4.1. ARTICLE : Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure.

Table 2.	Compilation of band intensity observed by RNase mapping.	125
----------	--	-----

Table 3.	Binding shift assays.	135
----------	-----------------------	-----

### 5.1. AUTRES RÉSULTATS : Études des mécanismes de pathogenèse de PLMVd.

Aucun tableau

## **DISCUSSION**

Aucun tableau

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

A	adénosine
aa	acides aminés
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire ( <i>cDNA</i> )
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
ARN	acide ribonucléique
ARN pol II	ARN polymérase II
ARNr	ARN ribosomal ( <i>rRNA</i> )
ARNt	ARN de transfert ( <i>tRNA</i> )
ASBVd	<i>avocado sunblotch viroid</i>
ATP	adénosine triphosphate
BBP	bleu de bromophénol
BSA	albumine de sérum de boeuf
C	cytosine
CAT	chloramphénicol acétyl transférase
CCCVd	<i>coconut cadang-cadang viroid</i>
CCM	chromatographie sur couche mince ( <i>TLC</i> )
CChMVd	<i>chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>
CEVd	<i>citrus exocortis viroid</i>
cm	centimètre
cpm	compte par minute
DNase	désoxyribonucléase
dNTP	désoxynucléotide triphosphate
dT	désoxythymidine
DTT	dithiothréitol



EDTA	acide éthylènediamine-tétraacétique
fmole	femtomole
G	guanosine
hh	<i>hammerhead</i>
HPLC	chromatographie liquide à haute pression
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LiCl	chlorure de lithium
M	molaire
mCi	millicurie
Mg <sup>2+</sup>	magnésium
mg	milligramme
MgCl <sub>2</sub>	chlorure de magnésium
min	minute
ml	millilitre
mM	millimolaire
msDNA	<i>multicopy, single-stranded DNA</i>
NEP	polymérase encodée au noyau
ng	nanogramme
NMP	nucléotide monophosphate
nt	nucléotide(s)
ori	origine
P1	produit 1
P2	produit 2
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
pb	paire(s) de base
PCR	réaction de polymérisation en chaîne

PEP	polymérase encodée au plastide
PEG	polyéthylèneglycol
PLMVd	<i>peach latent mosaic viroid</i>
pmole	picomole
PR	<i>pathogenesis-related protein</i>
PSI	photosystème de type I
PSII	photosystème de type II
PSTVd	<i>potato spindle tuber viroid</i>
RCC	région centrale conservée ( <i>CCR</i> )
RNAP	ARN polymérase
RNase	ribonucléase
rNTP	ribonucléotide triphosphate
RT	transcription inverse
Rz	ribozyme
S	Svedberg
SDS	dodecyl sulfate de sodium
SN2	substitution nucléophile de type 2
snRNA	petit ARN nucléaire
TD	tige droite
TG	tige gauche
Tm	température de dénaturation
U	uracile
UTP	uridine triphosphate
UV	ultra-violet
V	région variable
VHD	virus de l'hépatite D ( <i>HDV</i> )
vol	volume

XC	xylène cyanol
2D-TLC	chromatographie sur couche mince en 2 dimensions
(+)	identifie la polarité positive
(-)	identifie la polarité négative
$\mu\text{Ci}$	microcurie
$\mu\text{g}$	microgramme
$\mu\text{L}$	microlitre

## RÉSUMÉ

### **Caractérisation des mécanismes de réplication et de pathogénèse du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd).**

Par M. Fabien Côté

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

*philosophiae doctor* (Ph.D.) en Biochimie

13 octobre 2000

Les viroïdes sont de petits ARN circulaires simple brin qui infectent les plantes supérieures, causant ainsi d'importantes pertes économiques dans le domaine agro-alimentaire. Ces ARN ne sont pas encapsidés et se répliquent par un mécanisme en cercle roulant. Puisqu'ils ne semblent coder pour aucune protéine, les viroïdes sont dépendants de la machinerie enzymatique de l'hôte pour les différentes étapes de leur cycle de vie. La trentaine d'espèces différentes de viroïdes connues à ce jour sont classées en 2 grandes familles, celle des *Pospiviroidae* et celle des *Avsunviroidae*. Ces derniers sont caractérisés par la présence de séquences permettant l'adoption de la structure autocatalytique en tête de marteau (*hammerhead*) qui est responsable de la coupure des brins multimériques en monomères dans le cycle de réplication de ces viroïdes. Le but de mon projet de recherches était de mieux comprendre les différents mécanismes régissant les différentes étapes du cycle

de vie des membres de la famille des *Avsunviroidae*, plus précisément du viroïde responsable de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd).

Dans un premier temps, nous avons démontré que PLMVd peut être recircularisé *in vitro* par un mécanisme d'autoligation. Il s'agit d'une démonstration originale d'une telle réaction en biologie et plusieurs aspects de cette réaction non-enzymatique ont été mis à jour. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que cette réaction de transestérification produit majoritairement (>95%) un lien phosphodiester de type 2',5' plutôt que la liaison classique de type 3',5'. La démonstration que la plupart des transcrits circulaires de PLMVd isolés à partir de feuilles infectées possède un lien phosphodiester de type 2',5' au site d'autocoupeure/autoligation suggère fortement que la circularisation *in vivo* de PLMVd procède par un mécanisme d'autoligation. Il semble que la formation d'une telle liaison stabiliserait le viroïde dans sa conformation circulaire, puisque la présence de cette liaison inhibe une réaction d'autocoupeure subséquente. L'utilisation de la réaction d'autoligation est probablement le résultat de la location chloroplastique de ce viroïde. En effet, l'impossibilité jusqu'à ce jour à détecter une activité ligase dans ce compartiment cellulaire suggère l'absence d'une telle enzyme. Cette observation entraînerait une pression de sélection positive pour une activité d'autoligation associée aux séquences *hammerhead*.

Dans un second temps, des expériences d'initiation de la réplication utilisant l'ARN polymérase de *E. coli*, qui est fortement similaire à la polymérase de type bactérienne du chloroplaste, ont démontré que celle-ci pouvait répliquer des transcrits de PLMVd *in vitro*. De plus, ces expériences ont permis de démontrer que les séquences *hammerhead* pourraient jouer le rôle de promoteur pour l'initiation de la réplication de PLMVd. Ces séquences auraient donc un triple rôle, c.à.d. autocoupeure, autoligation et promoteur de la réplication, expliquant ainsi leur haut taux de conservation.

Dans un autre ordre d'idée, la possibilité que la pathogenèse de PLMVd puisse être le résultat d'une coupure *en trans* d'un ARN de l'hôte par la structure *hammerhead* de celui-ci a été étudiée. Les résultats suggèrent que ce scénario est peu probable car les séquences

*hammerhead* du viroïde sont englobées dans la forte structure secondaire de ce dernier, empêchant ainsi l'hybridation et la coupure du substrat. Par contre, certains résultats obtenus suggèrent qu'il est possible qu'une protéine puisse favoriser cette réaction en ouvrant la structure secondaire du viroïde. Cette ouverture faciliterait ainsi l'hybridation de l'ARN cible et par conséquent, la coupure. Bien que préliminaires, certains résultats démontrent la présence dans l'ARNr 18S d'un site de coupure potentiel pour les séquences catalytiques de PLMVd.

Finalement, des études structurales ont permis de déterminer la structure secondaire de PLMVd en solution. Celle-ci révèle la présence de plusieurs éléments conservés chez certains membres de la famille des *Avsunviroidae*. Ces résultats sont un premier pas vers la compréhension des relations structure/fonction chez ces ARN. De manière générale, ces recherches ont permis de mettre à jour plusieurs nouvelles fonctions associées aux séquences *hammerhead*.

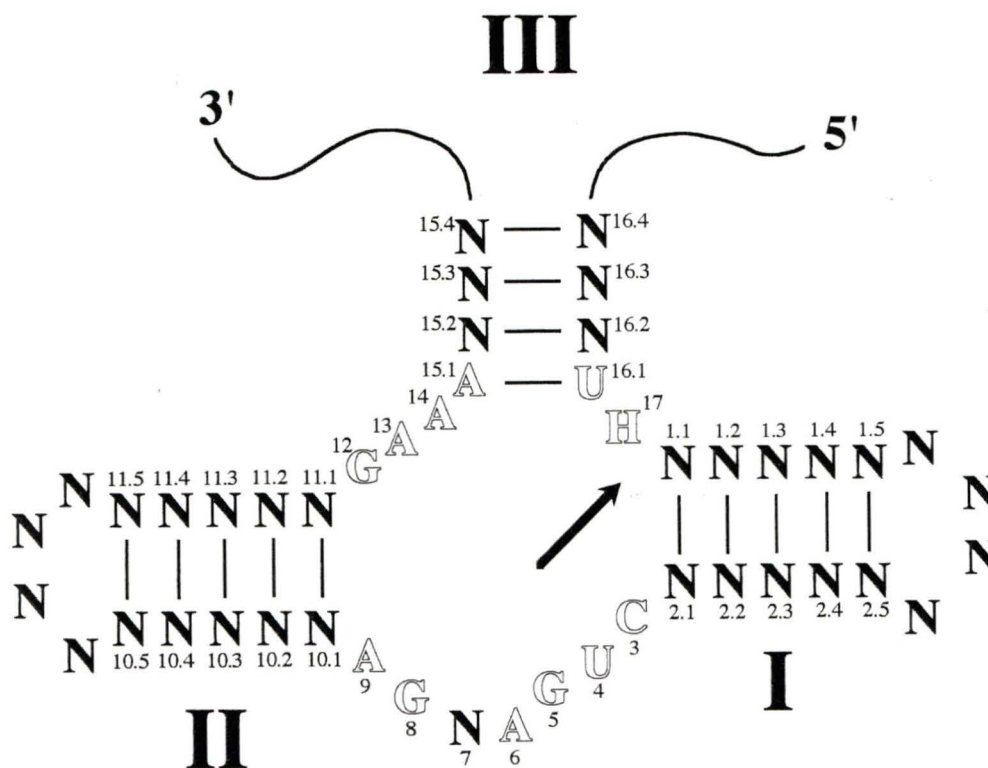
**Mots clés:** viroïdes, *hammerhead*, autoligation, pathogenèse, réplication, ARN catalytique

## INTRODUCTION

### 1. LES VIROÏDES ET LES ARN CATALYTIQUES

#### 1.1 Les viroïdes (généralités)

La grande simplicité des génomes viraux a longtemps fait penser que les virus étaient la forme la plus simple d'organisme pouvant exister. La découverte au début des années 1970 que l'agent causal d'une maladie retrouvée chez la pomme de terre était une petite molécule circulaire d'ARN simple brin d'environ 360 nucléotides (nt) a rapidement relégué cette croyance aux oubliettes (Diener, 1971). En plus de cette grande simplicité génomique, ces ARN diffèrent des virus par le fait qu'ils ne sont pas encapsidés dans une enveloppe protéique, c.à.d. qu'ils sont détectés sous forme d'ARN libre (Diener et Raymer, 1967). Le terme viroïde fut donc proposé pour caractériser ce type d'ARN infectieux. Jusqu'à ce jour, 30 espèces différentes de viroïdes, ainsi qu'un nombre élevé de variants de séquence de ces ARN dont la longueur varie entre 246-475 nt, ont été isolées (Pelchat et al., 2000a). Ces ARN sont caractérisés dans la majorité des cas par une forte structure secondaire en forme de tige (Diener, 1993). Pour l'instant, les variétés de plantes susceptibles d'être infectées par ce type d'agent pathogène semblent relativement restreintes à la trentaine d'espèces de végétaux à partir desquelles les différentes souches de viroïdes ont été isolées. Par contre, il semblerait que l'éventail d'hôtes potentiels de ce type d'ARN pourrait être beaucoup plus répandu que les quelques exemples connus jusqu'à maintenant, puisque de nouvelles espèces de viroïde sont découvertes régulièrement. Ceux-ci semblent pour le moment restreints au monde végétal puisque la présence d'un tel type d'ARN chez les animaux n'a jamais été démontrée.



**Figure 1.** Organisation de la structure catalytique en tête de marteau (*hammerhead*). Les trois tiges caractéristiques de cette structure sont indiquées par les chiffres romains. Ces tiges bordent le centre catalytique formé par les trois séquences hautement conservées représentées par les nucléotides en relief. Les nucléotides N indiquent que n'importe lequel des 4 mononucléotides A, C, G ou U peut se retrouver à ces positions alors que le nucléotide H représente un A, C ou un U. L'identification des nucléotides a été réalisée selon la numérotation consensus. Le site d'autocoupage de la structure hammerhead est situé entre les nucléotides 17 et 1.1 et est indiqué par la flèche.



## 1.2 Motifs autocatalytiques d'ARN

### 1.2.1. Introduction

La découverte dans les années 1980 que certaines molécules d'acide ribonucléique (ARN) pouvaient, tout comme les enzymes protéiques, catalyser une réaction biochimique a été un point tournant dans le domaine de la recherche portant sur les acides nucléiques (Guerrier-Takada et al., 1983; Kruger et al., 1982). La découverte des ribozymes (enzymes faits d'ARN) a déclenché un élan de vigueur extraordinaire et de grand espoir dans le domaine de la thérapie génique. Cette percée scientifique fut d'une telle importance qu'elle remodela nos croyances à propos des théories évolutionnistes. La grande majorité des ribozymes isolés à ce jour provient des viroïdes et des ARN satellites de virus de plantes. On retrouve aussi des ARN catalytiques dans plusieurs autres organismes, en passant du virus à l'humain, et ceux-ci catalysent des réactions biochimiques de premières importances. Par exemple, la composante catalytique responsable de la maturation de l'extrémité 5' des ARNt des eubactéries est un ARN d'environ 400 nt (Perreault et Altman, 1991). De plus, certains résultats cristallographiques de la structure de la sous-unité ribosomale 50S suggèrent que le ribosome est en fait un ribozyme. En effet, il semble que les ARNr soient responsables de l'activité peptidyltransférase du ribosome tandis que les composantes protéiques ne joueraient qu'un rôle structural (Nissen et al., 2000).

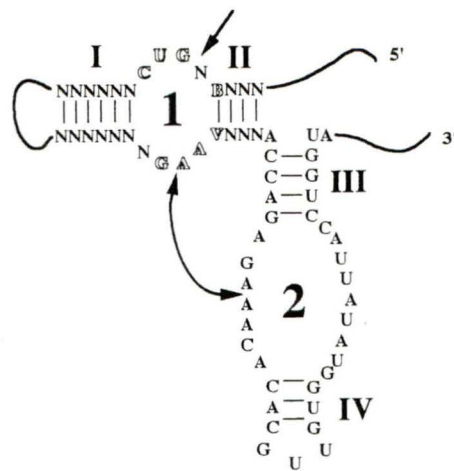
L'utilisation de la technique de SELEX a permis de construire une panoplie de ribozymes catalysant une multitude de réactions biochimiques (Wilson et Szostak, 1999). L'éventail des réactions biochimiques que peuvent catalyser les ARN semble aussi large que celui des réactions catalysées par les protéines. Étant donné cette vaste diversité, cette section ne s'attardera qu'aux ribozymes naturels retrouvés chez les viroïdes (*hammerhead*) (revue par Amarzguioui et Pridz, 1998; revue par Birikh et al., 1997; revue par McKay, 1996) et les ARN satellites de virus de plantes (*hammerhead* et *hairpin*) (revue par Fedor, 2000)

### 1.2.2. L'autocoupure

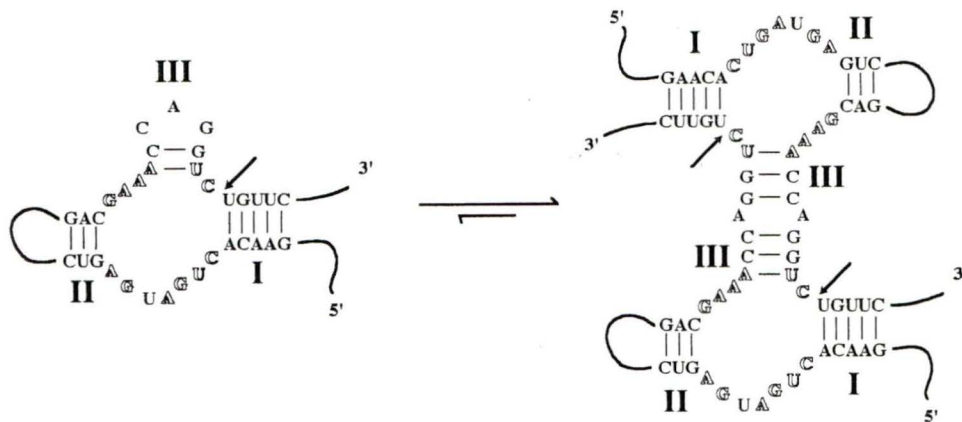
Les structures *hammerhead* et *hairpin* catalysent la coupure d'un lien phosphodiester spécifique d'un ARN. Étant donné la grande similarité des mécanismes de coupure de ces 2 motifs autocatalytiques, les explications se concentreront sur le modèle du motif *hammerhead*. Cette structure est caractérisée par la présence de trois tiges permettant la formation d'un centre catalytique composé de 11 nt hautement conservés (figure 1). La spécificité de la réaction de coupure est possible grâce aux séquences des tiges I et III qui permettent la reconnaissance de la séquence substrat et le positionnement adéquat de celui-ci à la partie ribozyme. Dans certains cas, c.à.d. lorsque la tige III n'est pas suffisamment longue pour permettre la formation d'une tige stable, la formation d'une structure en double *hammerhead* peut être utilisée afin de catalyser la réaction de coupure. Dans ce cas, 2 séquences *hammerhead* indépendantes d'un transcrit multimérique s'associent afin de former 2 structures *hammerhead* distinctes (figure 2) (Forster et al., 1988).

La formation du centre catalytique par les séquences conservées consensus de ces ARN entraîne le positionnement du lien phosphodiester scissile d'une manière telle que l'hydrolyse de ce dernier est facilitée. Durant l'étape de transition de cette réaction de coupure, le phosphate scissile change de configuration spatiale de manière à permettre une attaque en ligne de type  $S_N2$  par le groupement 2'-hydroxyle du nucléotide en position 17 (Van Tol et al., 1990; Murray et al., 1998a). Cette réaction de coupure génère des extrémités 5'-hydroxyle et 2',3'-phosphocyclique et l'efficacité de celle-ci est fortement dépendante de la présence d'ions divalents tels que le  $Mg^{2+}$  (figure 3) (Buzayan et al., 1986; Hampel et Tritz, 1989). Cependant, la présence de ce type d'ions n'est pas strictement nécessaire puisque dans certaines conditions spécifiques, la présence d'ions monovalents est suffisante pour supporter cette catalyse (Murray et al., 1998b). Plusieurs autres facteurs influencent l'efficacité de la réaction de coupure, comme par exemple l'identité des nucléotides formant la

A)



B)



**Figure 2.** Organisation des structures catalytiques *hairpin* et double *hammerhead*. Les différentes tiges formant la structure des ribozymes respectifs sont numérotées à l'aide des chiffres romains. Les nucléotides conservés formant le centre catalytique sont représentés par les lettres en relief et les sites de coupure par les flèches unidirectionnelles. **A)** Représentation de la structure catalytique *hairpin*. Les lettres N indiquent que n'importe lequel des 4 mononucléotides A, G, C et U peut être présent à cette position alors que B et V indiquent respectivement que seulement G, C ou U et G, C ou A sont acceptés. La forme active de ce ribozyme implique la juxtaposition des boucles 1 et 2, telle que représentée à l'aide de la flèche bidirectionnelle. **B)** Représentation de la structure catalytique en double *hammerhead* retrouvée dans les transcrits de polarité positive de ASBVd. La formation d'une tige III instable de seulement 2 pb dans la structure en simple *hammerhead* favorise l'utilisation de la structure plus stable en double *hammerhead*.

structure catalytique et la longueur des différentes tiges (Tuschl et Eckstein, 1993; Thomson et al., 1996; Long et Uhlenbeck, 1994; Hertel et al., 1996, revue de Amarzguioui et Prydz, 1998). Des expériences de coupure utilisant les séquences du ribozyme *hammerhead* seulement, c.à.d. exemptes de toutes séquences ne faisant pas partie de la structure catalytique, ont permis de déterminer que l'efficacité moyenne de cette catalyse est relativement élevée avec une constante de vitesse de  $1 \text{ min}^{-1}$ . Cependant, des études de mutagenèse de ce ribozyme ont permis d'identifier des variants de séquence ayant une constante de vitesse pouvant atteindre  $10 \text{ min}^{-1}$  *in vitro* (Clouet-d'Orval et Uhlenbeck, 1997).

Chez les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae*, les séquences participant à la formation des structures catalytiques *hammerhead* des brins des deux polarités se retrouvent englobées à l'intérieur du génome des viroïdes. Par exemple, dans la structure la plus stable de PLMVd et CChMVd, les séquences *hammerhead* sont retrouvées dans une tige hautement complémentaire et sont donc à priori inactivées (Beaudry et al., 1995; Navarro et Florès, 1997) (voir section 2.1.). Il est évident que le viroïde doit subir un réarrangement structural afin de permettre l'adoption de la structure catalytique. Dans cet ordre d'idée, l'autocoupure des transcrits multimériques de PLMVd et CChMVd est observée dans certaines conditions favorisant ce type de réarrangement (Beaudry et al., 1995; Navarro et Florès, 1997). Premièrement, lorsque ces transcrits sont soumis à une dénaturation-renaturation rapide (*snap-cooling*), favorisant ainsi l'adoption de structures alternatives de plus faible énergie, dont la structure *hammerhead*. Deuxièmement, pendant la transcription *in vitro* de ces viroïdes, confirmant l'adoption de la structure catalytique par les séquences du brin naissant. Dans ce cas-ci, la synthèse subséquente du brin complémentaire résulte en l'hybridation de ce dernier aux séquences *hammerhead*, formant ainsi une tige thermodynamiquement plus stable que la structure alternative. Par le fait même, l'activité d'autocoupure est inhibée.

L'impossibilité de détecter la présence de brins multimériques de PLMVd à partir de feuilles de pêchers infectées démontre que la réaction d'autocoupure *in vivo* est très efficace (Bussière et al., 1999). Il a été suggéré que ce haut niveau d'autocoupure pourrait être le

résultat d'une progression lente de la polymérase impliquée dans la réplication de ce viroïde, favorisant ainsi l'adoption de la structure *hammerhead* (Côté et al., 2000). Une autre possibilité implique qu'une protéine de l'hôte puisse favoriser l'adoption et le maintien de la structure catalytique. Cette hypothèse est renforcée par certaines évidences. D'une part, des expériences de coupure *in vitro* ont permis de démontrer que la présence de certaines protéines pouvaient favoriser l'activité catalytique du *hammerhead* (Tsuchihashi et al., 1993; Herschlag et al., 1994; Bertrand et Rossi, 1994). D'autre part, le motif autocatalytique *hammerhead* retrouvé dans certains transcrits de salamandre a été isolé comme partie intégrante d'un complexe ribonucléoprotéique et il a été démontré que la présence de ces protéines favorise la réaction de coupure (Luzi et al., 1997).

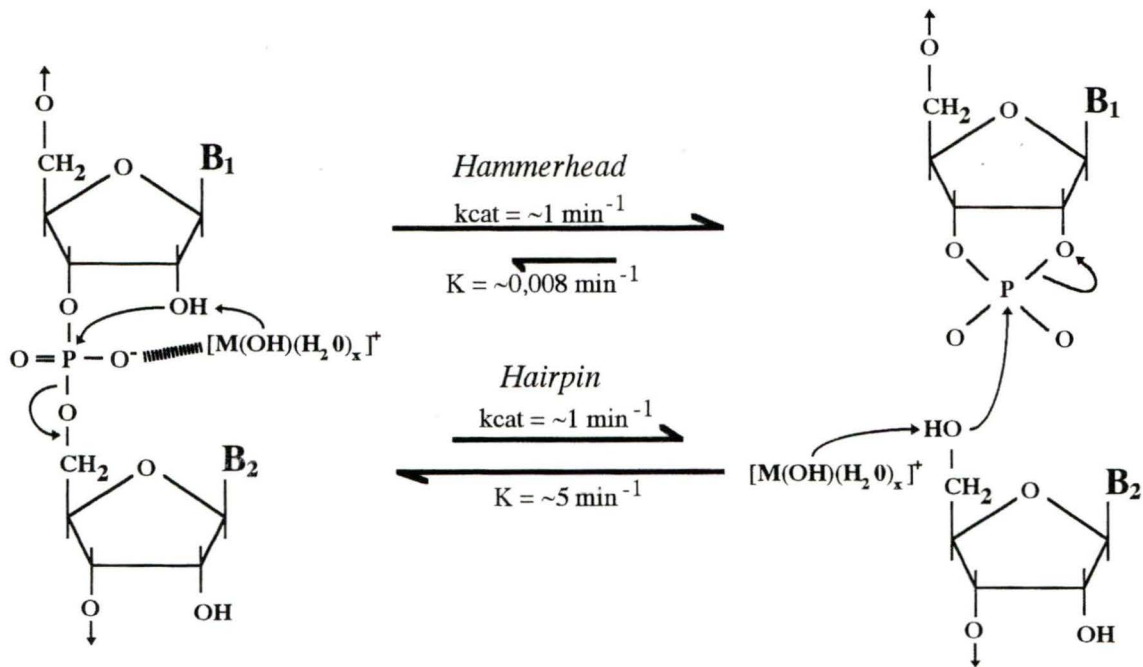
### 1.2.3 L'autoligation

L'autoligation est essentiellement la réaction inverse de l'autocoupure. Cette réaction consiste en une attaque nucléophile du groupement 2',3'-phosphocyclique par l'extrémité 5'-hydroxyle, résultant ainsi en la formation d'un lien phosphodiester (Lafontaine et al., 1995). Tout comme pour l'autocoupure, l'efficacité de la réaction d'autoligation est grandement influencée par la présence d'ions  $Mg^{2+}$  et le mécanisme utilisé. Par exemple, la recircularisation de certains ARN satellites de virus de plante est catalysée via leur structure catalytique en épingle à cheveux (*hairpin*) (Prody et al., 1986; Feldstein et Bruening, 1993). Dans ce cas-ci, la réaction de ligation est légèrement favorisée par rapport à la réaction de coupure, c.à.d. environ de 5 à 10 fois supérieure (figure 3) (revue par Fedor, 2000). D'un autre côté, l'équilibre interne de la réaction de ligation catalysée par la structure *hammerhead* est fortement dirigé, par un facteur d'environ 130 fois, vers la coupure plutôt que vers la ligation (figure 3) (Hertel et Uhlenbeck, 1995). Il a été suggéré que le déterminant majeur expliquant cette différence entre ces deux ribozymes serait la plus grande rigidité de la structure *hairpin* (Klemens et Uhlenbeck, 1995; revue par Fedor, 2000). En effet, ce dernier

serait plus apte que la structure flexible du *hammerhead* à positionner au site actif les extrémités 2',3'-phosphocyclique et 5'-hydroxyle du complexe de pré-ligation. Ce positionnement faciliterait ainsi la formation d'un nouveau lien phosphodiester de type 3',5' exclusivement (revue de Fedor, 2000). De plus, il semble que le complexe de pré-ligation du *hammerhead* soit relativement instable et que la faible efficacité de ligation observée chez celui-ci serait en partie le résultat d'une dissociation rapide des substrats de ligation.

Dans le cas de PLMVd et de HDV, la recircularisation de ces transcrits n'est pas performée par une structure catalytique comme décrit ci-haut, mais est le résultat d'une réaction d'autoligation non-enzymatique (Lafontaine et al., 1995; Sharmeen et al., 1989; revue par Karayiannis, 1998). Cette réaction est possible grâce à la juxtaposition par un brin complémentaire des deux extrémités générées par la réaction d'autocoupure. Certains résultats suggèrent que l'autoligation non-enzymatique pourrait produire un mélange de liaison de type 3',5' et 2',5' (Sharmeen et al., 1989; Lafontaine et al., 1995).

Jusqu'à ce jour, les exemples d'organismes ayant des activités d'autoligation sont assez limités. Toutefois, l'utilisation de la méthode de SELEX a permis de synthétiser un large arsenal de ribozymes catalysant efficacement une réaction de ligation entre deux extrémités intra- ou intermoléculaires (revue par Wilson et Szostak, 2000). Par contre, l'utilisation *in vivo* d'un tel mécanisme de recircularisation par certains organismes demeure spéculative.



**Figure 3.** Réaction de transestérification catalysée par certains ARN catalytiques. Un ion métallique bivalent sous forme hydroxyde ( $[M(OH)(H_2O)_x]^+$ ) lié à un atome d'oxygène attaque le groupement 2'-hydroxyle adjacent, résultant ainsi en une attaque de type  $S_N2$  sur le phosphate adjacent. La coupure du squelette phosphodiester s'effectue et génère des produits ayant des extrémités 5'-hydroxyle et 2',3'-phosphocyclique. Les demis flèches bidirectionnelles indiquent que cette réaction est réversible. Dans ce cas-ci, l'extrémité 5'-hydroxyle est activée par l'ion métallique, entraînant ainsi l'attaque du 2',3'-phosphocyclique et la formation d'un lien phosphodiester. Les constantes catalytiques de ces réactions catalysées par la structure *hammerhead* et *hairpin* sont indiquées près des flèches correspondantes. B1 et B2 représentent respectivement les bases -1 et +1 du site de coupure.

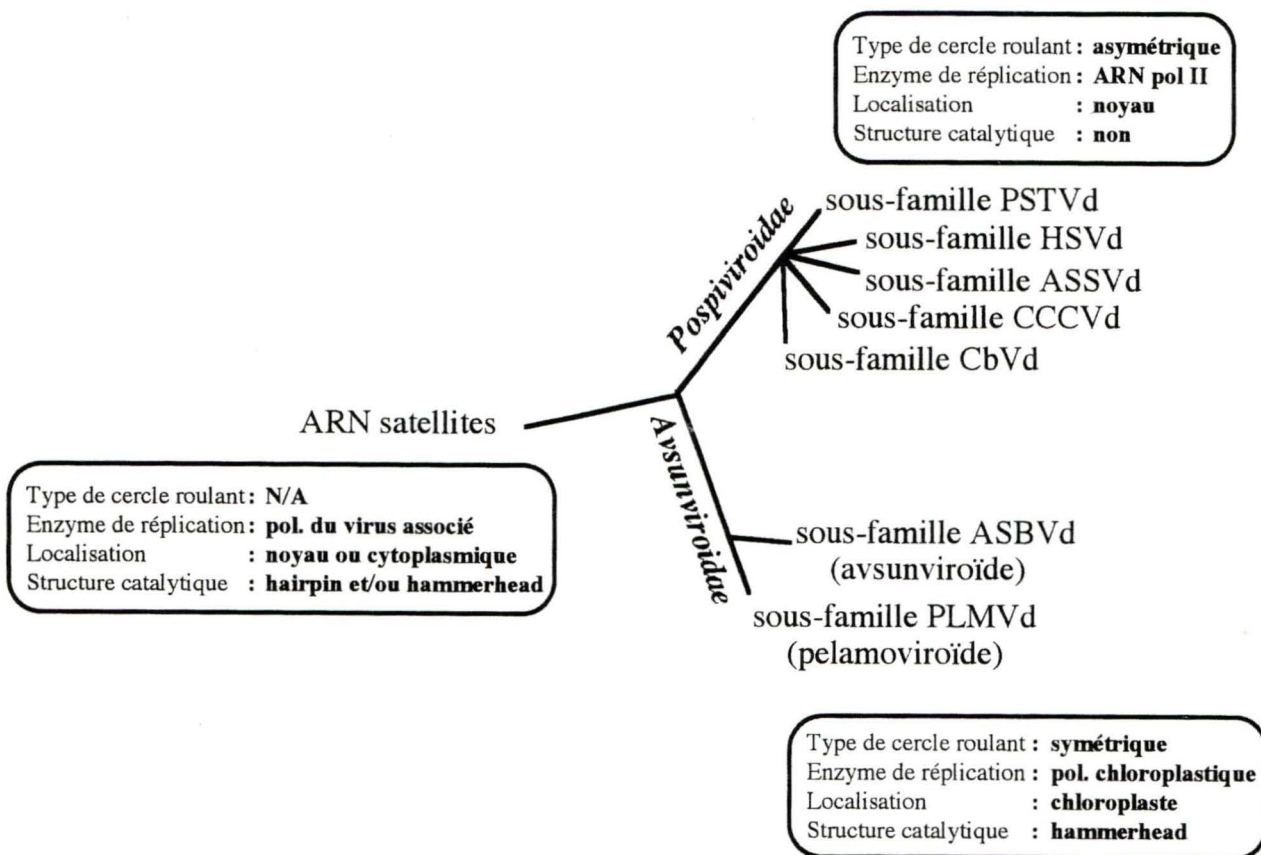
## 2. CARACTÉRISTIQUES DES VIROÏDES

### 2.1. Classification des viroïdes

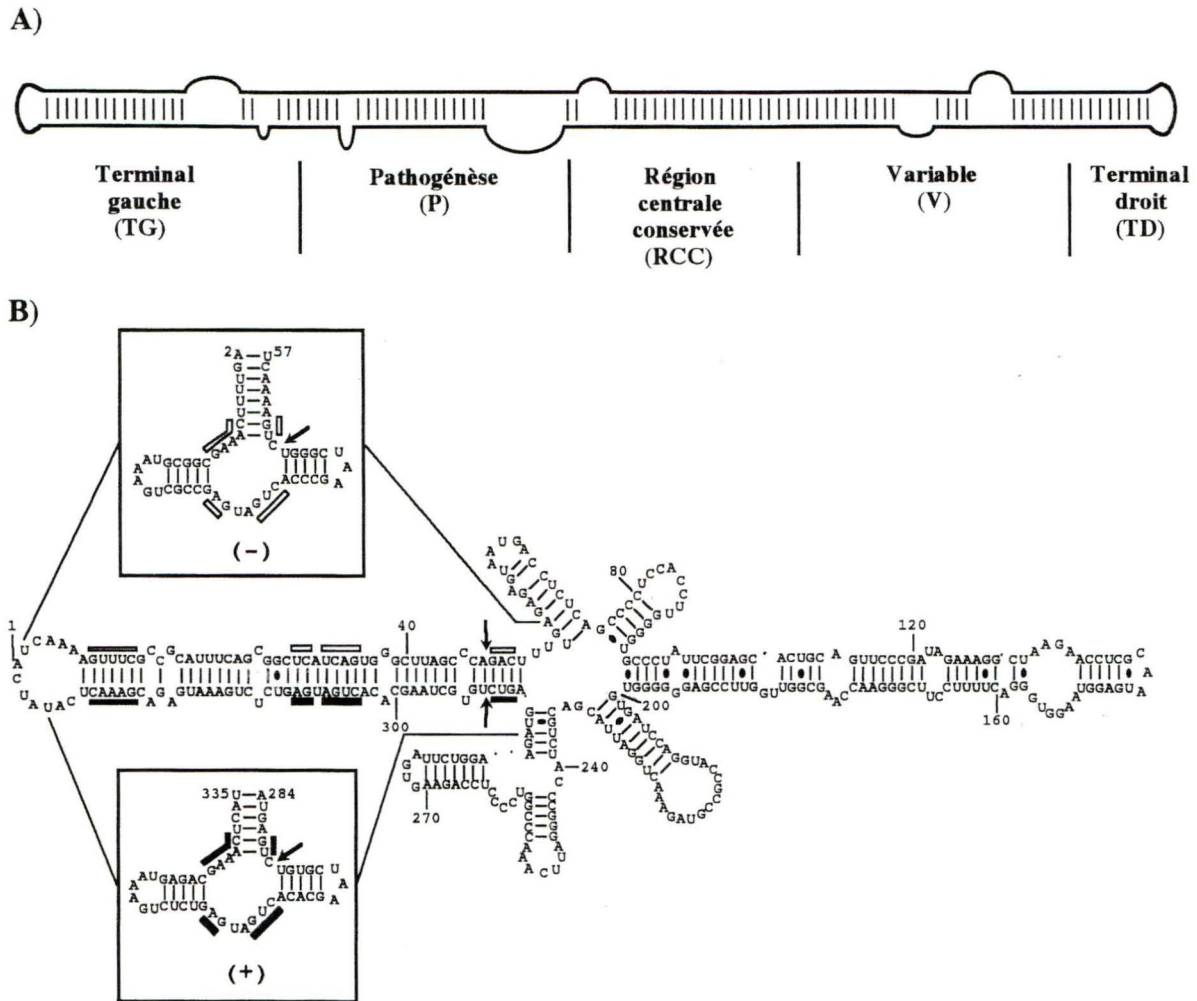
Les différentes espèces de viroïdes sont classées en deux grandes familles principales, soit la famille des *Pospiviroidae* (aussi appelée groupe B) et celle des *Avsunviroidae* (aussi appelée groupe A) (figure 4). La grande majorité des viroïdes répertoriés à ce jour appartient à la première famille, soit 27 espèces, alors que seulement 3 espèces appartiennent à la seconde (Pelchat et al., 2000a). Ce système de classification est basé principalement sur la présence ou l'absence des 5 domaines caractéristiques aux viroïdes de la famille des *Pospiviroidae*. Ces domaines sont la boucle terminale gauche et droite (TG et TD respectivement), la région de pathogenèse (P), la région variable (V) et la région centrale conservée (RCC) (figure 5A) (revue par Diener, 1993). L'identité de cette dernière région permet le sous-classement des différentes espèces en 5 sous-familles.

Les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* sont caractérisés par la présence de séquences catalytiques *hammerhead*. Les 3 différentes espèces appartenant à cette famille sont classées en 2 sous-familles (avsunviroïde et pelamoviroïde) sur la base de caractéristiques physiques, telles la solubilité dans une solution de chlorure de lithium à 2M, le type de structure *hammerhead* utilisé et le contenu en G+C. ASBVd est le seul membre de la sous-famille des avsunviroïdes alors que PLMVd et CChMVd appartiennent aux pelamoviroïdes. La forte structure secondaire branchée de ces derniers (figure 5B), comparativement à la structure en forme de tige des autres viroïdes (figure 5A) (Symons, 1981; Gross et al., 1978), est responsable de leur insolubilité dans la solution de chlorure de lithium (Beaudry et al., 1995; Navarro et Florès, 1997). De plus, des résultats relativement récents ont permis de démontrer des différences majeures dans la localisation cellulaire et dans les mécanismes de réplication utilisés par les membres des deux familles (Bussière et al., 1999).





**Figure 4.** Classification des viroïdes et ARN apparentés. Les viroïdes sont divisés en deux grandes familles qui sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs sous-familles. Les caractéristiques principales des membres de ces familles et des ARN satellites, qui sont apparentés aux viroïdes, sont énumérées dans les encadrés.



**Figure 5.** L'organisation des 5 domaines génomiques chez les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* et structure secondaire de PLMVd. A) Représentation schématique de la forte structure secondaire en forme de tige retrouvée chez les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae*. Les cinq régions caractéristiques de ce type d'organisme sont également représentées. B) Représentation de la structure primaire et secondaire de PLMVd déterminée par ordinateur. Les rectangles vides et pleins représentent les séquences conservées permettant l'adoption des motifs autocatalytiques et les flèches indiquent les sites de coupure des polarités positives et négatives du viroïde. Les structures alternatives hammerhead retrouvées dans les transcrits de polarité positive (+) et négative (-) sont schématisées dans les encadrés.

## **2.2. Localisation cellulaire des viroïdes**

Les toutes premières évidences de localisation cellulaire des viroïdes ont été rapportées il y a un peu plus de 10 ans grâce à des études de fractionnement cellulaire de tissus de tomate infectés par PSTVd (Harders et al., 1989). Ces études ont révélé que ce dernier s'accumulait essentiellement dans le noyau, plus précisément dans le nucléole. Plus récemment, la localisation au nucléole de plusieurs membres de la famille des *Pospiviroidae* a été confirmée par hybridation *in situ* et par microscopie confocale et électronique (Bonfiglioli et al., 1996). Ces mêmes techniques ont permis de démontrer que les membres de la famille des *Avsunviroidae* sont principalement localisés dans les chloroplastes de leurs hôtes (Lima et al., 1994; Bussière et al., 1999). En conséquence, il a été suggéré que la localisation cellulaire des viroïdes constituait une différence majeure permettant de classer ces espèces d'agents pathogènes. Il va de soi que cette localisation différentielle aura d'importantes répercussions sur les mécanismes utilisés durant les différentes étapes du cycle de vie de ces organismes.

## **2.3. Réplication des viroïdes**

### **2.3.1. Mécanismes de réplication**

La détection d'ARN dimériques, trimériques et de plus grands oligomères "tête à queue" dans les tissus infectés par des viroïdes ont été les premières évidences démontrant l'utilisation d'un mécanisme de réplication ADN-indépendant en cercle roulant (Branch et Robertson, 1984; Grill et Semancik, 1978). Ce mécanisme de réplication est maintenant accepté, même si certaines étapes diffèrent d'un viroïde à l'autre. Par exemple, les viroïdes

appartenant à la famille des *Avsunviroidae* se répliquent par un mécanisme en cercle roulant symétrique (figure 6) (Bussière et al., 1999; Daros et al., 1994). Dans ce type de répllication, les copies monomériques circulaires de polarité positive, arbitrairement assignée, sont copiées en un brin multimérique de polarité négative. Ce dernier est ensuite clivé en monomères linéaires qui sont par la suite recircularisés afin de donner des monomères circulaires de polarité négative. Les mêmes 3 étapes de polymérisation, coupure et ligation sont alors répétées afin de produire la progéniture du viroïde.

Les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* utilisent quant à eux un mécanisme en cercle roulant asymétrique (figure 6) (Branch et Robertson, 1981; Owens et Diener, 1982; Branch et al., 1988; Feldstein et al., 1998). Dans ce cas-ci, le brin multimérique de polarité négative est directement répliqué en un brin multimérique de polarité positive. Ce dernier est ensuite coupé et les monomères recircularisés comme précédemment afin de produire la progéniture. La différence majeure entre ces 2 mécanismes de répllication est donc la présence des intermédiaires monomériques linéaires et circulaires de polarité négative dans le cas du mécanisme de répllication symétrique.

### **2.3.2. Étape de polymérisation**

La démonstration que les intermédiaires de répllication et les transcrits matures des viroïdes se concentrent dans le même compartiment cellulaire supporte l'idée que le site de localisation de ces viroïdes correspond à leur site de répllication (Spiesmacher et al., 1983; Navarro et al., 1999). Dans le cas des viroïdes appartenant à la famille des *Pospiviroidae*, il a été démontré que l'étape de polymérisation est inhibée par de faibles concentrations d' $\alpha$ -amanitine, un inhibiteur connu de l'ARN polymérase II ADN-dépendante (Mülbach et Sängler, 1979; Florès et Semancik, 1982; Schindler et Mülbach, 1992; Rackwitz et al., 1981). L'implication de cette enzyme dans l'étape de polymérisation des viroïdes a reçu récemment une preuve additionnelle avec la démonstration que CEVd, un membre de la

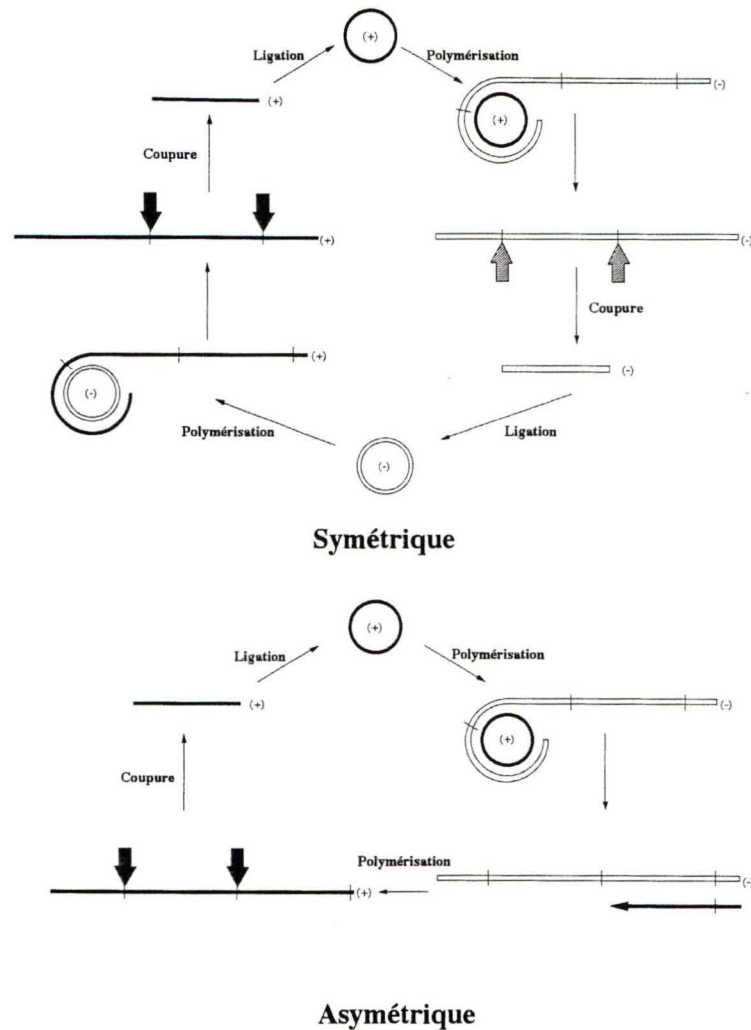
même famille que PSTVd, est associé *in vivo* avec la large sous-unité de l'ARN polymérase II (Warrilow et Symons, 1999).

L'absence de ce type de polymérase dans le chloroplaste et l'observation que l'étape de polymérisation des viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* est insensible à la présence d' $\alpha$ -amanitine (Marcos et Florès, 1992) impliquent nécessairement l'utilisation d'une polymérase de nature différente de celle utilisée par les *Pospiviroidae*. Le chloroplaste possède 2 activités ARN polymérase ADN-dépendante majeures. La première polymérase est encodée par le génome chloroplastique (PEP : *plastid-encoded polymerase*) et possède une structure similaire à la polymérase retrouvée chez *Escherichia coli*, c.à.d. une enzyme à plusieurs sous-unités. La seconde polymérase (NEP : *nuclear-encoded polymerase*) est encodée par le génome nucléaire et ne possède qu'une seule sous-unité.

Des expériences de répllication *in vitro* de ASBVd et une analyse des séquences entourant le site d'initiation suggèrent que la candidate la plus probable pour la répllication de ce viroïde serait la NEP (Navarro et al., 2000, Navarro et Flores, 2000). Par contre, l'implication de la NEP pour les autres membres de la famille des *Avsunviroidae* reste à confirmer.

### **2.3.3. Étape de coupure et de circularisation**

L'absence généralisée d'activité autocatalytique chez les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* implique nécessairement que la maturation des intermédiaires de répllication est effectuée par des enzymes de l'hôte. Par exemple, il a été montré que la ribonucléase T1 peut catalyser *in vitro* la formation de monomères circulaires de PSTVd à partir de transcrits multimériques linéaires (Tsagris et al. 1991). De plus, d'autres résultats démontrent que l'ARN ligase de germe de blé permet la circularisation des transcrits monomériques linéaires de différents viroïdes (Lafontaine et al., 1995; Branch et al., 1982; Konarska et al., 1982; Konarska et al., 1981).



**Figure 6.** Réplication en cercle roulant. L'ARN circulaire infectieux est utilisé comme matrice pour la synthèse d'un ARN multimérique complémentaire de polarité négative. La coupure de ce dernier et la ligation des monomères permettent la formation des intermédiaires circulaires de polarité négative. Dans le cycle symétrique, les mêmes étapes de polymérisation coupure et ligation sont répétées afin de générer la progéniture du viroïde. Dans le cycle asymétrique, l'ARN multimérique de polarité négative est directement utilisé pour la synthèse des multimères de polarité positive qui sont ensuite coupés et les monomères circularisés. La polarité positive et négative des différents brins est indiquée respectivement par un signe (+) ou (-), ou par des traits pleins ou vides. Les sites de coupure des multimères sont représentés par les flèches verticales alors que la flèche horizontale indique le sens de synthèse du brin complémentaire.

Il est évident que le viroïde en soi possède certains déterminants moléculaires qui lui permettent de diriger sa maturation vers la coupure ou la ligation. Dans le cas de PSTVd, il a été démontré que la RCC servirait "d'interrupteur" afin de diriger celui-ci vers ces différentes étapes. Le premier événement de coupure, c.à.d. la coupure de l'extrémité 5' des multimères de PSTVd, est induit par la formation d'une tétraboucle ultrastable (de type GNRA) dans la région du RCC (Baumstark et al., 1997). Par la suite, un réarrangement structural permet l'adoption d'une boucle interne qui dirige la coupure de l'extrémité 3' et la juxtaposition de ces 2 extrémités. Le monomère ainsi formé est finalement recircularisé par une ligase de l'hôte.

Il est généralement acquis que les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* ne possèdent pas d'activité autocatalytique. Par contre, des résultats relativement récents ont démontré que cette croyance est possiblement erronée. En effet, il a été démontré que PSTVd avait la capacité de se recirculariser *in vitro* en absence complète de protéine, bien que l'efficacité de cette réaction d'autoligation soit environ 10 fois moins efficace que le niveau de recircularisation observé dans des extraits de patates (Baumstark et al., 1997). De plus, il semble que la maturation des brins multimériques de CCCVd en monomères puisse être médiée dans certaines conditions spécifiques par un nouveau motif autocatalytique (Liu et Symons, 1998).

La présence des motifs autocatalytiques chez les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* et leur localisation chloroplastique suggèrent fortement que des mécanismes distincts de ceux mentionnés précédemment modulent les étapes de coupure et de ligation de ces organismes. En fait, certaines évidences supportent l'hypothèse que la structure *hammerhead* serait responsable, pour tous les membres de cette famille, de la coupure *in vivo* des brins multimériques. Premièrement, l'isolation des transcrits linéaires de ASBVd (Daros et al., 1994), CChMVd (Navarro et Florès, 1997) et de PLMVd (Laurendeau et Perreault, résultat non publié) à partir de feuilles infectées a permis de détecter que les sites de linéarisation de ceux-ci correspondent à ceux générés par l'autocoupure *in vitro*.

Deuxièmement, une analyse des séquences formant les structures catalytiques a permis d'identifier, dans plusieurs variants de PLMVd et CChMVd, des mutations compensatoires et/ou de la covariation de séquence permettant de préserver la stabilité de cette structure (Hernandez et Florès, 1992; Navarro et Flores, 1997; Pelchat et al., 2000b). Cette dernière observation suggère donc l'importance de conserver l'intégrité de cette structure, supportant ainsi l'hypothèse que celle-ci joue un rôle primordial dans le cycle de vie de ces organismes.

Le très faible niveau de détection des brins multimériques dans les 2 polarités de PLMVd et de CChMVd démontre que l'efficacité de la réaction de coupure médiée par le motif en simple *hammerhead* de ces viroïdes est très élevée *in vivo* (Bussière et al., 1999; Navarro et Flores, 1997). Par contre, cette réaction semble beaucoup moins efficace dans le cas de la réaction catalysée par la structure en double *hammerhead* utilisée par ASBVd puisque des oligomères de ce viroïde, pouvant aller jusqu'à 11 copies de long, ont été détectés *in vivo* (Hutchins et al., 1985; Sheldon et Symons, 1993, Silver et al., 1994).

Les preuves supportant l'implication de l'autoligation dans le cycle de réplication de ces organismes sont beaucoup moins évidentes que pour l'autocoupure. En fait, ces évidences se limitent à la capacité qu'ont les transcrits de PLMVd de s'autoliguer *in vitro* et à l'observation que l'efficacité de cette réaction est semblable au niveau d'accumulation des transcrits circulaires de PLMVd *in vivo* (~10%) (Lafontaine et al., 1995; Bussière et al., 1999). Toutefois, il a été suggéré suite à l'observation que l'autoligation de PLMVd génère en partie des liaisons de type 2',5' *in vitro* (voir section 1.2.3.) que l'utilisation de ce mécanisme est peu probable *in vivo* (Lafontaine et al., 1995; Flores et al., 1999).



### 3. Pathogenèse des viroïdes

#### 3.1. Infection et propagation

Les viroïdes sont responsables à chaque année de très importantes pertes dans le domaine agro-alimentaire. Par exemple, certains résultats démontrent que la moitié des pêcheurs en Amérique du Nord et en Europe sont infectés par PLMVd (Hadidi et al., 1997). Comme autre exemple, la presque totalité des 250 000 palmiers de l'île de San Miguel, dans les Philippines, sont morts suite à une infection par CCCVd en 1962 (Haselhoff et al., 1982). Ces exemples confirment sans aucun doute l'importance et l'étendue de ce problème. Il est difficile d'imaginer comment un ARN libre (non-encapsidé) comme les viroïdes peut se propager d'une plante à l'autre et traverser la double paroi membranaire des cellules végétales. Les premières évidences à propos des mécanismes d'infection de ces organismes ont été démontrées suite à l'observation que la greffe de tissus infectés et l'application d'une solution contenant des transcrits de viroïdes à la surface de feuilles endommagées mécaniquement résultaient en une infection systémique des plantes saines (Desvignes, 1986; Hadidi et al., 1997; Goss, 1926; Merriam et Bonde, 1954). Dans un contexte un peu plus naturel, il a été démontré que PSTVd pouvait se propager par contact foliaire ou par dispersion des graines provenant d'un plant infecté (Querci et al., 1997). D'autres résultats démontrent que PLMVd et PSTVd peuvent être transmis par certains insectes, tels la chenille (Desvignes, 1986, Querci et al., 1997). Par contre, il semblerait dans ces cas-ci que les viroïdes doivent être co-encapsidés à l'intérieur d'une particule virale afin d'être transmis efficacement (Querci et al., 1997).

Une fois la barrière membranaire franchit, les viroïdes se propagent à l'intérieur de la plante par l'intermédiaire des canaux intercellulaires appelés plasmodesmes, habituellement responsables du transport entre les cellules de macromolécules telles les protéines et les

acides nucléiques (Ding et al., 1997). Il demeure inconnu si les viroïdes diffusent librement à travers cette structure ou si cette propagation est médiée par une molécule transportrice. Par contre, il a été démontré que la fusion de PSTVd à un transcrit habituellement immobile est suffisante pour induire le transport de ce dernier d'une cellule à l'autre.

La propagation généralisée des viroïdes à l'intérieur de la plante génère un large éventail de symptômes et la sévérité de ceux-ci est dépendante de l'espèce et de la souche du viroïde (Diener et al, 1993). Dans certains cas, ces symptômes sont plutôt anodins, comme par exemple des anomalies de croissance, des dérèglements de la synthèse de la chlorophylle, des déformations des fruits ou des feuilles, etc. Dans d'autres cas, ces symptômes seront plus sévères, causant de la nécrose, la mort cellulaire et dans les circonstances extrêmes, la mort de la plante entière (CCCVd chez les palmiers). Dans le cas de PLMVd, la maladie est généralement latente durant 5-7 ans avant que les symptômes apparaissent et ceux-ci sont relativement doux. Par contre, de la nécrose est occasionnellement observée sur les bourgeons et sur certaines branches (Shamloul et al., 1995). D'un point de vue cellulaire, l'infection d'un viroïde induit d'importants changements physiologiques (Jakob et al., 1997). Par exemple, il a été démontré que la quantité de sucre diminue et que la teneur en eau augmente dans les plantes infectées. De plus, le nombre de chloroplastes diminue et ceux restant absorbent moins bien la lumière. Il est suggéré que ces observations seraient le résultat de la production d'un plus grand nombre de radicaux libres dans les feuilles infectées, ce qui entraînerait un vieillissement prématuré des feuilles et la dégradation des photosystèmes PSI et PSII impliqués dans l'absorption et la transformation de l'énergie lumineuse.

En général, on ne peut conclure aucun consensus à propos de la sévérité des symptômes. Par exemple, il semble que la concentration du viroïde à l'intérieur de la cellule ne soit pas un déterminant majeur de la sévérité des symptômes. Certaines souches d'une espèce peuvent s'accumuler à une très grande concentration sans produire d'effet, alors que d'autres souches de la même espèce pourront créer des effets dévastateurs, même si celles-ci

s'accumulent de façon très limitée (Diener et al., 1993a). D'un autre côté, des changements mineurs dans la séquence primaire du viroïde peuvent avoir des effets drastiques sur différents aspects de la pathogenèse des viroïdes. Par exemple, il a été démontré qu'un changement de seulement 2 nucléotides dans une souche "douce" de PSTVd pouvait changer celle-ci en une souche provoquant des symptômes sévères (Gross et al., 1981). Dans un autre cas, la substitution d'un seul nucléotide a permis de convertir une souche non-infectieuse de PSTVd en une souche infectieuse pour *Nicotiana tabacum* (Wassenegger et al., 1996). À la lumière de ces observations, il est évident que les mécanismes régissant les effets pathogènes des viroïdes sont fortement contrôlés par des déterminants spécifiques présents dans le génome de ceux-ci. En fait, c'est justement cette complexité relative à leur simplicité génomique qui rend ces organismes si particuliers.

### **3.2. Mécanismes de pathogenèse**

Malgré les nombreuses hypothèses proposées, les mécanismes moléculaires contrôlant la pathogenèse des viroïdes demeurent mystérieux. Une des premières hypothèses ayant été proposée stipulait que le viroïde devait coder pour un peptide quelconque et que l'expression de celui-ci déclenchait les symptômes observés chez les plantes infectées. Des expériences de traduction effectuées sur PSTVd et CEVd ont permis d'éliminer cette hypothèse, puisque ceux-ci ne codent pour aucune protéine (Davies et al., 1974; Hall et al., 1974; Semancik et al., 1977). Il semble donc que les viroïdes exercent leurs effets pathogènes via l'interaction avec une ou des composante(s) de l'hôte.

Une hypothèse suggère que les symptômes observés pourraient être le résultat de l'activation d'une protéine kinase (P68) impliquée dans la régulation de la traduction, la division cellulaire, la transcription et l'apoptose. Il a été démontré que l'infection de plants de tomates par PSTVd résultait en l'activation (autophosphorylation) de cette protéine et que la

sévérité des symptômes observés corrélait avec le degré de phosphorylation de la kinase (Hiddinga et al., 1988; Diener et al., 1993b; Langland et al., 1996). D'autres expériences ont permis de démontrer que PSTVd pouvait interagir avec les histones et certaines autres protéines dont l'identité n'a pu être déterminée (Wolff et al., 1985). Dans le cas de PLMVd, des expériences d'hybridation de type North-Western ont permis de déceler que celui-ci pouvait former un complexe avec au moins 2 protéines d'environ 22,8kDa et 8,8kDa et que cette interaction était observée seulement dans les extraits protéiques isolés à partir de feuilles de pêcheurs (Bussière et Perreault, résultats non-publiés).

Certaines hypothèses suggèrent que les viroïdes pourraient causer leurs effets pathogènes via l'interaction avec des ARN de l'hôte. Des recherches d'homologie entre les viroïdes et les ARN cellulaires ont permis de démontrer la présence d'une région de très bonne complémentarité (de 36 à 53 nt) entre plusieurs espèces de viroïdes et l'ARN 7S de la particule de reconnaissance de signal (SRP) de tomates (Haas et al., 1988). En plus de cet exemple, une forte complémentarité a aussi été détectée avec l'ARN U1 (snRNA U1) de mammifère (Diener, 1981). Dans d'autres cas, les séquences identifiées ne sont pas complémentaires mais plutôt homologues, suggérant ainsi que les viroïdes pourraient mimer et dérégler les fonctions normales de certains ARN cellulaires. C'est le cas entre autre de PSTVd et ASBVd, qui ont été démontrés pour avoir une bonne homologie avec les ARN de vertébrés U3B et U5 respectivement (Kiss et al., 1983, Kiss et Solymosy, 1982). Dans le cas de PLMVd, il a été démontré par Northern blot que des transcrits de ce viroïde interagissaient fortement avec un ARN de pêcheur d'environ 1kb (Bussière et al., 1999). La nature de ce transcrit n'est malheureusement pas connue mais la détection de cette interaction dans les conditions relativement stringentes utilisées implique que celle-ci doit être relativement stable.

L'hypothèse des interactions ARN-ARN est relativement intéressante mais souffre d'une lacune majeure. Il est difficile d'expliquer dans un contexte où la complémentarité s'étend sur plus de 50 nt comment une variation de seulement un ou 2 nucléotides peut

moduler un changement drastique dans les symptômes observés. Dans cet ordre d'idée, il est connu que la présence de boucles asymétriques tend à faire courber l'axe d'une l'hélice. Or, il a été démontré qu'un changement de seulement quelques nucléotides dans l'hélice de la région P de PSTVd résultait en une courbure prononcée de celle-ci et que la sévérité des symptômes créés par cet organisme était directement proportionnelle à l'amplitude de cette courbe (Owens et al., 1996). Il est suggéré que cette courbure pourrait augmenter l'affinité pour une protéine effectrice, résultant ainsi en une sévérité accrue des symptômes.

Une hypothèse relativement intéressante est celle stipulant que les viroïdes, du moins ceux de la famille des *Avsunviroidae*, pourraient couper en *trans* un ARN de l'hôte à l'aide de leurs séquences catalytiques. Le problème majeur de cette hypothèse est que comme mentionné précédemment, ces séquences sont incluses dans une forte structure secondaire rendant ainsi l'hybridation avec le substrat potentiel peu probable. Finalement, des résultats récents démontrent que l'expression de transcrits de PSTVd dans des cellules peut induire la méthylation spécifique de certaines régions du génome de la plante possédant une forte homologie avec ce viroïde (Wassenegger et al., 1994). Cette méthylation résulte en une inhibition de l'expression des transcrits de PSTVd codés par le génome et serait dirigée par l'hybridation des transcrits d'ARN à leurs séquences complémentaires présentes dans le génome. De plus, il a été démontré qu'une complémentarité d'aussi peu que 30 nt était suffisante pour diriger la méthylation (Pélissier et Wassenegger, 2000). Ces résultats suggèrent que l'expression de gènes cellulaires possédant une homologie avec un viroïde, comme par exemple le gène codant pour l'ARN 7S, pourrait être modulée par ce mécanisme.

### 3.3. Mécanismes de défense de l'hôte

L'infection d'une plante par des viroïdes déclenche l'expression par les cellules infectées d'une panoplie de gènes de défense faisant partie de la famille des protéines PR (*Pathogenesis-Related proteins*). C'est le cas entre autres des protéines PR-1 et PR-69 dont l'expression est fortement stimulée suite à l'infection par un viroïde (Tornero et al., 1994; Tornero et al., 1996). De plus, il a été démontré que ce type d'infection déclenchait l'expression d'une série de gènes contrôlant les propriétés de la paroi cellulaire, tels des peroxydases, des désaturases, des lipooxygénases et des inhibiteurs de protéases (Gadea et al., 1996). L'expression de ces gènes entraîne un épaississement irrégulier de la paroi (plus dense), une augmentation de l'adhésion cellulaire et la résistance aux enzymes protoplastiques. Ces changements rendent la cellule plus réfractaire à une attaque subséquente par d'autres agents pathogènes, ce qui pourrait expliquer l'observation qu'un plant infecté par un viroïde est généralement résistant à une infection subséquente par un autre viroïde de souche semblable ou rapprochée (Gadea et al., 1996). Ceci laisse donc croire que les facteurs de l'hôte nécessaires à la survie des viroïdes *in vivo* sont limités (Flores et al., 1997). Ces mécanismes de résistance ne sont pas spécifiques aux viroïdes, puisque la plupart des interactions plantes/agents pathogènes induisent cette réponse (Dixon et al., 1994).

## 4. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

### 4.1. Réplication des viroïdes de la famille des *Avsunviroidae*

#### 4.1.1. Contexte

La présence de séquences autocatalytiques dans les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* suggère que certaines étapes de leur cycle de réplication pourraient être catalysées par les structures *hammerhead*. De plus, leur localisation chloroplastique implique nécessairement que les enzymes impliquées dans leur réplication sont différentes de celles utilisées par les viroïdes appartenant à la famille des *Pospiviroidae* (Bussière et al., 1999). Étant donné le niveau relativement faible de connaissances à propos du cycle de réplication des viroïdes de la famille des *Avsunviroidae*, la caractérisation des différentes étapes du cycle de réplication de PLMVd pourrait fournir des indices importants pour une meilleure compréhension et l'élaboration d'un consensus par rapport aux mécanismes de réplication des membres de cette famille.

#### 4.1.2. Le problème de la circularisation des monomères

Des résultats antérieurs ont permis de démontrer que PLMVd avait la capacité *in vitro* de se recirculariser en absence complète de protéine (Lafontaine et al., 1995). Par contre, l'observation que l'efficacité de cette réaction est relativement peu élevée et que celle-ci semble produire en partie un lien phosphodiester de type 2',5' laisse croire que l'utilisation *in vivo* du mécanisme d'autoligation est peu probable. La croyance générale est donc que cette étape est catalysée par une enzyme de l'hôte. Toutefois, il a été démontré que les transcrits de PLMVd s'accumulent majoritairement sous la forme linéaire *in vivo*, c.à.d. à un niveau

comparable à l'efficacité d'autoligation observée *in vitro* (Bussière et al., 1999). Ces observations ont ainsi ravivé l'hypothèse stipulant que la réaction d'autoligation pourrait être responsable de la recircularisation *in vivo* des transcrits monomériques de PLMVd. Le problème est donc à savoir quel est le mécanisme de recircularisation utilisé par PLMVd et possiblement par les autres viroïdes de la famille des *Avsunviroidae*.

#### **4.1.3. Le problème de la polymérisation**

La localisation des viroïdes appartenant à la famille des *Avsunviroidae* suggère que l'enzyme impliquée dans leur réplication est chloroplastique. Dans cet ordre d'idée, il a été démontré que la polymérase impliquée dans la réplication d'ASBVd serait l'enzyme chloroplastique NEP (Navarro et al., 2000; Navarro et Flores, 2000). Il est donc possible que celle-ci puisse être également responsable de la réplication de PLMVd. D'un autre côté, les différences importantes dans la structure primaire et secondaire de ASBVd et PLMVd suggèrent que ces 2 viroïdes pourraient utiliser 2 polymérases distinctes pour leur réplication. De plus, une des grandes questions est de savoir quels sont les déterminants importants présents chez le viroïde permettant le recrutement de la polymérase et l'initiation de la réplication. Cette initiation se produit-elle à un endroit spécifique du viroïde ou aléatoirement? La réponse à ces questions pourrait donner d'importantes informations sur l'utilisation potentiel de mécanismes communs entre certains viroïdes pour cette étape primordiale du cycle de vie de ces organismes.

#### **4.1.4. Objectif général**

Caractériser certaines étapes du cycle de réplication de PLMVd afin de mieux comprendre les mécanismes régissant le cycle de vie de cet organisme et possiblement, ceux des autres viroïdes de la famille des *Avsunviroidae*.



#### 4.1.5. Objectifs spécifiques

1. Déterminer la nature et les caractéristiques du lien phosphodiester formé suite à un événement d'autoligation (chapitre 1).
2. Vérifier la possibilité que la réaction d'autoligation puisse être impliquée dans le cycle de réplication de PLMVd *in vivo* (chapitre 2).
3. Caractériser les déterminants moléculaires du viroïde et l'enzyme impliqués dans les mécanismes de reconnaissance et d'initiation de la réplication (chapitre 3).

#### 4.2. Structure secondaire des viroïdes

##### 4.2.1. Contexte

Il est généralement reconnu que les viroïdes adoptent une forte structure secondaire en forme de tige. Par contre, certains viroïdes semblent faire abstraction à cette règle, comme par exemple CChMVd et PLMVd. En effet, ceux-ci adoptent une structure secondaire plus branchée que celle observée régulièrement. Dans le cas de PLMVd, cette structure a été déterminée à l'aide de programmes informatiques (figure 5). Bien que pouvant donner de bonnes informations sur la structure générale des ARN, ces programmes ont certaines lacunes et la structure ainsi déterminée pour un ARN peut parfois varier largement de celle adoptée par celui-ci en solution. Certaines observations dans notre laboratoire laissent croire que ceci est probablement le cas pour la structure de PLMVd obtenue à l'aide de ce programme. L'identification de la structure réelle en solution d'un ARN est d'une grande

utilité puisque ceci permet de diriger correctement les expériences subséquentes et de comparer celle-ci avec d'autres ARN apparentés.

#### **4.2.2. Objectif général**

Déterminer la structure secondaire en solution de PLMVd.

#### **4.2.3. Objectifs spécifiques**

1. Vérifier la validité de la structure secondaire déterminée par programme informatique (chapitre 4).
2. Vérifier la possibilité de repliement tertiaire (chapitre 4).
3. Comparer la structure en solution avec d'autres viroïdes afin de trouver des structures conservées, ce qui suggérerait un rôle potentiel de ces structures (chapitre 4)

### **4.3. Pathogenèse des viroïdes**

#### **4.3.1. Contexte**

Les hypothèses sont nombreuses afin d'expliquer les mécanismes de pathogenèse des viroïdes. Malheureusement, aucune n'a pu être démontrée *in vivo* jusqu'à maintenant. Il est évident que la caractérisation des mécanismes de pathogenèse est de la plus grande importance, étant donné l'ampleur et l'étendue des dégâts que cet organisme occasionne. Certaines expériences ont démontré que les viroïdes ne semblaient pas coder pour aucune

protéine. Il est donc évident que la pathogenèse de ces organismes est le résultat de l'interaction de ceux-ci avec une composante de l'hôte. Le problème majeur est maintenant de déceler parmi toutes les composantes cellulaires laquelle (ou lesquelles) est (ou sont) responsable(s) des symptômes observés suite à une infection par un viroïde.

#### **4.3.2. Objectif général**

Étudier les mécanismes de pathogenèse de PLMVd.

#### **4.3.3. Objectifs spécifiques**

1. Déterminer la capacité des transcrits de PLMVd d'être utilisés comme matrice par la machinerie traductionnelle pour la production de courts peptides (chapitre 5).
2. Déterminer si PLMVd possède certaines homologues avec des ARN cellulaires connus (chapitre 5).
3. Vérifier la capacité des séquences catalytiques de PLMVd à couper un court substrat d'ARN (chapitre 5).
4. Caractériser les ARN de pêcheur susceptibles d'être la cible d'une coupure par les séquences catalytiques de PLMVd (chapitre 5).

## **RÉSULTATS**

### CHAPITRE 1:

#### **Caractérisation *in vitro* de la réaction d'auto-ligation chez PLMVd.**

##### 1.1. ARTICLE:

**Fabien Côté** et Jean-Pierre Perreault, (1997) Peach Latent Mosaic Viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by *in vitro* self-ligation.

*J. Mol. Biol.*, **273**(3), 533-543.

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

#### **Implication dans le travail**

J'ai effectué la totalité des expériences décrites dans cet article. De plus, j'ai participé activement à la rédaction de celui-ci.

## Summary

Unique among all known viroids, peach latent mosaic viroid (PLMVd) has been demonstrated *in vitro* to possess both self-cleavage and self-ligation abilities. These RNA activities have been attributed important roles in the rolling circle replication of PLMVd. Within this proposed mechanism, self-cleavage of the multimeric strands occurs via hammerhead structures producing monomers possessing 2',3'-cyclic phosphate and 5'-hydroxyl termini. In the most stable predicted secondary structure for PLMVd these two extremities are juxtaposed, a necessary condition for self-ligation to occur. In order to firmly establish the nature of the phosphodiester bond produced by self-ligation, we followed the classical procedure of complete enzymatic RNA hydrolysis coupled with thin layer chromatography fractionation. Here, we report that the self-ligation of PLMVd transcripts produces almost exclusively the 2',5' isomer (>96%). Additionally, primer extension assays revealed reverse transcriptase read through of this 2',5' linkage suggesting that it does not constitute a limit to the further replication of the viroid. Moreover, we observe this 2',5' linkage to be resistant to the nuclear intron debranching enzyme as well as preventing further viroid self-cleavage. Thus, if viroids do indeed self-ligate *in vivo*, the resulting 2',5'-phosphodiester bond may contribute to the stability of these RNA species. Finally, an analysis of both the sequence and the structural requirements for hammerhead self-cleavage and self-ligation, suggests that these two RNA processes may be interrelated. We hypothesize that the intramolecular self-ligation which produces circular conformers may contribute to the circularization step of the rolling circle replication, while the intermolecular nonenzymatic ligation is a potential mechanism for the sequence reassortment of viroids and viroid-like species.

**Keywords:** viroids; rolling circle replication; self-ligation; catalytic RNA; RNA stability

## Introduction

Viroids are small, single-stranded, circular RNAs that infect higher plants, causing diseases in crop species which result in important economic losses in agriculture (reviewed by Diener, 1993). These RNA pathogens along with the viroid-like plant satellite RNAs and the *delta* satellite RNA of the human B hepatitis (HDV), are proposed to constitute a brotherhood of small infectious circular RNAs (Branch *et al.*, 1990). They share several structural characteristics, and have been suggested to have a monophylogenetic origin (Elena *et al.*, 1991). These RNAs have been proposed to replicate in a DNA-independent manner via a rolling circle mechanism (Branch & Robertson, 1984). According to this hypothesis, these species are copied to give multimeric minus strands which are then cleaved and ligated into circular monomeric strands. From these circular monomeric minus strands, the same three steps of synthesis, cleavage and ligation are repeated in order to produce progeny of plus polarity. Alternatively, the multimeric minus strands can be directly copied into multimeric plus strands before being cleaved and circularized into progeny of plus polarity.

Several mechanisms have been proposed for the crucial ligation step which converts the linear monomeric strands into circular conformers; however, none has been confirmed *in vivo*. It has been shown that a wheat germ RNA ligase known to participate to tRNA intron splicing can circularize linear unit-length transcripts of potato spindle tuber viroid (PSTVd) (Branch & Robertson, 1984) and peach latent mosaic viroid (PLMVd) (Lafontaine *et al.*, 1995). In addition, *in vitro* experiments have demonstrated that T1 ribonuclease cleaves and circularizes PSTVd transcripts of greater than unit-length to monomeric molecules (Tsagris *et al.*, 1991; Steger *et al.*, 1992). More recently, PSTVd transcripts have been shown to be enzymatically cleaved and ligated in a nuclear extract from non-infected potato suspension cells (Baumstark & Riesner, 1995). Besides these examples of the protein catalysis of RNA ligation, the RNA itself has been proposed to be responsible for the ligation of some viroids and satellite RNAs. The circularization of the minus strand of the satellite RNA of tobacco

ringspot virus was shown to be catalyzed by its "hairpin" autocatalytic structure (Van Tol *et al.*, 1991; Feldstein & Bruening, 1993), and it has been suggested, but not yet demonstrated, that the corresponding strand of plus polarity may self-ligate at a reduced level (Prody *et al.*, 1986). Additionally, nonenzymatic self-ligation has been proposed to occur with HDV as small transcripts corresponding to the HDV sequences adjacent to the ligation site have been shown to self-ligate when juxtaposed by complementary oligonucleotides (Sharmeen *et al.*, 1988).

Recently, we have demonstrated that monomeric PLMVd transcripts of both polarities may be circularized by a mechanism of nonenzymatic self-ligation (Lafontaine *et al.*, 1995). Since the demonstration with PLMVd, PSTVd transcripts were shown to perform similar self-ligation (Baumstark *et al.*, 1997), suggesting that this mechanism can occur with most of the viroids. Previously, we have studied the kinetics of the reaction and determined both the optimal conditions and the substrate requirements of the PLMVd self-ligation (Lafontaine *et al.*, 1995). We proposed that self-ligation occurred by a mechanism involving a nucleophilic attack by the 5'-hydroxyl group on a 2',3'-cyclic phosphate group. Both of these reacting termini result from the preceding hammerhead self-cleavage. In the predicted most stable secondary structure for PLMVd, these termini are juxtaposed by the complementary strand (see Figure 7). These features were shown to be necessary and sufficient for the nonenzymatic ligation to occur. This mechanism of transesterification is enhanced by the rapid hydrolysis of the highly strained 2',3'-cyclic phosphate, thereby providing a large negative standard enthalpy change (Westheimer, 1987). The PLMVd intramolecular self-ligation produces circular conformers, and was proposed to contribute to the circularization step of the rolling circle replication of viroids. In contrast, the intermolecular nonenzymatic ligation of various PLMVd transcripts was suggested as mechanism for sequence reassortment in viroids and viroid-like species. Thus, nonenzymatic ligation may be an important chemical reaction for both the replication and the evolution of viroids and related satellite RNAs. Here, we report that the self-ligation of PLMVd primarily produces a 2',5'-

phosphodiester bond, and further analyze *in vitro* the consequences of the presence of such an unusual bond in a viroid.

## Results

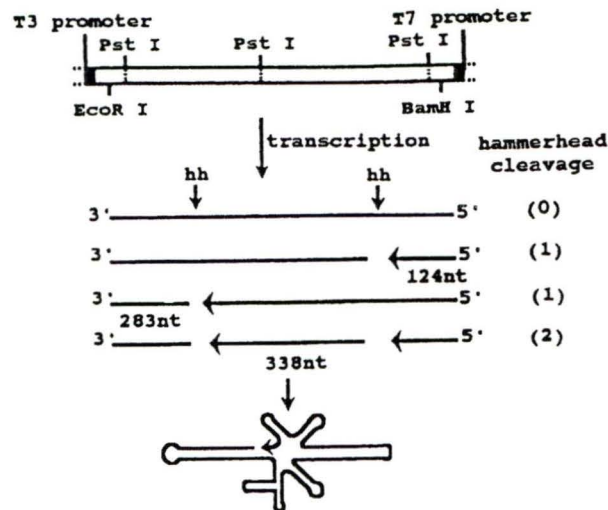
### Production of transcripts for self-ligation

The pPD1 clone used in this study possesses an insert of two tandemly repeated PLMVd sequences (Figure 7). Depending upon the restriction enzyme used (*Bam*HI or *Eco*RI) and the RNA polymerase used (T3 or T7), this construction permits the synthesis of transcripts of either plus or minus polarity (Beaudry *et al.*, 1995). During *in vitro* transcription, RNA of both polarities possessing hammerhead sequences are produced and observed to self-cleave efficiently. From a dimeric PLMVd insert, self-cleavage at both hammerhead sites produces 338 nucleotides (nt) linear monomers that harbor the 2',3'-cyclic phosphate and 5'-hydroxyl termini required for further self-ligation (Lafontaine *et al.*, 1995).

### Self-ligation produces a 2',5'-phosphodiester bond

The nature of the phosphodiester bond produced by the nonenzymatic ligation of PLMVd remains enigmatic. Based on the demonstration that the highly strained 2',3'-cyclic phosphate rapidly hydrolyzes randomly into either a 2'- or 3'-phosphate, we predicted that the 2',5' and the 3',5' isomers would be produced in similar proportions. A preliminary characterization based on the fact that reverse transcriptase can only read through 3',5'-phosphodiester bonds, and not 2',5' ones, was in agreement with this prediction (see below; Lafontaine *et al.*, 1995). In order to firmly establish the nature of the phosphodiester bond produced by self-ligation, we followed the classical procedure of complete enzymatic RNA hydrolysis coupled with thin layer chromatography (TLC) fractionation originally developed for the study of modified tRNA nucleotides (Silberklang *et al.*, 1979).





**Figure 7.** Schematic representation of the plasmid construction, minus polarity transcriptional products, and nonenzymatic intramolecular self-ligation of PLMVd. Details of the construction of the pPD1 plasmid were reported previously (Beaudry *et al.*, 1995). The number in parenthesis is the number of hammerhead (**hh**) self-cleavages required to produce the various transcripts, with the actual cleavage sites being indicated by arrows. The arrowheads on the transcripts indicate the presence of a 2'-3' phosphocyclic group at that terminus. The length in nucleotides (nt) of the cleaved fragment used in this study is indicated. The schematic is a representation of the lower energy secondary structure of the PLMVd monomeric transcripts as predicted by computer analysis. This structure was previously shown to support the intramolecular self-ligation of PLMVd (Lafontaine *et al.*, 1995).

Minus-strand, PLMVd monomer transcripts internally labelled with  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ [UMP] were synthesized, purified, and self-ligated under protein-free conditions (Figure 8). This generated  $\sim 10\%$  circular conformers possessing a retarded electrophoretic mobility (Figure 8(b)). Self-ligated transcripts were purified in order to permit their biochemical characterization. PLMVd transcripts of 283 nt that have hydroxyl groups at both termini were used as controls. The transcripts were incubated for 15 minutes in the presence of ribonuclease T2 (RNase T2) followed on two-dimensional TLC fractionation (Figure 8(c),(d)). RNase T2 specifically hydrolyzes 3',5'-phosphodiester bonds in ribonucleic acids producing 3'-monophosphate nucleotides. The radioactive phosphates were randomly introduced (see Figure 8(a)); hence, RNase T2 cleavage should release those phosphates with the upstream nucleotides. For the 283-nt transcripts, four spots of mobility corresponding to the 3'-monophosphate nucleotides were observed (Figure 8(c)). In contrast, the digestion of the self-ligated transcripts produced five spots: four 3'-monophosphate nucleotides and an additional species of mobility corresponding to a non-radioactive cytidylyl-2',5'-uridine used as migrational control (Figure 8(d)). The autoradiograms were over-exposed in order to allow for the detection of any other trace products. As shown by the radioactive spot at the origin, a short incubation did not allow for complete hydrolysis. In contrast, overnight incubation of self-ligated transcripts with the same preparation of RNase T2, which, according to the manufacturer, contains trace amounts of other ribonucleases, deoxyribonucleases, and phosphodiesterases, fully hydrolyzed the RNA into four mononucleotides (data not shown).

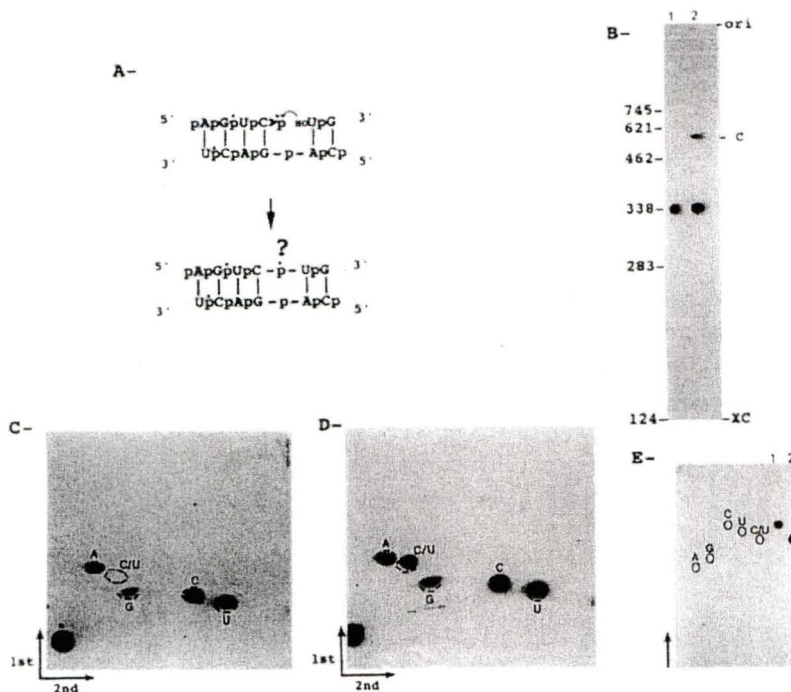
The presence of a 2',5'-phosphodiester bond formed by self-ligation receives additional support from nuclease P1 digestions. This enzyme, which specifically cleaves 3',5'-phosphodiester bonds releasing 5'-monophosphate nucleotides, produced only one spot with control linear transcripts (i.e. 5'-monophosphate uridine), and two spots with self-ligated circular molecules (i.e. 5'-monophosphate uridine and 5'-monophosphate cytidylyl-2',5'-uridine dinucleotide) (data not shown). The quantification of several TLC plates of

hydrolyzed mixtures of self-ligated circular transcripts with a PhosphorImager (Molecular Dynamic) indicated that self-ligation resulted in the formation of a 2',5'-phosphodiester bond in at least 96% of the transcripts. In fact, four experiments revealed that the proportion of 2',5' isomer was actually greater than 98%, while one yielded 96%.

In order to confirm the identity of the nucleotide linked by a 2',5'-phosphodiester bond, which should be C<sup>32</sup>pUp, we isolated the corresponding TLC spot after RNase T2 hydrolysis and recovered the radioactive molecules. This species was submitted to various hydrolysis procedures and the reaction mixtures analyzed by one-dimensional TLC (Figure 8(e)). Overnight incubation with ribonuclease T2 released radioactive cytosine (C<sup>32</sup>p, lane 1), confirming that the dinucleotide was C<sup>32</sup>pUp, because the radioactive phosphate was introduced as part of the uridine. Alkaline hydrolysis of the dinucleotide yielded the same result (data not shown). Finally, an overnight incubation in presence of nuclease P1 did not hydrolyze the phosphodiester bond (lane 2), thereby confirming that only the 2',5'-phosphodiester linked dinucleotide was present. In conclusion, these results demonstrate that the regiospecificity of the PLMVd self-ligation has a large preference for the 2',5' isomer over the 3',5' isomer.

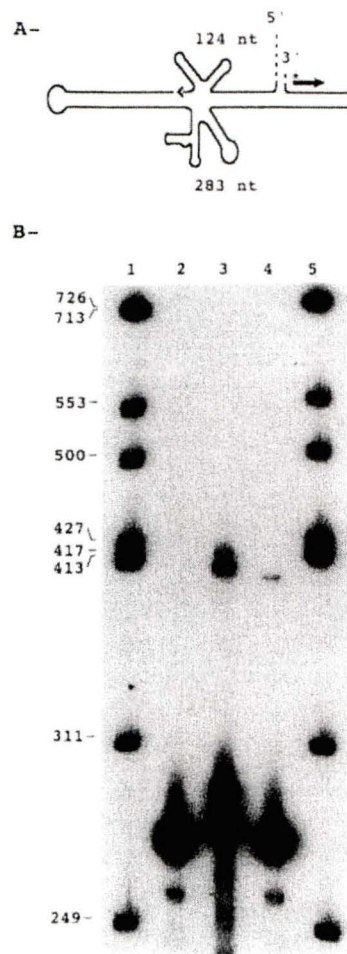
### **Reverse transcriptase read through of the 2',5'-phosphodiester bond**

In order to confirm the nature of the phosphodiester bond produced by PLMVd self-ligation, we evaluated the proportion of 2',5' and 3',5' isomers formed using the procedure developed for HDV ribo-oligonucleotide self-ligation (Sharmeen *et al.*, 1989). In essence this procedure consists of a primer extension reaction in which the self-ligation product serves as template. Under the conditions used, for reasons which are not clear, the reverse transcriptase is predicted to read through the 3',5' isomer, but not the 2',5' one. In the latter case the extension terminates either at the ligation site, or one nucleotide beyond.



**Figure 8.** Biochemical characterization of the nature of the phosphodiester bond produced by PLMVd intramolecular self-ligation. (a) Representation of the intramolecular self-ligation of PLMVd transcripts. Only the sequence and secondary structure near the self-ligation site are shown. The attack of the 5' hydroxyl group on the 2'-3'-cyclicphosphate is represented by the arrow. Stars (\*) indicate the position of the radioactive phosphates incorporated by *in vitro* transcription. (b) Autoradiogram of a 5% PAGE gel of self-ligated monomeric transcripts. Self-ligation was performed for zero and 16 hours (lanes 1 and 2, respectively). Adjacent to the gel, the positions of several PLMVd transcripts are indicated for size reference purposes. C indicates circular product. Ori and XC indicate the position of the origin and the xylene cyanol migration, respectively. (c) and (d) are autoradiograms of two-dimensional TLCs of the 283-nt transcript and the circular transcripts (produced by self-ligation) digested by RNase T2 for 15 minutes, respectively. The arrows indicate the migrational dimensions. Dashed circles represent the migration of commercial monophosphate-nucleotides and the C/U dinucleotide detected by UV shadowing. (e) Autoradiogram of a one dimensional TLC performed in order to confirm the identity of the dinucleotide produced at the self-ligation site. The dinucleotide was digested overnight either with RNase T2 or nuclease P1 (lanes 1 and 2, respectively).

The self-ligation between two minus-polarity PLMVd transcripts (i.e. 124 and 283 nt) that hybridize together was used as a model system for further primer extension assays (Figure 9(a)). The basis of the experiment is that if self-ligation does not occur, or if the reverse transcriptase cannot read through the novel phosphodiester bond, the resulting cDNA will be 273 nt in length. In contrast, if self-ligation occurs and the reverse transcriptase can read through the novel bond, the cDNA will be 397 nt in length. Allowing for the efficiencies of both self-ligation and primer extension, the ability of the reverse transcriptase to read through the novel bond can be estimated. An example of this type of assay is presented in Figure 9(b). A 5' end-labelled oligonucleotide complementary to the 3' end of the 283-nt transcripts was used as primer. Utilizing radioactive 283-nt transcripts we detected the presence of a novel 407 nt RNA species exclusively when ligation occurred (lane 3 in Figure 9(b)). In this experiment, the self-ligation efficiency was estimated to be 10%. When similar reactions were performed with unlabelled transcripts so as to permit a subsequent primer extension step, the longer cDNA was detected only in those cases where self-ligation occurred (compare lane 2 versus lanes 4 in Figure 9(b)). Both the specificity of the primer extension assay, and the efficiency of the reverse transcriptase in copying the 283-nt transcripts alone, were established (not shown). Allowing for the efficiencies of both the self-ligation and the primer extension steps, as well as for the amounts of both the 273 and 397 nt cDNAs, we estimate that the reverse transcriptase read through the phosphodiester bond formed by self-ligation approximately 60% of the time. This estimation confirmed a previous report using a different primer extension assay (Lafontaine *et al.*, 1995). The use of different oligonucleotides as primers, and of self-ligated transcripts of plus-polarity as templates, always produced a similar proportion (~50-60%) of fully elongated cDNAs (data not shown). In these assays the primer extension efficiency appeared to be dependent on the efficiency of primer annealing. Primer extension assays using reverse transcriptase from either avian myeloblastosis virus or moloney murine leukemia virus also gave similar results, albeit with different elongation efficiencies.



**Figure 9.** Primer extension assays. (a) Representation of the intermolecular self-ligation coupled with the reverse transcriptase assay. The plain line and the dashed line represent PLMVd and vectorial sequence, respectively, of both transcripts. The arrowhead at the 124-nt transcript terminus indicates the presence of a 2'-3' cyclic phosphate at this end. The primer hybridizing at the 3' end of the 283-nt nucleotide transcripts is represented by a bold arrow. The star indicates the radioactive phosphate present at the 5' end of this primer. (b) Analysis of both intermolecular self-ligation and primer extension assays. Lanes 3 is a 16 hours self-ligation performed with radioactive 283 nt transcripts. Lanes 2 and 4 are the radioactive reverse transcriptase assays performed with non-radioactive 283 nt transcripts alone and self-ligation mixture, respectively. Lanes 1 and 5 are positions of radioactive, single-stranded, DNA molecular mass markers (sizes are indicated adjacent to the gel). The samples were fractionated by 5% PAGE in the presence of 50% formamide.

The biochemical procedures described in the previous section constitute a more precise estimation of the proportion of 2',5' isomer produced by self-ligation (>96%) than the primer extension assays (~50-60%). In fact, we believe that the differences observed between the two methods indicates that the reverse transcriptase reads through approximately one-half of the 2',5'-phosphodiester bonds. This hypothesis is supported by the recent demonstration that reverse transcriptases possess the ability to read through a large proportion of 2',5'-phosphodiester bonds introduced into small, single-stranded, synthetic RNA templates (Lorsh *et al.*, 1995). This report clearly establish that the reverse transcriptase reaction terminated one nucleotide beyond the 2',5'-phosphodiester bond. Our results confirm this report, even though PLMVd is highly structured as compared to the species used in this earlier study. Model self-ligation of HDV derived small RNA molecules, which were brought into position by base pairing to a third RNA molecule, were also analyzed by primer extension (Sharmeen *et al.*, 1989). It was shown that self-ligation produced both the 2',5' and the 3',5' isomer in equal amounts. Based on our data, we propose that HDV self-ligation probably produced a majority of the 2',5' isomer, but that the primer extension analysis underestimated the proportion of this linkage.

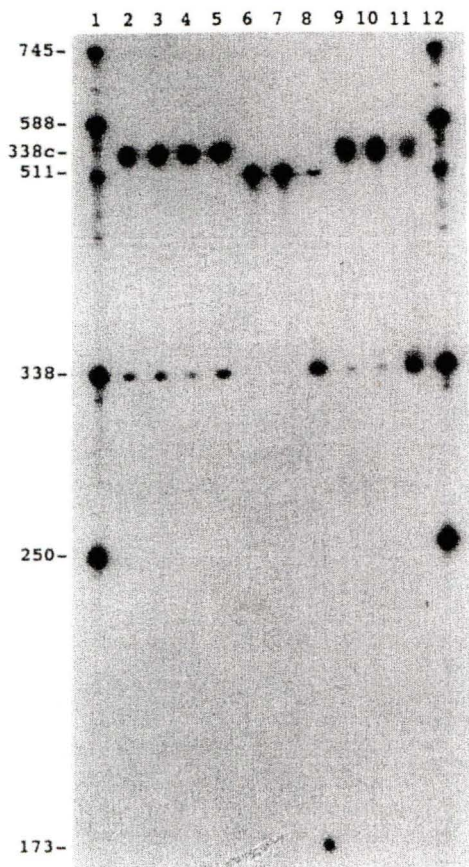
### **The 2',5'-phosphodiester bond prevents the self-cleavage of PLMVd transcripts**

The presence of a 2',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation site did not significantly reduce the ability of PLMVd transcripts to act as templates. However, it remains unknown whether the presence of such a linkage confers any advantage to the molecules. Using a minimal model system to study hammerhead ribozyme catalysis, it has been shown that the 2'-hydroxyl group of the ribose adjacent to the cleavage site is absolutely required for the reaction to occur (Perreault *et al.*, 1990). Therefore, we hypothesized that a 2',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation site could contribute to the stabilization of the circular transcripts by preventing further viroid self-cleavage. In order to

verify this hypothesis, we performed self-cleavage assays of transcripts containing either a 2'-5'- or 3'-5'-phosphodiester bond at the self-ligation site (Figure 10). Circular transcripts produced by self-ligation were snap-cooled, and then incubated in the presence of magnesium for a variety of times. At 10 and 60 minutes after the addition of the magnesium the percent increase in linear conformers was found to be 0.04 and 6%, respectively (lanes 2-5). However, it remains unclear whether the linearization resulted exclusively from hammerhead self-cleavage, or also from the nonspecific hydrolysis of phosphodiester bonds (i.e. RNA nicking). In contrast, circular PLMVd RNA synthesized via an enzymatic method (Beaudry & Perreault, 1995) so that it contains only 3',5'-phosphodiester bonds was found to efficiently self-cleave within 10 minutes after addition of the magnesium (41%; lane 11). Finally, greater than unit length, linear, PLMVd transcripts were observed to self-cleave twice as well as the circular conformer under similar conditions (88%, lanes 8), clearly indicating that circularity contributes to preventing hammerhead self-cleavage. The presence of a 2',5'-phosphodiester bond produced by self-ligation prevents further self-cleavage, thereby stabilizing the circular conformer and allowing it to adopt an alternative structure without any risk of being linearized.

We reached similar conclusions when the reaction containing a mixture of PLMVd transcripts possessing either a 2',5'- or 3',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation site were visualized by electron microscopy using a microversion of the Kleinschmidt technique under denaturing conditions (Kleinschmidt & Zhan, 1959) (data not shown). Transcripts containing a 3',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation site were retrieved mostly as linear, single-stranded molecules. In contrast, the transcripts with a 2',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation site were found to be primarily circular, single-stranded RNA structures. In the latter case, we also observed that about 5% of the molecules adopted a structure reminiscent of a magnifying-glass, more specifically a double-



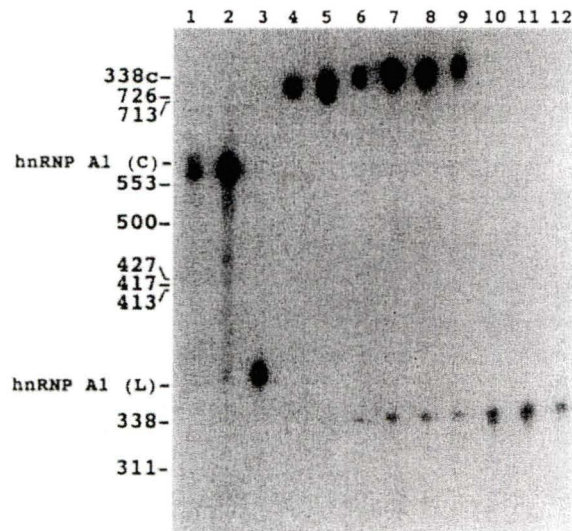


**Figure 10.** Self-cleavage assays analyzed by 5% PAGE. Lanes 2 to 5 are assays with circular transcripts produced by self-ligation; in lanes 2 and 3 the samples were incubated for 0 and 10 minutes without  $MgCl_2$  and prior heat denaturation-renaturation, while in lanes 4 and 5 the heat denaturation-renaturation was performed and  $MgCl_2$  then added prior to incubation for 10 and 60 minutes, respectively. Lane 6-8 are assays performed with linear 511-nt PLMVd transcripts of plus polarity, with the conditions being similar to those described for lanes 2-4, respectively. Lanes 9-11 are self-cleavage assays of circular PLMVd transcripts prepared enzymatically (i.e. including a 3',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation site), with the reaction conditions as described for lanes 2-4. Finally, lanes 1 and 12 are RNA molecular weight markers whose sizes are indicated on the left. The position of the monomeric circular PLMVd transcripts is indicated by 338c.

stranded domain (~100 nt) followed by a circular single-stranded domain (~225 nt). We did not observe any free extremities in this structure, suggesting that it is an alternative structure due to incompletely denatured circular molecules. This original structure supports the hypothesis that PLMVd transcripts harboring a 2',5'-phosphodiester bond can adopt alternative conformations without self-cleaving.

### **The 2',5'-phosphodiester bond is resistant to the intron debranching enzyme**

If a 2'-5' phosphodiester bond has a role to play in viroid stability, it is important that this linkage cannot be altered or cleaved by host enzymes, especially the intron debranching enzyme that specifically recognizes and subsequently cleaves 2'-5' phosphodiester bonds. In order to evaluate such a possibility, we incubated both circular or linear PLMVd transcripts, or an intron from the heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1), with a S100 soluble extract from isolated nuclei (Figure 11). Under these conditions, lariat introns from hnRNP A1 transcripts were efficiently debranched (lanes 1-3). In contrast, circular PLMVd transcripts produced either by self-ligation (lanes 4-6), or by our enzymatic procedure so as to include only 3',5'-phosphodiester bonds (lanes 7-9), as well as linear 338-nt transcripts (lanes 10-12), were not altered by the debranching activity of the proteic extract. Again we observed that both the circular and linear PLMVd transcripts with a 3',5' linkage at the self-cleavage/self-ligation site were more susceptible to self-cleavage during the incubation. Thus, the viroid 2',5'-phosphodiester bond produced by self-ligation is resistant to the debranching enzyme. This type of a resistance has been reported for a 2',5'-phosphodiester bond introduced into synthetic ribonucleic acids (Ruskin & Green, 1985; Arenas & Hurwitz, 1987). The debranching enzyme was proposed to recognize a junction composed of three strands, one of which is linked by a 2',5'-phosphodiester bond. Our results indicate that any other ribonuclease activity present in the proteic extract was sufficient to hydrolyze the RNA molecules present, although this does not exclude the possibility that other cellular nucleases can specifically degrade a 2',5'-linkage.



**Figure 11.** Autoradiogram of the debranching intron enzyme assays. hnRNP A1 introns (lane 1-3), circular PLMVd transcripts produced by either self-ligation (lane 4-6) or enzymically synthesis (7-9), and monomeric linear PLMVd transcripts were not incubated (lanes 1,4,7,10), or were incubated for 1 hour either in absence (lanes 2, 5, 8, 11) or in presence (lanes 3, 6, 9, 12) of an S100 nuclear extract. Adjacent to the gel the positions of several PLMVd transcripts are indicated as molecular weight markers.

## Discussion

### Regiospecificity and efficiency of PLMVd self-ligation

Previously, we reported the original finding that transcripts of sequence corresponding to PLMVd have the ability to self-ligate (Lafontaine *et al.*, 1995). Here, we report the nature of the phosphodiester bond formed by this nonenzymatic self-ligation, and further characterize its properties. PLMVd self-ligation produces primarily 2',5'-phosphodiester bonds (>96%). Even allowing for any imprecision in the quantification of the different TLC spots in the assay, the predominance of the 2',5' versus 3',5' isomer was unequivocal. This regiospecificity is in agreement with previous reports of the nonenzymatic, template-directed condensation of nucleotides and oligonucleotides (Renz *et al.*, 1971; Usher & McHale, 1976). For example, the nonenzymatic joining of both adenosine and short poly (A) oligonucleotides, which harbor 2',3'-cyclic phosphate groups, on poly (U) templates were shown to yield at least 97% of 2',5' isomer (Renz *et al.*, 1971; Usher & McHale, 1976). It has been suggested that the almost complete absence of the 3',5' isomer can be attributed to the intrinsic lack of activity of the 3'-hydroxyl group. Moreover, the orientation of the RNA helix favors the formation of the 2',5'-isomer; thus, factors which alter the relative orientation of template-bound reactants may influence both the efficiency and regiospecificity of the condensation.

The self-ligation reaction that we characterized involved a 2',3'-phosphocyclic cytosine and a 5'-hydroxyl uridine as reactants juxtaposed by a template. We propose that the most likely reaction mechanism involves a nucleophilic attack of the 5'-hydroxyl group on the phosphate of the 2',3'-cyclic phosphate resulting in the formation of a new phosphodiester bond. A 6 hour self-ligation reaction was found to produce ~10% circular conformers. Subsequent heat denaturation and slow renaturation of the transcripts so to favor folding into the most stable secondary structure was not observed to increase the percentage of circular products (P. Marquis & J.-P. Perreault, unpublished data). These results suggest

that under the *in vitro* reaction conditions used only a small proportion of the 2',3'-cyclic phosphates present act as reactants for the production of phosphodiester bonds, while the majority are simply hydrolyzed into either 2' or 3'-phosphate groups. *In vivo* it is possible that a cofactor, such as a protein, contributes to the enhancement of the self-ligation reaction. To date, no 2',5'-phosphodiester bond has been characterized in viroids and related satellite RNAs isolated from infected plants, although the presence of a 2',5'-phosphodiester linkage was not specifically investigated.

The presence of 2',5'-phosphodiester bonds is not restricted to the *in vitro* self-ligation of viroids. For example, the branched RNA strands in both introns and multicopy single stranded linear DNA (msDNA) involve a 2',5' phosphodiester bond. In these examples the formation of the 2',5'-phosphodiester bond occurs at a site where a 3',5'-phosphodiester bond is already present. Moreover, an RNA ligase that catalyzes the formation of a 2',5'-phosphodiester bond was purified from *Escherichia coli* and shown to have the ability to ligate tRNA half-molecules, although the natural substrates of this enzyme remain unidentified (Arn & Abelson, 1996). In addition, the occurrence of 2',5'-oligoadenylates in both eukaryotes and prokaryotes has been reported (Trujillo et al., 1987). Even if 2',5' phosphodiester bonds are frequently qualified as being unnatural and a remnant of a prebiotic chemistry, they are represented in nature today and are important biologically.

### **2',5'-phosphodiester bonds in viroids and related satellite RNAs**

It has been suggested that the intramolecular self-ligation of viroids yielding circular conformers could contribute to the circularization step of rolling circle replication, while the intermolecular nonenzymatic ligation is a potential mechanism for the sequence reassortment of viroids and viroid-like species (Robertson, 1992). In order for this hypothesis to be valid, the presence of a 2',5'-phosphodiester bond in these species of RNA must not be a limitation to further replication; rather, these molecules should conserve their ability to act as templates even through this condition is *sine quo num*. Primer extension assays have shown that the

presence of a 2',5'-phosphodiester bond in templates does not necessarily interrupt the reverse transcriptase elongation; in fact approximately one-half of the synthesized cDNAs are extended beyond the self-ligation site. Thus, the presence of such a linkage does not constitute an important obstacle to polymerase progression, rather the template ability of these species is conserved. The reduced potential of these molecules to act as templates is probably compensated by the important gain in stability conferred by the 2',5' linkage. This observation supports the idea that self-ligation is a mechanism involved in both the replication and the evolutionary processes of viroids and related satellite RNAs. Regardless of whether or not self-ligation and self-cleavage occur *in vivo*, the only crucial host component for PLMVd replication, and maybe for the replication of related RNA species, is a polymerase, thereby making its rolling circle replication largely an RNA-based mechanism (Bussi ere *et al.*, 1995).

Depending on the RNA species, the cleavage step of the rolling circle replication is either catalyzed by a host endoribonuclease, or involves RNA self-cleavage. Viroid-like plant satellite RNAs, HDV and two viroids (avocado sunblotch viroid and PLMVd) undergo specific self-cleavage via autocatalytic "hammerhead", "hairpin" or "delta" structures (Symons, 1992). In contrast, several mechanisms including protein catalysis and RNA self-ligation have been proposed for the ligation step, but none has yet been confirmed *in vivo* (revised in the Introduction). For PLMVd, the most stable predicted secondary structures of strands of both polarities include double-stranded helices in which both termini are juxtaposed. We predicted, using computer modelling the most likely stable, secondary structures of each of the known self-cleaving strands of viroids and related RNA (i.e. viroid-like plants satellites RNA and HDV). In general the most, or one of the ten most, stable structures (i.e. less than 5% of difference in term of free energy) localized the self-ligation site into a double-stranded helix (data not shown). This result confirms that the structural requirements for self-ligation are respected in all RNA strands known to self-ligate. Only the minus strands of the satellite RNA of the arabis mosaic virus, the chicory yellow mottle virus

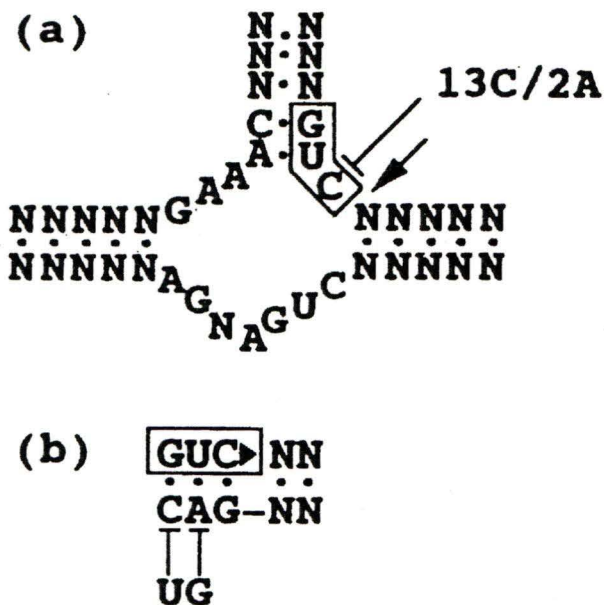
and the tobacco ringspot virus do not fold into a structure propitious for self-ligation (i.e. the termini were located in a single-stranded region). However, unlike the other RNA species, these three self-cleave by a "hairpin" structure in which the catalytic domain has been shown to catalyze both the cleavage and ligation reactions (Van Tol *et al.*, 1991; Feldstein & Bruening, 1993; Berzal-Herranz *et al.*, 1992). In contrast, hammerhead structures largely favor cleavage over ligation (Hertel & Ulhenbeck, 1995). Therefore, hammerhead self-cleaving strands may require an alternative mechanism of nonenzymatic self-ligation for circularization of the RNA species, as we have shown to occur with PLMVd transcripts.

### **Self-cleavage and self-ligation dependency**

The hammerhead structure is responsible for the self-cleavage in most self-cleaving viroids and related RNAs. This domain consists of three helices and a catalytic center formed by highly conserved nucleotides (see Figure 12). Co-variations of hammerhead base paired nucleotides occurs between RNA species, as well as between variants of the same species, suggesting a selective pressure in favor of the self-cleavage activity (Bussière *et al.*, 1996; Hernandez & Flores, 1992). A compilation of the natural hammerhead sequences shows that the triplet adjacent to the self-cleavage site is a GUC in 13 cases, while GUA is found in only two instances. In addition, an AUA triplet is present at that position in the plus polarity strands of barley yellow dwarf virus satellite RNA, a species in which this hammerhead motif includes an unusual pseudoknot structure whose contribution to the mechanism remains unclear (Miller *et al.*, 1991). With the exception of the latter case, all hammerhead structures include two first nucleotides that are always base paired, and a third located adjacent to the cleavage site, that is not. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction have been studied with a minimal model structure (Ruffner *et al.*, 1990). The first base pair (GC) can be replaced by UA or AU and efficient self-cleavage is conserved. The identity of the second base pair (UA) appears to be essential for efficient self-cleavage, indicating a contribution to the catalytic mechanism. Finally, the single-stranded C can be

replaced by an A without a significant decrease in activity. However, substitution by either a G or a U drastically decreases self-cleavage. These data from a model system only partly explain the naturally occurring sequence variations. For example, it is clear that the selection pressure is strong in favor of a U at the second position of the triplet. In contrast, the possibility of having different base-pairs at the first position of the triplet, and of having an A or G at the cleavage site, are not reflected in nature. With the high mutation rates observed in these species, these results are unexpected. In contrast to self-cleavage, the self-ligation reaction has minimal sequence and structural requirements. Specifically, all that is required is a complementary strand that juxtaposes both of the reacting termini (Figure 12(b)). If self-ligation does indeed occur *in vivo*, we believe that C is favored over A 13:2 at the third position because the resulting GC base pair is more stable than an AU base pair, and that this yields a more efficient self-ligation. The preference for G at the first position of the triplet may be due to its contribution to the stabilization of the self-ligation helix, even though A and U have been shown to be efficient for self-cleavage. In contrast, the selection pressure on the second nucleotide is strictly from the requirements for the self-cleavage mechanism to be efficient. It is important to note that in general the helix supporting self-ligation is relatively small; hence, the more stable it is (i.e., the preference for GC base pairs) the more likely self-ligation is. Following such a rationale, self-cleavage and self-ligation appear dependent on each other for their sequence requirements. Either the naturally occurring sequences surrounding the ligation site support a mechanism of self-ligation, or self-ligation activity contributes a selective pressure on the sequence including the highly conserved GUC triplet of the hammerhead domain.





**Figure 12.** Schematic representation of the sequence and secondary structure requirements for hammerhead self-cleavage (a) and self-ligation (b). Only highly conserved nucleotides are defined. For the hammerhead structure, the natural nucleotide variants of the GUC triplet (boxed), and their frequency of occurrence, are indicated. For the self-ligation structure, the possible nucleotide variants that can effectively base pair with the GUC triplet are shown.

### **2',5'-phosphodiester bonds and viroid stability**

In addition to showing that the 2',5'-phosphodiester bond produced by self-ligation is not an obstacle to further replication, we have shown that it is not specifically hydrolyzed by the intron debranching enzyme. We believe that the self-ligated bond was not recognized by this enzyme because it is not part of a three-strand junction as is found in introns. Searching to see if such a 2',5' linkage provided any advantages to the circular species, we demonstrated that it prevents further self-cleavage when the RNA strand is incubated under conditions allowing this reaction. Thus, the presence of a 2',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation allows the viroid to adopt alternative conformations comparable to the rod-like most stable structure without becoming linear. In effect, this novel bond acts as a padlock protecting the integrity of the circular RNA, a significant advantage for viroid.

Based on their self-cleavage ability, it has been suggested that viroids and related satellite RNAs could induce host pathogenesis by expressing this catalytic property in *trans* in order to cleave cellular RNA in a manner reminiscent of ribozymes. This hypothesis has not as yet received any support from physical experiments, partly because viroid-like transcripts made completely of 3',5'-phosphodiester bonds will favor intramolecular self-cleavage over the intermolecular reaction. We have demonstrated that the self-ligated circular transcripts lose their ability to self-cleave. By analogy to the *trans* model hammerhead structure, production of a 2',5'-phosphodiester bond by self-ligation modified the substrate portion of the viroid, while the catalytic core remained unchanged. We postulate that regardless of whether self-ligated viroids can fold so as to allow for the formation of the hammerhead catalytic core, it is possible that they cleave RNA substrates in *trans*. If such a mechanism occurs, the presence of a 2',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage/self-ligation would have a key role in both viroid integrity and pathogenesis. Considering that self-cleaving viroids are very old, perhaps even a relic of a precellular World, the fact that self-ligation can still occur today via the same mechanism as in ancient times suggests that it has been positively selected for.

## Materials and Methods

### *In vitro* transcription and purification of PLMVd RNA

The synthesis and purification of all of the linear transcripts used was as described previously (Beaudry *et al.*, 1995). Briefly, *in vitro* transcriptions were performed using plasmid pPD1 construction as template. This construction possesses two tandemly repeated PLMVd sequences cloned into the *Pst* I restriction site of pBluescript II KS (+/-) (cf. Figure 1). The insert is flanked by T3 and T7 promoters for the production of plus and minus polarity transcripts, respectively. For random internal labelling, 50  $\mu$ Ci of  $\alpha$ -<sup>32</sup>P[UTP] (3000 Ci/ mmol, Amersham) were added to the transcription reaction. After transcription, DNase (RNase free) treatment, and precipitation of nucleic acids, 0.5 vol. of stop buffer (0.3% each of bromophenol blue and xylene cyanol, 10 mM EDTA, pH 7.5, 97.5% deionized formamide) were added to the resuspended transcript solutions, and the resulting mixtures denatured for 2 minutes at 65°C prior to electrophoresis through a 5% polyacrylamide gel (PAGE) in 100 mM Tris-borate, pH 8.3, 1 mM EDTA, 7M urea buffer. Transcripts were detected by UV shadowing, excised, eluted, precipitated, purified by passage through Sephadex G-50 spin columns (Pharmacia), lyophilized and conserved at -70°C. Circular PLMVd transcripts, which include exclusively 3',5'-phosphodiester bonds, were synthesized as described (Beaudry and Perreault, 1995).

### Self-ligations

The intramolecular self-ligation of unit-length PLMVd transcripts (338 nt, ~500 000 c.p.m) resuspended in ultrapure water was performed by adding concentrated reaction buffer to a final concentration of 20 mM Tris-HCl pH 7.9 / 100 mM MgCl<sub>2</sub> in a final volume of 15  $\mu$ l (Lafontaine *et al.*, 1995). The samples were then incubated for 6 to 12 hours at 16°C. The ensuing radioactive transcripts were ethanol precipitated and washed, prior to lyophilization. The resulting pellets were either stored at -70°C for subsequent analysis, or resuspended in a

small volume of 10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 1 mM EDTA solution and analyzed by 5% PAGE. The intermolecular reactions were performed with 1  $\mu$ g of non-radioactive 124-nt transcripts incubated with either ~ 500 000 c.p.m. of radioactive or 1  $\mu$ g of non-radioactive transcripts of 283 nt. Both the 124- and 283-nt transcripts are of minus polarity, and were produced by self-cleavage during *in vitro* transcription (c.f. Figure 7). Both transcripts were incubated together under the self-ligation conditions described above, and then ethanol precipitated and either conserved for further analysis, or purified by 5% PAGE.

### **RNase digestion and analysis by thin layer chromatography**

The purified circular, radioactive, 338-nt transcripts produced by self-ligation were resuspended in 10 ml of either 150 mM ammonium acetate pH 5.3 containing 2 mg of nuclease P1 (Boehringer Mannheim), or 10 mM sodium acetate pH 4.5 containing 0.5 unit RNase T2 (Gibco BRL), and then incubated for either 15 minutes or overnight (~12 hr) at 37°C. After the reaction, the samples were analyzed by two-dimensional TLC on cellulose plates with UV indicator (Mandell) according to the solvent system described previously (Silberklang, 1979). Non-radioactive mononucleotides and dinucleotides were purchased (Sigma), and were also fractionated. The resulting dried plates were analyzed by both UV shadowing and autoradiography, and the spots quantified with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). The radioactive spot corresponding to the dinucleotide was recovered according to the procedure of Houssier *et al.* (1988). Dinucleotides were digested with either nuclease P1 or RNase T2 under the conditions described above, or by alkaline hydrolysis. The resulting samples were analyzed on PEI-cellulose with UV indicator (Mandell) in accordance to the solvent system described previously (Yang *et al.*, 1995).

### **Primer extension assays**

Non-radioactive transcript mixtures from intermolecular self-ligations were analyzed by primer extension assays. In the example illustrated in figure 9, the oligonucleotide primer

(5' GTTCCCGATAGAAAGGC 3') was complementary to a sequence near the 3' end of the 283-nt transcript (cf. Figure 9). The oligonucleotide had been previously labelled by polynucleotide kinase treatment in the presence of  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ [ATP] (3000 Ci/ mmol, Amersham) as recommended by the enzyme's manufacturer (Pharmacia Biotech). Equimolar amounts (10 pmol) of 5' end labelled primer and transcript mixture were resuspended together in a solution of 100 mM Tris-HCl pH 8.3 in a final volume of 4.5  $\mu\text{l}$ . The mixtures were heated at 80°C for 2 minutes, incubated 55°C for 3 minutes and then kept on ice for 5 minutes. The samples were then incubated for 2 hours at 37°C in the presence of 0.3 mM of each dNTP (Pharmacia Biotech), 1X AMV reverse transcriptase extension buffer (Boehringer Mannheim), 0.125 mM actinomycin, 2.5 mM  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 30 units RNA guard (Pharmacia Biotech) and 200 units of SuperScript reverse transcriptase (Gibco BRL) in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ . After the incubation 40  $\mu\text{l}$  of 10mM Tris-HCl / 1mM EDTA pH 8,0 and 1  $\mu\text{l}$  each of glycogen (20 mg/ml; Boehringer Mannheim) and phenol saturated with 10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 1 mM EDTA were added and the nucleic acids ethanol precipitated, ethanol washed and lyophilized. The resulting pellet was resuspended in stop buffer and analyzed by 5% PAGE through a gel containing 50% formamide.

### **Self-cleavage assays**

Various purified transcripts, both subjected and not subjected to a preliminary self-ligation step were tested for self-cleavage ability. These transcripts (~3000 c.p.m.) were resuspended in a volume of 9  $\mu\text{l}$  of 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA pH 8,0 and then heated at 90°C for 1 minute prior to snap-cooling on ice for 1 minute so as to favor the adoption of the hammerhead structure. Self-cleavage of the transcripts was initiated by adding 1  $\mu\text{l}$  of 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , and the reaction incubated at 37°C for different times. The reactions were stopped by the addition of 0.5 vol. stop buffer, kept on ice, denaturated for 2 min at 65°C, and finally purified on 5% PAGE gels.

**Incubation of transcripts with S100 nuclear extract**

Both circular and linear transcripts possessing either 2',5'- or 3',5'- phosphodiester bonds at the self-cleavage/self-ligation site were produced as described above. The lariat introns between exon 7 and 7b of hnRNP A1 transcripts and S100 nuclear extract were kindly provided by S. Hutchison and B. Chabot (Université de Sherbrooke). Both the splicing reaction and the preparation of the nuclear extract, which possesses the intron debranching enzyme, were performed as described previously (Krainer *et al.*, 1984; Dignam *et al.*, 1983). Briefly, transcripts (~250 c.p.m.) were incubated for 1 hour at 37°C with 10  $\mu$ l of nuclear extract in a final volume of 25  $\mu$ l containing 10 mM Hepes-NaOH pH 7.9, 50 mM KCl, 10% glycerol, 8 mM EDTA, 0.25 mM PMSF and 0.25 mM DTT. The reactions were stopped by phenol-chloroform extraction (0.5 vol./ 0.5 vol.), and the ribonucleic acids ethanol precipitated, ethanol washed, lyophilized and fractionated on 5% PAGE gels.

## **Acknowledgements**

We are grateful to Dr. B. Chabot and S. Hutchison for providing both hnRNP AI intron and S100 nuclear extract, and to F. Bussière for computer assistance with the secondary structure predictions. This work was sponsored by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and by a scientific team grant from Fonds pour la Formation de chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR, Québec). F.C. was the recipient of a predoctoral fellowship from the Université de Sherbrooke, and J.-P.P. was a scholar of the Medical Research Council (MRC, Canada).

## References

- Arenas, J. & Hurwitz, J. (1987). Purification of a RNA debranching activity from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **262**, 4274-4279.
- Arn, E. A. & Abelson, J. N. (1996). The 2'-5' RNA ligase of *Escherichia coli*. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **271**, 31145-31153.
- 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. *Nucl. Acids Res.* **23**, 4246-4254.
- Baumstark, T., Schröder, A. R. W. & Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.* **16**, p.599-610.
- Beaudry, D. & Perreault, J.-P. (1995). An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules. *Nucl. Acids Res.* **23**, 3064-3066.
- Beaudry, D., Bussière, F., Lareau, F., Lessard, C. & Perreault, J.-P. (1995). The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucl. Acids Res.* **23**, 745-752.
- Berzal-Herranz, A., Joseph, S. & Burke, J. M. (1992). In vitro selection of active hairpin ribozymes by sequential RNA-catalyzed cleavage and ligation reactions. *Genes & Dev.* **6**, 129-134.
- Branch, A. D. & Robertson, H. D. (1982). Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. *Science* **217**, 1147-1149.
- Branch, A. D. & Robertson, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450-455.
- Branch, A. D., Levine, B. J. & Robertson, H. D. (1990) The brotherhood of the small RNA circular pathogens. *Seminar in Virol.* **1**, 143-152.



- Bussière, F., Lafontaine, D., Côté, F., Beaudry, D. & Perreault, J.-P. (1995). Evidence for a model ancestral viroid. *Nucl. Acids Symp. Ser.* **33**, 143-144.
- Bussière, F., Lafontaine, D. & Perreault, J.-P. (1996). Compilation and analysis of viroid and viroid-like RNA sequences. *Nucl. Acids Res.* **24**, 1793-1798.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nucleic. *Nucl. Acids Res.* **11**, 1475-1488.
- Elena, S. F., Dopazo, J., Flores, R., Diener, T. O. & Moya, A. (1991) Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis  $\delta$  virus RNA. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 5631-5634.
- Feldstein, P. A. & Bruening, G. (1993). Catalytically active geometry in the reversible circularization of "mini-monomer" RNAs derived from the complementary strand of tobacco ringspot virus satellite RNA. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1991-1998.
- 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.
- Hertel, K. J. & Ulhenbeck, O. C. (1995). The internal equilibrium of the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry* **34**, 1744-1749.
- Houssier, C., Degee, P., Nicoghosian, K. & Grosjean, H. (1988). Effect of uridine dethiolation in the anticodon triplet of tRNA(Glu) on its association with tRNA(Phe). *J. Biomolecular Struc. & Dynam.* **5**, 1259-1266.
- Kleinschmidt, A. K. & Zhan, R. K. (1959). Ueber desoxyribonucleins ure-molekelin in protein-mischfilmen. *Z. Naturforsch.* **14b**, 770-779.
- Krainer, A. R., Maniatis, T., Ruskin, B. & Green, M. R. (1984). Normal and mutant human  $\beta$ -globin pre-mRNAs are faithfully and efficiently spliced *in vitro*. *Cell* **36**, 993-1005.

- Lafontaine, D., Beaudry, D., Marquis, P. & Perreault, J.-P. (1995). Intra- and intermolecular nonenzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology* **212**, 705-709.
- Lorsch, J. R., Bartel, D. P. & Szostak, J. W. (1995). Reverse transcriptase reads through a 2'-5' linkage and a 2'-thiophosphate in a template. *Nucl. Acids Res.* **23**, 2811-2814.
- Miller, W. A., Hercus, T., Waterhouse, P. M. & Gerlach, W. L. (1991). A satellite RNA of barley yellow dwarf virus contains a novel hammerhead structure in the self-cleavage domain. *Virology* **183**, 711-720.
- Nishimura, S. (1979). Chromatographic mobilities of modified nucleotides, In: *Transfer RNA, structure, properties, and recognition*. (Schimmel PR, Söll D, Abelson JN, eds) pp. 547-552, Cold Spring Harbor Lab, New York.
- Perreault, J.-P., Wu, T., Cousineau, B., Ogilvie, K. K. & Cedergren, R. (1990). Mixed deoxyribo- and ribo-oligonucleotides with catalytic activity. *Nature* **344**, 565-567.
- Prody, G. A., Bakos, J. T., Buzayan, J. M., Schneider, I. R. & Bruening, G. (1986). Autocatalytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* **231**, 1577-1580.
- Renz, M., Lohrmann, R. & Orgel, L. E. (1971). Catalysis for the polymerization of adenosine cyclic 2',3'-phosphate on a poly (U) template. *Biochim. Biophys. Acta* **240**, 463-471.
- Robertson, H. D. (1992). Replication and evolution of viroid-like pathogens. *Curr. Topic Microb. Imm.* **176**, 213-219.
- Ruffner, D. E., Stormo, G. D. & Uhlenbeck, O. C. (1990). Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* **29**, 10695-10702.
- Ruskin, B. & Green, M. R. (1985). An RNA processing activity that debranches RNA lariats. *Science* **229**, 135-140.
- Sharmeen, L., Kuo, M. Y.-P. & Taylor, J. (1989). Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **63**, 1428-1430.

- Silberklang, M., Gillum, A. M. & RajBhandary, U. L. (1979). Use of *in vitro* <sup>32</sup>P labeling in the sequence analysis of non-radioactive tRNAs. In *Methods in Enzymology* (Grosman, L., Moldave, K., ed.), pp.58-109, Academic Press, New York.
- Steger, G., Baumstark, T., Mörchen, M., Tabler, M., Tsagris, M., Sängler, H. L. and Riesner D. (1992) Structural requirements for viroid processing by RNase T1. *J. Mol. Biol.* **227**, 719-737.
- Symons, R. H. (1992). Small catalytic RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 641-671.
- Trujillo, M A., Roux, D., Fueri, J. P., Samuel, D., Cailla, H. L. & Rickenberg, H. V. (1987). *Eur. J. Biochem.* **169**, 167-173.
- Tsagris, M., Tabler, M. & Sängler H. L. (1991). Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation. *Nucl. Acids Res.* **19**, 1605-1612.
- Usher, D. A. & McHale, A. H. (1976). Nonenzymic joining of oligoadenylates on a polyuridylic acid template. *Science* **192**, 53-54.
- Van Tol, H., Buzayan, J. M. & Bruening, G. (1991). Evidence for spontaneous circle formation in the replication of the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Virology* **180**, 23-30.
- Westheimer, F. H. (1987). Why nature chose phosphates. *Science* **235**, 1173-1178.
- Yang, J. H., Sklar, P., Axel, R. & Maniatis, T. (1995). Editing of glutamate receptor subunit B pre-mRNA in vitro by site-specific deamination of adenosine. *Nature* **374**, 77-81.

## Description du travail

Cette étude avait comme but principal de déterminer la nature du lien phosphodiester produit suite à un événement d'auto-ligation chez PLMVd. Certaines études préliminaires suggéraient la possibilité que cette réaction puisse générer un lien phosphodiester de type 2',5' plutôt que la liaison classique de type 3',5'. À l'aide de la technique de digestion à la RNase et de chromatographie sur couche mince en 2 dimensions, ces résultats démontrent que la réaction d'auto-ligation de PLMVd génère majoritairement une liaison de type 2',5' (c.-a.d. >95%). De plus, nous avons démontré que la formation de ce type de lien phosphodiester empêchait une réaction d'autocoupure subséquente par le motif en tête de marteau, bloquant ainsi le viroïde dans sa forme circulaire. Il a été suggéré que ceci était probablement un mécanisme utilisé par le viroïde pour se protéger contre la dégradation par les nucléases cellulaires, puisque sous cette conformation il n'y a pas d'extrémité disponible pour les exonucléases. Fait intéressant, la liaison 2',5' présente au site d'autocoupure/auto-ligation est résistante à l'action de l'enzyme de débranchement, qui est connue pour cliver le lien 2',5' au site de branchement des introns en lasso. Finalement, des résultats d'élongation d'amorce suggèrent que la présence de ce type de liaison n'est pas une entrave à la viabilité répliationnelle du viroïde puisque celle-ci peut être lue par une polymérase.

## CHAPITRE 2:

**Implication *in vivo* de la réaction d'auto-ligation  
dans le mécanisme de réplication de PLMVd.**

## 2.1. ARTICLE:

Côté, F., Lévesque, D., Perreault, J.P. (2000) Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. Sous presse, *J. Virol.*

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

**Implication dans le travail**

J'ai effectué la très grande majorité des expériences décrites dans cet article et j'ai contribué activement à sa rédaction. D. Lévesque a repris les essais de digestion aux nucléases et a performé certains contrôle.

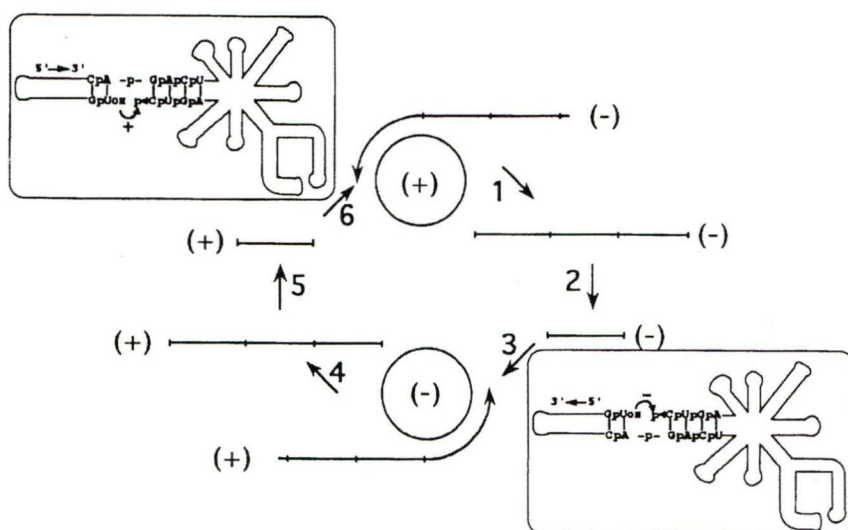
## ABSTRACT

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) is a circular RNA pathogen that replicates in a DNA-independent fashion via a rolling-circle mechanism. PLMVd has been shown to self-ligate *in vitro* primarily via the formation of 2',5'-phosphodiester bonds; however, *in vivo* the occurrence and necessity of this non-enzymatic mechanism are not evident. Here, we unequivocally report the presence of 2',5'-phosphodiester bonds at the ligation site of circular PLMVd strands isolated from infected peach leaves. These bonds serve to close the linear conformers, yielding circular ones. Furthermore, these bonds are shown to stabilize the replicational circular templates, resulting in a significant advantage in terms of viroid viability. Although the mechanism responsible for the formation of these 2',5'-phosphodiester bonds remains to be elucidated, a hypothesis describing an *in vivo* non-enzymatic self-ligation is proposed. Most significantly, our results clearly show that 2',5'-phosphodiester bonds are still present in nature, and that they are of biological importance.

## INTRODUCTION

Viroids are the smallest nucleic acid-based pathogens known to date (see references 15 and 33 for reviews). They are small (~300 nucleotides), single-stranded, circular RNAs that infect higher plants and cause significant losses in agriculture. Viroids have been classified in two groups (A and B) based primarily on whether or not they possess the five typical structural domains found in the group B viroids. Further division among the 27 group B members depends on the sequence and length of the conserved central regions (7, 14, 33). Viroids that do not possess any kind of sequence or structural similarity with group B viroids have been classified as belonging to group A. The latter group includes the avocado sunblotch viroid (ASBVd), the peach latent mosaic viroid (PLMVd), and the chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) (7, 15). All the group A viroids possess hammerhead self-cleaving motifs, and are proposed to replicate in chloroplasts (8, 11, 23). This localization has received recent support from the identification of a chloroplastic RNA polymerase that has the ability to replicate ASBVd (26). In contrast, group B viroids are localized in the nucleus, and RNA polymerase II appears to be responsible for their replication (4, 18, 31).

In infected cells viroids replicate in a DNA-independent manner via a rolling circle mechanism that follows either a symmetric or an asymmetric mode (6, 8, 33, 36). The replicational intermediates of PLMVd, a group A viroid of 338 nucleotides that is the causal agent of peach latent mosaic disease (19), were recently studied by Northern blot analysis (8). PLMVd has been shown to replicate in a symmetric mode involving the accumulation of both circular and linear monomeric strands of both polarities (see Fig. 13). No multimeric conformer was detected, indicating that both strands self-cleave efficiently via their hammerhead sequences. Moreover, it has been observed that monomeric linear RNAs accumulate at a high level as compared to the circular conformers (8). The latter observation might be the result of a rather inefficient ligation step (i.e. circularization).



**FIG. 13.** PLMVd rolling-circle replication. The polymerization, hammerhead mediated self-cleavage and ligation steps are numbered 1-4, 2-5 and 3-6, respectively. The polarities of the strands are indicated in parentheses. The insets show schematic secondary structures for the PLMVd strands of both polarities according to the model published previously (9). For each strand the nucleotide sequence and structure adopted at the ligation site is illustrated.



Based on *in vitro* experiments, two different ligation mechanisms were proposed for the conversion of the linear monomeric PLMVd strands into circular conformers (10, 22). Initially, a wheat germ RNA ligase was shown to catalyze the circularization of linear, unit-length PLMVd transcripts, as has been observed for PSTVd (5, 22). Such an enzymatic ligation leaves a 2'-phosphomonoester 3',5'-phosphodiester bond as its signature, as has been observed in two viroid-like satellite RNAs (21). More recently, PLMVd has been shown to self-ligate *in vitro* primarily via the formation of 2',5'-phosphodiester bonds ( i.e. > 96%; see ref. 10, 22). However, *in vivo* the occurrence and necessity of this non-enzymatic mechanism are not evident (15). In order to shed some light on the PLMVd circularization step, we have investigated the nature of the phosphodiester bond found at the ligation site of natural PLMVd strands isolated from infected cells. We report unequivocal evidence of the presence of 2',5'-phosphodiester bonds at the ligation site of circular PLMVd strands. These bonds serve to close the linear conformers, yielding circular ones. Furthermore, these bonds are shown to prevent self-cleavage of the replicational circular templates, resulting in a significant advantage in terms of viroid viability.

## MATERIALS AND METHODS

**RNA isolation.** RNA samples were isolated from leaves harvested from different peach cultivars either infected or not by PLMVd (see Table 1) using three previously described extraction methods (8, 17). The first procedure used the RNeasy Plant mini kit (Qiagen) to prepare RNA from 50-100 mg of tissue as specified by the manufacturer. This procedure was also performed with the addition of 5 mM EDTA to all buffers. The second procedure used was the Tris-EDTA extraction method (8). The third procedure used was a modification of that involving a polyethylene glycol precipitation (PEG-precipitation) (17). All RNA samples were quantified by UV spectrophotometry, and electrophoresed on 1.3% agarose gels in order to assess their quality. Dried RNA samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Preparation of synthetic PLMVd transcripts and RNA probes.** The synthesis and purification of both the linear and circular PLMVd transcripts used were performed as described previously (2, 3, 10). Briefly, *in vitro* transcriptions were performed using the recombinant plasmid pPD1 that possesses two tandemly repeated PLMVd sequences (+/-). During transcription, RNAs of both polarities possessing hammerhead sequences are produced and self-cleave efficiently, yielding 338-nt monomeric transcripts (i.e. L-PLMVd). For random internal labelling, 50  $\mu\text{Ci}$  of [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]UTP (3 000 Ci/mmol, Amersham) was added to the transcription reaction. After transcription, DNase (RNase free) treatment and precipitation of the nucleic acids, they were dissolved in 20  $\mu\text{L}$  10 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM EDTA and 0.5 volume of stop buffer (0.3% (w/vol) each of bromophenol blue and xylene cyanol, 10 mM EDTA (pH 7.5) and 97.5% (vol/vol) deionized formamide) and electrophoresed through a 5% (w/vol) polyacrylamide gel (PAGE) in 100 mM Tris-borate (pH 8.3), 1 mM EDTA, 7 M urea buffer. Non-radioactive transcripts were detected by UV shadowing, radioactive ones by autoradiography, and both were excised, eluted, precipitated, purified by passage through Sephadex G-50 spin columns (Amersham

Life Science), lyophilized, resuspended in water and quantitated either by absorbance spectrophotometry at 260 nm or Cherenkov counting, and stored dry at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Both the plus and minus strand-specific riboprobes used for Northern blot hybridization were synthesized and purified in an analogous manner, except that: i. we used the StripEZ transcription kit (Ambion) to obtain probes that can be stripped under mild washing conditions so as to permit multiple probings of the same membrane; and, ii. the transcription reactions were performed in the presence of  $50\ \mu\text{Ci}$  of  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  (3,000 Ci/mmol; Amersham Life Science) (8).

Circular PLMVd transcripts which include exclusively 3',5'-phosphodiester bonds (3',5'-C-PLMVd) were synthesized through a procedure based on the circularly permuted RNA strategy described previously (2). Circular PLMVd transcripts including a 2',5'-phosphodiester bond at the ligation site (2',5'-C-PLMVd) were synthesized by *in vitro* self-ligation of L-PLMVd as described previously (10, 22). L-PLMVd ( $\sim 500\ 000$  cpm for radioactive transcripts or 1-10  $\mu\text{g}$  for non-radioactive ones) was resuspended in a final volume of 15  $\mu\text{L}$  of 4 mM Tris-HCl (pH 7.9), 100 mM  $\text{MgCl}_2$ , incubated overnight at  $16^{\circ}\text{C}$ , ethanol precipitated, washed, and lyophilized. The resulting pellets were purified by 5% PAGE as described above.

**RNA Fractionation by two-dimensional PAGE.** RNA samples (5  $\mu\text{g}$ ) purified from peach tree leaves were mixed with trace amounts ( $< 1$  fmole; 500 cpm) of *in vitro* synthesized  $^{32}\text{P}$ -labelled C-PLMVd in a volume of 30  $\mu\text{l}$  of either water or 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, and 10  $\mu\text{l}$  loading buffer (0.25% xylene cyanol and bromophenol blue, 50% glycerol) then added. The resulting samples were then fractionated on a 5% two-dimensional polyacrylamide gel (2D-PAGE gel) with the first dimension being run under native conditions ( $4^{\circ}\text{C}$ ) and the second under denaturing conditions ( $50^{\circ}\text{C}$  in the presence of 7M urea) as described previously (29). Radiolabeled C- and L- PLMVd-transcripts were detected by autoradiography, excised, eluted, precipitated, purified by passage through Sephadex G-50 spun columns, and stored dry at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Analysis of the phosphodiester bonds.** The RNA species isolated with the radiolabeled C-PLMVd and L-PLMVd spots from the 2D-PAGE gels were treated according to the method used to identify modified nucleosides (32). The RNA samples were resuspended in 10  $\mu$ l of 10 mM ammonium acetate (pH 4.5) containing 0.05 units of ribonuclease T2 (Gibco BRL; producing 3'NMP), and were then incubated overnight at 37°C. The resulting mixtures were lyophilized, and the nucleotides (and dinucleotides) then 5'-end labelled using T4 polynucleotide kinase (Pharmacia) in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol (Amersham); producing 5',3'-NDP) in a total volume of 11  $\mu$ L according to the manufacturer's recommendations. The excess [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP was chased using 0.008 unit yeast hexokinase (Sigma) in the presence of 22 nmoles glucose for 10 min at 37°C. Non-radioactive ATP (2.5 mM) was added, and the mixtures incubated at 37°C for an additional 10 min. This latter step was then repeated. After cooling the mixtures on ice, they were lyophilized and resuspended in 20  $\mu$ L ultrapure water. One half (10  $\mu$ L) of each the resulting samples was treated with nuclease P1 by adding 10  $\mu$ L 150 mM ammonium acetate (pH 5.3) and 2  $\mu$ g of nuclease P1 (Boehringer Mannheim; producing 5'NMP). The reaction was incubated at 37°C for 3 hr, and then analyzed by two-dimensional thin layer chromatography (2D-TLC) on cellulose plates with UV indicator (Mandell) using the solvent system described by Silberklang et al. (32). Alternatively, the 2D-TLC were run using the solvent system described by Nishimura (27). Non-radioactive mononucleotides and dinucleotides (including C/U) were purchased (Sigma), and were also fractionated. The resulting dried plates were analyzed by UV shadowing and autoradiography, and the spots quantified with a PhosphorImager (Molecular Dynamics). The radioactive spot corresponding to the dinucleotide was recovered as described by Houssier et al. (20). Dinucleotides were digested by alkaline hydrolysis, or were 5'-end labeled using polynucleotide kinase in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, and the resulting samples analyzed directly on PEI-cellulose with UV indicator (Mandell) using the solvent system described previously (37).

**Self-cleavage assay.** The mixtures of RNA (i.e. extracted RNA and added radioactive PLMVd; ~3 000 cpm) were resuspended in a volume of 9  $\mu$ L of 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) / 1 mM EDTA, and were then heated at 90°C for 1 min prior to snap-cooling on ice for 30 sec. Self-cleavage of the transcripts was initiated by adding 1  $\mu$ l 1 M MgCl<sub>2</sub>, and the reactions incubated at 37°C for 15-30 min. The reactions were quenched by the addition of 0.5 volume of stop buffer, and were stored on ice until being denatured for 2 min at 65°C and purified on denaturing 5% PAGE gels.

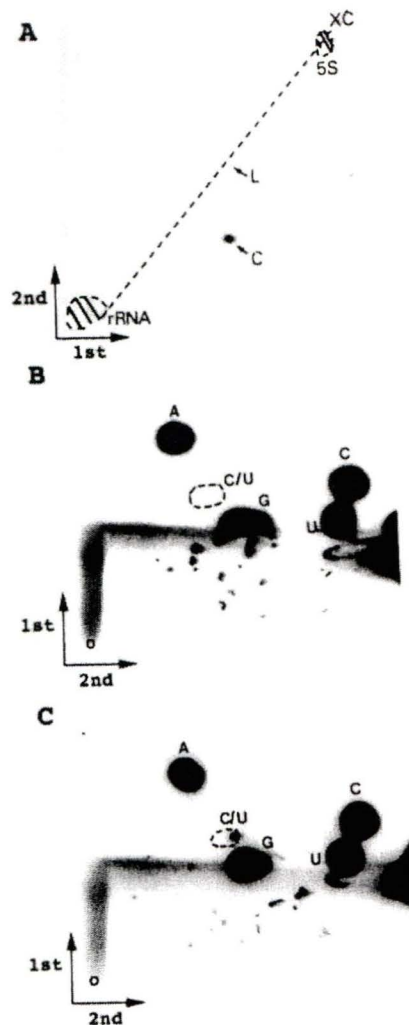
**Northern blot hybridizations.** RNA samples (5  $\mu$ g) isolated from both healthy and PLMVd infected Siberian C cultivar leaves were analyzed by Northern blot hybridizations using radiolabeled probes as described previously (8). RNA samples from healthy leaves mixed with 0.5 ng of synthetic non-radioactive 3',5'-C-PLMVd transcripts (of plus polarity) were also analyzed. The RNA samples were resuspended in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 0.1 mM EDTA and either heat-denatured at 90°C for 1 min and snap-cooled on ice for 30 sec, or not, and MgCl<sub>2</sub> then added to 100 mM final prior to incubation at 37°C for 10-30 min. The reactions were stopped by the addition of 1 vol of formamide-dye mixture (95% formamide, 10 mM EDTA, 0.05 % bromophenol blue, 0.05 % xylene cyanol), denatured for 2 min at 70°C, and subjected to 5% PAGE analysis as described above. Nucleic acid transfer to nylon filters (Hybond N<sup>+</sup>; Amhersham Life Science), prehybridization and hybridizations were performed as described previously (8). The resulting filters were analyzed by autoradiography, or were exposed to a phosphor screen. All blots were successively hybridized with both the plus and minus PLMVd-strand probes.

## RESULTS

### Detection of 2',5'-phosphodiester bonds at the ligation site of PLMVd.

The processing of PLMVd concatameric intermediates is mediated by RNA self-catalytic hammerhead structures that produce linear monomeric strands with 2',3'-cyclic phosphate and 5'-hydroxyl termini (3, 19). After self-cleavage, precise re-folding is required in order to bring the two ends (i.e. 3'-cytosine and 5'-uridine) into the close proximity required for ligation (Fig. 13, insets). Although the *in vivo* ligation mechanism remains unknown, if self-ligation does occur, cytidylyl-2',5'-uridine (C/U dinucleotides) should be found in circular PLMVd strands (C-PLMVd) isolated from infected leaves. Since 2',5'-phosphodiester bonds, but not 3',5'-phosphodiester bonds, are resistant to both ribonuclease T2 and nuclease P1 (10, 13), we should be able to simply verify whether or not self-ligation is a potential mechanism of *in vivo* circularization for PLMVd.

In order to detect the position of natural C-PLMVd in two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE), trace amounts of synthetic  $^{32}\text{P}$ -labeled C-PLMVd containing exclusively 3',5'-phosphodiester bonds (2) was added to RNA samples isolated from infected leaves. Figure 14A shows that C-PLMVd migrates off-diagonal, while a trace of linear-PLMVd (L-PLMVd), produced by self-cleavage, is barely detectable on the diagonal. The off-diagonal band (C-PLMVd) was excised from the gels and the RNA eluted. The eluted RNA was digested with ribonuclease T2, and the digestion products labeled at their 5' end with  $^{32}\text{P}$  using polynucleotide kinase prior to 2D-thin layer chromatographic analysis (2D-TLC; Fig. 14B-C). The 4 mononucleosides (NMP), and a species with a migration consistent with that of a commercial non-radioactive C/U dinucleotide linked by a 2',5'-bond, were detected in the infected samples, but not in the RNA sample extracted from healthy (i.e. uninfected) leaves. Similar results were obtained using other solvent systems (data not shown).



**FIG. 14.** (A) Autoradiogram of a 2D-PAGE gel. RNA from PLMVd-infected (Siberian C cultivar) peach leaves mixed with *in vitro* synthesized  $^{32}\text{P}$ -labelled C-PLMVd was fractionated on a 5% 2D-PAGE gel. The C- and L- PLMVd-transcripts are indicated by arrows. The diagonal (dotted line), 5S and rRNA (dotted circles) were revealed by silver staining. XC is xylene cyanol. (B) and (C) Typical 2D-TLC autoradiograms corresponding to hydrolysis of the RNA species isolated from healthy and infected peach leaves, respectively. Non-radioactive mono- and dinucleotides were also co-fractionated, and are identified. The directions of migration are shown, and the origin is indicated by o. These autoradiograms were over-exposed in order to allow for the detection of any trace products.

TABLE 1. Detection of the 2',5'-linked dinucleotides.

Peach cultivar	infected plants	extraction procedure	L- or C-PLMVd <sup>a</sup>	C/U detected <sup>b</sup>
Siberian C	+	RNeasy	C	+
			L	-
	-	Tris-EDTA	C	+
		RNeasy	C	-
Redhaven	+	PEG-precipitation <sup>f</sup>	L	-
			C	+
Harrow Beauty	+	RNeasy <sup>c</sup>	L	-
			C	+
Agua	-	PEG-precipitation	C	-
			L	-
-----				
synthetic transcripts				
3',5'-linked			C	-
			L	-
			L + C <sup>d</sup>	-
2',5'-linked			C	+
			L	-

<sup>a</sup> Band isolated on 2D-PAGE: L and C indicate linear and circular PLMVd, respectively.

<sup>b</sup> The detection or not of the C/U dinucleotide is indicated by the + or - symbol, respectively.

<sup>c</sup> This experiment was repeated in the presence of 5 mM EDTA in all extraction buffer and the result was similar.

<sup>d</sup> A mixture of L- and C-PLMVd that has not been gel-purified, but was treated directly.

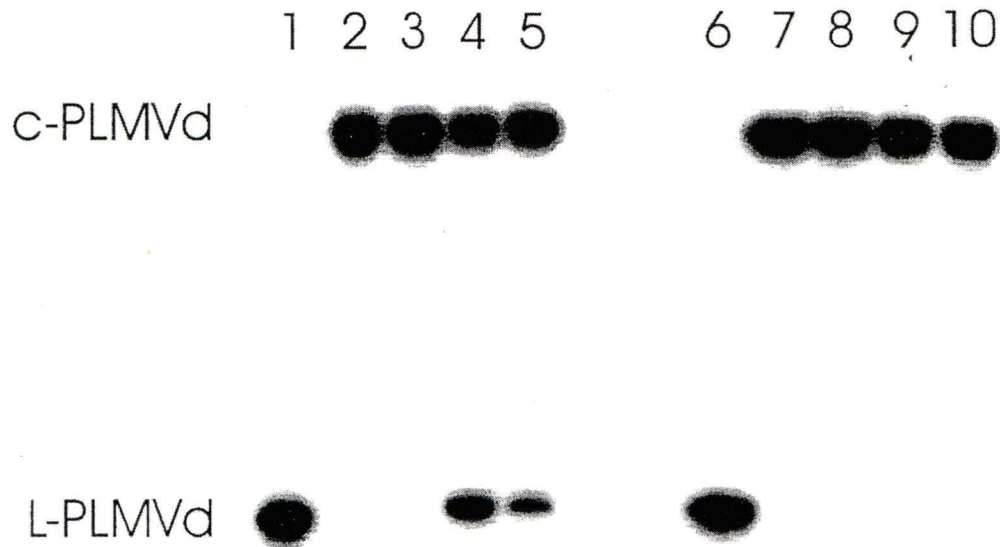


The C/U identity of this species was subsequently confirmed (data not shown), by the methods described previously for the *in vitro* self-ligation experiments. Specifically, in the absence of commercial nucleotides, the radioactive spot corresponding to the dinucleotide was recovered and digested by alkaline hydrolysis, thereby releasing the NMPs. The resulting samples were analyzed on 1D-TLC to confirm the presence of the 5'-<sup>32</sup>P-cytosine. Alternatively, the NMPs released by alkaline hydrolysis were 5'-end labeled with T4 polynucleotide kinase. In this case a 5'-<sup>32</sup>P-cytosine and a 5'-<sup>32</sup>P-uridine were detected, confirming the presence of the 3'-uridine. The chromatographic mobilities of these species (C/U, C and U) in both 1D- and 2D-TLCs excluded the possibility that the spot is a 2'-phosphomonoester 3',5'-phosphodiester bond, as is found in two viroid-like satellite RNAs (21). Moreover, the migration position of all dinucleotides on 2D-TLC are well known and different. No other dinucleotide migrated to the same position as C/U.

Similar experiments were performed using either synthetic transcripts or various RNA samples isolated from both infected and uninfected peach leaves (Table 1). The dinucleotide was detected only in two cases: i. in C-PLMVd isolated from infected leaves, regardless of the extraction method used or the particular PLMVd cultivar; and, ii. in a synthetic C-PLMVd prepared by *in vitro* self-ligation. No L-PLMVd species isolated from infected leaves was observed to possess a dinucleotide. Together, the latter result and the C/U identity of the dinucleotide confirm that 2',5'-phosphodiester bonds originate from the ligation sites. Furthermore, the 2',5'-phosphodiester bonds observed by TLC are not the result of subsequent self-cleavage and self-ligation of the synthetic 3',5'-linked C-PLMVd, nor of the self-ligation of natural L-PLMVd during the extraction procedure as no dinucleotide was detected in experiments using this transcript alone (Table 1); and, secondly, because extraction performed in the presence of radioactive synthetic L-PLMVd did not result in the formation of C-PLMVd (data not shown). It is doubtful that the dinucleotide originated from another RNA species that co-migrates with C-PLMVd strands as, if this was the case, we should detect the dinucleotide in the experiments performed with the off-diagonal bands from

healthy leaves. Furthermore, the TLC of the synthetic 3',5'-linked C-PLMVd in the presence of RNA isolated from healthy leaves always required a longer exposure (>10 times) in order to produce NMP intensities comparable to those derived from the samples from infected leaves. This difference suggests that with the samples from healthy leaves the NMPs were derived exclusively from the added synthetic  $^{32}\text{P}$ -C-PLMVd; therefore, natural C-PLMVd strands are likely alone, or almost alone, in having this electrophoretic mobility.

**Proportion of 2',5'-phosphodiester bonds.** We estimate, by PhosphorImager quantification, that more than 88% of the C-PLMVd strands isolated from infected leaves contain a 2',5'-bond (8 TLCs were analyzed in total, with the percentage varying from 62 to 115%). Even allowing for imprecisions in the quantification of the different TLC spots, the predominance of the 2',5' versus 3',5' isomer at the ligation site appears unequivocal. However, this value may be inflated due to the self-cleavage of natural 3',5'-C-PLMVd strands during the manipulations which produced the linear conformers seen on the 2D-gels. In order to rule out this possibility we performed two experiments. In one, EDTA was included (up to 5 mM) in the RNA extraction steps in order to prevent hammerhead self-cleavage of the 3',5'-linked C-PLMVd. No detectable differences were observed (Table 1). In the other, the addition of circular, synthetic  $^{32}\text{P}$ -labeled PLMVd transcripts with either a 3',5'- or 2',5'-phosphodiester bond at the ligation site to the extraction (i.e. in the ground leaf powder) resulted in less than 1% self-cleavage as determined by PAGE analysis (Fig. 15 lanes 2 and 7, respectively). The results were identical in the presence of an additional 5 mM EDTA in all buffers used in the extraction procedures (Fig. 15 lanes 3 and 8), as well as when the synthetic transcripts were added to the leaves prior to the extraction. Also, greater than one unit length linear PLMVd transcripts submitted to the same treatments show less than 2% self-cleavage (data not shown). When equivalent samples were heat-denatured, snap-cooled on ice, and  $\text{MgCl}_2$  added to 100 mM final prior to incubation at 37°C for 10-30



**FIG. 15.** Autoradiogram of a 5% PAGE gel of self-cleavage experiments using either 2',5'- or 3',5'-linked C-PLMVd. Radioactive transcripts (C-PLMVd) were added to the ground leaf powder, the RNA then extracted using the RNeasy Plant mini kit, and incubated under self-cleavage conditions with or without prior heat-denatured and snap-cooling treatment. Lanes 1 and 6 are untreated L-PLMVd (control). Lanes 2 to 5 and 7 to 10 are 3',5'-linked and 2',5'-linked C-PLMVd, respectively. Lanes 2 and 7 contain C-PLMVd extracted and incubated under self-cleavage conditions without heat-denaturing and snap-cooling step. Lanes 3 and 8 are as in 2 and 7 except that the extraction was performed in the presence of an additional 5 mM EDTA in all buffers. Lanes 4 and 9 are as in 2 and 7 except that the samples were heat-denatured and snap-cooled prior to incubation under self-cleavage conditions. Lanes 5 and 10 are as in 4 and 9 except that the extraction was performed in the presence of an additional 5 mM EDTA. Adjacent to the gel, the positions of the **C-PLMVd** and **L-PLMVd** transcripts are used as size references

min (i.e. under optimal self-cleavage conditions), the 3',5'-linked C-PLMVd self-cleaved normally (i.e. ~40%; Fig. 15 lane 4), showing that it had not lost its ability to self-cleave. In contrast, the 2',5'-linked C-PLMVd showed only a barely detectable level of self-cleavage (< 0.5%; lane 9), in agreement with the previous demonstration that 2',5'-linked C-PLMVd transcripts (produced *in vitro*) are protected against self-cleavage (10). Finally, the mixture of synthetic transcripts and RNA samples extracted in the presence of 5 mM EDTA was also tested for self-cleavage activity. The 3',5'-linked C-PLMVd had a slightly reduced level of self-cleavage, most likely because the EDTA chelated a portion of the magnesium (Fig. 15, lane 5). In the case of the 2',5'-linked C-PLMVd no self-cleavage activity was detected (Fig. 15 lane 10). Most importantly, these controls demonstrated that the protocols used preserve the integrity of the RNA species, thereby confirming the predominance of 2',5'-phosphodiester bonds.

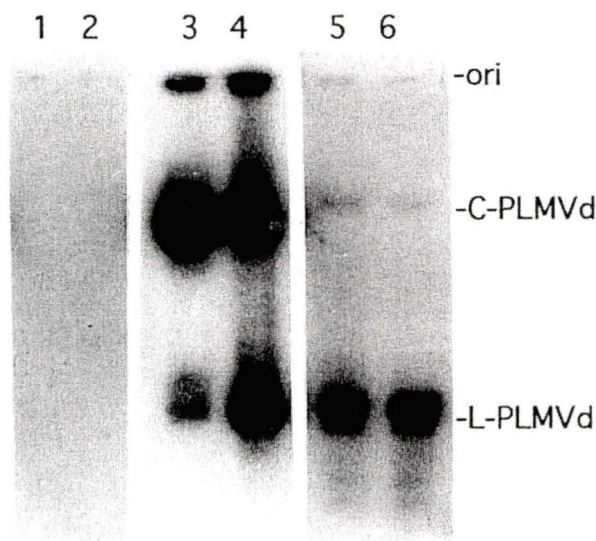
**The presence of a 2',5'-phosphodiester bond prevents self-cleavage.**

As mentioned above, it has previously been shown that 2',5'-linked C-PLMVd transcripts (produced *in vitro*) are protected against self-cleavage (10). To verify if this property is shared by the natural C-PLMVd, RNA extracted from infected leaves was incubated under self-cleavage conditions prior to Northern blot analysis using linear PLMVd strands of minus polarity as probe (Fig. 16). While self-cleavage was observed with synthetic 3',5'-linked C-PLMVd transcripts (lanes 3 and 4), the ratio of L-PLMVd:C-PLMVd remained virtually identical for the PLMVd isolated from the infected leaves (lanes 5 and 6). Since the quantity of C-PLMVd is significantly smaller than that of L-PLMVd, it is not impossible that a small proportion self-cleaved without being detected by the method used. Identical results were obtained when plus polarity PLMVd was used as probe. These results are easily explained by the fact that the 2'-hydroxyl group adjacent to the hammerhead scissile phosphate is essential for the self-cleavage reaction (10), therefore the presence of a 2',5'-phosphodiester bond at this site prevents the self-cleavage of C-PLMVd and thus stabilizes this conformer.

Moreover, the result in lane 5 also shows that PLMVd strands accumulate predominantly as linear conformers rather than as circular ones, and that no multimeric strands are detected. This result is in agreement with those published previously showing a larger proportion of PLMVd linear conformers, as compared to circular strands accumulated in infected cells (8). The accumulation of primarily PLMVd linear strands suggests that the ligation step is relatively inefficient.

## DISCUSSION

**2',5'-phosphodiester bonds in PLMVd.** Our results illustrate the presence of 2',5'-phosphodiester bonds at the ligation site of C-PLMVd strands isolated from the leaves of infected peach plants. This is in contrast to the report of the presence of a 2'-phosphomonoester 3',5'-phosphodiester bond at the ligation site of two viroid-like satellite RNAs (21). In this latter case, the two viroid-like satellite RNAs were initially replicated in protoplasts from *Nicotiana clevelandii* in order to produce <sup>32</sup>P-labelled RNA that was then purified by one-dimensional denaturing gel electrophoresis (i.e. a fractionation strictly based on molecular weight). We wanted to use peach protoplasts, but unfortunately this approach was not experimentally viable (data not shown). Consequently, RNA samples were isolated from infected peach leaves and purified by two-dimensional electrophoresis involving a fractionation based on molecular weight followed by one based on the conformation of the RNAs. As a result, the RNA species isolated from far off the diagonal in these gels correspond to circular 338 nt RNA molecules. The probability that these isolated RNA species might result from an induction by viroid infection is infinitely small. The viral infection modulates (i.e. results in the over-expression of) the expression of several genes as compared to the normal state. However, most of these genes are expressed at a basal level;



**FIG. 16.** Autoradiogram of a Northern blot with RNA samples incubated under both self-cleaving and non-self-cleaving conditions. Lane 1 is a synthetic, minus, monomeric, PLMVd strand without snap-cooling. Lane 2 is an RNA sample from healthy leaves incubated without snap-cooling. Lanes 3 and 4 are RNA samples from healthy leaves mixed with 0.5 ng of synthetic 3',5'-linked C-PLMVd transcripts (of plus polarity), and incubated without and with snap-cooling, respectively. Lanes 5 and 6 are RNA samples isolated from PLMVd-infected leaves either without or with prior self-cleavage, respectively. Adjacent to the gel the positions of the **C-PLMVd** and **L-PLMVd** transcripts are used as size references, and **ori** indicates the origin. The panels including lanes 1-2 and 5-6 were over-exposed in order to allow for the detection of any trace products.

hence, if one produces an RNA with the same migrational properties as circular PLMVd, we should be able to detect it in healthy samples. This was not the case (see Table 1). Furthermore, the isolated RNA species were not a lariat because they would have produced a different junction after digestion (i.e. a threeway junction). Moreover, the possibility that a 2',5'-linked oligo-A may have co-migrated with PLMVd is highly unlikely as it has been shown that most oligonucleotides of this type are usually very small (i.e. ~10 nt; ref. 34). Also, it would be surprising that such an oligo includes a C/U 2',5'-linked-dinucleotide; and, more importantly, that this C/U dinucleotide is the only 2',5'-linked dinucleotide that it contains. Although the sequence context of this C/U dinucleotide is limited, the only conclusion that can be drawn is that it unequivocally originated from purified C-PLMVd. By itself the demonstration that almost all PLMVd circular copies include the resistant bond constitutes an additional evidence that PLMVd was the only RNA species found in the off diagonal gel bands.

Since PLMVd multimeric strands are not accumulated in cells (8), the obligatory templates for replication are the circular conformers (i.e. C-PLMVd). Therefore, the 2',5'-phosphodiester bonds most likely create these circular templates. The ability of a reverse transcriptase to read through a 2',5'-linkage has been estimated to be greater than 50% (10, 25), with the remaining cDNA synthesis being terminated. Therefore, the presence of a 2',5'-linkage does not constitute an important obstacle to polymerase progression (10, 25), rather it results in a significant advantage in terms of viroid viability since it protects their integrity.

The mechanism responsible for the formation of these 2',5'-phosphodiester bonds remains to be elucidated. One possibility is catalysis by a host 2',5' RNA ligase. Such an enzyme has been purified from *E. coli* and demonstrated to ligate tRNA half-molecules *in vitro*, but the natural substrate(s) remains unidentified (1, 16). However, some observations suggest that the *in vivo* mechanism of ligation may be analogous to the non-enzymatic one observed *in vitro* (10). Firstly, PLMVd accumulates predominantly, and most likely

replicates, in chloroplasts (8), and no chloroplastic gene encoding an RNA ligase has been identified, nor has such an activity been purified from chloroplasts. Secondly, self-ligation has minimal requirements other than the correct juxtaposition of the strand ends produced by hammerhead self-cleavage on a complementary strand (22). It has been shown that the self-ligation site is embedded in a very stable stem that is formed in solution, and, most likely, also *in vivo* (9). Thirdly, analysis of the sequence surrounding the ligation sites suggests the existence of a selective pressure in favor of the self-ligation mechanism, as it appears to be conserved (10). Thus, all self-ligation requirements are satisfied. Finally, *in vitro* self-ligation is relatively inefficient (i.e. ~10%; ref. 10), resulting in the accumulation of linear monomers. This correlates perfectly with the ratio of linear to circular PLMVd strands observed *in vivo* (i.e. >11:1; ref. 8) (also see Fig. 16 lanes 5-6). Clearly, *in vivo* non-enzymatic self-ligation appears to be the most interesting hypothesis for PLMVd circularization. However, additional physical evidence in favour of this mechanism is required. Unfortunately, directed mutagenesis of the nucleotide(s) near the ligation site, in order to either reduce or abolish self-ligation *in vivo*, does not constitute an option as it also inhibits the self-cleavage activity of the concatameric PLMVd strands. Nevertheless, if self-ligation, like self-cleavage, is indeed a part of PLMVd replication, then this process would be a largely RNA-based mechanism in which the only host component required is an RNA replicase.

**The role of 2',5'-phosphodiester bonds in nature.** RNA molecules are biological polymers composed of nucleotides covalently linked by phosphodiester bonds. Enzymes, such as RNA polymerases, that act on RNA use the ribose 3'-hydroxyl groups, instead of the 2'-hydroxyl groups, to create 3',5'-phosphodiester bonds. There are some examples of 2',5'-phosphodiester bonds in nature, but most of these are formed in RNA species that already possess a 3',5'-phosphodiester bond and result in a "branched" 2',5' linkage like that observed in the lariats adopted by introns. Currently the only "in-line" 2',5'-



phosphodiester bonds, which leave the 3'-hydroxyl group free, that have been retrieved from cells are the 2',5'-oligoadenylates (see ref. 34 for review). Based on our current knowledge, the discovery of any other "in-line" natural 2',5'-phosphodiester bonds appears to be unlikely. In fact, the existence of these bonds was essentially limited, so far, to *in vitro* experiments representative of prebiotic chemistry in which the absence of the 3',5'-phosphodiester bond has been attributed to the intrinsic lack of activity of the 3'-hydroxyl group (e.g. see ref. 24, 28, 30, 35). For example, the non-enzymatic joining of both adenosine and short poly(A) oligonucleotides on poly(U) templates produces 97% 2',5'-phosphodiester bonds (28, 35). Moreover, *in vitro* selection of RNA enzymes using pools of randomized sequences has led to the isolation of catalytic sequences that act as 2',5' RNA ligases (13).

The results reported here show that 2',5'-phosphodiester bonds are still present in nature, and that they are of biological importance. The finding of 2',5'-phosphodiester bonds in an RNA species currently found in nature may have at least two consequences regarding molecular biology. On one hand, since this type of phosphodiester bond is primarily associated with prebiotic chemistry, its presence in PLMVd supports the hypothesis that this viroid constitute a model "relic" from the precellular world (12). On the other hand, regardless of the mechanism responsible for the production of the 2',5'-phosphodiester bonds, it is tempting to speculate that these bonds are not restricted to PLMVd, and that many other as yet unidentified RNA molecules may possess this linkage. Since the requirements for self-ligation are minimal, this mechanism may be the source of production of these bonds in various cellular RNAs. The 2',5'-phosphodiester bonds could serve to stabilize the phosphate backbone at specific locations, or even to create and modify an RNA molecule (i.e. RNA recombination). They have the potential to contribute significantly to biological life.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank D.A. Thompson for RNA samples, and our laboratory colleagues for critical comments and helpful suggestions. This research was supported by grants from Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Canada), and Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR, Québec) to J.P.P. F.C. was recipient of an NSERC studentship. J.P.P. is a Medical Research Council (MRC, Canada) scholar.

**REFERENCES**

1. **Arn, E. A., and J. N. Abelson.** 1996. The 2',5' RNA ligase of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **271**:31145-31153.
2. **Beaudry, D., and J. P. Perreault.** 1995. An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules. Nucleic Acids Res. **23**:3064-3066.
3. **Beaudry, D., F. Bussière, F. Lareau, C. Lessard, and J. P. Perreault.** 1995. The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. Nucleic Acids Res. **23**:745-752.
4. **Bonfiglioli, R. G., D. R. Webb, and R. H. Symons.** 1996. Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. Plant J. **9**:457-465.
5. **Branch, A. D., and H. D. Robertson.** 1982. Cell-free circularization of viroid progeny RNA by an RNA ligase from wheat germ. Science **217**:1147-1149.
6. **Branch, A. D., and H. D. Robertson.** 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. Science **223**:450-455.
7. **Bussière, F., D. Lafontaine and J. P. Perreault.** 1996. Compilation and analysis of viroid and viroid-like RNA sequences. Nucleic Acids Res. **24**:1793-1798.
8. **Bussière, F., J. Lehoux, D. A. Thompson, L. J. Skrzeczkowski, and J. P. Perreault.** 1999. Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. J. Virol. **73**:6353-6360.
9. **Bussière, F., J. Ouellet, F. Côté, D. Lévesque, and J. P. Perreault.** 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.

10. **Côté, F., and J. P. Perreault.** 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.
11. **Daros, J. A., J. F. Marcos, C. Hernandez, and R. Flores.** 1994. Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:12813-138170.
12. **Diener, T.O.** 1989. Circular RNAs: relics of precellular evolution? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:9370-9374.
13. **Ekland, E. H., J. W. Szostak, and D. P. Bartel.** 1995. Structurally complex and highly active RNA ligase derived from random RNA sequences. *Science* **269**:364-370.
14. **Flores, R., Randles, J. W., Barjoseph, M., and T. O. Diener.** 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.* **143**:623-629.
15. **Flores, R., J. A. Navarro, M. Pena, B. Navarro, S. Ambros, and A. Vera.** 1999. Viroids with hammerhead ribozymes: some unique structural and functional aspects with respect to other members of the group. *Biol. Chem.* **380**:849-854.
16. **Greer, C. L., B. Javor, and J. Abelson.** 1983. RNA ligase in bacteria: formation of a 2',5' linkage by an *E. coli* extract. *Cell* **33**:899-906.
17. **Hadidi, A. , L. Giunchedi, A. M. Schamboul, C. Poggi-Pollini, and M. A. Amer.** 1997. Occurrence of peach latent mosaic viroid in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Dis.* **81**:154-158.
18. **Harders, J., N. Lukacs, M. Robert-Nicoud, J. M. Jovin, and D. Riesner.** 1989. Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**:3941-3949.

19. **Hernandez, C., and R. Flores.** 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. Proc Natl. Acad. Sci. USA **89**:3711-3715.
20. **Houssier, C., P. Degee, K. Nicoghosian, and H. Grosjean.** 1988. Effect of uridine dethiolation in the anticodon triplet of tRNA(Glu) on its association with tRNA(Phe). J. Biomol. Struct. Dynam. **5**:1259-1266.
21. **Kiberstis, P. A., J. Haseloff, and D. Zimmern.** 1985. 2'-phosphomonoester, 3'-5'-phosphodiester bond at a unique site in a circular viral RNA. EMBO J. **4**:817-822.
22. **Lafontaine, D., D. Beaudry, P. Marquis, and J. P. Perreault.** 1995. Intra- and intermolecular nonenzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. Virology **212**:705-709.
23. **Lima, M. I., M. E. N. Fonseca, R. Flores, and E. W. Kitajima.** 1994. Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by *in situ* hybridization. Arch. Virol. **13**:385-390.
24. **Lohrmann, R., and L. E. Orgel.** 1980. Efficient catalysis of polycytidylic acid-directed oligoguanylate formation by Pb<sup>2+</sup>. J. Mol. Biol. **142**:555-567.
25. **Lorsch, J. R., D. P. Bartel, and J. W. Szostak.** 1995. Reverse transcriptase reads through a 2',5'-linkage and a 2'-thiophosphate in a template. Nucleic Acids Res. **23**:2811-2814.
26. **Navarro, J. A., A. Vera, and R. Flores.** 2000. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. Virology **268**:218-225.
27. **Nishimura, S.** 1979. Chromatographic mobilities of modified nucleotides, p. 547-552. In P. R. Schimmel, D. Söll, and J. N. Abelson (ed), Transfer RNA, Structure, Properties, and Recognition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

28. **Renz, M., R. Lohrmann, and L. E. Orgel.** 1971. Catalysis for the polymerization of adenosine cyclic 2',3'-phosphate on a poly (U) template. *Biochem. Biophys. Acta* **240**:463-471.
29. **Roy, G., S. Mercure, F. Beuvon, and J. P. Perreault.** 1997. Characterization of stable RNAs from the resected intestinal tissues of individuals with either Crohn's disease or ulcerative colitis. *Biochem. Cell Biol.* **75**:789-794.
30. **Sharmeen, L., M. Y. Kuo, and J. Taylor.** 1989. Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.* **63**:1428-1430.
31. **Schumacher, J., H. L. Sänger, and D. Riesner.** 1983. Subcellular localization of viroids in highly purified nucleic from tomato leaf tissue. *EMBO J.* **2**:1549-1555.
32. **Silberklang, M., A. M. Gillum, and U. L. RajBhandary.** 1979. Use of *in vitro* <sup>32</sup>P labeling in the sequence analysis of non-radioactive tRNAs, p. 58-109. *In* L. Grossman and K. Moldave (ed), *Methods in Enzymology*. Academic Press, N. Y.
33. **Symons, R. H.** 1997. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* **25**:2683-2689.
34. **Trujillo, M. A., D. Roux, J. P. Fueri, D. Samuel, H. L. Cailla, and H. V. Rickenberg** 1987. The occurrence of 2',5' oligoadenylates in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **169**:167-173.
35. **Usher, D. A., and A. H. McHale.** 1976. Nonenzymatic joining of oligoadenylates on a polyuridylic acid template. *Science* **192**:53-54.
36. **Warrilow, D., and R. H. Symons.** 1999. Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Arch. Virol.* **144**:2367-2375.
37. **Yang, J. H., P. Sklar, R. Axel, and T. Maniatis.** 1995. Editing of glutamate receptor subunit B pre-mRNA *in vitro* by site-specific deamination of adenosine. *Nature* **374**:77-81.

## Description du travail

L'article précédent démontrait que la réaction d'auto-ligation de PLMVd *in vitro* produisait majoritairement un lien phosphodiester de type 2',5'. Le but des expériences décrites dans cet article était donc de vérifier si des transcrits naturels de PLMVd, i.e. isolés à partir de feuilles infectées, contenaient une telle liaison. Ces résultats démontrent la présence d'une liaison de type 2',5' dans les transcrits circulaires naturels de PLMVd. De plus, plusieurs évidences suggèrent fortement que cette liaison est située au site d'auto-coupeure/autoligation de PLMVd. Cette démonstration suggère donc que PLMVd utilise la réaction d'autoligation, plutôt que la ligation catalysée par une enzyme de l'hôte, dans l'étape de circularisation de son cycle de réplication. Ces résultats sont d'une grande importance puisque PLMVd est le premier organisme dont l'utilisation *in vivo* de la réaction d'auto-ligation est démontrée.

CHAPITRE 3:  
**Caratérisation des déterminants moléculaires importants  
pour l'initiation de la réplication de PLMVd.**

3.1. ARTICLE:

Pelchat, M., Côté, F., Perreault, J.P. (2000) The self-catalytic hammerhead RNA domain of peach latent mosaic viroid acts as a promoter for the *Escherichia coli* RNA polymerase.

Soumis à *Virology*.

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

**Implication dans le travail**

Mon implication dans ces travaux fut de procéder aux expériences d'hybridation de type Northern. J'ai également eu plusieurs discussions intéressantes et enrichissantes avec le Dr. Martin Pelchat pendant le déroulement de ces travaux et j'ai contribué à l'édition du manuscrit.



## ABSTRACT

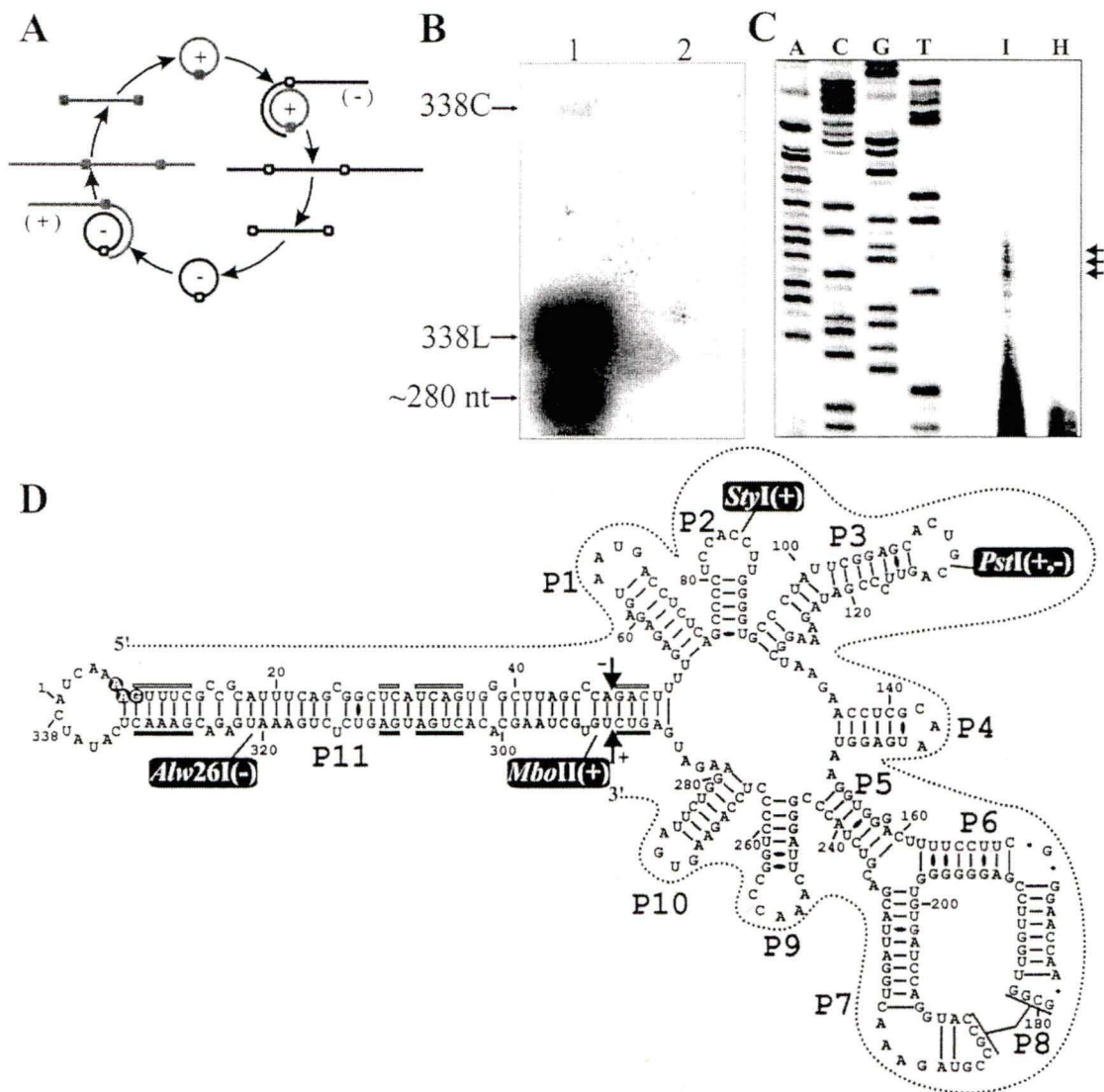
We report here an *in vitro* assay using *Escherichia coli* RNA polymerase (RNAP) to initiate the replication of peach latent mosaic viroid (PLMVd). All PLMVd promoter features required for the initiation of synthesis are shown to be localized in the domain formed by the self-complementary, hammerhead sequences; thereby, attributing a putative novel function to these self-catalytic sequences. The RNAP has the same initiation site regardless of the polarity of the PLMVd strand used as template. This initiation site correlates with the detection of small PLMVd-related species in infected peach-leaves. As a result of these observations, we propose that the peach chloroplastic bacterial-like RNAP supports PLMVd replication.

## INTRODUCTION

Viroids are small (~ 300 nucleotides, nt), single-stranded, circular RNAs that infect higher plants causing significant losses in the agricultural industry (1,2). These RNA species replicate through a rolling circle mechanism involving only RNA intermediates, and adopt either an asymmetric or symmetric mode depending on the absence or presence, respectively, of the minus circular strand that serves as template in the latter case (Fig. 17A) (1-3). Since viroids do not encode any protein, two of the most intriguing questions with regard to their replication are the identification of the host polymerase involved, and the determination of the signal(s) that trigger this enzyme. *Pospiviroidae*, such as the potato spindle tuber viroid, share five typical structural domains, a nuclear localization and an asymmetric replication that seems to be supported by the host RNA polymerase (RNAP) II (1,4). Conversely, *Avsunviroidae* such as PLMVd and avocado sunblotch viroid (ASBVd), possess self-cleaving hammerhead motifs that are crucial for their symmetric replication (1). Strands of both the plus and minus polarities of ASBVd and PLMVd have been localized in the chloroplasts of infected plants (5, 6), suggesting that the replication of these viroids occurs within this cellular compartment that possesses a nuclear encoded phage-like RNAP and a plastid encoded bacterial-like RNAP. While the phage-like RNAP was suggested to be responsible for the ASBVd replication (7), nothing is known regarding the polymerization step of PLMVd replication.

## RESULTS

Recently, all expected PLMVd replication intermediates were detected by Northern blot hybridization (6). More specifically, PLMVd strands of both polarities were shown to accumulate predominantly as linear monomers, while circular conformers were found to be present in small amounts and concatamers were only detected upon over-exposure of the membranes. A typical autoradiogram using the PLMVd plus polarity riboprobe (i.e. detecting minus polarity strands) is illustrated in figure 17B. In addition to the linear and circular monomers, another abundant RNA species of approximately 280 nt in size is always detected in RNA samples isolated from infected leaves (lane 1), regardless of the polarity of the riboprobe and peach cultivar used (see also Fig. 3 of reference 6). The gel-bands of 280 nt from infected and healthy peach samples were excised from a non-transferred gel, the RNA recovered and used for primer extension analysis in order to determine their 5' end(s). Only three abundant products were detected in RNA isolated from PLMVd-infected leaves (Fig. 17C). Their 5' ends corresponded to the AAG triplet found at the junction of the left-terminal loop and stem (i.e. within the P11 stem; Fig. 17D). No longer extension products were detected, indicating that these signals do not originate from premature arrests. The use of both various oligonucleotides in primer extension assays, and experiments of rapid amplification of RNA ends by PCR (RACE-PCR), confirmed these 5' ends for the 280 nt species of both polarities (data not shown). One likely explanation for the existence of these abundant 280 nt species of both plus and minus polarities is that they originate from the first replication cycle, and correspond to the sequence beginning at the initiation site and ending at the self-cleavage site (i.e. 5' and 3' ends, respectively). Using a large collection of natural PLMVd sequence variants it was observed that either an insertion or a deletion of one nucleotide often occurred within the left-terminal domain (8); therefore, we believed that the observed 5'-end triplet may reflect the occurrence of such an insertion or deletion, and most



**FIG. 17.** Rolling circle replication and structure of PLMVd. (A) Schematic representation of the symmetric mechanism of PLMVd replication. The polarity of the strands is indicated in parentheses, and the boxes denote the hammerhead self-cleavage consensus sequences. (B) Northern blot hybridization of RNA samples isolated from either infected (lane 1) or healthy (lane 2) peach leaves and probed using the PLMVd plus polarity riboprobe (detecting minus polarity strands). Adjacent to the gel the length in nucleotides and the conformation (circular, C; linear, L) of the PLMVd intermediates are indicated. (C) Primer extension assays using the 280 nt RNA isolated from either PLMVd-infected (I) or healthy (H) peach leaves. The Universal Primer was used on M13mp19 DNA to generate a sequence marker. (D) PLMVd sequence and proposed secondary structure. The helix numbering is in accordance with Bussière et al. (19). The conserved hammerhead sequences of both polarities are indicated by small boxes, and the cleavage sites by arrows. Positions of the restriction sites used to synthesize the various transcripts are shown. The dotted line represents the 280 nt RNA species. The positions of 5' ends produced on the primer extension assay are indicated by closed circles.

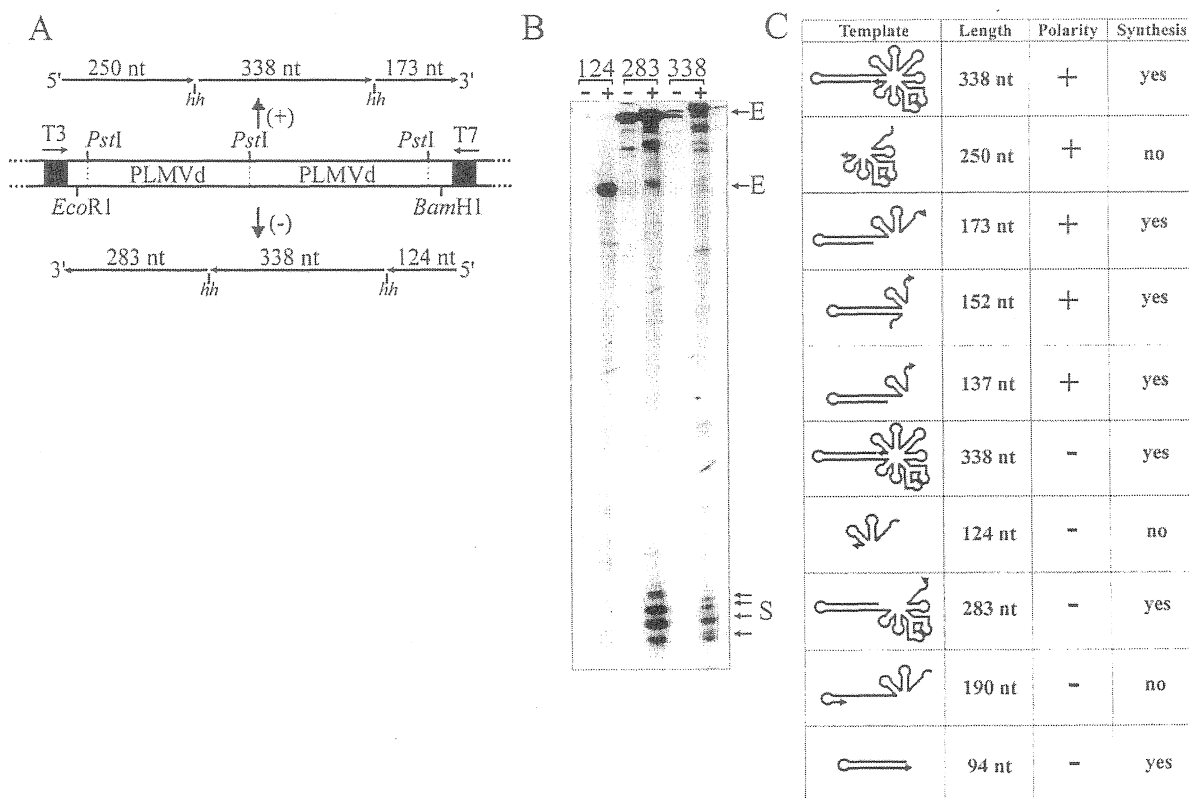
likely the adenosine residue located in the middle can be considered as the initiation site for the replication of PLMVd strands of both polarities. These results do not rule out the possibility that these 5'-ends may be the result of specific cleavage, nor the possible existence of additional initiation sites located either in the central or right domains of PLMVd. However, primer extension and RACE-PCR experiments using several oligonucleotides complementary to various regions of PLMVd on total RNA extracted from infected leaves did not lead to the detection of any other potential initiation sites (data not shown).

In order to develop an *in vitro* PLMVd replication assay, we initially tested various protein extracts from both peach leaves and isolated chloroplasts. However, these extracts failed to produce PLMVd derived transcripts, most likely because the relatively low abundance of chloroplasts in peach cells and the fact that these leaves are lignious (i.e. woody) considerably limited our ability to obtain enough transcription activity from PLMVd RNA templates. Therefore, we decided to test available phage and bacterial RNAPs for their ability to support the initiation of PLMVd synthesis. In order to permit easy determination of the initiation site(s) based on the size of the product(s), linear PLMVd templates of both polarities with known extremities were produced *in vitro* from a linearized plasmid containing two tandemly repeated viroid copies (Fig. 18A) (9). During transcription from this plasmid, the RNA of both polarities self-cleaved efficiently via their hammerhead motifs, thereby permitting the isolation of transcripts corresponding to different portions of PLMVd. Preliminary assays failed to identify a phage RNAP (e.g. phages T3 and T7 RNAP) capable of supporting transcriptional initiation using various PLMVd strands as templates (data not shown). In contrast, the use of *E. coli* RNAP resulted in the detection of transcription products using several PLMVd strands of both polarities as templates (see below).

As it is well documented that *E. coli* RNAP can non-specifically initiate transcription from RNA templates in the presence of manganese (10), transcription assays were performed using only magnesium as bivalent cation. In addition, the assays were always performed either in the presence of only one nucleotide (i.e. GTP), or of all four nucleotides (NTP), in

order to differentiate between template extension and the synthesis of novel RNA molecules (i.e. transcription), respectively. A typical gel using three minus polarity RNA strands as templates is presented in figure 18B. Extension products are detected primarily in the upper portion of the gel (Fig. 18B). While the same banding pattern is detected under transcription conditions, additional specific products (ranging from 40-50 nt in size) are observed with the 283 and 338 nt RNA templates, but not with the 124 nt RNA. The size of these additional RNA molecules suggests that the initiation of synthesis occurred near the left-terminal loop of the PLMVd strands (see Fig. 17D, P11 domain). Using the 283 nt transcripts and other PLMVd-derived RNAs as templates, three types of experiments were performed in order to confirm that the new bands were transcriptional products (data not shown). Firstly, when the templates were radiolabeled and the assay performed in the presence of non-radioactive NTP, the specific bands (40-50 nt) were not detected. Secondly, when the assays were performed in the presence of non-radioactive NTP and the resulting RNA molecules 3'-end labeled using T4 RNA ligase and [ $\alpha$ - $^{32}$ P]pCp, the specific bands were detected. Thus, these bands are synthesized by transcription catalyzed by the *E. coli* RNAP, rather than being produced either by template extension or specific hydrolysis of the template. Thirdly, when the initiation of synthesis was performed in the presence of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, which allows the incorporation of a radioactive phosphate only at the 5' end of a novel transcript (i.e. no more template extension), the specific bands were detected. However, the incorporation of a single radioactive phosphate required long over-exposure of the gels; and therefore, was not a sensitive enough detection method to warrant modification of the initial assay for subsequent analysis.

The results using various PLMVd-derived transcripts are summarized in figure 18C. With the exception of the 250 nt transcripts, all PLMVd-derived templates of plus polarity produced specific products corresponding to an initiation in the left-terminal loop. Even the smallest template of 137 nt, corresponding to just slightly more than the P11 domain of



**FIG. 18.** Transcription assays using various PLMVd-derived RNAs. (A) Schematic representation of plasmid pPD1 and the run-off transcription products corresponding to the various PLMVd-derived templates. *hh* indicates hammerhead self-cleavage sites. (B) Example of a PAGE gel of transcription assays performed with *E. coli* RNAP using the 124, 283 and 338 nt transcripts of minus polarity as templates. Extension (E) in the presence of GTP only and synthesis (S) using the four NTP are identified the symbols (+) and (-), respectively. (C) Compilation of the results.



PLMVd (i.e. including the hammerhead sequences of both polarities), was sufficient to produce these products. Similarly, the use of PLMVd-derived transcripts of minus polarity led to the production of these specific bands (40-50 nt) when the template possessed at least both strands of the P11 domain (i.e. the 338, 283 and 94 nt RNAs). However, neither the 124 nt transcripts (i.e. derived from the right-hand domain), nor the 190 nt one including only one complementary hammerhead sequence, supported the production of these specific RNAs. Together, these results suggest that all the requirements for the initiation of the synthesis of new strands are located within the PLMVd P11 domain. Moreover, we noticed that the relative intensity of the bands varied slightly depending on the template, suggesting that alternative structures may influence the efficiency of the transcription.

The initiation sites were further characterized by primer extension using an oligonucleotide that annealed to the sequence adjacent to the self-cleavage site (Fig. 19A-C). Using full-length PLMVd RNA template of minus polarity (i.e. 338 nt), two predominant extension products were observed (Fig. 19A). Comparison to a DNA ladder showed that the length of these products supports initiations occurring at the consecutive adenosine and guanosine residues that form the first two basepairs of the stem adjacent to the left-terminal loop (Fig. 19B). Minor bands of smaller size were also detected with the minus polarity template (Fig. 19A); however, it is not clear whether they originated from other initiation sites located in the same stem, or more likely, resulted from incomplete extension. Using the same oligonucleotide as before, full length plus PLMVd transcripts produced three extension products, indicating that initiation occurred at adenosine residues located either in the left-terminal loop (in two cases), or at the first adenosine of the adjacent stem (Fig. 19C). These experiments showed that the initiation of transcription *in vitro* for PLMVd strands of both polarities occurs in the left-terminal stem-loop, in agreement with the data from infected cells. More initiation sites are observed to be used in the *in vitro* assay than in the RNA samples isolated from PLMVd-infected peach-leaves; however, the observation of multiple initiation sites *in vitro* compared to *in vivo* is not limited to PLMVd (e.g. see ref. 11).

It is well-established that the  $\sigma^{70}$  subunit of *E. coli* RNAP acts as a specificity factor directing binding of the polymerase to DNA templates (12). In order to verify the involvement of this transcription factor in the RNAP binding we performed transcription assays using both holo- and core- RNAP (i.e. with and without  $\sigma^{70}$ , respectively). Almost no product was observed in the absence of the  $\sigma^{70}$  subunit (Fig. 19D), clearly indicating the requirement for this factor. Moreover, it was suggested that tagetitoxin, which strongly inhibits both *E. coli* RNAP and the homologous chloroplastic RNAP (13), may be used to determine the enzyme involved in *Avsunviroidae* replication (7). As shown in figure 19D, while a concentration of 12 mM tagetitoxin strongly prevented transcription from a control DNA template (pBlueScriptKS DNA digested by *ScaI*, see right panel), it has only a weak effect on the synthesis from PLMVd RNA templates by *E. coli* RNAP. Higher concentrations of tagetitoxin (i.e. from 60 to 120 mM) only led to ~50% inhibition with a PLMVd derived RNA template (data not shown). Apparently, the inhibitory effect of tagetitoxin may be restricted to DNA templates, like actinomycin D (14), and should not be considered as a means of identifying an RNAP involved in RNA pathogen replication.

## DISCUSSION

In contrast to several previous reports of polymerases replicating viroids in the presence of manganese, which significantly reduces the specificity of these enzymes (15-17), we demonstrate that *E. coli* RNAP initiates synthesis from PLMVd RNA in the presence of magnesium as bivalent cation. The initiation of the synthesis occurs at different sites *in vitro* than *in vivo*, but all occur at purines located in the left-terminal loop or in the adjacent positions in the stem. However, only one initiation site was shared between plus and minus the PLMVd templates *in vitro*, namely the first double-stranded adenosine residue adjacent to



**FIG. 19.** Characterization of the transcription assay using *E. coli* RNAP. (A-C) Determination of the *in vitro* initiation sites. (A) Example of a primer extension assay on the RNA produced by transcription using full length minus PLMVd as template. The *E. coli* RNAP was omitted in lane 2. Arrows indicate primer extension products. The ladder generated using the Universal Primer on M13mp19 DNA was used as a sequence marker. (B-C) Localization of the initiation sites using the minus and plus PLMVd strands as template, respectively. The positions of initiation are illustrated by closed circles. The positions with smaller circles probably result from premature arrest or degradation. (D) Effects of the  $\sigma^{70}$  subunit of *E. coli* RNAP and tagetitoxin on the *in vitro* synthesis of the 152 nt RNA derived from PLMVd. Transcription reactions were performed using either holo- (with  $\sigma^{70}$ ) or core- (without  $\sigma^{70}$ ) *E. coli* RNAP. The enzymes were incubated both in the presence and the absence of 12  $\mu$ M tagetitoxin. S identifies novel synthesized strands. In the right panel a transcriptional control using pBlueScript KS DNA digested with *ScaI* (pKS/*ScaI*) as template is shown

the left-terminal loop. This initiation site also appears to be used by the natural enzyme that replicates PLMVd *in vivo* producing the ~280 nt RNA species found to accumulate in infected cells and originating from the first replication cycle (see above). Since these species are observed for both polarities, this appears to be the only rational explanation for their accumulation in cells. Similarly, ASBVd strands corresponding to the initial replication cycle were also shown to accumulate in avocado leaves (18). In both cases, the observed resistance of these species to host nuclease is unexpected, suggesting that these replication intermediates serve an as yet unidentified function in the life cycle of these viroids.

Based on the facts that PLMVd accumulates in chloroplasts (6), that *E. coli* RNAP supports the transcription of PLMVd strands of both polarities, and that initiation sites are shared *in vitro* and *in vivo*, we suggest that the chloroplastic bacterial-like RNAP might be the enzyme responsible for PLMVd replication. The avocado chloroplastic phage-like RNAP has been proposed to support the replication of ASBVd based on the observation that the RNAP replicating ASBVd was resistant to tagetitoxin (7). However, as we have shown this method is not ideal for identifying the polymerase involved in the replication of an RNA pathogen. However, it is not impossible that ASBVd and PLMVd require different RNAPs for their replication. Although these viroids share the presence of hammerhead motifs and their cellular localization, they differ in several features. For example, ASBVd adopts a rod-like secondary structure while PLMVd has a branched one (19), and the organization of their hammerhead sequences differ significantly (1,2).

Using several PLMVd-derived transcripts as templates, we have shown that all RNA features required for the initiation of synthesis, at least *in vitro*, are located within the P11 domain of PLMVd composed solely of the self-complementary, hammerhead catalytic sequences. Obviously, this is a novel function for these sequences. In addition to the nucleotides essential for the formation of active self-cleaving hammerhead structures, analysis from 64 natural PLMVd variants shows other highly conserved sequences in the P11 domain (8). Neither active self-cleaving hammerhead structures, nor the rod-like shape

of the P11 domain, justify this conservation; maybe these nucleotides, or those of the hammerhead catalytic core, contribute to the initiation of transcription or at the limit constitute -35 and -10 box-like elements. However, both the manner by which the RNAP and its  $\sigma^{70}$  subunit interact with this RNA domain, and the mechanism by which the initiation of the synthesis occurs, remain obscure. Biochemical treatments of model templates that are composed solely of hammerhead sequences of both polarities showed that they have to fold as double-stranded structure (i.e. rod-like) in order to serve as efficient templates for the RNAP (data not shown). The requirement for the *E. coli*  $\sigma^{70}$  subunit for the transcription of PLMVd-derived templates may provide an explanation as this transcriptional factor is known to bind double-stranded DNA sequences and to determine the start site of synthesis (12). In addition, this requirement might explain the conservation of the superimposition of the self-catalytic hammerhead sequences of both polarities in PLMVd, as well as the observation that PLMVd intermediates of both polarities accumulate at similar levels in infected cells (6), most likely due to the use of similar promoters by templates of both polarities. The involvement of a  $\sigma^{70}$ -like subunit from peach chloroplast may also explain why only one initiation site is observed *in vivo*, although theoretically the rolling circle replication of PLMVd does not require a site-specific initiation because concatemers are precisely processed into monomeric units by hammerhead self-cleavage. Work is in progress to assess the essential features of the P11 domain, and to shed light on the mechanism of initiation. The use of *E. coli* RNAP as a model enzymatic synthesis assay should be a fundamental building block for these studies.

## **MATERIALS AND METHODS**

RNA samples were isolated from leaves harvested from both PLMVd infected and healthy peach cultivars using the RNeasy Plant mini kit (Qiagen). The RNA (5  $\mu$ g) was fractionated by electrophoresis through a 5% PAGE gel and Northern blot hybridizations

were performed by successively using the 338 nt PLMVd linear plus and minus strand-specific riboprobes as described previously (6). The 280 nt species was excised from a non-transferred gel, eluted, ethanol precipitated, dried and then analyzed for determination of its 5' end. Primer extension assays were carried out by heating 10  $\mu$ g of RNA for 5 min at 65°C with 1 pmol of  $^{32}$ P-5'-end-labeled oligonucleotide (5'-<sub>291</sub>TGGGCTAAGCCCCACTG<sub>306</sub>-3') in 5 ml of 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM KCl solution, and then quickly snap freezing the reaction by immersion in a -80°C ethanol bath for 2 min. Synthesis was performed by adding avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (4 units; Pharmacia) in 5  $\mu$ l of ice cold, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM DTT, 80 mM KCl, 4 mM dNTP solution to the primer annealed templates and incubating at 42°C for 30 min. The reaction products were then fractionated by 10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and revealed by phosphorimaging.

With the exception of the 152 nt RNA of plus polarity, the synthesis and purification of all of the linear transcripts derived from plasmid pPD1 have been described previously (9). Briefly, plasmid pPD1 contains an insert that includes a dimeric end-to-tail copy of PLMVd flanked by the T3 and T7 promoters for the production of plus and minus polarity transcripts, respectively (Fig. 18A). After digestion of the plasmid with the appropriate restriction enzyme, *in vitro* run-off transcription, DNase (RNase-free) treatment and nucleic acid precipitation, the transcripts were fractionated through a denaturing 5% PAGE gel in 100 mM Tris-borate (pH 8.3), 1 mM EDTA, 7M urea buffer. Bands were detected by UV shadowing, excised, eluted in 500 mM ammonium acetate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution, precipitated, purified by passage through Shephadex G-50 spun columns (Pharmacia), lyophilized and conserved dry at -70°C. For random internal labelling, 50  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]GTP (Amersham Life Science) was added to the transcription reaction. The 152 nt transcripts of plus polarity were synthesized from a DNA template amplified from plasmid pPD1 using the sense 5'-GGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGATTCTGGAAGATGAGGGTGTGC

TAAGCAC<sub>302</sub>-3' and antisense 5'-GGAATTC<sub>86</sub>GGTGGAGGGGCTGAG<sub>72</sub>-3' oligonucleotides as primers (underlined nt indicate T7 promoter and *EcoR* I restriction site, respectively).

Transcription reactions were performed according to the manufacturer's recommended protocol (Pharmacia). Template (1  $\mu$ g) was resuspended in 25  $\mu$ L of 40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 5 mM dithiothreitol (DTT), 5 mg/ml BSA, 1 mM NTP solution containing 50  $\mu$ Ci of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP (i.e. for radioactive reactions), then 3.8 units of *E. coli* RNAP (Pharmacia) were added and the reaction incubated at 37°C for 60 min. In some cases, 1 unit of either the *E. coli* holo- or core-RNAP (Epicentre Technologie) were used in the presence or absence of 1 to 200 units of tagetitoxin (Epicentre Technologie). The reactions were stopped by adding 1 mL of 1M EDTA (pH 8.0), and were then extracted with phenol-chloroform, the nucleic acids ethanol precipitated, washed twice, and dried. The pellets were resuspended in a mixture of 6  $\mu$ L DEPC-treated water and 6  $\mu$ L of formamide dye buffer (i.e. 80% formamide, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1 mg/ml each of xylene cyanol FF and bromophenol blue), and half of the resulting samples fractionated on 12% PAGE gels which were either autoradiographed or exposed to a phosphor screen.



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank D.A. Thompson for providing peach leaves. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to J.P.P. F.C. was the recipient of pre-doctoral fellowships from NSERC. J.P.P. is a Medical Research Council (MRC of Canada) scientist.

**REFERENCES**

1. Flores, R., Di Serio, F., and Hernandez, C. (1997). Viroids: the non-coding genomes. *Semin. Virol.* **8**, 65-73.
2. Symons, R. H. (1997). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2683-2689.
3. Branch, A. D., and Robertson, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450-455.
4. Warrilow D, and Symons, R. H. (1999) Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Arch. Virol.* **144**, 2367-2375.
5. Navarro, J. A., Daros, J. A., and Flores, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* **253**, 77-85.
6. Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J., and 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.
7. Navarro, J. A., Vera, A., and Flores, R. (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of Avocado Sunblotch viroid. *Virology* **268**, 218-225.
8. Pelchat, M., Lévesque, D., Ouellet, J., Laurendeau, S., L vesques, S., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, J., and Perreault, J. P. (2000). Sequencing of peach latent mosaic viroid variants from nine North american peach cultivars shows that this RNA folds in a complex secondary structure. *Virology* **271**, 37-45.
9. Beaudry, D., Bussière, F., Lareau, F., Lessard, C., and Perreault, J. P. (1995). The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.* **23**, 745-752.

10. Pays, E., and Gilmour, R. S. (1981). Specificity of chromatin transcription *in vitro*. Asymmetric transcription of the globin gene by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* **653**, 356-367.
11. Jeong, W., and Kang, C. (1994). Start site selection at lacUV5 promoter affected by the sequence context around the initiation sites. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4667-4672.
12. Dombroski, A. J., Walter, W. A., Record, M. T. Jr, Siegele, D. A., and Gross, C. A. (1992). Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**, 501-512.
13. Mathews, D. E., and Durbin, R. D. (1990). Tagetitoxin inhibits RNA synthesis directed by RNA polymerase from chloroplasts and *Escherichia coli*. *J. Biol.Chem.* **265**, 493-498.
14. Meienhofer, J., and Atherton, E. (1973). Structure-activity relationships in the actinomycins. *Adv. Appl. Microbiol.* **16**, 203-300.
15. Owens, R. A., and Diener, T. O. (1977). Synthesis of RNA complementary to potato spindle tuber viroid using Qbeta replicase. *Virology* **79**, 109-120.
16. Boege, F., Rohde, W., and Sanger, H. L. (1982). *In vitro* transcription of viroid RNA into full-length copies by RNA-dependent RNA polymerase from healthy tomato leaf tissue. *Biosci. Rep.* **2**, 185-194.
17. Rohde, W., Rackwitz, H. R., Boege, F., and Sanger, H. L. (1982). Viroid RNA is accepted as a template for *in vitro* transcription by DNA-dependent DNA polymerase I and RNA polymerase from *Escherichia coli*. *Biosci. Rep.* **2**, 929-939.
18. Navarro, J. A., and Flores, R. (2000). Characterization of the initiation sites of both polarities strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* **19**, 2662-2670.
19. Bussière, F., Ouellet, J., Coté, F., Lévesque, D., and 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. Virology* **74**, 2647-2654.

## Description du travail

L'objectif principal de ce manuscrit était de caractériser les déterminants moléculaires permettant l'initiation de la réplication de PLMVd et la nature de l'enzyme impliquée dans cette étape. Les résultats présentés dans cet article démontrent que les séquences permettant l'initiation de la réplication sont localisées dans la tige contenant les séquences permettant l'adoption de la structure catalytique en *hammerhead*. Par essais d'extension d'amorce, il a été déterminé que le site d'initiation est situé dans la boucle à l'extrémité de cette région hélicoïdale. De plus, il a été démontré que l'ARN polymérase d'*Escherichia coli* pouvait initier spécifiquement la transcription de PLMVd *in vitro*, et que cette initiation était dépendante de la présence de la sous-unité  $\sigma^{70}$ . Étant donné la grande similarité entre cette RNAP et la polymérase chloroplastique PEP (*Plastid-Encoded Polymerase*), nous suggérons donc que cette dernière est l'enzyme impliquée dans la réplication *in vivo* de PLMVd. Ces résultats sont d'une importance capitale puisqu'ils identifient les déterminants majeurs d'une étape cruciale dans le cycle de vie de ce viroïde.

## CHAPITRE 4:

**Caractérisation de la structure secondaire et tertiaire en solution de PLMVd.**

## 4.1. ARTICLE:

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. *Virology*, **74(6)**, 2647-2654.

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

**Implication dans le travail**

J'ai personnellement initié ce projet en mettant aux points les différentes conditions de réaction en débutant les expériences de susceptibilité aux ribonucléases. La détermination de la structure secondaire a été effectuée en grande partie par Dr. Frédéric Bussière et M. Jonathan Ouellet.

**ABSTRACT**

We have investigated the secondary structure of peach latent mosaic viroid (PLMVd) in solution, and present here the first description of the structure of a "branched" viroid in solution. Different PLMVd transcripts of plus polarity were produced using the circularly permuted RNA method and the exploitation of RNA internal secondary structure to position 5' and 3' termini, and studied by nuclease mapping and binding shift assays using DNA and RNA oligonucleotides. We show that PLMVd folds into a complex, branched secondary structure. In general this structure is similar to previous reports based on sequence comparison and computer modelling. The structural microheterogeneity is apparently limited to only some small domains. More importantly, this structure includes a novel pseudoknot that is conserved in all PLMVd isolates and seems to allow folding into a very compact form. This pseudoknot is also found in chrysanthemum chlorotic mottle viroid, suggesting that it is a unique feature of the viroid members of the PLMVd sub-group.

**Keywords:** viroid / RNA structure / RNA organism / catalytic RNA

## INTRODUCTION

Viroids are small (~300 nucleotides), single-stranded, circular RNAs that infect higher plants causing significant losses in the agricultural industry (see refs. 7 and 15 for reviews). Viroids have been classified in two groups (i.e. A and B) based primarily on whether or not they possess five typical structural domains found in the group B viroids (7). Further division among the group B members depends on the sequence and length of the conserved central region (CCR). Viroids that do not possess any kind of sequence and structural similarity with the group B viroids have been classified as belonging to group A. The viroids from this group possess self-cleaving hammerhead motifs that are crucial for their replication via a rolling circle mechanism.

The group A viroids include the avocado sunblotch viroid (ASBVd), the peach latent mosaic viroid (PLMVd) and the chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd) (10). Both PLMVd and CChMVd have been proposed to adopt branched secondary structures (Fig. 20A) instead of the rod-like ones proposed for most viroids, including ASBVd (10). The unusual conformations of PLMVd and CChMVd are supported by their insolubility in 2 M lithium chloride, whereas ASBVd and a number of non-self-cleaving viroids (i.e. the group B viroids) are soluble in this high salt solution (10). In general, secondary structures of viroids are predicted using computer software, and are useful for the formulation of hypotheses on the structure/function relationships of these RNA molecules (4). Characterization of biological structures *in vitro* as well as *in vivo* is obviously more accurate for elucidating the structure/function relationship. The only secondary structure of a viroid that has been extensively studied in solution is that of the potato spindle tuber viroid (PSTVd) (8). This group B species, which was shown to adopt a rod-like shape in solution, is responsible for most of our knowledge on the biology of viroids.

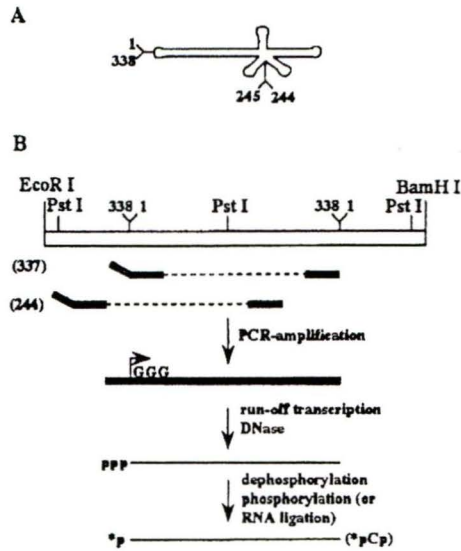
In order to determine the secondary structure of PLMVd (the RNA species that causes peach latent mosaic disease (9)) in solution, we performed nuclease mapping and

oligonucleotide binding shift assays on PLMVd synthesized by *in vitro* transcription. The results confirm that PLMVd folds into a complex, branched secondary structure, and show that it can form a novel pseudoknot.

## MATERIALS AND METHODS

**Synthesis of DNA templates.** DNA templates for *in vitro* transcription of the three different RNA molecules used in this study were synthesized from the pPD1 vector (3). Briefly, this construct possesses two tandemly repeated PLMVd sequences (from the Armking peach cultivar, ref. 9) cloned into the *Pst* I restriction site of pBluescript II KS. The strategy for the production of monomeric PLMVd RNA has been reported previously (2). A first DNA template was amplified from pPD1 with Pwo DNA polymerase (Boehringer Mannheim) using sense (5'-TAATACGACTCACTATAGGGTCAAAAGTTTCGCCGC-3') and antisense (5'-TATGAGTTTCGTCTCATTTC-3') primers for RNA transcripts starting from position 337. A second DNA template was produced using sense (5'-TAATACGACTCACTATAGGGATTCAAACCCGGTC-3') and antisense (5'-GGGTAGACGTCGTAATCC-3') primers for RNA transcripts starting from position 244. The third DNA template used for the production of the mutant harboring the sequence  $_{212}AAAA_{215}$ , was initially prepared from pPD1 using the PCR product generated with the sense primer used for transcripts starting at position 337 with a mutated antisense primer (5'-TTTCTACGTTTTTTACCTGGA-3'; the underlined nucleotides are the mutant ones); and, secondly, using the PCR product generated with a mutated sense primer (5'-TCCAGGTAAAAACGTAGAAA-3') coupled with the antisense primer used for the transcripts starting at position 337. These two PCR products were mixed together and amplified using Taq DNA polymerase in order to produce full sized DNA template, which was then verified by dideoxynucleotide sequencing.





**Fig. 20.** Strategy of synthesis of the PLMVd strands. **A** Schematic representation of the circular PLMVd strand of plus polarity. By convention position 1 was arbitrarily fixed in the left hand loop. **B** Strategy of synthesis of the linear PLMVd strands and their end labelling based on the circularly permuted RNA method. The 5'-end positions of the transcripts used in this work are indicated in parentheses.

**Run-off transcription.** *In vitro* transcription reactions contained unpurified PCR products were performed using 25  $\mu\text{g}$  of purified T7 RNA polymerase (6,16), as described previously (5). The reaction mixtures were fractionated by denaturing 5% polyacrylamide gel electrophoresis (19:1 ratio of acrylamide to bisacrylamide) in buffer containing 90 mM Tris borate, pH 7.5, 7 M urea, and 2 mM EDTA. The reaction products were visualized by UV shadowing, and the bands corresponding to the correct size (338 nt) cut out, the transcripts eluted, passed through a G-50 Sephadex spin column (Amersham Pharmacia Biotech), ethanol precipitated and quantity was determined by spectrophotometry at 260 nm.

**5'- and 3'-end labelling of transcripts.** Transcripts (4  $\mu\text{g}$ ) were dephosphorylated with 0.2 units calf intestinal alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim) and then 5'-end labelled with 30 units T4 polynucleotide kinase (Amersham Pharmacia Biotech) in the presence of 40  $\mu\text{Ci}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (3000 mCi/mmol, Amersham). Transcripts (4  $\mu\text{g}$ ) were 3'-end labelled using 40 units T4 RNA ligase (New England Biolabs) in the presence of 40  $\mu\text{Ci}$  [ $^{32}\text{P}$ ]pCp (3000 mCi/mmol; Amersham). After labelling reaction, the mixtures were separated on denaturing 5% PAGE gels and recovered as described above. The concentration of RNA was determined by Cherenkov counting.

**Nuclease mapping.** Either 5'- or 3'-end labelled PLMVd transcripts (~50 000 cpm) were resuspended in 4  $\mu\text{L}$  of either 10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (low salt) or 20 mM Tris-HCl pH 8.0 / 10 mM  $\text{MgCl}_2$  / 100 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (high salt) solution. The transcripts were then denatured by heating at 65°C for 2 min, and renatured by slow cooling to room temperature. This procedure of denaturation-renaturation was performed prior to all enzymatic reactions unless indicated otherwise in the text. Either RNase T<sub>1</sub> (0.25 units; Amersham Pharmacia Biotech), RNase T<sub>2</sub> (6 units; Gibco BRL), RNase Phy M (0.5 units; Pharmacia), or RNase V<sub>1</sub> (1 unit; Amersham Pharmacia Biotech) were then added (in a final volume of 6  $\mu\text{L}$ ), and the mixtures incubated at either 25°C or 37°C for various times. For the RNase U<sub>2</sub> reactions (0.02 units; Amersham Pharmacia Biotech), the transcripts were resuspended in a buffer containing 20 mM sodium citrate pH 6.0. These mixtures were

incubated at 37°C, and aliquots removed at various times and quenched by the addition of 5  $\mu$ L stop solution. Ribonuclease T<sub>1</sub> digestion was also performed in the presence of 7M urea (at 55°C). Alkaline hydrolysis was performed so as to permit accurate assignment of the cleavage sites. The reaction products were fractionated on either 5%, 8% or 12% denaturing PAGE gels, and then either exposed to a X-ray film, or fixed, dried and exposed to a PhosphorImager screen when quantification was required.

**Oligonucleotide binding shift assays.** RNA oligonucleotides were chemically synthesized using an automated oligonucleotide synthesizer (Keck Biotechnology Resource Laboratory, Yale University), deprotected and gel-purified as described previously (14). Deprotected and purified DNA oligonucleotides were purchased from Gibco-BRL. Each oligonucleotide (5 pmol) was 5'-end labelled using T4 polynucleotide kinase in the presence of an excess of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP as described above, and was purified by phenol-chloroform extraction followed by passage through two Sephadex G-50 spin columns. The quantity of labelled oligonucleotide was determined by Cherenkov (cpm) counting, while the quality was verified by denaturing 20% PAGE. Dried PLMVd transcripts (500 ng) were resuspended in 8  $\mu$ L of a solution containing 10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 1 mM MgCl<sub>2</sub> (low salt). Radiolabelled oligonucleotide (20 000 cpm; 2  $\mu$ L) was added either before or after the transcripts were denatured for 2 min at 65°C, and slowly cooled to 4°C to renature them. The mixtures were then incubated at 4°C for at least 60 min prior to the addition of 2  $\mu$ L of agarose-dye (30% glycerol [vol:vol], 1 mM EDTA pH 8.0, 0.25% xylene cyanol and bromophenol blue) and analysis on 2.5% agarose gels. The resulting gels were fixed, dried and exposed to X-ray films.

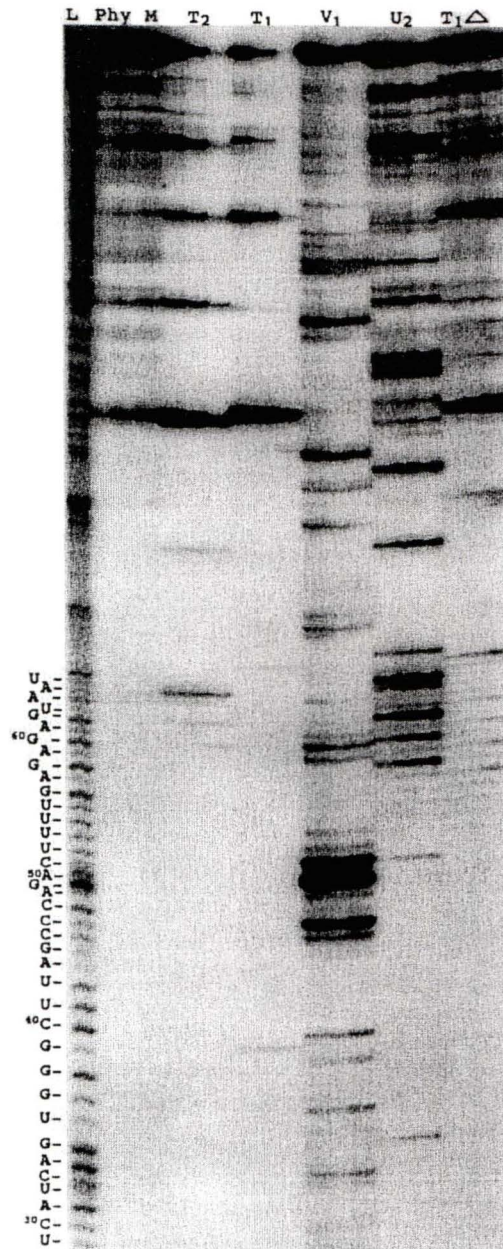
## RESULTS

**RNA synthesis strategy.** In order to probe the secondary structure of a PLMVd sequence variant isolated from the peach Armking cultivar (also named french variant; ref. 9), a unique  $^{32}\text{P}$ -labelled phosphate has to be introduced at an end of the RNA strand. Initially, we tried to label PLMVd monomeric strands produced by the self-cleavage of linear concatamers. However, these RNA strands were inefficiently  $^{32}\text{P}$ -labelled at both the 5'- and 3'-ends, suggesting that both extremities were located inside the molecule. Consequently, we developed a second strategy for the production of full-length PLMVd molecules that can be efficiently labelled at both ends (2). This strategy is based on the circularly permuted RNA method (11), and on the exploitation of RNA internal secondary structure to position the 5' and 3' termini such that they will be located in single-stranded regions which are easily accessible for efficient end-labelling (Fig. 20B). In this approach, non-radioactive, full length PLMVd transcripts possessing a 5'-triphosphate (at position 337) and 3'-hydroxyl (at position 336) were produced and further purified. Note that positions 336 and 337 are located in the left-end loop (Fig. 20). The only modification as compared to the wildtype sequence is the introduction of three guanosines at the 5'-end in place of the  $_{337}\text{UCA}_1$  so as to allow for efficient transcription. A second PLMVd-derived RNA molecule whose 5'-end is located at position 244 was produced with the appropriate oligonucleotides according to the same procedure (Fig. 20). Since positions 244-246 correspond to three guanosines in the wildtype sequence, no mutation was required in order to favor *in vitro* transcription. This transcript will confirm the results from the previous construct, and more specifically will allow study of the secondary structure of the left hand loop, including positions 336-337 where the other construct was opened.

**Nuclease probing.** The structure of the plus polarity PLMVd strands were probed using various nucleases which cleave 3' of different nucleotides: i. ribonuclease (RNase) T<sub>1</sub>, which preferentially cleaves single-stranded guanosines; ii. RNase U<sub>2</sub>, which

preferentially cleaves single-stranded adenosines; iii. RNase Phy M, which preferentially cleaves single-stranded adenosines and uracils; iv. RNase T<sub>2</sub>, which preferentially cleaves single-stranded nucleotides regardless of base identity; and, v. RNase V<sub>1</sub>, which preferentially cleaves double-stranded nucleotides regardless of base identity. In addition, some portions of the molecules were probed with the *Bacillus cereus* RNase, which has a preference for single-stranded cytosines and uracils, in order to confirm the data obtained with the other enzymes. The reaction conditions for each nuclease were optimized prior to the structural probing. This optimization was required as no carrier (i.e. tRNA) was added to the reactions so as to avoid any structural interference with the PLMVd strands. Regardless of whether the RNase mapping was performed at 22°C or 37°C, no significant differences were detected in the cleavage pattern.

Prior to the nuclease probing, the transcripts were treated in several ways in order to favor structural homogeneity. For example, they were denatured at 65°C and then renatured by slow cooling to either room temperature or 4°C; or, they were partially denatured at 85°C (always in the absence of magnesium to avoid self-cleavage) and then renatured at room temperature in a two step procedure (i.e. 2 min at 55°C followed by 2 min at room temperature) prior to addition of the magnesium. With the exception of the observation that incubation at 85°C stimulates self-cleavage of the transcripts, the various treatments all produced the same digestion pattern (data not shown). Therefore, we decided to use the simplest treatment consisting of a 2 min denaturation at 65°C followed by slow cooling to room temperature. During nuclease hydrolysis experiments aliquots were removed from the reaction at different times, stopped and fractionated on 5%-12% polyacrylamide sequencing gels. Figure 21 shows a typical autoradiogram for 5'-end-labelled PLMVd transcripts starting at position 337, under low salt conditions. Under these electrophoretic conditions the region from positions 29 to 66, which corresponds to a portion of the upper strand of the left arm and the first hairpin on the top (i.e. P11 and P1 stems, respectively, Fig. 22), was revealed.



**Fig. 21.** Autoradiogram of a PLMVd nuclease mapping assay under low salt conditions analyzed on a 12% PAGE gel. The nucleases used are indicated at the top. L represents the alkaline hydrolysis ladder and T<sub>1</sub>Δ represents the RNase T<sub>1</sub> reaction incubated at 55°C. Aliquots were removed at 30 sec, 1 min and 2 min (left to right) for each enzyme. The PLMVd sequence for the region from U<sub>29</sub> to U<sub>66</sub> is shown at the left.

Nucleotides 29 to 66 are primarily hydrolyzed by RNase V<sub>1</sub>, indicating that they are in a double-stranded region.

At least the first 180 nucleotides from both the 5'-<sup>32</sup>P- and 3'-<sup>32</sup>pCp-labelled transcripts were resolved using different migration conditions (e.g. by varying the migration times and acrylamide concentrations). The relative intensity of all radioactive bands was scored in comparison to the most intense bands found in each reaction. Scores varying from 1 to 4 (with 4 being the most intense) were attributed to each nucleotide, and then a relative intensity average at each nucleotide for each nuclease was calculated (Table 2). In some cases, more than eight experiments were performed in order to ensure the reproducibility of the results. The two RNA constructs gave similar results with the exception that nuclease accessibility was greater close to their respective ends. For example, the construct starting at position 337 indicated that both ends were single-stranded and highly accessible; while the construct starting at 244 confirmed the presence of the left-hand loop, although the intensity of the bands was less.

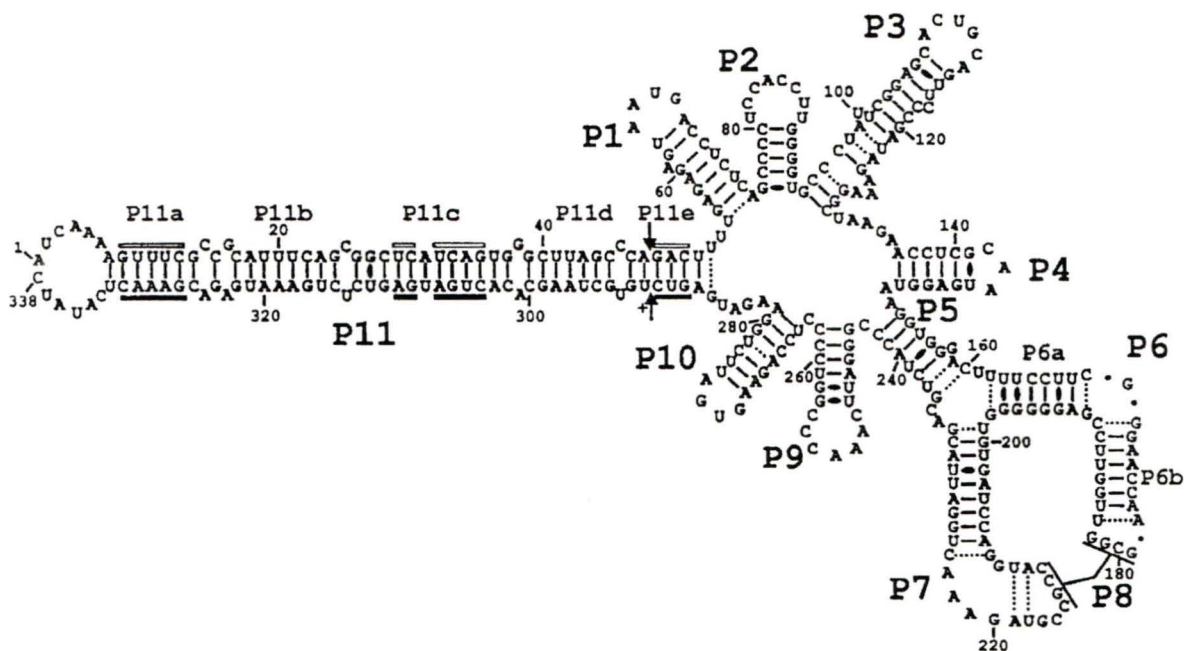
**Description of the proposed secondary structure.** In order to facilitate the description of the secondary structure (Fig. 22) we have numbered the helices as if this circular RNA had been synthesized from position 1, which by convention is located in the left hand loop, and numbered the stems in the order of appearance. If two helices have the potential to stack, but are separated by internal loop(s), the same number was given to both stems and they are then differentiated by a letter (e.g. P11a-e stems, see Fig. 22).

In general this structure is similar to that based on sequence comparison and computer modelling (1,3). According to this secondary structure, 86 (25.4 %) and 252 (74.5 %) nucleotides are located in single- and double-stranded regions, respectively, when GU wobble basepairs and Watson-Crick basepairs proven to exist in high salt conditions are considered (see below). This structure includes 11 helices (P1-P11), with the P11 stem including four consecutive stems (P11a to P11d) that form a left-hand rod-like domain that

Table 2: Compilation of band intensity observed by Rnase mapping

nt				nt				nt				nt				nt				nt														
T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>		T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>		T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>		T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>		T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>		T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>		T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>		T <sub>1</sub>	PhyM	V <sub>1</sub>				
U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>			U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>			U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>			U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>			U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>			U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>			U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>			U <sub>2</sub>	T <sub>2</sub>					
1	A	3	4	3	61	A	3	1	121	A	1	2	181	G	1	2	241	C	3	301	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
2	U	4	3	62	G	1	1	1	122	U	1	1	2	182	G	1	3	242	C	2	302	C	2	2	2	2	2	2	2	2	2			
3	C	3	3	63	U	1	1	1	123	A	2	1	1	2	183	U	1	2	2	1	2	303	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
4	A	3	3	4	64	A	3	1	1	124	G	1	1	2	184	U	2	1	2	2	2	304	C	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
5	A	3	3	4	65	A	3	1	3	1	125	A	1	2	2	1	185	G	1	1	2	305	U	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
6	A	3	3	3	66	U	2	1	1	1	126	A	3	1	2	1	186	G	3	3	3	306	G	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
7	A	2	1	2	1	67	G	2	1	1	127	A	2	1	2	1	187	U	3	3	3	307	A	1	3	3	3	3	3	3	3	3		
8	G	1	3	68	A	3	1	1	1	128	G	1	1	1	1	188	U	1	2	2	2	308	U	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
9	U	1	3	69	C	2	2	2	129	G	1	2	2	2	189	C	2	2	2	2	2	309	G	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
10	U	1	4	70	C	2	2	2	130	C	2	2	2	1	190	C	2	2	2	2	1	310	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
11	U	1	4	71	U	1	2	2	131	U	2	1	2	1	191	G	2	1	2	2	2	311	G	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
12	C	4	72	C	2	2	2	2	132	A	2	2	2	1	192	A	1	2	2	2	2	312	U	1	2	2	2	2	2	2	2	2		
13	G	1	1	3	73	U	1	3	133	A	1	2	2	1	193	G	1	2	2	2	2	313	C	1	1	2	2	2	2	2	2	2		
14	C	3	2	74	C	1	1	1	134	G	2	1	1	1	194	G	3	3	3	3	3	314	U	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
15	C	2	2	75	A	1	3	3	135	A	2	1	1	1	195	G	3	3	3	3	3	315	C	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
16	G	2	3	1	76	G	2	2	136	A	1	2	2	2	196	G	2	2	2	2	2	316	U	1	2	2	2	2	2	2	2	2		
17	C	1	2	77	C	2	2	2	137	C	4	4	4	4	197	G	1	1	2	2	2	317	G	1	2	2	2	2	2	2	2	2		
18	A	1	1	2	78	C	2	2	138	C	4	4	4	4	198	G	2	2	2	2	2	318	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2		
19	U	1	3	79	C	2	2	2	139	U	3	3	3	3	199	U	1	2	2	2	2	319	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
20	U	1	3	80	C	2	2	2	140	C	2	2	2	2	200	G	1	2	2	2	2	320	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2		
21	U	2	1	3	81	U	1	1	1	141	G	3	2	2	2	201	U	1	3	3	3	321	U	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
22	C	1	3	82	C	2	2	2	142	C	3	2	2	2	202	G	3	3	3	3	3	322	G	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
23	A	1	1	3	83	C	3	1	1	143	A	4	4	4	4	203	A	2	2	2	2	323	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
24	G	4	84	A	3	1	1	1	144	A	4	4	4	4	204	U	4	4	4	4	4	324	G	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
25	C	2	85	C	2	2	2	2	145	U	1	4	3	1	205	C	4	4	4	4	4	325	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
26	G	1	2	86	C	2	2	2	146	G	1	2	2	2	206	C	4	4	4	4	4	326	C	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
27	G	3	87	U	1	1	1	1	147	A	1	2	3	3	207	A	1	1	3	3	3	327	G	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
28	C	3	88	U	1	1	1	1	148	G	2	2	2	2	208	G	1	1	2	2	2	328	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2		
29	U	1	1	2	89	G	1	1	1	149	G	1	2	2	2	209	G	2	1	2	2	329	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
30	C	1	2	90	G	2	2	2	150	U	1	2	2	2	210	U	1	2	2	2	2	330	A	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
31	A	1	2	91	G	3	3	3	151	A	2	1	2	2	211	A	2	2	2	2	2	331	C	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
32	U	1	92	G	1	2	2	2	152	A	1	2	1	2	212	C	2	2	2	2	2	332	U	1	2	2	2	2	2	2	2	2		
33	C	2	93	U	2	2	2	2	153	G	1	1	2	2	213	C	3	3	3	3	3	333	C	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
34	A	3	94	G	2	2	2	2	154	G	2	2	2	2	214	G	2	1	3	3	3	334	A	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
35	G	1	2	95	C	1	2	2	155	U	1	2	2	2	215	C	2	2	2	2	2	335	U	1	4	4	4	4	4	4	4	4		
36	U	2	96	C	1	2	2	2	156	G	2	2	2	2	216	C	1	1	2	2	2	336	A	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
37	G	1	97	C	1	2	2	2	157	G	2	1	2	2	217	G	4	1	3	3	3	337	U	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
38	G	1	1	2	98	U	1	1	1	158	G	2	2	2	2	218	U	3	4	3	3	338	C	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
39	G	2	1	99	A	2	1	1	1	159	A	2	3	1	2	219	A	1	4	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
40	C	4	100	U	1	1	1	1	160	C	1	2	2	2	220	G	4	1	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
41	U	2	101	U	2	2	2	2	161	U	1	2	2	2	221	A	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
42	U	2	102	C	3	3	3	3	162	U	2	2	2	2	222	A	3	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2		
43	A	1	103	G	1	2	2	2	163	U	1	1	1	1	223	A	2	2	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
44	G	2	104	G	1	2	2	2	164	U	2	1	2	2	224	C	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
45	C	3	105	A	1	2	2	2	165	C	2	2	2	2	225	U	1	1	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
46	C	1	106	G	1	2	2	2	166	C	2	2	2	2	226	G	4	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
47	C	3	107	C	2	2	2	2	167	U	2	2	2	2	227	G	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
48	A	2	108	A	2	1	3	3	168	U	1	2	2	2	228	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
49	G	4	109	C	4	4	4	4	169	C	1	1	1	1	229	U	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
50	A	1	3	110	U	3	4	4	170	G	4	2	4	4	230	U	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
51	C	1	3	111	G	4	4	4	171	G	3	1	2	1	2	231	A	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
52	U	2	112	C	4	4	4	4	172	G	1	1	2	2	232	C	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
53	U	1	2	113	A	2	2	2	173	A	1	1	2	2	233	G	3	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
54	U	1	1	1	114	G	2	1	2	174	A	1	1	2	2	234	A	2	1	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
55	U	1	1	1	115	U	1	2	1	175	C	3	3	3	3	235	C	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
56	G	1	1	2	116	U	1	2	1	176	C	2	2	2	2	236	G	2																





**Fig. 22.** PLMVd sequence and the proposed secondary structure based on nuclease mapping under low salt conditions. The helix numbering has been arbitrary fixed as if the circular RNA was synthesized from position 1, and follows their order of appearance. GU wobble basepairs are represented with black ovals, while Watson-Crick basepairs which appeared to be either unstable, or for which single- and double-strand coexistence is proposed under the conditions used, are illustrated with dotted lines. The basepairs of the P8 pseudoknot were not included in order to simplify the illustration.

contains the hammerhead sequences of both the plus and minus polarities. While most of the helices correspond to hairpins (i.e. stem-loop structures), the P5 stem is an internal helix which acts as a bridge closing the molecule. The proposed structure includes 17 basepairs illustrated with dotted lines indicating that it is not unequivocal whether or not the two nucleotides in question are single stranded or basepaired in the presence of low salt (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>). In fact, both forms may co-exist. In order to verify this hypothesis, and to investigate potential structural transitions caused by higher ionic strengths, nuclease probing experiments were also performed in buffer containing 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 mM NH<sub>4</sub>Cl (raw data not shown). In general, the results were identical to those reported in Table 2, regardless of the difference in the processing of each enzyme. No structural transition was detected. The uncertain basepairs (i.e. dotted lines in Fig. 22) in the middle of the P3 stem, in the bottom of the P5 stem, in the P6a stem and in the P10 stem appeared to be closed, eliminating the possibility of the co-existence of single- and double-stranded structures in higher salt conditions. However, the uncertain basepairs could also be due to the steric hindrance of RNases because of their large size. Thus, the proposed secondary structure appears to remain identical under both salt conditions tested.

*The novel P8 pseudoknot.* The proposed secondary structure for PLMVd includes a novel pseudoknot, the P8 stem. In previous secondary structures (1,3,5,9) nucleotides <sub>179</sub>GCGG<sub>182</sub> (loop P6b) and <sub>209</sub>GUACCGCCGUAGAAA<sub>223</sub> (loop P7) were proposed to form single stranded regions. In this scenario it is expected that the RNases with specificities for single-stranded nucleotides should give hydrolysis products, while RNase V<sub>1</sub> should not. In the structure proposed here, nucleotides <sub>179</sub>GCGG<sub>182</sub> (loop P6b) and <sub>212</sub>CCGC<sub>215</sub> (loop P7) basepair to form a pseudoknot (Fig. 23A). We observe RNase V<sub>1</sub> (specific for double-stranded regions) to produce several cleavage products in these regions, while both RNase T<sub>1</sub> (specific for single-stranded G) and T<sub>2</sub> (specific for single-stranded regions) were almost unable to hydrolyse the phosphodiester backbone of these bases. In addition, nucleotides <sub>210</sub>UA<sub>211</sub> and <sub>218</sub>UA<sub>219</sub> of the P7 loop are proposed to basepair together. These results

clearly demonstrate that the P7 loop (positions 209 to 224) appears to be highly structured, with the exception of the  $_{220}\text{GAAA}_{223}$  loop (see Table 2 and Fig. 23A).

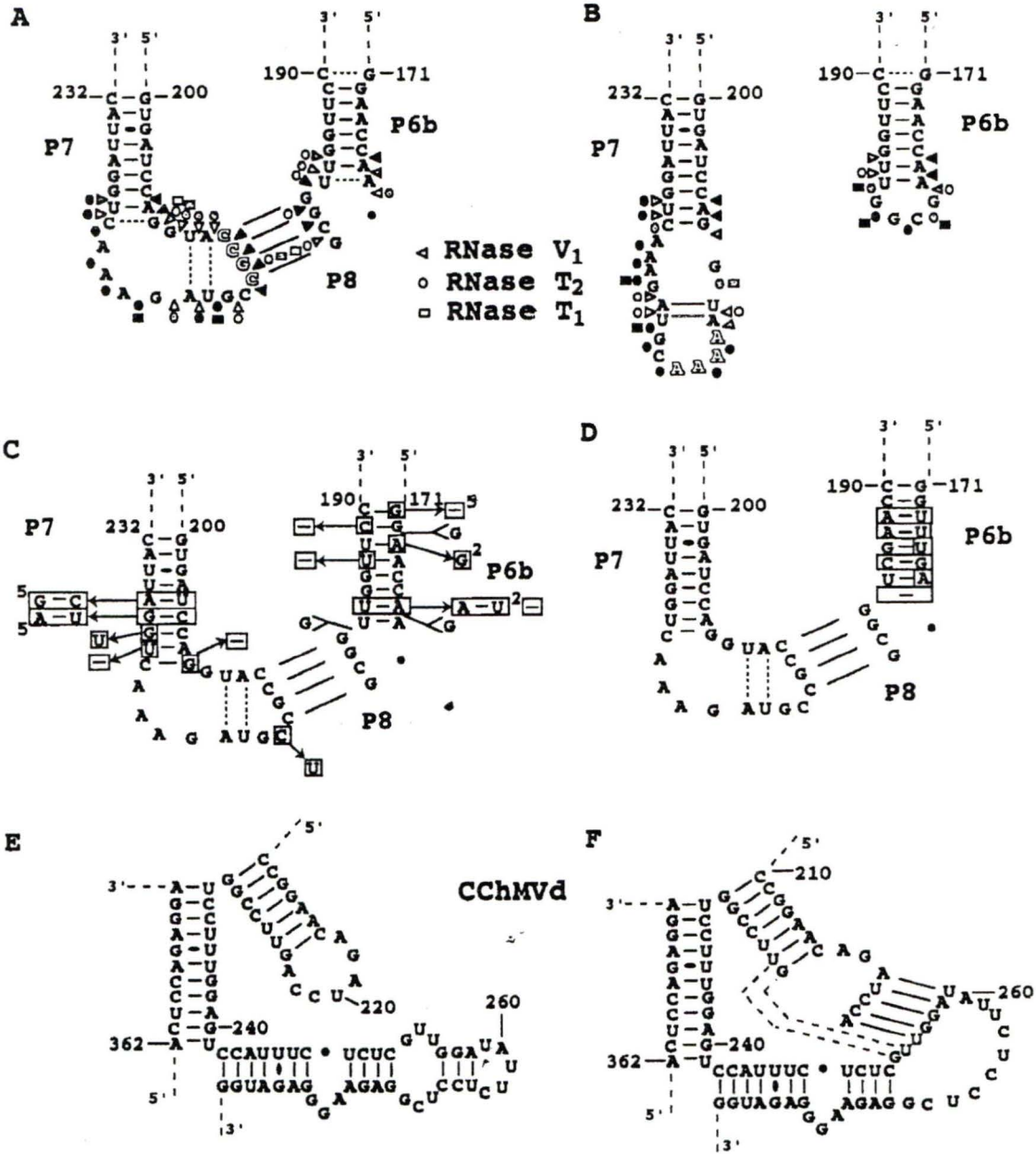
In order to support the presence of the P8 pseudoknot, a mutant PLMVd transcript was synthesized and nuclease mapped (Fig. 23B). In contrast to the wildtype sequence, which includes the sequence  $_{212}\text{CCGC}_{215}$  in the P7 loop, the mutant possesses the sequence  $_{212}\text{AAAA}_{215}$ . We chose to introduce four adenines because the hydrolysis pattern with the RNase Phy M was the clearest as compared to other nucleases, except RNase T<sub>1</sub>. With this transcript, the RNase V<sub>1</sub> did not hydrolyze either nucleotides  $_{212}\text{AAAA}_{215}$  or  $_{179}\text{GCGG}_{182}$ ; whereas the four adenines at positions 212 to 215 were readily hydrolyzed by RNase T<sub>2</sub>, and nucleotides  $_{179}\text{GCGG}_{182}$  were readily hydrolyzed by both RNase T<sub>2</sub> and T<sub>1</sub>. In addition, we observed differences in the hydrolysis patterns of nucleotides  $_{210}\text{UA}_{211}$  and  $_{218}\text{UA}_{219}$ , suggesting a stronger base-pairing in the mutant transcript (Fig. 23B). The latter difference is probably due to the fact that the absence of the pseudoknot reduced the constraint (i.e. stress) on the P7 loop thereby favoring formation of the two basepairs. With the exception of the P8 pseudoknot region, the mutant gave a digestion pattern similar to that of the wildtype transcript.

The base composition of this four basepair pseudoknot is perfectly conserved among all PLMVd variants (Fig. 23C and D; ref. 1,13). This is an indirect proof of the existence of the P8 pseudoknot, although covariation would have been more conclusive. Nucleotide variations were observed on both sides of the pseudoknot, but did not affect its length. Covariations are observed at the bottom of the P6b and P7 stems. The perfect conservation of the sequence forming the pseudoknot (i.e. four ordered GC basepairs) is probably required for formation of a helix in this stretched region of the molecule. It is also plausible that the base conservation has a biological relevance such as binding to a host macromolecule. Surprisingly, a similar pseudoknot may be formed by CChMVd, another member of the PLMVd sub-group (Figure 23E and F). According to the structural similarities between PLMVd and CChMVd (13), a pseudoknot may be formed between the P6 and P7 loops. The

presence of this CChMVd pseudoknot prevents formation of 3 basepairs in the P7 stem, but it adds 5 basepairs resulting in a net of two additional basepairs which stabilize the structure (Fig. 23E and F).

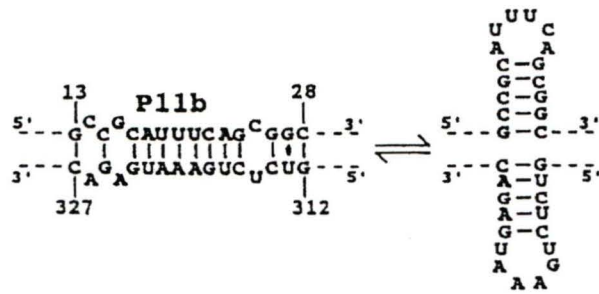
*Alternative structures.* Based on sequence comparisons it was proposed that stem P11b and the adjacent nucleotides on both sides may adopt a slightly less stable, in terms of energy, alternative structure corresponding to the hammerhead hairpin II on both strands (Fig 24; ref. 1). Although nuclease probing shows stem P11b to be as proposed in figure 22 for most RNA molecules, we did note that RNase Phy M hydrolyzed after the A and U in the  $_{18}\text{AUUUCA}_{23}$  and  $_{316}\text{UAGAAU}_{321}$  stretches, albeit at reduced levels (Table 2). One way to reconcile these results is to propose that the RNA strands adopt both structures, but strongly prefer the most stable one which allows for the stacking of all P11 sub-helices.

The presence of a pseudoknot formed by nucleotides of the left-handed loop and the P1 loop, specifically between the sequence  $_{337}\text{UCAU}_2$  and  $_{65}\text{AUGA}_{68}$ , has been suggested previously (1). While the RNA construct with the 5'-end at position 337 does not allow observation of the formation of this pseudoknot, the second construct with the 5'-end at position 245 should. The nuclease mapping results with this RNA construct suggest that both loops are located in single-stranded regions, and, therefore, the presence of this potential pseudoknot is not supported under the conditions tested (Table 2). However, sequence analysis of different PLMVd isolates shows that this pseudoknot may be extended 5 or 6 basepairs in other variants, and that the stability of this motif is related to the pathogenicity of the viroid (1). Thus it seems that this pseudoknot is not found in all PLMVd sequence variants, and consequently it maybe related to an unessential function of the viroid such as its pathogenicity (1).



**Fig. 23.** Characterization of the P8 pseudoknot and surrounding region. **A** and **B** are nuclease mapping of the wildtype ( $_{212}\text{CCGC}_{215}$ ) and mutant ( $_{212}\text{AAAA}_{215}$ ) PLMVd transcripts. The mutated bases are shadowed. Only results with RNases  $V_1$ ,  $T_1$  and  $T_2$  are shown. White, dotted and black forms indicate weak, intermediate and strong cleavage, respectively. **C** and **D** are nucleotide variations observed in all known natural PLMVd isolates, as of August 1st, 1999 (13). **C** includes the sequences of 62 variants, while **D** is the sequence of a PLMVd isolated from Hardired cultivar (i.e. Hd6, ref. 13) for which most of the P6b stem is different. Differences with the sequence characterized in this study are boxed. Uppercase numbers indicate the number of PLMVd variants which includes this mutation when it occurs more than once. **E** and **F** are the sequences and proposed secondary structures of the corresponding region of CChMVd. **E** Secondary structure as proposed previously (10). **F** Secondary structure proposed here that includes the P8 pseudoknot. Dotted lines are potential additional basepairs extending the pseudoknot.

**Additional support from binding shift assays.** Concurrent with the nuclease mapping experiments, oligonucleotide binding shift assays were performed with wildtype PLMVd transcripts starting at position 337. Trace amounts of 5'-end labelled DNA or RNA oligonucleotides were incubated in the presence of a large excess of PLMVd transcripts under low salt conditions, and the mixtures fractionated on native agarose gels. The oligonucleotides were added either before or after the transcripts were denatured at 65°C and renatured by slow cooling to 4°C. Addition of the oligonucleotide prior to denaturation-renaturation should favor binding to the transcript. Among the DNA oligonucleotides tested, trace amounts (> 0.1%) of PLMVd-oligo complexes were detected with D33-48 and D94-109 only when they were added prior to renaturation (Table 3). These two oligonucleotides correspond to one strand of the P11c-e stem and the P3 stem, respectively, and most probably hybridize to the complementary PLMVd strands. In contrast, the D39-58 oligonucleotide complementary to P11-d and -e and a portion of P1 stem produced no oligonucleotide binding, indicating that this region is tightly folded (Table 3). Oligonucleotides D153-171 and D205-224 complementary to the P5-P6 stems and the P7 stem-loop structures, respectively, hybridized with the PLMVd transcripts. Trace amounts of D153-171 was shown to hybridize with transcripts regardless of when it was added to the mixture, indicating that this region was slightly accessible to the oligonucleotide (Table 3). In contrast, D205-224 was predominantly found to hybridize when it was present during the denaturation-renaturation, whereas only trace amounts were found to hybridize when it was added after the denaturation-renaturation (Table 3). This suggest that the oligonucleotide hybridizes poorly when added to stably folded PLMVd, thereby supporting the presence of the P8 pseudoknot. The specificity of hybridization for oligonucleotides D153-171 and D205-224 was verified by RNase H hydrolysis (data not shown).



**Fig. 24.** Alternative structure including the hairpin II of the hammerhead motifs.



Shorter RNA oligonucleotides were also tested in order to investigate the accessibility of short PLMVd sequences (Table 3). Oligonucleotide R77-83, which is complementary to a portion of the P2 stem-loop, constitutes a negative control, and produced no complex. These results were expected since nuclease mapping clearly indicated the presence of this stem. Oligonucleotide R130-135 hybridized efficiently to the PLMVd transcripts regardless whether it was added before or after the denaturation-renaturation, supporting the hypothesis that the small region between stems P3 and P4 is single-stranded. A short RNA oligonucleotide (R212-216, 5-mer), corresponding to the P7 loop sequence involved in formation of the P8 stem did not bind to the PLMVd transcripts, supporting the presence of the stable pseudoknot. In contrast, oligonucleotide R212-223 (12-mer) encompassing most of the P7 loop hybridized, indicating that it has the ability to unfold the P8 pseudoknot. DNA and RNA oligonucleotide binding shift assays were also performed under different salt conditions (i.e. high salt) and different magnesium concentrations. With the exception of small differences in the binding affinity of some oligonucleotides, the results were similar regardless of the conditions used. Thus, the binding shift assays support the PLMVd secondary structure proposed with the data from the nuclease mapping experiments.

TABLE 3. Binding shift assays

Oligonucleotide <sup>a</sup>	Length (nt)	Polarity <sup>b</sup>	Hybridization <sup>c</sup>	
			Before	After
D33-48	16	S	+	-
D39-58	20	AS	-	-
D94-109	15	S	+	-
D153-171	19	AS	+	+
D205-224	20	AS	+++	+
R77-83	7	AS	-	-
R130-135	6	AS	++	++
R212-216	5	AS	-	-
R212-223	12	AS	++	+

<sup>a</sup> In the oligonucleotide designations, R and D indicate RNA and DNA natures, respectively, and the numbers correspond to positions on the PLMVd sequence (Fig. 3).

<sup>b</sup> Oligonucleotide sequences are either sense (S) or antisense (AS) (complementary).

<sup>c</sup> Symbols indicate proportion of shifted oligonucleotide, as follows: -, 0; +, >1%; ++, 1 to 10%; and +++, >10%. Oligonucleotides were added to the mixtures before or after the denaturation-renaturation of the transcripts.

## DISCUSSION

**Structural homogeneity of the transcripts.** Nuclease mapping and oligonucleotide binding shift assays confirmed that PLMVd folds into a branched secondary structure in solution. The nuclease mapping data from the two transcripts (i.e. wildtype transcripts starting either at position 377 or at position 244) used here agreed perfectly except for near the termini of the RNA molecules. Clearly both transcripts fold into a similar structure. This conclusion is supported by data from lead-induced cleavage experiments at pH 7.0 with both these transcripts and the  $_{212}AAAA_{215}$  mutant (12). The patterns produced on PAGE gels by lead-ion hydrolysis were similar for all three RNA transcripts, clearly suggesting that they are folded in a similar manner (data not shown). The only important difference in the cleavage patterns of these three transcripts was that the  $_{212}AAAA_{215}$  mutant's P6b and P7 loops were efficiently hydrolyzed, while those of wildtype sequence possessing the P8 pseudoknot and the basepairs  $_{210}UA_{211-218}UA_{220}$  were not. The different results presented here support the hypothesis that the PLMVd transcripts characterized in this report fold into similar structures.

**PLMVd structure in solution.** Complete nuclease mapping of RNA molecules longer than 100 nucleotides in length is limited to a few examples. One of these is the group B viroid PSTVd, which was unambiguously shown to fold into a rod-like structure in solution (8). In this report we use nuclease mapping, combined with oligonucleotide binding shift assays, to show that PLMVd adopts a complex, branched secondary structure in solution. In general this structure is similar to that based on sequence comparison and computer modelling (1,13), having 74.5% of its nucleotides basepaired. Structural microheterogeneity seems to be limited to small domains including the hammerhead hairpin II and the P8 pseudoknot, the latter of which adopts primarily one structure with only a small proportion (i.e. or trace amounts) being observed to fold into alternative structures (see Results section). The use of low and high salt buffers allowed us to demonstrate that some

basepairs are stabilized in the latter conditions. For example, inside the P3 stem three basepairs were evident under high salt conditions, while under low salt conditions these basepairs seem to be formed in only a portion of the RNA molecules.

Based on the results presented here, we believe that the PLMVd structure includes the novel P8 pseudoknot. This pseudoknot also appears to be present in CChMVd, suggesting that it is a unique feature of the viroid members of the PLMVd sub-group. The structural similarities between PLMVd and CChMVd, including the presence of this pseudoknot, may help to explain why these viroids are insoluble in 2 M lithium chloride while all other viroids proposed to adopt a rod-like structure are soluble. The branched secondary structures of PLMVd and CChMVd, in conjunction with the presence of the P8 pseudoknot, produce a compact structure that is probably the biochemical basis of this observation.

The proposed structure for PLMVd is the most stable one adopted under the conditions used. However, it must be remembered that the most stable structure is not necessarily the biologically active structure. For example, hammerhead structures are crucial for self-cleavage during the rolling circle replication of PLMVd, but are not formed in the most stable PLMVd structure. Furthermore, host protein(s) may interact with PLMVd and alter its folding. Thus, a host protein may be involved in formation of the proposed pseudoknot between the P1 and P11 loops (1), and in the formation of another putative pseudoknot involving the P1 stem and the single stranded domain between the P10 and P11 stems (13), thereby explaining why these structural motifs were not observed in this structure. Conversely, the P8 pseudoknot, whose sequence is highly conserved among all PLMVd variants, is most likely to be essential in the PLMVd life cycle.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was sponsored by a grant from Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to J.P.P. F.B. and F.C. were the recipients of NSERC studentships. J.P.P. is a Medical Research Council (MRC) of Canada scholar.

**REFERENCES**

1. Ambros, S., Hernandez, C., Desvignes, J.C. and Flores, R. (1998) Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: Implication of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies. *J. Virol.*, **72**, 7397-7406.
2. Beaudry, D. and Perreault, J.P. (1995) An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3064-3066.
3. Beaudry, D., Bussière, F., Lareau, F., Lessard, C. and Perreault, J.P. (1995) The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 745-752.
4. Bussière, F., Lafontaine, D. and Perreault, J.P. (1995) Compilation and analysis of viroid and viroid-like RNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1793-1798.
5. Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, L.J. and 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.
6. Davanoo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2035-2039.
7. Flores, R., Di Serio, F. and Hernandez, C. (1997) Viroids: The noncoding genomes. *Semin. Virol.*, **8**, 65-73.
8. Gast, F.U., Kempe, D., Spieker, R.L. and Sängler, H.L. (1996) Secondary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and sequence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence for central non-canonical base-pairs, large A-rich loops, and a terminal branch. *J. Mol. Biol.*, **262**, 652-670.

9. Hernandez, C. and Flores, R. (1992) Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3711-3715.
10. Navarro, B. and Flores, R. (1997) Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11262-11267.
11. Nolan, J.M., Burke, D.H. and J.P. Perreault (1993) Circular permuted tRNAs as specific photoaffinity probes of ribonuclease P RNA structure. *Science*, **261**, 762-765.
12. Ouellet, J. and J.P. Perreault. (1999) unpublished data.
13. Pelchat, M., Lévesque, D. Ouellet, J. Laurendeau, S., Lévesque, S., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, L.J. and Perreault, J.P. (1999) unpublished data.
14. Perreault, J.P. and Altman, S. (1992) Important 2'-hydroxyl groups in model substrates for M1 RNA, the catalytic subunits of RNase P from *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, **226**, 399-409.
15. Symons, R.H. (1997) Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2683-2689.
16. Zawadski, V., and Gross, H.J. (1991) Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1948.

## Description du travail

L'objectif principal de ce travail était d'étudier les éléments structuraux de PLMVd en solution. Les résultats montrent l'existence d'une structure secondaire relativement branchée et la formation d'un pseudo-noeud, reliant ainsi le viroïde dans une structure tertiaire. De plus, plusieurs caractéristiques structurales de PLMVd semblent être retrouvées chez CChMVd, un autre membre de la famille des *Awsunviroidae*. En résumé, nous avons observé pour la première fois une organisation structurale potentiellement conservée chez des viroïdes appartenant à cette famille.



## CHAPITRE 5:

**Études des mécanismes de pathogenèse de PLMVd.**

## 5.1. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS:

**Fabien Côté** et Jean-Pierre Perreault

**Mise en contexte:** J'ai effectué durant mes études graduées une panoplie d'expériences visant à vérifier certaines hypothèses par rapport aux mécanismes de pathogenèse de PLMVd. Ces expériences n'ont pas permis de conclure en faveur de l'utilisation de l'un de ces mécanismes mais les résultats obtenus laissent place à la spéculation. Un survol général de ces résultats a été fait dans le chapitre de livre mis en annexe (Annexe 2). Ceux-ci seront donc analysés et discutés plus minutieusement dans cette section.

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

**Implication dans le travail**

J'ai effectué la totalité des expériences décrites dans cette section.

## 1. ESSAIS DE TRADUCTION

### Introduction

Une des premières hypothèses à avoir été proposées concernant les mécanismes de pathogenèse des viroïdes a été que ceux-ci coderaient pour une ou des protéine(s) responsable(s) de l'apparition des symptômes chez les plants infectés. Dans le but de vérifier si cette hypothèse était valable avec PLMVd, nous avons cherché la présence de cadres de lecture ouverts (ORF) potentiels chez ce dernier. Chaque polarité de ce dernier possède de 5 à 7 ORF dont les longueurs varient de 2 à 28 acides aminés (aa). L'étape suivante a été de vérifier la capacité des transcrits de PLMVd à agir comme matrices pour la traduction. Les résultats obtenus suggèrent que PLMVd ne semble pas coder pour aucune protéine.

### Matériels et méthodes

Les transcrits de PLMVd de 761 nt (polarité positive) et de 621 nt (polarité négative) servant de matrice pour les essais de traduction ont été produits comme décrit précédemment (chapitre 1). Ces ARN (~1µg) ont été par la suite chauffés pendant 10 min à 65°C puis les essais de traduction ont été effectués selon le protocole fourni par le manufacturier (Promega). Brièvement, les essais ont été effectués en présence de 7µl d'extrait de germe de blé, 1,5 µl du mélange d'aa (sans méthionine), 1µl d'une solution de 333 mM d'acétate de potassium, 16 unités de RNAGuard (Pharmacia) et 1µl de <sup>35</sup>S-méthionine (3000 Ci/mmol, Amersham) dans un volume final de 15 µl. Les échantillons ont été incubés à température pièce pendant 60 min puis 7,5 µl ont été déposés sur une plaque de chromatographie sur couche mince (CCM) de silice. La migration fut effectuée dans un tampon butanol:acide acétique:H<sub>2</sub>O (5:2:3) jusqu'à environ 1cm du sommet de la plaque. Celle-ci fut par la suite séchée à l'air libre et analysée par autoradiogramme. La seconde moitié de l'échantillon a été

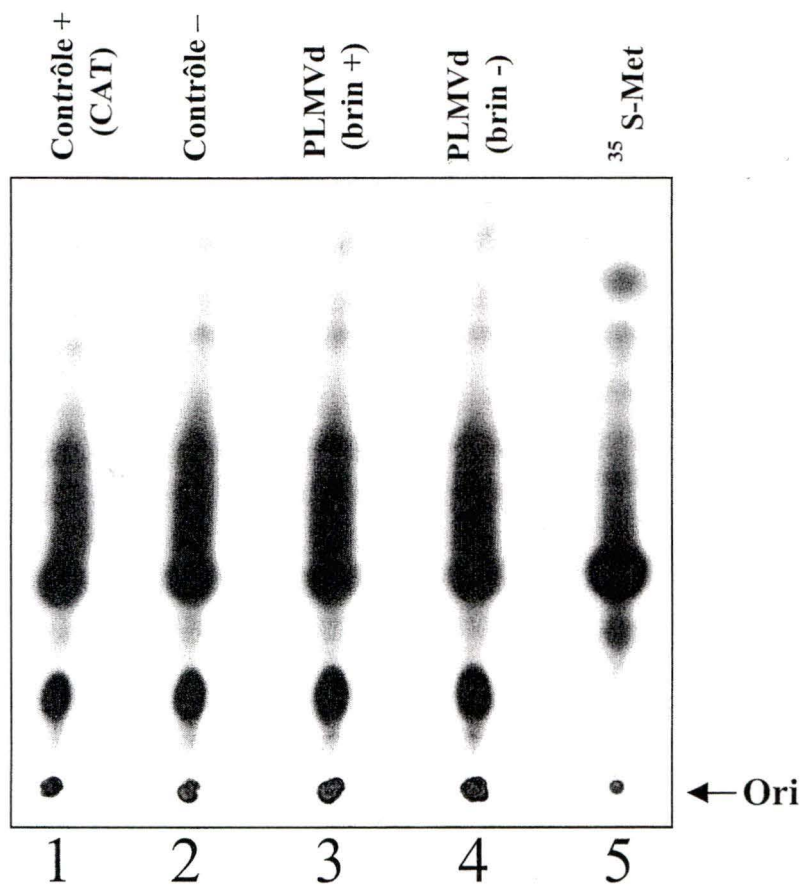
précipitée puis resuspendu dans une solution pour un fractionnement subséquent par chromatographie liquide à haute pression (HPLC) sur une colonne C18 (avec la collaboration de M. Hendrick Plante et Dr Emmanuel Escher).

## Résultats et discussion

Malgré la présence de plusieurs ORF dans le génome de ce variant de PLMVd, les résultats des expériences de traduction semblent confirmer que ce viroïde ne code pour aucune protéine (figure 25). Ces mêmes échantillons ont été analysés par HPLC et cette méthode n'a pas permis de détecter la présence de peptides, confirmant ainsi les résultats obtenus par CCM. Cette observation n'est pas le résultat d'un système de traduction déficient puisque la protéine CAT du contrôle positif a été produite. Toutefois, ces résultats n'excluent pas hors de tout doute l'hypothèse que la pathogenèse pourrait être le résultat de la production d'un court peptide. En effet, la traduction *in vivo* de PLMVd nécessite peut-être que ce dernier soit sous la forme monomérique ou circulaire, ou encore la présence d'un facteur spécifique aux plants de pêchers pour que les ribosomes soient fonctionnels. De plus, il est connu que le code génétique chloroplastique n'est pas tout à fait le même que celui du noyau. Ainsi, il est possible que le système de traduction nucléaire utilisé ne permet pas la traduction efficace de PLMVd.

Bien que les viroïdes ne semblent pas être traduits, il est possible que ceux-ci puissent moduler le niveau d'expression de certains gènes cellulaires, en titrant par exemple une composante de la machinerie traductionnelle. Dans cet ordre d'idée, la forte complémentarité de certains viroïdes avec l'ARN 7S de la particule de reconnaissance du signal (SRP) suggère que ceux-ci pourraient dérégler le fonctionnement normal de certains processus cellulaires (voir section 3.2 de l'introduction). Il est ainsi possible que des viroïdes puissent altérer le fonctionnement normal de l'ARN 7S, résultant en un dérèglement de la traduction et de la

translocation des protéines cellulaires. Il aurait été intéressant de vérifier dans ce contexte l'effet de l'ajout de transcrits de viroïde sur l'efficacité de la traduction du contrôle positif CAT utilisé dans les essais de traduction de PLMVd.



**Figure 25:** Autoradiogramme des essais de traduction de PLMVd. Les essais de traduction des transcrits de polarité positive et négative de PLMVd sont représentés dans les pistes 3 et 4 respectivement. La piste 1 est un contrôle positif de traduction fournis avec la trousse alors que la piste 2 est un contrôle négatif dans lequel l'ajout d'un ARN matrice a été omis. La piste 5 est un contrôle afin de déterminer la position de migration du <sup>35</sup>S-méthionine.

## 2. ESSAIS DE COUPURE EN *TRANS*

### Introduction

Une autre hypothèse de mécanisme de pathogenèse des viroïdes, du moins pour les membres de la famille des *Ayssunviroidae*, est celle impliquant la coupure en *trans* d'un ARN cellulaire par les séquences catalytiques des viroïdes. Il a été démontré que les séquences en tête de marteau pouvaient efficacement couper *in vitro* et *in vivo* un ARN possédant la séquence cible de ce motif catalytique. Le problème majeur dans le cas de PLMVd est que les séquences catalytiques sont localisées dans une tige fortement complémentaire (voir chapitre 4). La formation de cette tige empêche le repliement et l'adoption de la structure catalytiquement active, diminuant ainsi la probabilité qu'un ARN de l'hôte puisse s'hybrider et être coupé par cette structure. L'efficacité des transcrits de PLMVd à couper un court substrat d'ARN a été étudiée afin de vérifier l'implication potentielle d'un tel mécanisme dans la pathogenèse de ce type d'organisme. Les résultats décrits dans cette section démontrent qu'il est peu probable qu'un ARN cellulaire puisse être coupé par les séquences catalytiques d'un viroïde, dans le contexte où celles-ci sont localisées à l'intérieur d'une forte tige. Toutefois, des évidences seront présentées démontrant que ce mécanisme de coupure *en trans* pourrait subvenir *in vivo*, grâce à l'action de certaines protéines qui pourraient favoriser l'ouverture de la tige et l'hybridation du substrat aux séquences catalytiques. Ces résultats sont brièvement décrits dans un chapitre de livre avec comité de pairs (à paraître, voir annexe 3).

## Matériels et méthodes

Synthèse des ribozymes Rz173L, Rz250L, Rz338L(290): La procédure utilisée pour la synthèse et la purification des transcrits linéaires a été rapportée précédemment (Beaudry et al. 1995). Brièvement, les transcriptions *in vitro* ont été synthétisées à partir des constructions plasmidiques pPD1 et pP1D qui consistent en un dimère de PLMVd cloné dans le site de restriction *Pst*1 du vecteur pBluescript II KS (+/-) ou pBluescript II SK (+/-) respectivement. L'insert est flanqué par le promoteur de l'ARN polymérase T7 pour la production des brins de polarité positive (pBluescript II SK) et négative (pBluescript II KS). Le plasmide linéarisé a été incubé pendant 4 heures dans 80 mM d'Hepes-KOH, pH 7.5, 24 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM de spermidine, 50 mM de DTT, 2.5 mM de chaque rNTP, 60 unités de RNA guard (Pharmacia), 5 unités de pyrophosphatase de levure (Boehringer Mannheim) et 50 µg d'ARN polymérase T7. Lorsqu'un marquage interne était nécessaire, 50 µCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]UTP (3000 Ci/mmol, Amersham) ont été ajoutés au mélange réactionnel. Après la transcription, un traitement à la DNase puis une précipitation des acides nucléiques ont été effectués. L'ARN a été resuspendu dans de l'eau millipore avec 0.5 vol d'une solution d'arrêt (0.3% de bleu de bromophénol et de xylène cyanol, 10 mM d'EDTA, pH 7.5, 97.5% de formamide déionisée) puis dénaturé 2 min à 65°C et finalement fractionné par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 5% (PAGE) dans un tampon 100 mM de Tris-borate, pH 8.3, 1mM EDTA et 7M d'urée. Les différents transcrits ont été détectés par ombrage aux UV, excisés, élués, précipités et passés 2 fois à travers une *spin column* G-50 (Pharmacia). La quantité de transcrits a été déterminée par spectrophotométrie à 260 nm puis ces derniers ont été lyophilisés et conservés à -70°C. Il est à noter que les transcrits ont été purifiés une deuxième fois par PAGE afin d'éliminer toute trace de contaminants. La nomenclature des ribozymes est expliquée à la figure 26.

Synthèse du ribozyme Rz47L: Le ribozyme Rz47L a été synthétisé à partir du transcrit Rz173L par hydrolyse à l'aide de la RNase H. Dix µg de Rz173L ont été resuspendus dans une solution de 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5 et 10 mM de MgCl<sub>2</sub> en présence d'un excès d'oligonucléotide d'ADN (5'-GCGGCGAAACTTTTGATG-3') qui est complémentaire aux positions 338/17 de la tige gauche de PLMVd (figure 5) dans un volume final de 9 µl. L'échantillon a été chauffé à 80°C pour 2 min, incubé à 55°C pour 3 min et gardé sur glace 5 min. L'hydrolyse enzymatique de 30 min à 37°C a été initiée par l'addition de 1.2 unités de RNase H (Pharmacia), puis arrêtée par l'ajout de la solution d'arrêt. Le mélange final a été dénaturé 2 min à 65°C puis séparé par PAGE 5%. Le ribozyme Rz47L a été isolé comme décrit précédemment.

Synthèse des ribozymes circulaires: La synthèse des ribozymes Rz338C(3',5'), qui est entièrement composé de liens phosphodiesters de type 3',5', et Rz338C(2',5'), qui possède un lien de type 2',5' au site d'autocoupeure/autoligation (position 290), a été effectuée comme décrit précédemment (Beaudry et Perreault 1995). Les ribozymes ont été purifiés par PAGE 5% et isolés comme décrit ci-haut.

Synthèse des substrats radioactifs: Une quantité équimolaire (500 pmoles) des oligonucléotides (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') et (5'-AGCACAGACTCATACCCTATAGTGAGTCGTATTA-3'), qui correspondent respectivement à la séquence du promoteur T7 et à la séquence complémentaire de T7 flanquée d'une séquence permettant la production d'un substrat de 17 nt (souligné) a été mélangée dans 20 µl de tampon Tris-acétate à 10 mM, pH 7.5, d'acétate de magnésium à 10 mM et d'acétate de potassium à 50 mM. Le mélange a été chauffé à 100°C pour 5 min, incubé à la température pièce pour 30 min puis gardé sur glace 15 min. Ensuite, les échantillons ont été transcrits pendant 2 heures comme décrit précédemment. Par la suite, ces solutions ont été incubées pendant 15 min en présence de DNase RQ1 (Promega), puis la réaction a été arrêtée



par une extraction phénol-chloroforme. Les transcrits ont été purifiés par PAGE 20%, détectés par ombrage aux UV et élués comme décrit ci-haut. Les substrats purifiés ont été resuspendus dans une solution de 250 mM de Tris-HCl, pH 8.3 avant l'addition de 30 unités de RNA guard (Pharmacia) et 0.2 unité de phosphatase alcaline d'intestin de veau (Pharmacia) dans un volume total de 20  $\mu$ l. Le mélange a été incubé pendant 30 min à 37°C et la réaction arrêtée par extraction phénol-chloroforme. Les substrats déphosphorylés ont été marqués à l'aide de la T4 polynucléotide kinase (Pharmacia) en présence de [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP (3000 Ci/mmol, Amersham) comme décrit par le manufacturier. Finalement, les substrats ont été purifiés par un passage à travers une *spin column* de Séphadex G-50 (Pharmacia) puis congelés jusqu'à leur utilisation.

Réaction de coupure en *trans*: La condition standard de la réaction de coupure est une quantité équimolaire (0.1 pmole) de substrat radioactif et de ribozyme non radiomarcué. Ces ARN sont resuspendus dans 9  $\mu$ l de tampon Tris-HCl à 10 mM, pH 8.0 et de 1 mM d'EDTA, pH 8.0. Le mélange est dénaturé à 90°C pendant 1 min puis placé immédiatement sur glace pendant 30 sec (*snap-cooling*) dans le but de favoriser l'adoption de la structure en tête de marteau. La réaction de coupure est ensuite initiée par l'addition de 1  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> à 1M, incubée pendant 15 min à 37°C puis arrêtée par l'ajout de 0.5 vol de solution d'arrêt. Le mélange est séparé par PAGE 20% puis analysé par autoradiogramme ou à l'aide d'un PhosphorImager (Molecular Dynamic). Des variations à cette procédure standard ont été utilisées, par exemple l'incubation à différentes températures, différentes concentrations de magnésium, différents temps, ajout de la protéine A1, etc. Ces variations sont mentionnées dans le texte et les légendes des figures correspondantes.

Essais de coupure en *trans* pendant la transcription de PLMVd: La transcription de PLMVd a été effectuée à partir de 1  $\mu$ g du clone pPD1 préalablement digéré avec l'enzyme *Bam*H1, qui permet la production des brins de polarité positive à l'aide de l'ARN polymérase T3. La

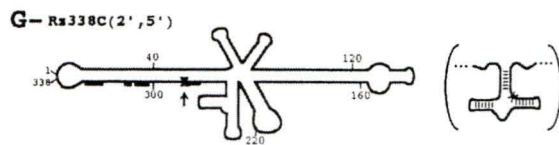
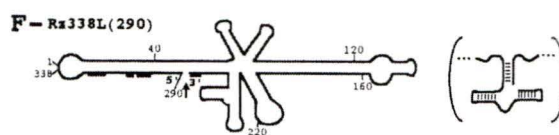
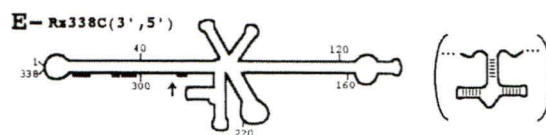
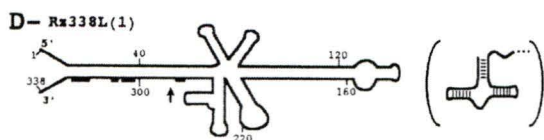
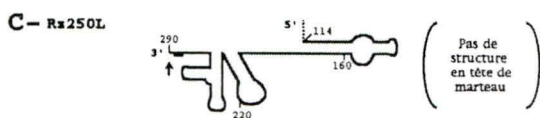
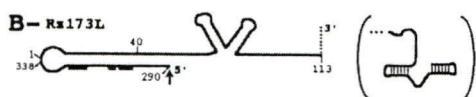
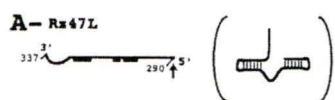
transcription a été effectuée dans un volume final de 20 µl à l'aide de la trousse de transcription T3 Ribomax (Promega) en présence de 0.1 pmole du substrat radioactif dans les conditions décrites par le manufacturier. La concentration en rNTP et le temps d'incubation ont été ajustés dans les différents échantillons selon les conditions mentionnées à la figure 27. Les mélanges ont été séparés par PAGE 20% puis analysés par autoradiogramme.

Identification des substrats potentiels: L'ARN total de feuilles de pêcher à tout d'abord été extrait à l'aide de la trousse *RNeasy Plant Mini Kit* selon la procédure proposée par le manufacturier (Qiagen). Afin de détecter la présence de sites potentiels de coupure dans les ARN isolés, des expériences de transcriptase inverse ont été effectuées dans les conditions décrites au chapitre 1, en présence de l'oligonucléotide *EcoRTHH* (5'-CAGAATTCTAAGCACAGACT-3'), contenant un site de restriction *EcoR1* (souligné) en 5' et qui est complémentaire à la séquence cible de la structure en tête de marteau. Afin de pouvoir détecter une réaction d'extention, cet oligonucléotide a été préalablement radiomarqué en 5' selon la méthode décrite ci-haut. Les échantillons ont été par la suite séparés par PAGE 5% et les ADNc produits ont été détectés par autoradiogramme puis élués comme décrit précédemment. Les ADNc ont été resuspendus et une queue polyA a été ajoutée à l'aide de la terminale transférase dans les conditions décrites par le manufacturier (Boehringer Mannheim). La synthèse du deuxième brin et l'amplification des ADNc ont été effectuées par PCR en présence de 1/10 de la quantité totale d'ADNc isolé, de 10 mM de Tris-HCl, pH 8.85, de 25 mM de KCl, de 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, de 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, de 0.2mM des dNTP, de 1 mM de chaque oligonucléotide *EcoRTHH* et poly(dT) (qui consiste en 20 nt dT) et de 2.5 unités d'ADN polymérase PWO (Boehringer Mannheim). L'amplification a été effectuée selon les cycles suivants: 1 min à 94°C (1 fois), (1 min à 94°C, 1 min à 40°C, 1 min à 72°C (1 fois)), (1 min à 94°C, 1 min à 45°C, 1 min à 72°C (33 fois)) et finalement 10 min à 72°C. Une fraction des produits de PCR a été analysée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans un tampon de 90 mM de Tris-borate et de 2 mM d'EDTA, pH 8.0, afin

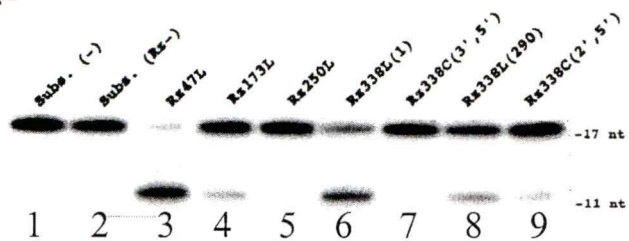
de vérifier la qualité de l'amplification. Les échantillons ont été digérés pendant 2 heures à 37°C en présence de 40 unités de l'enzyme de restriction *EcoR*I dans une solution de 20 mM de Tris-acétate, pH 7.5, de 20 mM d'acétate de magnésium et de 100 mM d'acétate de potassium. L'ADN résultant a été cloné entre les sites de restriction *EcoR*I et *Sma*I du vecteur pBluescript KS (+/-). Les clones ont été transformés et amplifiés dans des bactéries compétentes *E. coli* Top10 selon la procédure fournie par le manufacturier (Invitrogen). L'ADN plasmidique a été extrait à l'aide de la trousse *Plasmid Midi Kit* (Qiagen) selon la procédure fournie par le détaillant. Les inserts ont été finalement séquencés en présence de l'oligonucléotide 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' à l'aide de la trousse de séquençage *Deaza G/A<sup>T</sup>7 Sequencing<sup>TM</sup> Mixes* (Pharmacia) selon les conditions décrites par le manufacturier. Ces réactions ont été séparées par PAGE 8% et analysées par autoradiogramme.

## Résultats et discussion

Les résultats des expériences de coupure *en trans* ont démontré que la plupart des ribozymes testés pouvaient couper le substrat (figure 26). La grande efficacité de coupure du ribozyme Rz47L (~90%), s'explique par l'absence de séquence complémentaire, ce qui permet l'adoption de la structure active de la majorité de ces ARN. Par contre, il est surprenant d'observer une aussi bonne efficacité de coupure dans le cas du ribozyme Rz338L(1) (~65%), puisque celui-ci possède les séquences "inhibitrices". La réaction de *snap-cooling* résulte dans ce cas-ci en l'autocoupure de ce transcrit, libérant ainsi un ribozyme semblable à Rz47L qui coupe efficacement le substrat. La diminution drastique de l'efficacité de coupure observée avec les ribozymes Rz173L et Rz338(290) (~10-20%) confirme l'effet inhibiteur de la séquence complémentaire sur la formation de la structure



**H-**



**Figure 26: Coupure du substrat par les différents ribozymes.** Les différents ribozymes utilisés dans les essais de coupure *en trans* sont représentés graphiquement de A à G. La nomenclature suivante a été utilisée pour les différents ribozymes: Rz suivit de i) la longueur en nucléotides de l'ARN; ii) L (linéaire) ou C (circulaire) indiquant la conformation du ribozyme; iii) un nombre entre parenthèse dans le cas des ribozymes linéaires indiquant le site de linéarisation de ceux-ci (selon la numérotation relative à la figure 5) et pour les ribozymes circulaires, un 2',5' ou 3',5' entre parenthèse est indicateur de la nature du lien phosphodiester au site d'autocoupure/autoligation (position 290). Les lignes pleines représentent les séquences du viroïde formant les différents ribozymes alors que les lignes pointillées représentent des séquences provenant du vecteur permettant la synthèse des différents transcrits de PLMVd (pPD1). Le site de coupure *en cis* des ribozymes et les séquences conservées formant le motif en tête de marteau sont représentés par une flèche et les rectangles noirs respectivement. La présence d'une liaison de type 2',5' au site de coupure est représentée par un X (Schéma G). La structure en tête de marteau pouvant être adoptée par les différents ribozymes est schématisée entre parenthèses. **H)** Autoradiogramme des résultats des expériences de coupure *en trans* du substrat de 17 nt par les différents Rz. La coupure de ce substrat génère un produit de 11 nt. Les 2 premières pistes sont des contrôles négatifs, c.à.d. migration du substrat seul non traité (pas subit de réaction d'autocoupure) et du substrat qui a subit la réaction de coupure en absence de ribozyme. Les autres pistes correspondent à une réaction de coupure du substrat par un Rz en particulier et l'identité du Rz utilisée est mentionnée au dessus de chaque piste.

catalytique. L'observation que le niveau de coupure du substrat pour ces 2 ribozymes est similaire laisse croire que la région de droite de PLMVd n'a aucune influence sur la formation de la structure catalytique. Finalement, il est intéressant de constater que le ribozyme possédant un lien 2',5' au site d'autocoupure/autoligation (Rz338C(2',5')) coupe plus efficacement le substrat que son homologue 3',5' Rz338C(3',5'). Ce résultat suggère que la présence du lien 2',5' favorise d'une manière ou d'une autre l'hybridation et la coupure du substrat.

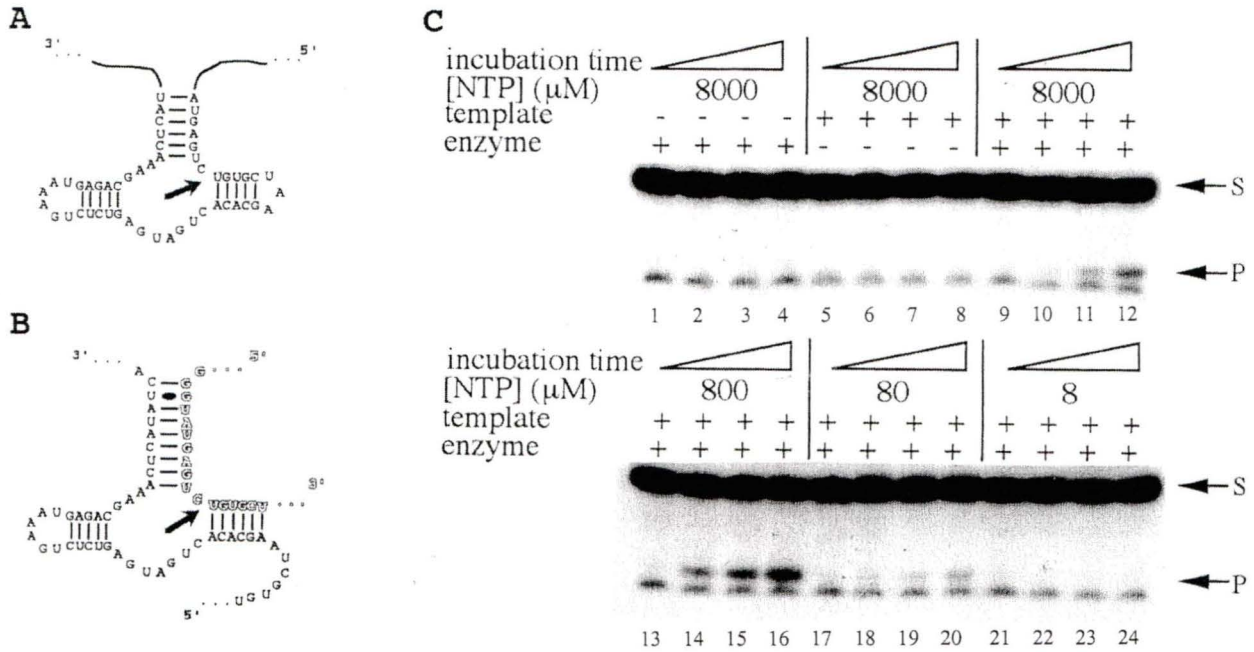
Certaines observations laissent croire que les différents niveaux de coupure observés avec ces ribozymes ne dépendent pas en de leur efficacité à adopter la structure catalytique active mais plutôt de leur potentiel à générer de façon spécifique (par autocoupure) ou non spécifique (par hydrolyse) des ribozymes du type Rz47L. Ces évidences sont que premièrement, les caractéristiques de la réaction de coupure médiée par les transcrits monomériques linéaires et circulaires (effet de la T(°C), du temps, de la concentration de Mg<sup>2+</sup>, du ratio ribozyme/substrat, etc.), sont similaires à celles déterminées pour la réaction catalysée par le ribozyme seul (Rz47L). Deuxièmement, il semble que les conditions de réaction utilisées dans ces expériences pourraient résulter en une hydrolyse non spécifique des transcrits de PLMVd durant la réaction de *snap-cooling*, libérant ainsi sporadiquement des ribozymes pouvant couper efficacement le substrat (Lafontaine, communication personnelle). Des expériences de coupure en *trans* utilisant des conditions de réaction plus douces ont confirmé cette hypothèse. Dans ces conditions, le niveau de coupure observé avec le ribozyme Rz338L(290) est négligeable (<2%). Donc, il semble peu probable que les séquences catalytiques de PLMVd puissent couper dans ce contexte un substrat *en trans*.

Toutefois, ces explications ne justifient pas pourquoi Rz338C(2',5') coupe plus efficacement le substrat que Rz338C(3',5'). La nature circulaire de ces 2 ribozymes nécessite que 2 événements d'hydrolyse aient lieu à des endroits relativement précis afin de libérer un ribozyme du type Rz47L. L'efficacité devrait donc être plus élevée dans le cas de Rz338C(3',5') puisqu'une des 2 hydrolyses nécessaires est le résultat d'une coupure en *cis*

(autocoupure) de ces transcrits (chapitre 1, figure 10, piste 11). Puisque la liaison 2',5' ne semble pas s'hydrolyser dans les conditions de la réaction de *snap-cooling* (chapitre 1, figure 10 piste 4), il semble donc que la présence de ce lien favorise l'hybridation avec le substrat en *trans*, probablement en favorisant l'ouverture de la tige et/ou en inhibant l'hybridation du substrat en *cis*.

Dans cet ordre d'idée, il est possible que certaines protéines cellulaires puissent favoriser l'hybridation entre un ARN cellulaire et les séquences catalytiques du viroïde. Les expériences de coupure pendant la transcription (figure 27) et en présence de la protéine A1 (figure 28) avaient pour but de vérifier cette dernière hypothèse. Tout d'abord, il est intéressant de constater qu'une diminution de la vitesse de la polymérase (diminution de la concentration en NTP) entraîne une plus grande efficacité de coupure du substrat (figure 27, piste 9-12 versus 13-16). Cette observation s'explique par le fait que dans ce système de transcription le site d'initiation est localisé à un endroit tel que les séquences catalytiques sont synthétisées avant le brin complémentaire. Dans ce contexte, une diminution de la vitesse de la polymérase retarde la synthèse du brin inhibiteur, augmentant ainsi la chance que les séquences catalytiques puissent adopter la structure active et hybrider le substrat. La plus faible efficacité de coupure observée aux plus petites concentrations de NTP s'explique par le fait que le facteur limitant dans ces cas-ci n'est plus la vitesse de la polymérase mais bien la faible quantité de ribozymes produits. Il est peu probable que cette coupure soit en grande partie le résultat d'une catalyse par des produits de transcription avortés car l'efficacité n'aurait pas été aussi dépendante de la vitesse de la polymérase. Donc, il semble que la coupure soit générée majoritairement par les séquences catalytiques du brin naissant.

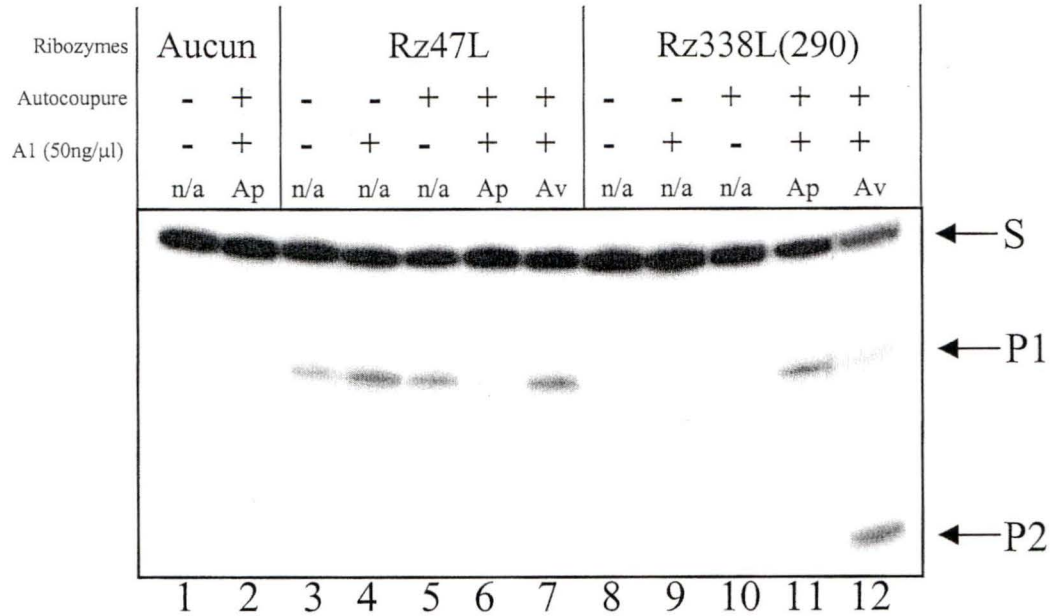
Ces dernières observations sont difficiles à concilier dans un contexte cellulaire où les séquences catalytiques sont synthétisées après le brin complémentaire (voir discussion section 1.3.2.). Dans cette condition, il est possible qu'une protéine puisse favoriser la réaction de coupure en *trans*. Les résultats de coupure en présence de la protéine A1



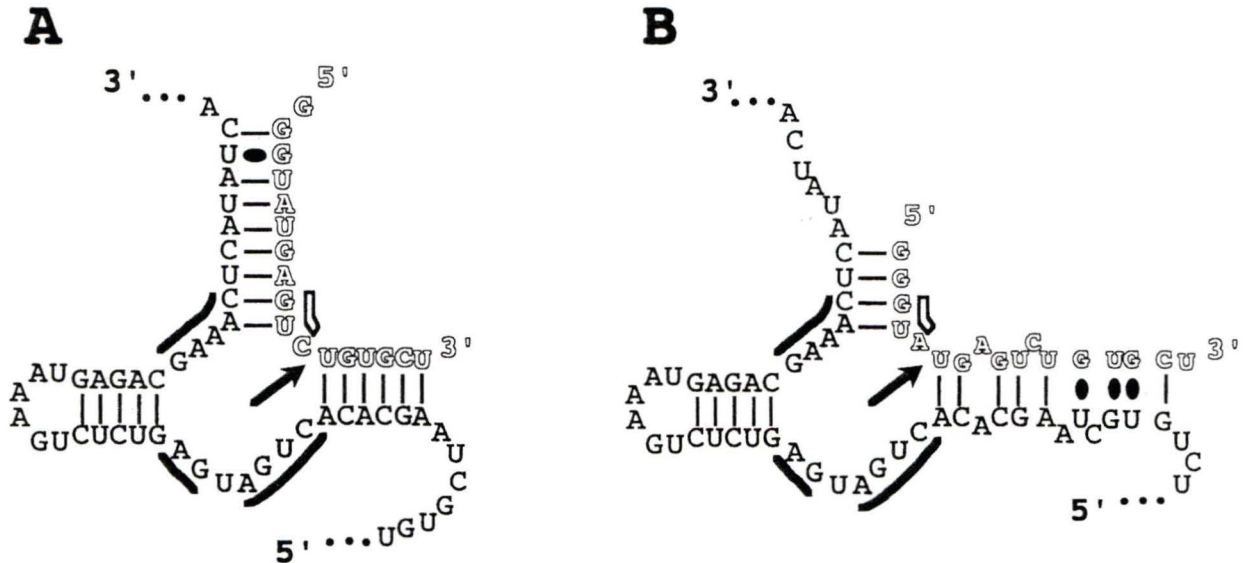
**Figure 27: Coupure du substrat pendant la transcription de PLMVd.** Représentation de la structure en tête de marteau pour la coupure d'un substrat *en cis* (A) et *en trans* (B). La flèche indique dans ces 2 cas le site de coupure du substrat. Les lettres pleines et vides représentent respectivement les séquences du viroïde et du substrat *en trans*. Dans ce dernier cas, la reconnaissance du substrat s'effectue par l'hybridation aux séquences catalytiques du Rz par la formation des tiges I et III. C) Les positions de migration du substrat et du produit de coupure sont indiquées par les lettres S et P respectivement. Les 8 premières pistes sont des contrôles négatifs dans lesquels l'ajout du vecteur codant pour la production des transcrits de PLMVd a été omis (pistes 1-4) ou l'enzyme permettant la synthèse des transcrits (pistes 5-8). La balance des pistes représente l'efficacité de coupure du substrat selon le temps d'incubation à différentes vitesses de polymérisation des transcrits de PLMVd.



démontrent que cette dernière augmente significativement l'efficacité de coupure du ribozyme correspondant aux transcrits majoritaires de PLMVd retrouvés *in vivo*, c.-à.-d. du ribozyme Rz338L(290) (figure 28, piste 10 versus 11). En fait, l'efficacité de coupure observée avec Rz338L(290) en présence de la protéine est similaire à celle observée avec le ribozyme Rz47L (figure 28, piste 5). Cependant, cette protéine n'a pas d'effet sur l'efficacité de coupure du substrat par le ribozyme Rz338L(290) si l'étape de *snap-cooling* est omise (piste 9). Ceci suggère que l'effet de A1 n'est pas le résultat d'une ouverture de la tige inhibitrice P11 à l'aide de son activité de désappariement (domaine N-terminale), mais plutôt le résultat d'une meilleure hybridation du substrat ou encore d'une meilleure stabilisation de la structure catalytiquement active (Bertrand et Rossi, 1994). Cependant, le fait que Rz47L ne coupe presque pas dans ces mêmes conditions (piste 6) suggère que la stabilisation de la forme active du ribozyme Rz338L(290) est l'hypothèse la plus probable. La forte inhibition de coupure observée dans ce dernier cas est possiblement le résultat de la dissociation par l'appariement de A1 des complexes ribozyme/substrat formés suite au *snap-cooling*. De plus, il est intéressant de remarquer que l'effet de cette protéine diffère selon si celle-ci a été ajoutée avant ou après l'étape de *snap-cooling* (figure 28, piste 11 versus 12). L'ajout de celle-ci avant le *snap-cooling* entraîne l'utilisation d'un site de coupure secondaire du substrat dans les essais effectués avec Rz338L(290) (figure 29B). Il est possible que les protéines A1 puissent interagir avec le substrat et le ribozyme séparément suite au *snap-cooling* et que la dimérisation subséquente de ces protéines via leur domaine RGG résulte en une hybridation alternative du substrat au ribozyme, provoquant ainsi l'utilisation du site de coupure secondaire. Dans cet ordre d'idée, il est possible que la protéine puisse s'apparier aux séquences du ribozyme permettant la formation de la tige III, empêchant ainsi l'hybridation normale du substrat. Il est important de préciser que la grande différence dans les niveaux de coupure observée pour les mêmes ribozymes entre les expériences de la figure 26 et 28 est principalement due au fait que le magnésium a été ajouté respectivement avant ou après la réaction de *snap-cooling*.

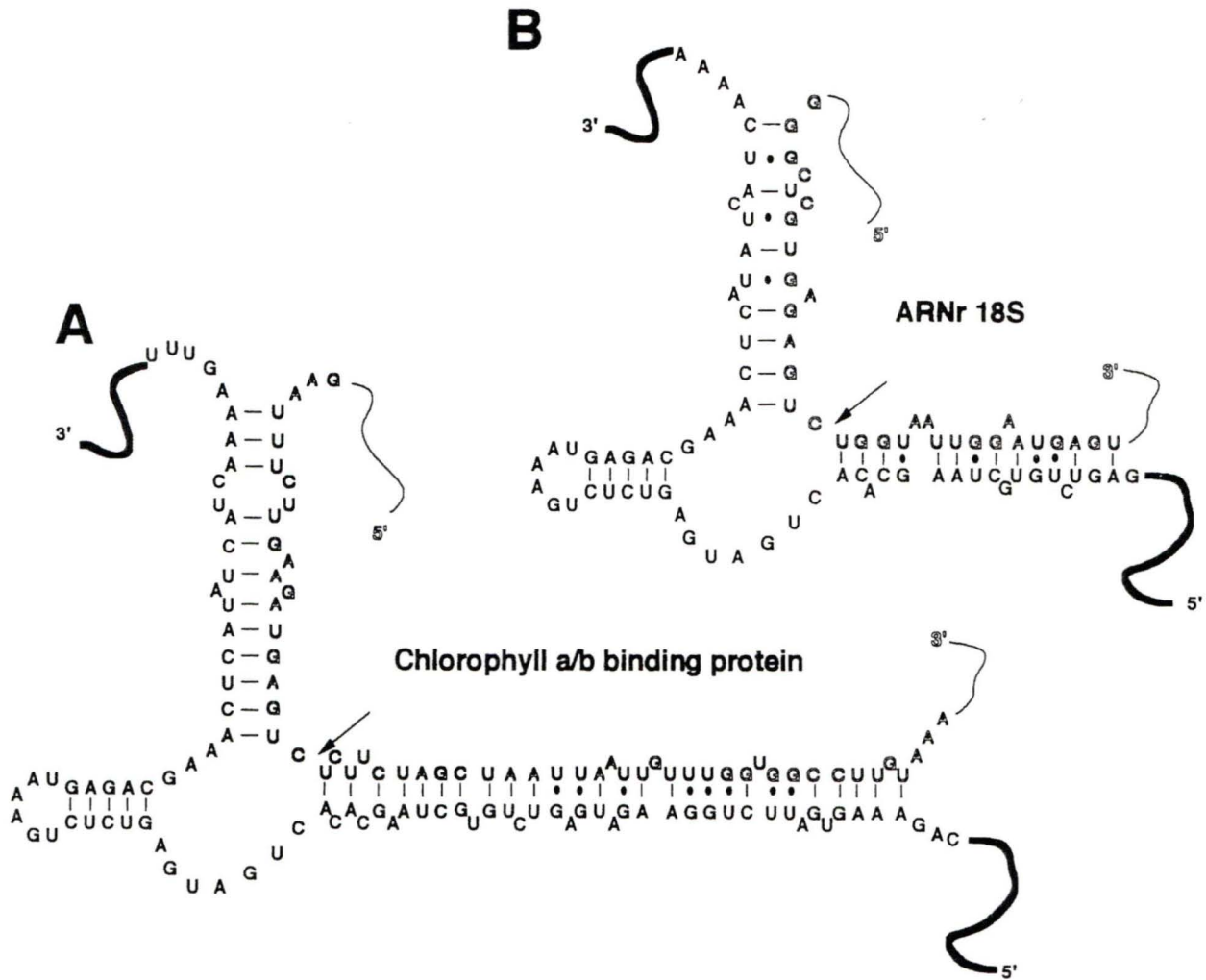


**Figure 28:** Effets de la protéine A1 sur l'efficacité de coupure du substrat. Les conditions de réaction des différents échantillons sont résumées au dessus de l'autoradiogramme. Brièvement, Rz indique l'absence (-) ou la présence (+) d'un ribozyme dans l'échantillon, RC indique l'omission (-) ou l'accomplissement (+) de la réaction de coupure (*snap-cooling*) avant l'incubation et finalement, A1 indique l'absence (-) ou la présence (+) dans le mélange réactionnel de la protéine A1 à une concentration finale de 50 ng/ $\mu$ l. À noter que dans ce dernier cas, les symboles (Av) et (Ap) indiquent respectivement si la protéine a été ajoutée avant ou après la réaction de *snap-cooling*. Dans tous les cas, les essais de coupure ont été effectués comme décrit dans la section matériels et méthodes, mis à part le fait que dans ces expériences, la réaction a été arrêtée par l'ajout d'un volume d'une solution 0.5% SDS et 25mM EDTA. Les pistes 3-7 et 8-12 représentent les essais de coupure effectués avec les ribozymes Rz47L et Rz338L(290) respectivement.



**Figure 29:** Hybridation alternative entre les séquences *hammerhead* et le substrat synthétique. A) Représentation de l'hybridation normale entre le substrat et le ribozyme. B) Représentation de l'hybridation alternative entre le substrat et le ribozyme. Les nucléotides pleins et en reliefs représentent respectivement la partie ribozyme et le substrat. Les séquences conservées formant le centre catalytique du ribozyme sont indiquées par les rectangles pleins alors que les rectangles vides représentent les séquences conservées de l'ARN substrat. Les sites de coupure sont représentés par la flèche.

L'hypothèse que le mécanisme de pathogenèse de PLMVd est le résultat de la coupure en *trans* d'un ARN cellulaire implique nécessairement que certains de ces ARN possèdent la séquence cible de la structure catalytique de PLMVd. Les expériences d'élongation d'amorces et de recherche d'homologie à partir de banques de données ont ainsi permis d'identifier des candidats potentiels, dont les plus intéressants sont l'ARNr 18S et l'ARN codant pour la *chlorophyll a/b binding protein* (figure 30). Il est intéressant de constater que le site de coupure potentiel de l'ARNr possède une séquence conservée à 100% chez tous les ARNr 18S de plantes analysés. Malheureusement, les expériences de coupures en *trans* de cet ARNr isolé du pêcher à l'aide du ribozyme Rz47L n'a donné aucun résultat significatif, possiblement en raison de l'hybridation imparfaite entre les séquences ribozymes et substrats (figure 30). Cependant, le haut taux de mutations des viroïdes observé *in vivo* (Pelchat et al., 2000b) suggère que certaines souches de PLMVd pourraient permettre une meilleure hybridation avec le substrat et par le fait même, une coupure efficace de cet ARN *in vivo*.



**Figure 30:** Représentation des sites de coupure des substrats cellulaires potentiels. A) Schématisation de l'hybridation entre les séquences catalytiques de PLMVd et l'ARN codant pour la *chlorophyll a/b binding protein*. B) Schématisation de l'hybridation entre les séquences catalytiques de PLMVd et l'ARNr 18S. Les nucléotides pleins et en reliefs représentent respectivement les séquences de PLMVd et des ARN respectifs. Le site de coupure est représenté par la flèche.

## Conclusion

L'objectif principal de ces travaux était de vérifier certaines hypothèses à propos des mécanismes de pathogenèse de PLMVd. Premièrement, il semble que PLMVd ne code pour aucune protéine, comme l'ont démontré les expériences de traduction *in vitro*. Donc, ce viroïde doit créer ses effets pathogènes via l'interaction avec une ou des composante(s) de l'hôte. Toutefois, des recherches informatisées d'homologies entre PLMVd et des ARN cellulaires ont été effectuées sans donner de résultats positifs. Finalement, la possibilité que la pathogenèse puisse être le résultat de la coupure d'un ARN de l'hôte par les séquences catalytiques de PLMVd a été étudiée. Des expériences de coupure d'un court substrat d'ARN en présence de transcrits du viroïde suggèrent qu'il est peu probable que cette réaction puisse avoir lieu, en raison de la forte structure secondaire de ceux-ci. Par contre, d'autres résultats démontrent que le niveau de coupure de ces substrats peut être augmenté si ces expériences sont réalisées pendant la transcription de PLMVd ou en présence d'une protéine telle A1. Donc, il est possible qu'une protéine quelconque, comme par exemple la polymérase impliquée dans la réplication de ce viroïde, pourrait permettre l'ouverture de la structure secondaire de PLMVd et ainsi favoriser l'hybridation et la coupure d'un ARN cellulaire. Des études dans le but de trouver des ARN cellulaires cibles ont permis d'identifier certains candidats intéressants possédant un site de coupure potentiel de la structure en tête de marteau. Toutefois, aucune évidence physique de l'utilisation de ce mécanisme *in vivo* n'a pu être obtenue.

## DISCUSSION

### 1. STRUCTURE ET RÉPLICATION DE PLMVd.

#### 1.1. La structure secondaire et tertiaire de PLMVd.

L'utilisation de programmes informatiques est très répandue pour l'analyse de la structure primaire et secondaire des ARN. Ce type d'analyse peut fournir des indices importants sur les séquences ou structures impliquées dans les différentes fonctions de ces ARN. Par exemple, la présence de la RCC dans tous les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* suggère que cette région joue probablement un rôle dans le cycle de vie de ces organismes. En fait, plusieurs éléments conservés ont été identifiés chez ces organismes, que ce soit au niveau de la structure primaire ou secondaire (Flores et al., 1997). Dans le cas des viroïdes de la famille des *Avsunviroidae*, les exemples d'éléments conservés sont limités aux séquences permettant l'adoption du motif autocatalytique *hammerhead*. Certains indices nous suggéraient que la structure de PLMVd déterminée par ordinateur ne correspondait probablement pas à celle adoptée en solution. Afin de vérifier cette hypothèse, la structure en solution de PLMVd a donc été déterminée à l'aide d'expériences de susceptibilité aux ribonucléases (chapitre 4).

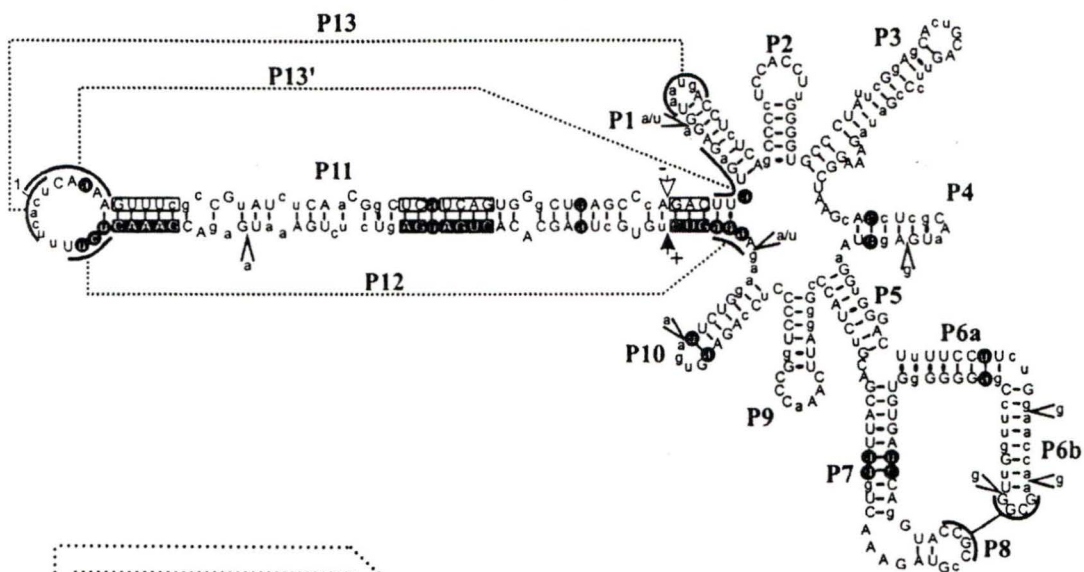
Les résultats obtenus démontrent que le brin de polarité positive de PLMVd adopte une structure beaucoup plus branchée que celle déterminée par ordinateur (figure 5 versus figure 22). La différence majeure est un réarrangement de la tige droite prédite à l'aide de programmes informatiques en plusieurs tiges-boucles. La nouvelle structure secondaire proposée pour PLMVd possède une forte similarité structurale avec celle de CChMVd, bien que la séquence primaire de ces 2 viroïdes soit très différente. En fait, la plupart des tiges-boucles entourant la partie centrale de PLMVd ont un équivalent chez CChMVd. De plus, nos

résultats ont permis d'identifier pour la première fois chez un viroïde la présence d'un pseudo-noeud, plus spécifiquement entre les boucles des tiges P6 et P7 de PLMVd. L'analyse des différentes boucles de CChMVd permet de suggérer que ce dernier a la possibilité de former un pseudo-noeud équivalent (figure 23). Cette grande similarité structurale suggère la présence d'éléments conservés caractéristiques entre les membres des pelamoviroïdes et fort possiblement l'utilisation de mécanismes similaires dans leur cycle de vie. Par exemple, leurs motifs catalytiques sont positionnés similairement dans une tige hautement complémentaire, suggérant ainsi que les paramètres dirigeant la coupure et la ligation des intermédiaires de réplication sont identiques. La démonstration que ces 2 organismes s'accumulent principalement sous la forme linéaire *in vivo* supporte cette hypothèse (Bussière et al., 1999; Navarro et Flores, 1997).

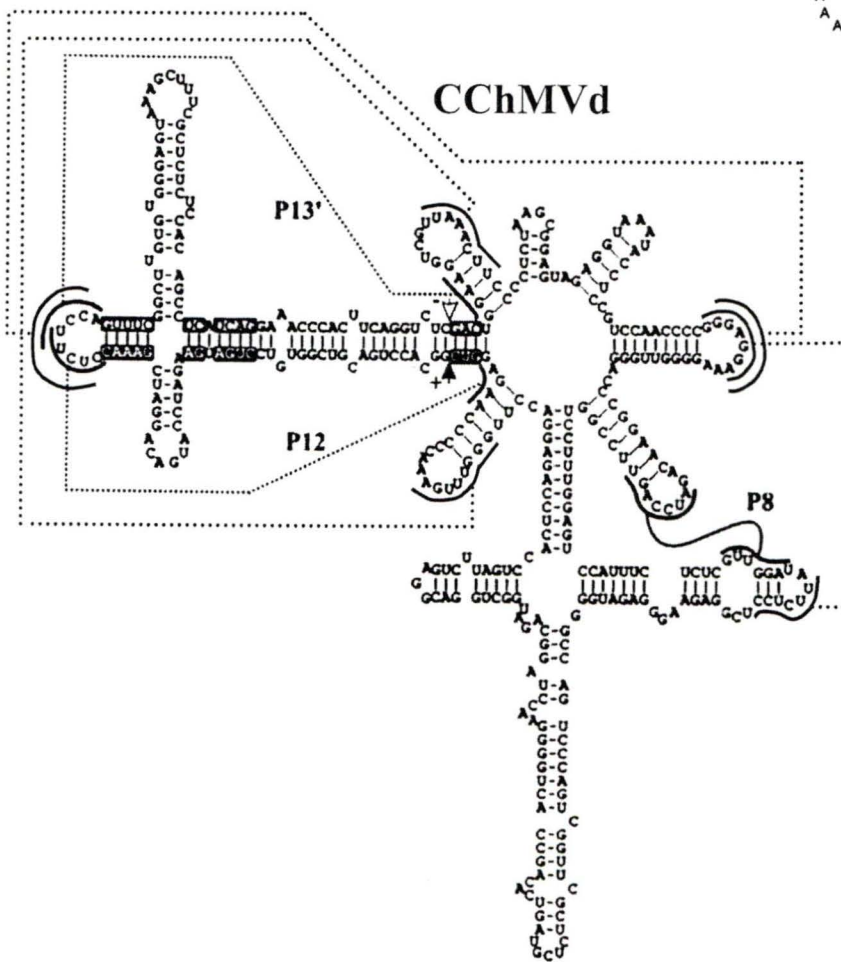
La structure secondaire de PLMVd présentée à la figure 31 montre que la tige P11 est constituée presque entièrement des séquences formant les motifs autocatalytiques *hammerhead* des 2 polarités. La compilation de 64 variants de séquence de PLMVd a permis de déterminer une séquence consensus de ce viroïde (figure 31) (Pelchat et al., 2000b). La conservation de séquence au niveau de la tige P11 va bien au-delà de celle requise pour que l'activité de coupure des 2 brins soit préservée. Plus spécifiquement, seulement 11 nucléotides conservés ont été démontrés pour former le centre catalytique de la structure *hammerhead*. Basée sur cette exigence, seulement 22 nucléotides devraient être conservés pour assurer cette activité dans les 2 polarités du viroïde. Cependant, plus d'une quarantaine de nucléotides de la tige P11 sont conservés, suggérant que les séquences *hammerhead* sont possiblement multifonctionnelles.



## PLMVd



## CChMVd



**Figure 31.** Comparaison de la structure secondaire de PLMVd et de CChMVd. Les séquences conservées des structures *hammerhead* sont encadrées dans des rectangles noirs ou blancs, indiquant respectivement les polarités positives et négatives. Les flèches noires et blanches représentent respectivement les sites de coupure respectifs. Les lignes pleines indiquent les pseudo-noeuds confirmés alors que les lignes pointillées sont les pseudo-noeuds putatifs. Dans le cas de PLMVd seulement, les nucléotides en majuscules sont hautement conservés entre les différents variants de séquences tandis que les nucléotides encerclés démontrent de la covariation. Les insertions observées chez seulement un variant de PLMVd sont identifiées par des pointes de flèche.

## 1.2. Le cycle de réplication de PLMVd

### 1.2.1. Mécanismes d'autoligation chez PLMVd

Généralement, les liens phosphodiester retrouvés dans la nature sont de type 3',5'. L'observation que l'autoligation des transcrits de PLMVd produit majoritairement, pour ne pas dire exclusivement, un lien de type 2',5' est donc relativement surprenante (chapitre 1 et 2). Toutefois, il a été démontré précédemment que dans certaines conditions spécifiques, la condensation de monopurines sur une matrice de polypyrimidines produit majoritairement ce type de lien (Lohrmann et Orgel, 1980; Orgel, 1986; Renz et al., 1971; Usher et McHale, 1976). Par exemple, la condensation d'adénosines 2',3'-phosphocycliques (A>p) sur une matrice de polyuridines produit jusqu'à 97% de liaison de type 2',5' avec une efficacité d'environ 15-20% (Renz et al., 1971), ce qui est conforme aux résultats observés pour l'autoligation de la polarité négative de PLMVd (chapitre 1). Il est suggéré que la production presque exclusive de 2',5' est le résultat du plus grand caractère électrophile de la liaison 3' phosphate comparativement à la liaison 2' phosphate (Ruest et Lesage, communication personnelle). En effet, il semble que la liaison 2' serait soumise à l'effet anomère du ribose. La base au carbone C1 du sucre tend à être axiale plutôt qu'équatoriale en raison de la répulsion entre l'oxygène du cycle et la base (Ternay, 1979). Cette conformation et la proximité de la base stabilise le lien 2' en augmentant la densité électronique de cette liaison. De plus, la liaison 3' est sensiblement plus faible en raison de l'effet électroattracteur du groupement phosphate en 5'. Cette liaison est par conséquent préférentiellement hydrolysée suite à l'attaque de l'extrémité 5'-hydroxyle sur le groupement 2',3'-phosphocyclique générant ainsi un lien phosphodiester de type 2',5'. (Ruest et Lesage, communication personnelle). Finalement, il est possible que la régiospécificité observée soit le résultat de certaines contraintes structurales. Par exemple, il semble que la nature de l'hélice formée par

un duplex ARN-ARN (hélice de type A) peut jouer un rôle important dans le type de liens phosphodiester formés (Renz et al., 1971). Les paires de bases de ces duplex sont beaucoup plus inclinées par rapport à l'axe de l'hélice que dans le cas de l'ADN, ce qui permet aux groupements 2'-OH des sucres de s'accommoder vers l'extérieur de l'hélice (Rawn, 1989). Cette orientation des hydroxyles dirigerait la formation préférentielle de liaisons de type 2',5'. Ainsi, il est intéressant de constater que le site d'autoligation de PLMVd est localisé à l'intérieur d'une importante tige relativement stable (figure 31). La formation de cette hélice est un pré-requis important pour la réaction d'autoligation car elle positionne correctement les 2 extrémités nécessaires à l'autoligation (Lafontaine et al., 1995), résultant ainsi en la formation d'un nouveau lien phosphodiester de type 2',5'.

La faible efficacité de la réaction d'autoligation est explicable par le fait que la vitesse d'hydrolyse des groupement 2',3'-phosphocycliques est beaucoup plus grande que la vitesse de formation du lien phosphodiester (chapitre 1) (Renz et al., 1971). Par contre, il est difficile d'expliquer pourquoi l'efficacité d'autoligation *in vitro* des transcrits de polarité négative de PLMVd est beaucoup plus élevée que celle des transcrits de polarité positive (F. Côté, résultats non publiés). Il est possible que les structures secondaires des deux polarités soit différentes et que des structures alternatives ou un repliement tertiaire puissent favoriser ou défavoriser l'autoligation de l'une ou l'autre polarité. Dans cet ordre d'idée, il a été démontré que les transcrits de PSTVd avaient une forte tendance à se dimériser suite à la formation possible d'hélices triples (Gast et al., 1998). Il est intéressant de souligner que la réaction de condensation des A>p sur une matrice poly-U décrite précédemment nécessitait, pour que celle-ci soit efficace, la formation d'une hélice triple constituée de copies de poly-U et de monoA>p (Usher et McHale, 1976; Renz et al., 1971). Il est donc possible que les brins de polarité négative de PLMVd puissent former de telles structures, augmentant ainsi l'efficacité de la réaction d'autoligation chez ces transcrits.

### 1.2.2. Autoligation de PLMVd *in vivo*

La découverte que l'autoligation de PLMVd *in vitro* forme un lien phosphodiester de type 2',5' a permis d'utiliser les caractéristiques de ce type de liaison afin de déterminer si cette réaction avait lieu *in vivo*. La détection de liaisons 2',5' dans les transcrits circulaires de PLMVd isolés à partir de feuilles de pêchers infectés supporte l'hypothèse de l'implication de l'autoligation dans le cycle de réplication de ce viroïde (chapitre 2). Cependant, ce résultat n'implique pas nécessairement que la circularisation *in vivo* des transcrits monomériques linéaires de PLMVd est le résultat d'une réaction d'autoligation. Il n'est pas exclus que la formation de ce lien soit le résultat d'une réaction catalysée par une enzyme de l'hôte. Par exemple, il a été démontré qu'une protéine isolée à partir d'extraits protéiques de *E. coli* peut liguer deux moitiés d'ARNt par la formation d'un lien phosphodiester de type 2',5' (Greer et al., 1983; Arn et Abelson, 1996). De plus, il est intéressant de souligner que comme pour l'autoligation, cette réaction ne requiert pas d'ATP, que les extrémités doivent être 2',3'-phosphocycliques et 5'-hydroxyles et que l'efficacité de cette ligation est d'environ 15-25%. La grande similarité observée entre cette réaction enzymatique et l'autoligation laisse croire que le rôle de cette protéine pourrait être de stabiliser le duplex formé par les deux moitiés d'ARNt ou de changer la conformation de celui-ci afin de positionner adéquatement les deux extrémités. Il est donc possible que la ligation observée dans ce cas puisse être le résultat d'une réaction d'autoligation.

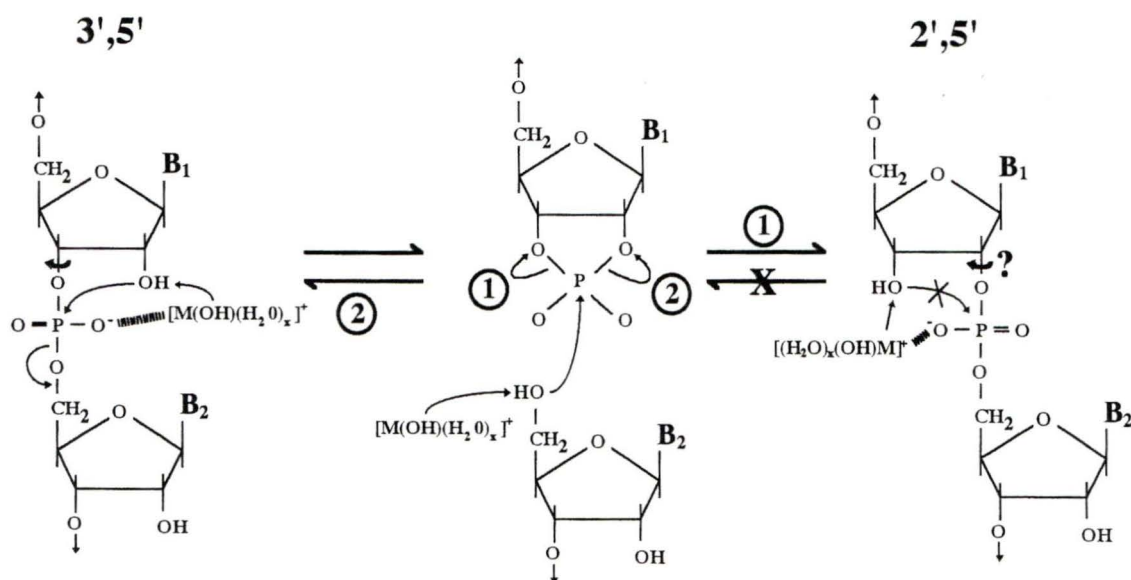
Plusieurs observations supportent l'hypothèse que la circularisation de PLMVd *in vivo* est le résultat d'une réaction d'autoligation plutôt qu'une ligation catalysée par une enzyme de l'hôte. Premièrement, aucune activité ligase n'a jamais été détectée dans des extraits de chloroplastes. Deuxièmement, s'il s'agit du produit d'une enzyme, nous devrions retrouver des liens 2',5' dans d'autres ARN cellulaires, ce qui n'est pas le cas. Troisièmement, la position de migration du dinucléotide isolé confirme que l'identité de celui-ci correspond à l'identité du dinucléotide formant le site d'autocoupeure/autoligation de

PLMVd. Quatrièmement, l'efficacité de la réaction d'autoligation observée *in vitro* est sensiblement la même que celle observée pour la circularisation de PLMVd *in vivo*. Fait à souligner dans ce cas-ci, l'analyse des intermédiaires de réplication de ce viroïde démontre que les transcrits circulaires de polarité positive et négative s'accumulent équimolairement *in vivo* (figure 16) (Bussière et al., 1999) alors que l'efficacité de la réaction d'autoligation *in vitro* était beaucoup plus élevée dans le cas de la polarité négative. Les raisons expliquant cette observation sont inconnues, mais il est possible qu'une protéine puisse stimuler l'autoligation des transcrits de polarité positive *in vivo* en favorisant l'adoption d'une structure plus active pour cette réaction. Cinquièmement, les exigences pour que l'autoligation de PLMVd puisse subvenir sont réunies, c.-à.-d. que le site d'autoligation est situé dans une tige très stable (P11) qui juxtapose les extrémités 2',3'-phosphocycliques et 5'-hydroxyles. Sixièmement, l'analyse des séquences bordant le site d'autoligation de PLMVd démontre la présence d'une certaine pression de sélection afin de garder un site d'autoligation actif et stable (figure 12). Finalement, il a été démontré que les transcrits linéaires de PLMVd isolés à partir de feuilles infectées étaient linéarisés au site d'autocoupeure/autoligation de celui-ci. Le fait qu'aucune liaison 2',5' n'ait été détectée dans ces transcrits linéaires confirme donc que cette liaison est localisée au site de recircularisation des transcrits circulaires de PLMVd *in vivo* et que celui-ci correspond au site d'autoligation identifié *in vitro*.

Certaines autres observations suggèrent qu'il est peu probable que le dinucléotide analysé provienne d'un ARN cellulaire qui aurait co-migré à la même position que les transcrits circulaires de PLMVd. Dans ce contexte, nous aurions dû également détecter ces dinucléotides dans l'échantillon d'ARN isolé à partir des extraits de feuilles saines, ce qui n'est pas le cas (tableau 1). Par contre, il est possible que ces dinucléotides puissent provenir d'un ARN cellulaire dont l'expression est induite suite à l'infection par le viroïde, ce qui expliquerait pourquoi celui-ci n'est pas détecté dans les extraits de plantes saines. Cependant, il faudrait pour expliquer ces résultats que ces transcrits soient exprimés strictement suite à

l'infection et qu'ils aient le même poids moléculaire ainsi qu'une structure circulaire similaire à PLMVd afin qu'ils puissent co-migrer avec les transcrits de PLMVd lors de l'électrophorèse en deux dimensions. De plus, il faudrait que ces ARN possèdent un lien 2',5' et que cette liaison soit située spécifiquement entre un dinucléotide C/U. Il est donc invraisemblable qu'un des gènes induits suite à une infection par PLMVd possède toutes ces caractéristiques. La position de migration des dinucléotides exclut la possibilité que ceux-ci puissent contenir un lien 3',5'[2' monophosphate], comme ceux retrouvés au site de ligation de certains ARN viraux (Kiberstis et al., 1985), un lien 2',5' comme celui présent au site de branchement des introns en lasso, ou comme celui des 2',5'-oligoadénylates de *E. coli* (A<sub>2</sub>'p<sub>5</sub>'A) (Trujillo et al., 1987). Finalement, la démonstration que les transcrits naturels de PLMVd ont perdu la capacité à s'autocouper est caractéristique de la présence d'un lien phosphodiester de type 2',5' dans ces transcrits (figure 16, piste 6). Il semble donc évident que la liaison 2',5' détectée dans les extraits d'ARN de feuilles infectées provient des transcrits circulaires de PLMVd et que celle-ci est le résultat d'une autoligation *in vivo*.

La fonction d'une telle liaison dans le cycle de vie de ce viroïde reste pour le moment que pure spéculation. Certains résultats nous ont permis de démontrer que la formation d'un lien phosphodiester de type 2',5' empêchait une réaction subséquente d'autocoupeure, aussi bien *in vitro* (figure 10, piste 4) qu'*in vivo* (figure 16, piste 6). Comme mentionné précédemment, le site de coupure de la structure en tête de marteau doit subir un changement conformationnel majeur pour que cette réaction puisse subvenir. Ce changement implique la rotation de la base et du ribose en C17 d'environ 60 degrés, permettant ainsi l'attaque du groupement 2'-hydroxyle au phosphate adjacent (figure 32) (Murray et al., 1998). Si ce réarrangement structural se produit (en présence d'une liaison 2',5'), le C17 tournera sur l'axe de la liaison 2' et il en résultera une conformation non propice à l'attaque du phosphate par le groupement 3'-hydroxyle. Ainsi, la présence d'un lien 2',5' inhiberait la réaction de coupure en modifiant la structure du site de coupure. La formation de ce type de liaison



**Figure 32.** Formation et fonction d'une liaison phosphodiester de type 2',5'. Suite à la réaction d'autocoupeure (voir figure 3), l'attaque de l'extrémité 5'-hydroxyle sur le 2',3'-phosphocyclique peut résulter en deux possibilités (chiffres encadrés). Premièrement, le lien 3' est hydrolysé, résultant ainsi en la formation d'une liaison 2',5'. Deuxièmement, l'hydrolyse de la liaison 2' génère un lien 3',5'. Dans ce dernier cas (structure *hairpin*), le changement conformationnel nécessaire à la réaction de coupeure (représenté par la flèche autour de la liaison 3') est possible, résultant à nouveau en une coupeure de ce lien. Dans le cas de la formation d'un lien 2',5' (PLMVd), il est possible que ce changement conformationnel ne soit pas possible (représenté par la flèche avec un point d'interrogation). S'il y a lieu, la rotation autour du lien 2' résulte en l'adoption d'une structure non propice à l'attaque du 3'-hydroxyle sur le phosphate adjacent et la réaction inverse est donc inhibée.



pourrait donc être un moyen utilisé par le viroïde pour préserver son intégrité circulaire et par le fait même, de se protéger contre la dégradation par des ARNase cellulaires. Toutefois, la détection que PLMVd s'accumule majoritairement sous la forme linéaire *in vivo* suggère que cette conformation doit être relativement stable (figure 16, piste 5) (Bussière et al., 1999). Par conséquent, il semble que la fonction principale de l'autoligation soit la formation de transcrits adéquats (circulaires) pour que la réplication en cercle roulant puisse subvenir. De plus, il est possible que la présence de cette liaison puisse favoriser l'interaction entre le viroïde et une ou des composantes cellulaires. En effet, il a été démontré que la présence de ce type de liaison dans une tige d'ARN diminuait la température de dénaturation de celle-ci (communication personnelle). Cette diminution de l'affinité entre les deux brins complémentaires pourrait favoriser l'interaction avec certains acides nucléiques ou certaines protéines de l'hôte. Une hypothèse intéressante est que la présence de cette liaison pourrait servir de signal de reconnaissance pour que la polymérase impliquée dans la réplication de PLMVd puisse reconnaître préférentiellement les transcrits circulaires de ce dernier. Ceci empêcherait ainsi l'initiation de la réplication sur des transcrits inaptes (linéaires) à supporter pleinement la réplication en cercle roulant.

L'utilisation des activités catalytiques chez les viroïdes de la famille des *Avsunviroïdæ* est possiblement le résultat de la localisation cellulaire de ces organismes (Lima et al., 1994; Bussière et al., 1999). Le chloroplaste ne semble pas posséder toutes les enzymes nécessaires aux différentes étapes de leur cycle de réplication, imposant ainsi une forte pression de sélection afin de maintenir les activités d'autocoupure et d'autoligation en fonction. Il est évident que la prochaine étape est de confirmer de façon biochimique l'utilisation *in vivo* de la réaction d'autoligation dans la réplication des viroïdes de la sous-famille des pelamoviroïdes. La meilleure façon d'accomplir cette tâche serait de vérifier la viabilité de différents mutants négatifs pour l'activité d'autoligation. Par contre, ces démonstrations risquent d'être relativement difficiles puisque des mutations dans ce domaine peuvent non seulement affecter l'autoligation, mais aussi l'autocoupure et la polymérisation

(voir section suivante). De plus, il a été démontré que les viroïdes ont habituellement un haut taux de mutations et que ceux-ci tendent à rétablir à l'aide de mutations compensatoires la séquence et la structure originale des mutants (Hu et al., 1997).

### 1.2.3. Étape de polymérisation

La localisation chloroplastique des viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* implique que la polymérase responsable de la réplication de ceux-ci diffère de celle déterminée pour les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae*. Les premières évidences de la nature de la polymérase impliquée dans la réplication de ces viroïdes démontrent que l'enzyme responsable de la réplication de ASBVd est probablement la NEP (Navarro et al., 2000; Navarro et Florès, 2000). Cette polymérase est une enzyme monomérique qui assure l'expression des gènes d'entretien du chloroplaste (*housekeeping genes*). Par contre, ces observations ne semblent pas s'appliquer à la réplication de PLMVd. La polymérase responsable dans ce cas-ci semble être la PEP, qui est une enzyme multimérique de 7-13 sous-unités impliquée dans la transcription des gènes spécifiques à l'activité photosynthétique. Les résultats obtenus démontrent que l'ARN polymérase d'*Escherichia coli* peut initier spécifiquement la réplication de PLMVd *in vitro* (chapitre 3). La grande similarité entre ces polymérases supporte l'implication de la PEP *in vivo*.

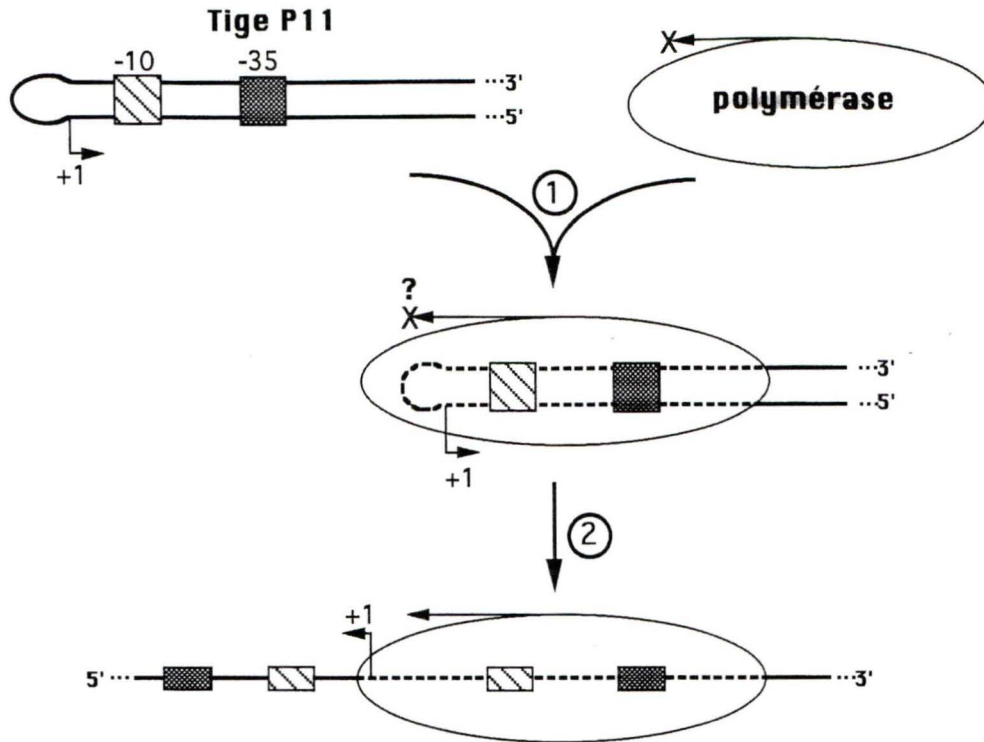
Il peut paraître surprenant que PLMVd et ASBVd puisse utiliser différentes polymérases pour leur réplication. Cependant, certaines observations suggèrent que les mécanismes contrôlant la réplication de ces viroïdes diffèrent. Tout d'abord, ces deux ARN ne possèdent pas de forte homologie, tant au niveau de leur structure primaire que secondaire. Ensuite, le contenu en AT est beaucoup plus élevé dans le cas de ASBVd que pour PLMVd et CChMVd. Fait intéressant, il semble que les promoteurs types de la NEP soient de courtes séquences de 15-19 nt riches en AT et placées immédiatement en amont du site d'initiation (Navarro et Flores, 2000). Certaines expériences ont permis de démontrer

que le site d'initiation de réplication d'ASBVd est situé dans une boucle de 17 nt entièrement composée de nucléotides AU. Ces observations corrélaient donc avec l'hypothèse de l'implication de la polymérase NEP dans la réplication de ASBVd. Cependant, ni PLMVd et ni CChMVd ne possède de telle région AU-riche, supportant l'hypothèse que l'enzyme impliquée dans la réplication de ces deux viroïdes n'est probablement pas la NEP, mais bien la PEP.

Les gènes exprimés par la PEP possèdent généralement une région promotrice ressemblant à celle retrouvée chez les procaryotes. Les caractéristiques majeures de ces promoteurs sont la présence de deux séquences conservées, situées à environ -10 et -35 nt du site d'initiation de la transcription. Bien que les séquences consensus proposées soient respectivement TATAAT (-10) et TTGACA (-35), celles-ci sont relativement flexibles et l'identité de ces séquences peut varier largement d'un gène à l'autre (Hawley et McClure, 1983). Dans le cas de PLMVd, les expériences effectuées démontrent que les éléments nécessaires à l'initiation de la réplication sont situés à l'intérieur de la tige P11. Malheureusement, les séquences précises permettant cette initiation ne sont pas encore caractérisées. Par contre, il est intéressant de constater que celles-ci sont localisées dans une région fortement double-brin qui pourrait mimer les caractéristiques d'un promoteur d'ADN double-brin (Rackwitz et al., 1981; Riesner et al., 1979). Cette caractéristique pourrait expliquer pourquoi des ARN polymérases habituellement ADN-dépendantes peuvent reconnaître et initier la réplication d'une matrice d'ARN. De plus, les boîtes conservées GAAAN et CUGANGA formant le centre catalytique de la structure en tête de marteau sont situées respectivement à environ -10 et -35 nt du site d'initiation de la réplication *in vitro* (chapitre 3). La conservation de ces séquences et leurs positionnements laissent croire que celles-ci pourraient jouer le rôle de promoteur chez PLMVd. Par contre, il a été démontré que la région *hammerhead* possédait d'autres séquences conservées qui n'ont pour l'instant aucune fonction connue (figure 31). Il est possible que celles-ci pourraient servir de promoteur.

Il a été démontré que les séquences présentes entre les deux boîtes conservées GAAAN et CUGANGA de la structure *hammerhead* peuvent se replier en une structure alternative (figure 24). L'adoption de cette structure modifie la distance relative entre les séquences promotrices potentielles -10/-35 et ce phénomène pourrait être utilisé par le viroïde afin d'empêcher la reconnaissance et l'attachement de la polymérase. Cette structure pourrait donc servir de modulateur afin de contrôler l'expression de PLMVd. Il est difficile pour le moment de confirmer sans l'ombre d'un doute l'utilisation des séquences *hammerhead* comme promoteur de la réplication de PLMVd, mais si ce n'était pas le cas, ces coïncidences seraient vraiment étranges. Dans le cas de ASBVd, la position des séquences catalytiques à l'intérieur du génome ne permet la formation adéquate d'un promoteur de type -10/-35. Cette observation pourrait ainsi expliquer pourquoi ASBVd utilise la NEP plutôt que la PEP. Les preuves soutenant l'hypothèse de l'utilisation de la PEP pour PLMVd et CChMVd et de la NEP pour ASBVd et la présence de régions promotrices ne sont pour le moment qu'indirectes et il est donc évident qu'une caractérisation précise de celles-ci sera nécessaire.

La localisation des séquences promotrices et du site d'initiation à l'extrémité de la tige P11 implique que l'initiation doit se faire dans la direction inverse de la reconnaissance du promoteur par la polymérase (figure 33). Il est difficile d'imaginer dans ce contexte comment l'initiation de la réplication peut subvenir. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène est illustrée à la figure 33. Dans cette hypothèse, la reconnaissance et l'attachement de la polymérase se produisent via la structure double-brin de la tige. Cette dernière est par la suite ouverte par l'activité hélicase de la polymérase, positionnant ainsi le site d'initiation dans la bonne orientation. Cette hypothèse est relativement intéressante, bien qu'elle souffre d'une légère lacune. En effet, il est connu que le brin d'ADN non transcrit joue un rôle actif dans l'expression des gènes (Guerin et al., 1996; Weston et al., 1997; Beletskii et Bhagwat, 1998). Or, la nature simple-brin de la matrice dans cette hypothèse implique l'absence d'un brin non transcrit. Cependant, le fait que PLMVd possède plusieurs



**Figure 33.** Mécanisme potentiel d'initiation de la réplication de PLMVd. Le sens de lecture de la polymérase est indiqué par la flèche au-dessus de celle-ci. La présence d'un X indique que l'initiation est inhibée. Le sens et le site d'initiation de la réplication sont indiqués par la flèche sur le brin inférieur de la tige P11. **1)** La reconnaissance et l'attachement de la polymérase sont dirigés via les séquences putatives -10/-35 et la forte structure secondaire de la tige P11. La présence du ? au dessus du X indique qu'il est peu probable que l'initiation puisse subvenir dans ce contexte en raison de l'orientation inverse de la polymérase et du site d'initiation. **2)** L'ouverture de la tige P11 positionne le site d'initiation dans la même orientation que le sens de la processivité de la polymérase. L'initiation de la réplication peut ainsi débuter.

boucles et régions simples-brins supporte l'idée que la présence du brin complémentaire non transcrit n'est pas absolument nécessaire pour qu'il puisse y avoir réplication. Il est difficile pour le moment de confirmer l'utilisation d'un tel mécanisme *in vivo* ou de tout autre mécanisme d'initiation de la réplication. Par contre, les résultats de sensibilité à la tagetitoxine (figure 19) suggèrent que les mécanismes de reconnaissance et d'initiation de la réplication (transcription) par une polymérase sur une matrice d'ARN ne sont pas les mêmes que dans le cas d'une matrice d'ADN. Il est donc évident que les connaissances actuelles à propos de ces mécanismes sont difficilement applicables aux viroïdes.

## 2. MÉCANISMES DE PATHOGENÈSE

La démonstration que PLMVd ne semble coder pour aucune protéine implique que les mécanismes de pathogenèse de ce viroïde doivent être médiés via l'interaction de celui-ci avec une ou des composantes cellulaires. Dans cet ordre d'idée, les expériences de coupure en *trans* d'un substrat par les séquences *hammerhead* de PLMVd effectuées pendant la transcription de ce dernier et en présence de la protéine A1 laissent croire qu'un tel mécanisme de pathogenèse pourrait être utilisé dans un contexte cellulaire. Par exemple, il est possible qu'une protéine cellulaire semblable à A1 puisse empêcher temporairement la formation de la tige P11 en se liant au brin naissant lors de la réplication de PLMVd. Cet événement favoriserait ainsi l'hybridation et la coupure du substrat potentiel. De plus, il n'est pas impossible que le brin matrice puisse lui aussi jouer un rôle dans la coupure d'un ARN cellulaire *in vivo*. En effet, il est possible que la présence de la polymérase et/ou de la liaison 2',5' puissent favoriser l'ouverture de la tige et permettre l'hybridation et la coupure d'un substrat par les séquences catalytiques du brin matrice.

L'hypothèse que les symptômes observés sont le résultat de la coupure en *trans* de l'ARNr 18S souffre du fait que ces deux ARN ne sont pas localisés dans le même

compartiment cellulaire. Toutefois, il est évident que le viroïde doit avoir une phase cytoplasmique afin de pouvoir se propager de cellule en cellule par le plasmodesme. Il est donc possible que la coupure puisse subvenir pendant cette phase. De plus, il a été observé que de petits fragments de PLMVd semblaient s'accumuler de façon stable *in vivo* (Bussière et al., 1999). Il est aussi possible que ces petits fragments ne soient pas confinés aux chloroplastes comme les transcrits monomériques et que par conséquent, ceux-ci puissent se retrouver au cytoplasme. Il est tentant de proposer que certains de ces ARN pourraient être exempts de la séquence inhibitrice et ainsi couper efficacement l'ARN 18S.

Ce mécanisme de pathogenèse pourrait expliquer pourquoi un changement minime dans la séquence du viroïde peut entraîner d'importantes différences dans la sévérité des symptômes observés. Malheureusement, cette hypothèse, comme les autres hypothèses de pathogenèse proposées (voir section 3.2. de l'Introduction), n'a pu être confirmée *in vivo*. Nous ne savons donc pas si les symptômes observés sont le résultat d'une de ces possibilités ou d'une combinaison de plusieurs de celles-ci. Par contre, étant donné la diversité des symptômes observés, il semble évident que les mécanismes de pathogenèse ne sont pas les mêmes pour toutes les espèces de viroïdes.

### 3. CONCLUSIONS

Les résultats présentés dans cette thèse ont permis d'éclaircir plusieurs étapes du mécanisme de réplication de PLMVd. Premièrement, ces résultats démontrent que les séquences *hammerhead* ont plusieurs fonctions dans le cycle de vie de PLMVd (figure 34). Ces séquences jouent un rôle de premier plan dans la coupure et la ligation des intermédiaires de réplication de ce viroïde, dans l'initiation de la réplication et possiblement dans les mécanismes de pathogenèse. Ces observations suggèrent ainsi que les fonctions associées aux séquences *hammerhead* de PLMVd sont possiblement partagées par d'autres organismes possédant ce genre de séquences. De plus, ces résultats démontrent que la réaction d'autoligation produit un lien phosphodiester de type 2',5'. Il ne serait pas surprenant de découvrir que ce type de liaison puisse être plus répandu qu'on le pense. Comme la technique utilisée précédemment pour détecter ces liaisons était basée sur une réaction d'élongation par la transcriptase inverse, il est donc normal que peu de liaisons 2',5' ont été détectées jusqu'à ce jour puisque cette enzyme peut lire ce type de lien (figure 9) (Lorsch et al., 1995). Cette dernière observation suggère que la formation d'un tel lien n'est pas une entrave majeure à la viabilité répliationnelle du viroïde puisque les polymérases peuvent lire ce type de liaison. Pour l'instant, PLMVd est le seul viroïde caractérisé qui utilise dans son cycle de réplication les activités d'autoligation et d'autocoupure. Toutefois, la très grande similarité structurale entre PLMVd et CChMVd et l'observation que ces viroïdes s'accumulent similairement *in vivo*, c.-à.-d. principalement sous la forme linéaire (Navarro et Florès, 1997; Bussière et al., 1999), suggèrent que ce dernier pourrait également utiliser l'autoligation dans son cycle de réplication. Il serait donc intéressant de vérifier la présence de liaison de type 2',5' dans les transcrits circulaires de CChMVd afin de déterminer si l'utilisation de cette réaction est une caractéristique commune aux membres de la sous-famille des pelamoviroïdes. Cette grande similarité entre ces deux viroïdes est très intéressante puisqu'elle ouvre de nombreuses

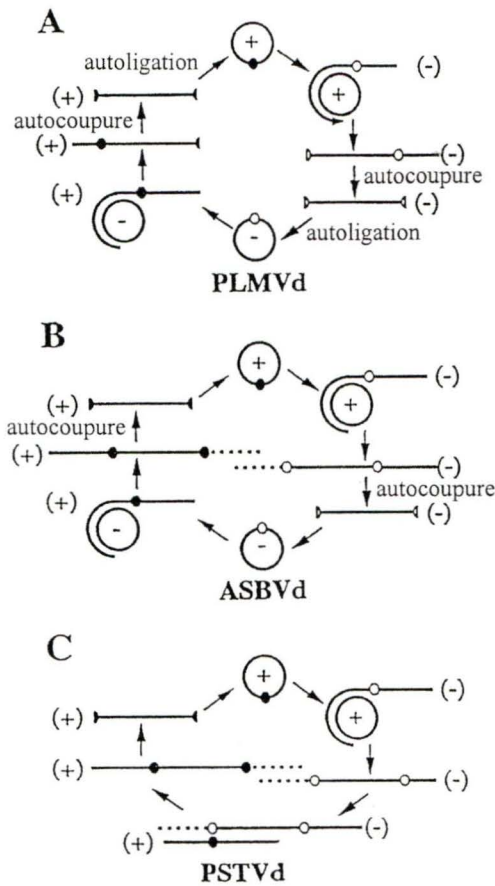




**Figure 34.** Représentation des différentes fonctions des séquences *hammerhead*. Les séquences conservées de la structure *hammerhead* présente à l'intérieur de la tige P11 de PLMVd sont indiquées par les rectangles pleins ou vides, représentant respectivement les séquences de polarité positive et négative. Les sites de coupure sont indiqués par les flèches avec la polarité correspondante entre parenthèses. Les flèches pleines numérotées de 1 à 4 représentent les différentes fonctions des séquences *hammerhead*. Les flèches pointillées numérotées représentent les liens entre ces différentes fonctions. 1) Ces séquences peuvent se replier en la structure catalytique *hammerhead* afin de couper en *cis* les brins multimériques de PLMVd. 2) L'adoption de la tige P11 par ces séquences permet de positionner les deux extrémités générées suite à l'autocoupure (1), résultant ainsi en la circularisation des transcrits monomériques linéaires via la formation d'un lien phosphodiester de type 2',5'. 3) Le positionnement et la conservation des boîtes CUGANGA et GAAAN suggèrent que celles-ci pourraient jouer le rôle de promoteur pour l'initiation de la réplication. Le symbole N représente la liaison phosphodiester de type 2'-5'. 4) Hybridation et coupure d'un ARN cellulaire par les séquences catalytiques de PLMVd. 5) La réaction de coupure génère les extrémités nécessaires à la réaction d'autoligation. 6) Il est possible que la formation d'une liaison 2',5' puisse favoriser l'attachement de la polymérase. 7) La présence d'une liaison 2',5' favorise l'hybridation d'un substrat en *trans* en diminuant la stabilité de la tige P11 et en empêchant l'hybridation du substrat en *cis*.

possibilités pour l'étude de leur cycle biologique. L'avancement des connaissances dans ce domaine était jusqu'à maintenant relativement limité en raison de la nature même des pêcheurs. L'utilisation des chrysanthèmes pourrait possiblement simplifier certaines approches expérimentales en raison de la plus grande facilité à manipuler ce type de plantes. La mise au point d'une technique efficace d'extraction de chloroplastes ou d'une lignée de protoplastes serait sans aucun doute d'une aide précieuse afin de confirmer plus directement la nature de la polymérase, l'implication de l'autoligation ainsi que les mécanismes de pathogénèse.

Il est intéressant de constater que le mécanisme de cercle roulant utilisé par les viroïdes varie entre les membres des différentes familles et sous-familles (figure 35). Alors que les viroïdes de la famille de PSTVd sont complètement dépendants des enzymes de l'hôte, PLMVd et possiblement CChMVd ne nécessitent que la présence de la polymérase. Toutes les autres étapes de leur cycle de réplication sont accomplies par des motifs ARN. Cette quasi-autonomie par rapport à leur mécanisme de réplication nous permet de spéculer à propos de l'origine de ces viroïdes. Selon nos connaissances actuelles sur un putatif monde à ARN qui aurait existé il y a environ 3,6 milliards d'année, les propriétés des ARN de cette période devaient certainement être la simplicité génomique, la stabilité et l'autonomie répliationnelle. Il est intéressant de constater que PLMVd possède toutes ces caractéristiques, de par sa petitesse, sa forte structure secondaire et son indépendance dans plusieurs étapes de son cycle de réplication. De plus, la formation de liaisons phosphodiesteres de type 2',5' est suggérée comme étant le résultat d'une réaction de chimie prébiotique. Ces observations pourraient facilement laisser croire que PLMVd est une relique d'un monde pré-cellulaire.



**Figure 35.** Comparaison des différents mécanismes de réplication utilisés par les viroïdes. La polarité des différents transcrits est indiquée entre parenthèses et dans les transcrits circulaires. Les sites d'autocoupage et les extrémités générées par cette réaction sont représentés respectivement par des cercles et des demi-cercles. L'utilisation d'activités autocatalytiques dans les différentes étapes du cycle de réplication est mentionnée lorsqu'il y a lieu.

Dans ce contexte, il est possible que les viroïdes puissent être les précurseurs des virus modernes par l'acquisition successive des différents gènes codant pour, par exemple, les protéines de la capsid et de la polymérase virale. Cette hypothèse est particulièrement attrayante dans le cas des organismes comme PLMVd qui possèdent une activité d'autoligation. Le mécanisme de "capture" des différents gènes pourrait être une autoligation en *trans* entre le viroïde et le gène en question, tout comme l'épissage inverse (*reverse splicing*) observé chez les introns autocatalytiques. Dans cet ordre d'idée, il a été démontré que les viroïdes pouvaient être co-encapsidés à l'intérieur d'une particule virale. Il est donc tentant de proposer que l'acquisition de gènes viraux par ce type de mécanisme pourrait être grandement facilitée par cette co-encapsidation, résultant ainsi en la formation de nouveaux virus. De plus, il est intéressant de constater que la majorité des éléments importants pour la réplication de PLMVd est localisée dans la tige gauche alors que les fonctions de la partie de droite du génome ne sont pas connues. L'observation que PLMVd peut être divisé en deux régions distinctes permet de spéculer que ce viroïde est possiblement le résultat de la fusion de deux ARN indépendants. Finalement, la présence d'activités autocatalytiques dans certains ARN satellites de virus de plantes supporte l'hypothèse que les viroïdes pourraient être les ancêtres de virus plus complexes.

Toutefois, certaines évidences suggèrent que l'origine des viroïdes pourrait être beaucoup plus récente. Tout d'abord, des homologues au niveau de la structure primaire et secondaire ont été identifiées entre les introns du groupe I et les viroïdes, suggérant ainsi que les viroïdes pourraient être des introns ayant acquis la possibilité de se répliquer (Diener, 1989). Par exemple, il a été démontré récemment que certains introns peuvent être excisés non pas sous la forme de lasso habituellement détecté, mais bien sous la forme d'ARN circulaire dont les extrémités sont reliées entre elles par une liaison de type 2',5' (Murray et al., 2000). Finalement, il est possible que les viroïdes aient évolué à partir de virus ayant perdu leurs gènes codants, un peu comme les particules déficientes interférantes (*defective interfering particle*) retrouvées suite à une infection virale.

Comme nous venons de le voir, les défis restent encore importants afin de percer les mystères des différentes étapes du cycle de vie des viroïdes. Afin de faciliter les futures expériences, il serait important d'essayer de synthétiser un viroïde minimum ayant gardé la capacité de se répliquer *in vivo*. Puisque la majorité des déterminants nécessaires au cycle de réplication de PLMVd sont localisés dans la tige P11, il serait intéressant de vérifier si cette tige, bordée de boucles aux deux extrémités, pourrait servir de viroïde minimum sans toutefois créer les symptômes caractéristiques (réplicon). La synthèse de ce type de molécules pourrait ouvrir la voie à l'utilisation de celles-ci pour certaines applications majeures. Par exemple, la capacité qu'ont ces ARN de se propager d'une cellule à la plante entière et de s'y répliquer de façon stable implique que ceux-ci pourraient être utilisés comme vecteur afin de délivrer intégralement un gène quelconque dans une plante adulte. Par exemple, un second ribozyme pourrait être inséré dans le réplicon dont la fonction serait de couper en *trans* un ARN cellulaire, comme par exemple un ARN de virus de plante, et ainsi agir d'agent thérapeutique.

Certaines autres expériences seraient intéressantes à exécuter d'un point de vue évolutif des viroïdes. Des expériences sont présentement en cours dans divers laboratoires afin de synthétiser une ARN polymérase composée uniquement d'ARN. Pour le moment, la processivité de ces polymérases est relativement limitée mais les progrès sont relativement importants. Il serait intéressant de greffer ce genre de polymérase au viroïde minimum afin de vérifier s'il est possible d'obtenir un organisme d'ARN complètement indépendant. Finalement, la mise au point et l'utilisation d'un système de réplication efficace des viroïdes *in vitro* ou *in vivo* permettrait d'analyser la capacité de PLMVd à se fusionner par autoligation en *trans* avec un autre ARN et de vérifier l'hypothèse que les viroïdes puissent être les ancêtres des virus plus complexes.

Les viroïdes sont un problème majeur dans le domaine agro-alimentaire et sont la cause de pertes de plusieurs milliards de dollars par année. Il est donc évident qu'il est de toute première importance de trouver un moyen de contrer ce fléau. De plus, les connaissances acquises par ces expériences pourront probablement nous aider à comprendre les mécanismes d'action de virus plus complexes. Pour le moment, les viroïdes sont confinés aux plantes, mais il n'est pas exclu que ces derniers ne traverseront pas un jour, si ce n'est déjà fait, la barrière les séparant du règne animal.

## **REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier le Dr Jean-Pierre Perreault de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir supporté et encouragé durant toutes ces années. Je voudrais également remercier tous les membres du laboratoire et du département de biochimie présents et passés que j'ai eu le plaisir de cotoyer, plus particulièrement la "gang", Frédéric Bussière, Daniel Lafontaine Serge Gravel pour les nombreux "happy hours" autour d'une bonne Boréale rousse, les soupers moules et frites et les bons souvenirs de nos excursions chasses et pêches. Finalement, je tiens à remercier ma famille qui m'a toujours supporté financièrement et SURTOUT moralement dans mes bons et moins bons moments.



## **RÉFÉRENCES**

- Amarzguioui, M., Prydz, H. (1998) Hammerhead ribozyme design and application. *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 1175-1202.
- Arn, E.A., Abelson, J.N. (1996) The 2'-5' RNA ligase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 31145-31153.
- Baumstark, T., Schröder, A. R.W., Riesner, D. (1997) Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, **16**, 599-610.
- Beaudry, D., Perreault, J.P. (1995) An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3064-3066.
- Beaudry, D., Bussière, F., Lareau, F., Lessard, C., Perreault, J.P. (1995) The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 745-752.
- Beletskii, A., Bhagwat, A.S. (1998) Correlation between transcription and C to T mutations in the non-transcribed DNA strand. *Biol. Chem.*, **379**, 549-551.
- Bertrand, E.L., Rossi, J.J. (1994) Facilitation of the hammerhead ribozyme catalysis by the nucleocapsid protein of HIV-1 and the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *EMBO J.*, **13**, 2904-2912.
- Birikh, K.R., Heaton, P.A., Eckstein, F. (1997) The structure, function and application of the hammerhead ribozyme. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 1-16.
- Bonfiglioli, R.G., Webb, D.R., Symons, R.H. (1996) Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.*, **9**, 457-465.
- Branch, A.D., Robertson, H.D. (1981) Longer-than-unit-length viroid minus strand are present in RNA from infected plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6381-6385.

- Branch, A.D., Robertson, H.D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C., Abelson, J. (1982) Cell free circularization of viroid progeny RNA by RNA ligase from wheat germ. *Science*, **217**, 1147-1149.
- Branch, A.D., Robertson, H.D. (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*, **223**, 450-455.
- Branch, A.D., Benenfeld, B.J., Robertson, H.D. (1988) Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9128-9132.
- Bussièrè, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, L.J., Perreault, J.P. (1999) Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: Hallmark of group A viroids. *J. Virol.*, **73**, 6353-6360.
- Buzayan, J.M., Gerlach, W.L., Bruening, G. (1986) Nonenzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature*, **323**, 349-353.
- Clouet-d'Orval, B., Uhlenbeck O.C. (1997) Hammerhead ribozymes with a faster cleavage rate. *Biochemistry*, **36**, 9087-9092.
- Daros, J.A., Marcos, J.F., Hernandez, C., Florès, C. (1994) Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12813-12817.
- Davies, J.W., Kaesberg, P., Diener, T.O. (1974) Potato spindle tuber viroid. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology*, **61**, 281-286.
- Desvignes, J.C. (1986) Peach latent mosaic and its relation to peach mosaic and peach yellow mosaic virus diseases. *Acta Horticul.* **193**, 51-57.
- Diener, T.O. and Raymer, W.B. (1967) Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science*, **158**, 378-381.
- Diener, T.O. (1971) Potato spindle tuber "virus". A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, **45**, 411-428.

- Diener, T.O. (1981) Are viroids escaped introns? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5014-5015.
- Diener, T.O. (1989) Circular RNAs: relics of precellular evolution? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9370-9374
- Diener, T.O. (1993) The viroid: big punch in a small package. *Trends in Microbiol.*, **1**, 289-293.
- Diener, T.O., Owens, R.A., Hammond, R.W. (1993a) Viroids: The smallest and simplest agents of infectious disease. How do they make plants sick? *Intervirology*, **35**, 186-195.
- Diener, T.O., Hammond, R.W., Black, T., Katze, M.G. (1993b) Mechanism of viroid pathogenesis: Differential activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated,  $M_r$  68 000 protein kinase by viroid strains of varying pathogenicity. *Biochimie*, **75**, 533-538.
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R., Owens, R. (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.*, **12**, 931-936.
- Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**, 479-501.
- Fedor, M.J. (2000) Structure and function of the hairpin ribozyme. *J. Mol. Biol.*, **297**, 269-291.
- Feldstein, P.A., Bruening, G. (1993) Catalytically active geometry in the reversible circularization of 'mini-monomer' RNA derived from the complementary strand of tobacco ringspot virus satellite RNA. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1991-1998.
- Feldstein, P.A., Hu, Y., Owens, R.A. (1998) Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6560-6565.
- Flores, R., Semancik, J.S. (1982) Properties of a cell free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6285-6288.

- Flores, R., Di Serio, F., Hernandez, C. (1997) Viroids: The noncoding genomes. *Seminars in Virology*, **8**, 65-73.
- Forster, A.C., Davies, C., Sheldon, C.C., Jeffries, A.C., and Symons, R.H. (1988) Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimers. *Nature*, **334**, 265-267.
- Gadea, J., Mayda, M.E., Conejero, V., Vera, P. (1996) Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **9**, 409-415.
- Gast, F.U., Kempe, K., Sanger, H.L. (1998) The dimerization domain of potato spindle tuber viroid, a possible hallmark for infectious RNA. *Biochemistry*, **37**, 14098-14107.
- Goss, R.W. (1926) Transmission of potato spindle tuber by cutting knives and seed piece contact. *Phytopathology*, **16**, 299-303.
- Greer, C.L., Javor, B., Abelson, J. (1983) RNA ligase in bacteria: Formation of a 2',5' linkage by an *E. coli* extract. *Cell*, **33**, 899-906.
- Grill, L.K., Semancik, J.S. (1978) RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 896-900.
- Gross, H.J., Domdey, H., Loscow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., Sanger, H.L. (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, **273**, 203-208.
- Gross, H.J., Liebl, U., Alberty, H., Krupp, G., Domdey, H., Ramm, K., Sanger, H.L. (1981) A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchange only. *Biosci. Rep.*, **1**, 235-241.
- Guerin, M., Leng, M., Rahmouni, A.R. (1996) High resolution mapping of *E. coli* transcription elongation complex *in situ* reveals protein interactions with the non-transcribed strand. *EMBO J.*, **15**, 5397-5407.

- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell*, **35**, 849-857.
- Hadidi, A., Giunchedi, L., Shamloul, A.M., Poggipollini, C., Amer, M.A. (1997) Occurrence of peach latent mosaic viroid in stone fruits and its transmission with contaminated blades. *Plant Dis.*, **81**, 154-158.
- Hall, T.C., Wepprich, R.K., Davies, J.W., Weathers, L.G., Semancik, J.S. (1974) Functional distinctions between the ribonucleic acids from citrus exocortis viroid and plant viruses: cell-free translation and aminoacylation reactions. *Virology*, **61**, 486-492.
- Hampel, A., Tritz, R. (1989) RNA catalytic properties of the minimum (-) sTRSV sequence. *Biochemistry*, **28**, 4929-4933.
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, J.M., 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.
- Haas, B., Klanner, A., Ramm, K., Sanger, H.L. (1988) The 7S RNA from tomato leaf tissue resembles a signal recognition particle RNA and exhibits a remarkable sequence complementary to viroids. *EMBO J.*, **7**, 4063-4074.
- Hasseloff, J., Mohamed, N.A., Symons, R.H. (1982) Viroids RNAs of the cadang cadang disease of coconuts. *Nature*, **299**, 316-332.
- Hawley, D.K., McClure, W.R. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2237-2255.
- 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. USA*, **89**, 3711-3715.

- Herschlag, D., Khosla, M., Tsuchihashi, Z., Karpel, R.L. (1994) An RNA chaperone activity of non-specific RNA binding proteins in hammerhead ribozyme catalysis. *EMBO J.*, **13**, 2913-2924.
- Hertel, K.J., Herschlag, D., Uhlenbeck, O.C. (1996) Specificity of hammerhead ribozyme cleavage. *EMBO J.*, **15**, 3751-3757.
- Hiddinga, H.J., Crum, C.J., Hu, J., Roth, D.A. (1988) Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, **241**, 451-453.
- Hu, Y., Feldstein, P.A., Hammond, J., Hammond, R.W., Bottino, P.J., Owens, R.A. (1997) Destabilization of potato spindle tuber viroid by mutations in the left terminal loop. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1199-1206.
- Hutchins, C.J., Keese, P., Visvader, J.E., Rathjen, P.D., McInnes, J.L., Symons, R.H. (1985) Comparison of multimeric plus and minus strands of viroids and virusoids. *Plant Mol. Biol.*, **4**, 293-304.
- Jakob, B., Gamalei, Y., Wolf, R., Heber, U., Gross, H.J. (1997) Photooxydative damage in young leaves of declining grapevine: Does it result from a new and possibly viroid-related disease? *Plant Cell Physiol.*, **38**, 1-9.
- Jeong, W., Kang, C. (1994) Start site selection at lacUV5 promoter affected by the sequence context around the initiation sites. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4667-4672.
- Karayannis, P. (1998) Hepatitis D virus. *Rev. Med. Virol.*, **8**, 13-24.
- Kiberstis, P.A., Haseloff, J., Zimmermann, D. (1985) 2' phosphomonoester, 3'-5' phosphodiester bond at a unique site in a circular viral RNA. *EMBO J.*, **4**, 817-827.
- Kiss, T., Solymosy, F. (1982) Sequence homologies between a viroid and a small nuclear RNA (snRNA) species of mammalian origin. *FEBS Lett.*, **144**, 318-320.
- Kiss, T., Posfai, J., Solymosy, F. (1983) Sequence homology between potato spindle tuber viroid and U3B snRNA. *FEBS Lett.*, **163**, 217-220.

- Klemens, J.H., Uhlenbeck, O.C. (1995) The internal equilibrium of the hammerhead ribozyme reaction. *Biochemistry*, **34**, 1744-1749.
- Konarska, M., Fillipowicz, Domdey, H., W., Gross, H.J. (1981) Formation of a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ. *Nature*, **293**, 112-116
- Konarska, M., Fillipowicz, W., Gross, H.J. (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. USA*, **79**, 1474-1478.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottshling, D.E., Cech, T.R. (1982) Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*, **31**, 147-157.
- Lafontaine, D., Beaudry, D., Marquis, P., Perreault, J.P. (1995) Intra- and intermolecular nonenzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology*, **212**, 705-709.
- Langland, J.O., Langland, L.A., Roth, D.A. (1996) Polyanion regulation of the plant-encoded double-stranded RNA-dependant protein kinase (pPKR). *Plant Physiol. Biochem.*, **34**, 521-526.
- Lima, M.I., Fonseca, M.E., Flores, R., Kitajima, E.W. (1994) Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by *in situ* hybridization. *Arch. Virol.*, **138**, 385-390.
- Liu, Y.H., Symons, R.H. (1998) Specific RNA self-cleavage in coconut cadang cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA*, **4**, 418-429.
- Lohrmann, R., Orgel, L.E. (1980) Efficient catalysis of polycytidylic acid-directed oligoguanylate formation by  $Pb^{2+}$ . *J. Mol. Biol.*, **142**, 555-567.

- Long, D.M., Uhlenbeck, O.C. (1994) Kinetic characterization of intramolecular and intermolecular hammerhead RNAs with stem II deletions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 6977-6981.
- Lorsch, J.R., Bartel, D.P., Szostak, J.W. (1995) Reverse transcriptase reads through a 2',5' linkage and a 2'-thiophosphate in a template. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2811-2814.
- Luzi, E., Eckstein, F., Barsacchi, G. (1997) The new ribozyme is part of a riboprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 9711-9716.
- Marcos, J.F., Flores, R. (1992) Characterization of RNAs specific to avocado sunblotch viroid synthesized *in vitro* by a cell free system from infected avocado leaves. *Virology*, **186**, 481-488.
- McCay, D.B. (1996) Structure and function of the hammerhead ribozyme - an unfinished story. *RNA*, **2**, 395-403.
- Merriam, D., Bonde, R. (1954) Dissemination of spindle tuber by contaminated tractor wheels and by foliage contact with diseased plants. *Phytopathology*, **44**, 111.
- Mülbach, H.P., Sanger, H.L. (1979) Viroid replication is inhibited by  $\alpha$ -amanitin. *Nature*, **278**, 185-188.
- Murray, H.L., Coljee, V.W., Mikheeva, S., Donahue, W.F., Turczyk, B.M., Jarell, K.A., (2000) Circular group II intron RNAs and the generation of circular DNAs *in vivo*. *Cahier de résumé de RNA 2000: fifth annual meeting of the RNA society*. **5**, 518.
- Murray, J.B., Terwey, D.P., Maloney, L., Karpeisky, A., Usman, N., Beigelman, L., Scott, W.G. (1998a) The structural basis of hammerhead ribozyme self-cleavage. *Cell*, **92**, 665-673.
- Murray, J.B., Seyhan, A.A., Walter, N.G., Burke, J.M., Scott, W.G. (1998b) The hammerhead, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem. Biol.*, **5**, 587-595.



- Navarro, B., Flores, R. (1997) Chysanthenum chlorotic mottle viroid: Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11262-11267.
- Navarro, J.A., Daros, J.A., Flores, R. (1999) Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology*, **253**, 77-85.
- Navarro, J.A., 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.
- Navarro, J.A., Vera, A., Flores, R. (2000) A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology*, **268**, 218-225.
- Nissen, P., Ban, N., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) The structure of the 50S ribosomal subunit at 2.7 Angström resolution and its functional consequences. *Cahier de résumé de RNA 2000: fifth annual meeting of the RNA society*. **5**, 1.
- Orgel, L.E. (1986) RNA catalysis and the origins of life. *J. Theor. Biol.*, **123**, 127-149.
- Owens, R.A. and Diener T.O. (1982) RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 113-117.
- Owens, R.A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R.W., Riesner, D. (1996) RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology*, **222**, 144-158.
- Pelchat, M., Deschênes, P., Perreault, J.P., (2000a) The database of the smallest known auto-replicable RNA species: viroids and viroid-like RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **28(1)**, 179-180.

- Pelchat, M., Lévesque, D., Ouellet, J., Laurendeau, S., Lévesque, S., Lehoux, J., Thompson, D.A., Eastwell, K.C., Skrzeczkowski, L.J., Perreault, J.P. (2000b) 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.
- Pélissier, T., Wassenegger, M. (2000) A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA*, **6**, 55-65.
- Perreault, J.P., Altman, S. (1991) La ribonucléase P: une véritable enzyme à ARN *in vitro*. *Médecine/Sciences*, **7**, 847-850.
- Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R., Bruening G. (1986) Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science*, **231**, 1577-1580.
- Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V., Salazar, L.F. (1997) Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *J. Gen. Virol.*, **78**, 1207-1211.
- Rackwitz, H.R., Rohde, W., Sängner, H.L. (1981) DNA-dependant RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature*, **291**, 297-301.
- Rawn, J.D. (1989) *Traité de biochimie*. Éditions du renouveau pédagogique.
- Renz, M., Lohrmann, R., Orgel, L.E. (1971) Catalysts for the polymerization of adenosine cyclic 2',3'-phosphate on a poly (U) template. *Biochim. Biophys. Acta*, **240**, 463-471.
- Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, G., Kleinschmidt, A.K., Domdey, H., Jank, P., Groos, H.J., Sängner, H.L. (1979) Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.*, **133**, 85-115.
- Schindler, I.M., Mülbach, H.P. (1992) Involvement of nuclear DNA-dependant RNA polymerase in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.*, **84**, 221-229.

- Semancik, J.S., Conejero, V., Gerhart, J. (1977) Citrus exocortis viroid: survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology*, **80**, 218-221.
- Shamloul, A.M., Minafra, A., Hadidi, A. (1995) Peach latent mosaic viroid: Nucleotide sequence of a italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. *Acta Horticult.*, **386**, 522-530.
- Sharmeen, L., Kuo, M.Y.P., Taylor, J. (1989) Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J. Virol.*, **63**, 1428-1430.
- Sheldon, C.C., Symons, R.H. (1993) Is hammerhead self-cleavage involved in the replication of a virusoid *in vivo*? *Virology*, **194**, 463-474.
- Silver, S.L., Rasochova, L., Dineshkumar, S.P., Miller, W.A. (1994) Replication of barley yellow dwarf virus satellite RNA transcripts in oat protoplasts. *Virology*, **198**, 331-335.
- Spiesmacher, E., Mülbach, H.P., Schnölzer, M., Haas, B., Sängler, H.L. (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.
- Symons, R.H. (1981) Avocado sunblotch viroid: primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6527-6537.
- Ternay Jr., A.L. (1979) Contemporary organic chemistry. W.B. Saunders Company, second edition.
- Thomson, J.B., Sigurdsson, S.T., Zeuch, A., Eckstein, F. (1996) *In vitro* selection of hammerhead ribozymes containing a bulged nucleotide in stem II. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4401-4406.
- Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1994) A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 47-53.

- Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. (1996) Primary structure and expression of a pathogen induced protease (PR-69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 6332-6337.
- Trujillo, M.A., Roux, D., Fueri, J.P., Samuel, D., Cailla, H.L., Rickenberg, H.V. (1987) The occurrence of 2'-5' oligoadenylates in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, **169**, 167-173.
- Tsagris, M., Tabler, M., Sanger, H.L. (1991) Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1605-1612.
- Tsuchihashi, Z., Khosla, M., Herschlag, D. (1993) Protein enhancement of hammerhead ribozyme catalysis. *Science*, **262**, 99-101.
- Tuschl, T., Eckstein, F. (1993) Hammerhead ribozymes: Importance of stem-loop II for activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **90**, 6991-6994.
- Usher, D.A., McHale A.H. (1976) Nonenzymatic joining of oligoadenylates on a polyuridylic acid template. *Science*, **192**, 53-54.
- Van Tol, H., Buzayan, J.M., Feldstein, P.A., Eckstein, F., Bruening, G. (1990) Two autolytic processing reactions of a satellite RNA proceed with inversion of configuration. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1971-1975
- Warrilow, D., Symons, R.H. (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., Sanger, H.L. (1994) RNA-directed *de novo* methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**, 567-576.
- Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmeir, S., Gast, F.U., Riedel, L., Sanger, H.L. (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.

- Weston, B.F., Kuzmine, I., Martin C.T. (1997) Positioning of the start site in the initiation of transcription by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **272**, 21-30.
- Wilson, D.S., Szostak, J.W. (1999) *In vitro* selection of functional nucleic acids. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 611-647.
- Wolff, P., Gilz, R., Schumacher, J., Riesner, D. (1985) Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 355-366.

**ANNEXES**

## 1. ARTICLE :

**Evidence for a model ancestral viroid.**

Frédéric Bussière, Daniel Lafontaine, **Fabien Côté**, Danièle Beaudry

et Jean-Pierre Perreault

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

Article publié dans : Nucleic Acids Symposium Series, Vol. 33, 143-144, 1995

## Evidence for a model ancestral viroid

Frédéric Bussière, Daniel Lafontaine, Fabien Côté, Danièle Beaudry and Jean-Pierre Perreault\*  
Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,  
Québec J1H 5N4, Canada

### ABSTRACT

The generation of a phylogenetic tree of viroids and viroid-like plant satellite RNAs via computer analysis, coupled with several conspicuous biochemical characteristics of the rolling circle replication of these RNAs -including both self-cleavage and self-ligation- leads us to propose the peach latent mosaic viroid (PLMVd) as a current "living fossil" dating from a precellular world. Incorporated within this proposal is a revised mechanism of PLMVd rolling circle replication which requires a minimal protein involvement.

### INTRODUCTION

Viroids are small (246-375 nt) single-stranded circular RNAs that infect higher plants causing diseases in numerous crop species which result in significant economic losses in the agricultural industry (1,2). Both viroids and "viroid-like" plant satellite RNAs have been proposed as examples of "living fossils" from a precellular world (see Ref. 3). The fundamental belief of this hypothesis is that these biological macromolecules exhibit both genotypical and phenotypical functions.

Using the numerous viroid sequences published during the last five years, we have refined the phylogenetic analysis of viroids and viroid-like plant satellite RNAs (4). This modification of the phylogenetic tree was achieved using the maximum parsimony algorithms included in the PAUP package (5). This analytical method, coupled with the use of a larger number of species, permitted the prediction of a more parsimonious tree than any published to date (6-8). The resulting tree, which is summarized in figure 1, supports a monophyletic origin of these RNAs as proposed previously (3). As illustrated in figure 1, the viroid sequences are clustered in three groups (potato spindle tuber viroid (PSTVd) group, apple scar skin viroid (ASSVd) group and avocado sunblotch viroid (ASBVd) group), while satellite RNAs are clustered together in a fourth group. The cluster formed by the ASBVd, the PLMVd and the carnation stunt associated viroid (CarSAV, which is not yet formally classified as a viroid) supports the existence of the ASBVd group. The members of this group, which appears as an evolutionary link between the classical viroids and the related satellite RNAs, have the capacity to self-cleave by hammerhead structures.

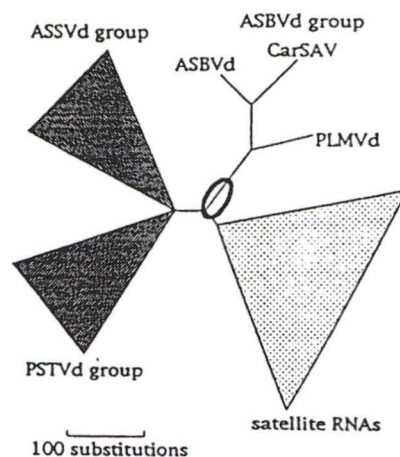
In this paper, we report several experiments designed to identify the member of the ASBVd group that most closely resembles the potential ancestral organism of both classical viroids and satellite RNAs.

### PHYLOGENETIC EXPERIMENTS

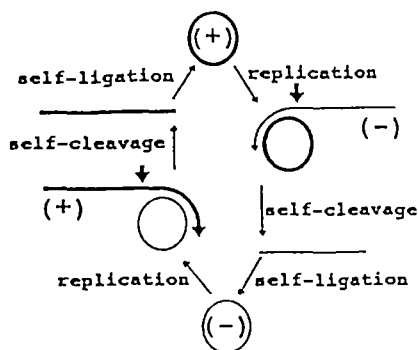
Two different approaches were used for rooting the proposed tree. Firstly the satellite RNAs were considered as the outgroup taxa; and, secondly, a minimal number of species, including members of each group, were used to computer generate phylogenetic trees by the exhaustive method using various outgroup taxa (including viroid-like domains of either the mitochondria transcripts from satellite 2 DNA or the human delta hepatitis virus, RNA replicon domains, etc). These analyses produced no precise root as no selection of outgroup taxa was perfect. However, all tested outgroups permitted the rooting of the tree in the first part of the ASBVd group branch (fig. 1). These results support the hypothesis that ASBVd group is an evolutionary link between the classical viroids and the satellite RNAs. Furthermore, these results suggest that the hammerhead motif was part of the ancestral viroid world as it is found in the members of ASBVd group.

### BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

To determine whether a viroid from the ASBVd group may be a current "living fossil", we considered their known



**Figure 1.** Schematic representation of the proposed phylogenetic tree of viroids and viroid-like plant satellite RNAs. The triangles are the lineages of the PSTVd group and ASSVd group. The triangle size represents the diversity of these lineages. For ASBVd group, each member is specifically identified. The circle (bold) defines the region where several taxa rooted the tree.



**Figure 2.**  
Simplified rolling circle mechanism proposed for PLMVd (see text for description).

replication characteristics. We characterized the hammerhead self-cleavage of dimeric, monomeric and mutated transcripts derived from RNA of both polarities of PLMVd (9). Several experiments demonstrated that transcripts of both polarities derived from PLMVd self-cleave exclusively by single hammerhead structures. This observation contrasts with the case of ASBVd and CarSAV whose mechanisms involve mostly double hammerhead structures. Single hammerhead cleavage is associated with viroid-like satellite RNAs, and this PLMVd characteristic suggests that it may be the more likely candidate as a current "living fossil" dating from the precellular world.

Furthermore, we have demonstrated the non-enzymatic self-ligation of transcripts both polarities of PLMVd (10), the first such description of this process with viroid sequences. Self-ligation occurs when the 5'-hydroxyl and the 2'-3'-cyclic phosphate termini produced by the hammerhead self-cleavage of the viroid RNA are juxtaposed by the viroid rod-like structure, and a phosphodiester bond is formed between the two following hydrolysis of the cyclic phosphate. The intramolecular self-ligation of PLMVd transcripts could contribute to the production of properly circularized viroids during rolling circle replication. In addition, these results suggest that an ancestral viroid may not require the existence of a specific ligase to produce circularized progeny.

### ROLLING CIRCLE MECHANISM

The discovery of both the self-ligation and the self-cleavage behavior of PLMVd transcripts suggests a reworking of the rolling circle mechanism of PLMVd replication (Fig. 2). Initially, the plus polarity circular RNA is copied to yield a RNA of minus polarity. In contrast to classical viroids (like PSTVd), the RNA polymerase II from wheat germ did not support the replication of PLMVd (unpublished data, F. Lareau and J.-P. Perreault) and ASBVd (11), in fact the RNA polymerase responsible for this step remains to be identified. Secondly, once the hammerhead motif is synthesized, the transcript rapidly self-cleaved. This reaction occurs concurrently with the polymerization step, hence no accumulation of long multimeric replicates is expected for PLMVd. Thirdly, the polymerization of the minus polarity

RNA is pursued, and, when a unit-length transcript is complete, the RNA folds into its stable rod-like structure which brings both termini into the close proximity required for self-ligation. This last reaction may be partly nonenzymatic, enhanced by a protein cofactor or catalyzed by a protein *in vivo*. The self-ligation has the advantage of favorizing the formation of a 2',5'-phosphodiester bond which prevents further intramolecular self-cleavage. The same three steps are repeated to yield the progeny viroids. In contrast to the proposed replication mechanism for classical viroids, which requires different enzymes for each step, only the polymerisation described here requires the involvement of an exogenous enzymatic activity. This simplified rolling circle mechanism could be important in the replication of ancestral viroids because of the minimal requirement for exogenous enzymatic activity.

The sequences required for both the self-cleavage and self-ligation of PLMVd, are localized in the left arm region and concentrated in ~100 nt of this viroid. This region is the replicational domain of PLMVd and could have been shared with an ancestral viroid.

### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was sponsored by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to J-PP. FL, DL and FC are in receipt of predoctoral fellowships from respectively Fondation George Phoenix, Fonds FRSQ-FCAR and Université de Sherbrooke. J-PP is a Scholar of the Medical Research Council of Canada (MRC).

### REFERENCES

1. Symons, R.H. (1990) *Semin. Virol.*, **1**, 75-81.
2. Diener, T.O. (1993) *Trends Microbio.*, **1**, 289-294.
3. Diener, T.O. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9370-9374.
4. Bussière, F., Lafontaine, D. and Perreault, J.-P. (1995) unpublished results.
5. Swofford, D.L. (1992) PAUP-Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Version 3.0 s.
6. Elena, S.F., Dopazo, J., Flores, R., Diener, T.O. and Moya, A. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5631-5634.
7. Hernandez, C. and Flores, R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3711-3715.
8. Hernandez, C., Elena, S.F., Moya, A. and Flores, R. (1992) *J. Gen. Virol.*, **73**, 2503-2507.
9. Beaudry, D., Bussière, F., Lareau, F., Lessard, C. and Perreault, J.-P. (1995) *Nucleic Acids Res.*, **23**, 745-752.
10. Lafontaine, D., Marquis, P., Beaudry, D. and Perreault, J.-P. (1995) submitted to *J. Virol.*
11. Lima, M.I., Fonseca, M.E.N., Flores, R. and Kitajima, E.W. (1994) *Arch. Virol.*, **138**, 385-390.

\*To whom correspondence should be addressed



2. CHAPITRE DE LIVRE :

**Ribozyme reactions of viroids.**

**Fabien Côté, Marcos De la Peña, Ricardo Flores et Jean-Pierre Perreault**

Département de Biochimie

Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

Chapitre publié dans le livre : Viroid diseases and their control (sous presse)

## 1. Introduction

Viroids replicate through a DNA-independent rolling-circle mechanism involving the synthesis of multimeric strands of both polarities and their subsequent cleavage into monomeric fragments, which are then circularized to produce the progeny (Branch and Robertson, 1984). Regarding whether or not the minus multimeric strands are cleaved and ligated to unit-length circular strands, which are then used as templates for the second half of the cycle, the viroid RNA is considered to replicate by either a symmetric or asymmetric mode (see chapter on replication in Section 3). While processing of the multimeric plus RNA intermediates is generally believed to require a host ribonuclease in members of family *Pospiviroidae* (formerly known as group B viroids), this step is autocatalytic and mediated by hammerhead ribozymes in members of family *Avsunviroidae* (formerly known as group A viroids) (reviewed in Symons, 1989; Flores *et al.*, 1998; see chapter on classification in Section 3). However, the possibility has been raised that the processing step is RNA-catalyzed in all cases (reviewed in Symons, 1997). The three viroid species of family *Avsunviroidae* known to date, avocado sunblotch viroid, ASBVd (Symons, 1981; Hutchins *et al.*, 1986), peach latent mosaic viroid, PLMVd (Hernández and Flores, 1992) and chrysanthemum chlorotic mottle viroid, CChMVd (Navarro and Flores, 1997), can adopt hammerhead structures on their plus and minus polarity strands and, as a consequence, they are presumed to replicate according to the symmetric rolling-circle mechanism. The hammerhead structures appear as the only "homologous molecular characters" shared by these viroids. Briefly, the hammerhead structure is a small RNA motif consisting of three sequence non-specific helices bordering a catalytic core of 11 conserved residues which form a complex array of non-canonical interactions (Prody *et al.*, 1986; Hutchins *et al.*, 1986; Forster and Symons, 1987; Pley *et al.*, 1994) (Fig. 1). The adoption of this structure in the presence of a divalent cation,

usually magnesium, results in the self-cleavage of the RNA chain at a specific phosphodiester bond creating 2',3'-cyclic phosphate and 5'-hydroxyl termini.

Biochemical knowledge in respect to both detailed structural features and molecular mechanism of the hammerhead structures has been reviewed recently (Flores *et al.*, 2000; Stage-Zimmermann and Uhlenbeck, 1998) and, therefore, will not be the main focus of this chapter that has for primarily aim to present the hammerhead structure as an essential molecular feature of the *Avsunviroidae* members and, particularly, of their replication cycle. We will also consider the potential of this self-cleaving motif to act in *trans* targeting cellular RNA and, more specifically, to contribute to viroid pathogenesis.

## **2. Hammerhead structures of viroids: molecular architecture**

Figure 2 shows the six hammerhead structures described so far in viroids. In ASBVd, the sequences involved in both polarity hammerhead structures are found in the upper and lower strands of the central domain of the quasi-rod-like secondary structure proposed for this viroid, with the remaining nucleotides of the genome, referred here as "extracatalytic" RNA sequences, flanking the central domain (Fig. 2A). Therefore, the sequences forming the catalytic core are not contiguous but segregated in two subdomains. In contrast, the sequences involved in the hammerhead structures of PLMVd and CChMVd are contiguous and located in an arm of their proposed branched conformation, with the "extracatalytic" RNA sequences constituting the rest of the genomes (Fig. 2B and C).

There are two classes of viroid hammerhead structures according to their morphology. The monomeric strands of PLMVd and CChMVd can adopt stable hammerhead structures with helices I and II of five-six base pairs closed by short loops 1 and 2 (the CChMVd minus hammerhead structure is an exception in having an unusually long imperfect helix II), and helices III of six-eight base-pairs (Fig. 2B and C). Conversely, the hammerhead structures that

can form the monomeric ASBVd RNAs are thermodynamically unstable, particularly in the plus polarity strand with a stem III of only two base pairs closed by a loop 3 of three residues (Fig. 2A). This very different architecture of the viroid hammerhead structures has deep implications for their *in vitro* and *in vivo* self-cleavage efficiency (see below).

Inspection of natural hammerhead structures shows that they are characterized by a central core with a cluster of strictly conserved nucleotide residues flanked by three double-helix regions (i.e. stems I, II and III) with loose sequence conservation except positions 15.2 and 16.2, which in most cases form a C-G pair, and positions 10.1 and 11.1, which in most cases form a G-C pair (Fig. 2). Some viroid hammerhead structures present unusual features. For example, a transition U to C affecting the conserved U4 in the plus hammerhead structure has been observed in a sequence variant of PLMVd (Ambrós and Flores, 1998). On the other hand, the common C17 preceding the minus self-cleavage site is A in a sequence variant of ASBVd, and the common pyrimidine residue at position 7 is substituted by an A in the minus hammerhead structure of another ASBVd variant (Rakowski and Symons, 1989). An extra A between A9 and G10.1 of the plus hammerhead structure of CChMVd has been also reported (Fig. 2C). This extra residue, which is compatible with extensive *in vitro* self-cleavage, could either induce a rearrangement of the junction between helix II and three adjacent non-canonical interactions of the central core, or be accommodated as a bulging residue. These and other sequence variations in the hammerhead structures retrieved in the nature from different self-cleaving RNAs have been compiled recently (see Flores *et al.*, 2000). The conservation of the sequences forming the hammerhead structures in the *Avsunviroidae* members, as well as in most other hammerhead structures known so far, extend beyond the strict requirements for self-cleavage, suggesting that additional selective pressures may act on these sequences. However, the identity of any other selective pressure remains unidentified.

### 3. *Cis*-acting hammerhead structures of viroids: *in vitro* and *in vivo* function

The similarities found between the plus and minus hammerhead sequences and their genomic organization within each viroid most likely have physical and functional consequences. The PLMVd and CChMVd sequences spanning the two hammerhead domains are almost complementary and can fold into structures with long double-stranded regions; this is the typical arrangement found in the most stable secondary structures predicted for the two viroids (Fig. 2B and C). These stable arrangements, formed by the superposition of the hammerhead sequences of both polarities, have the potential to prevent the adoption of the active hammerhead foldings, which are alternative structures of higher energy (Hernández and Flores, 1992; Beaudry *et al.*, 1995; Navarro and Flores, 1997). More importantly, self-cleavage inhibition permits the accumulation of certain levels of the viroid monomeric circular forms, which are the templates of the rolling-circle mechanism of replication. In addition, the compact non-self-cleaving structures may contribute positively to the extra- (e.g. during transmission) and intracellular stability of these RNA species. The peculiar organization of the hammerhead sequences may be also informative of mechanistic requirements. For example, these RNAs may need to have similar hammerheads in order to perform *in vivo* self-cleavage to essentially the same extent in both strands, as it appears to be the case in PLMVd (Bussière *et al.*, 1999). Interactions with cellular components (e.g. proteins) enhancing self-cleavage may have promoted conservation of similar hammerheads. Therefore, a complex synergy between the stability of the viroid RNA as a whole, and the mechanisms of self-cleavage regulation, has probably contributed to the emergence of the superposed hammerhead sequences.

As already indicated, the ability of viroid RNAs that possess autocatalytic sequences to self-cleave depends on their adoption of a conformation different from the most stable structure (Fig. 2). Self-cleavage of viroid strands occurs at either single or double

hammerhead structures depending on whether or not the sequences can form stable helices surrounding the catalytic core. Whereas the six hammerhead structures of viroids have stable helices I and II, this is not the case for helix III. Both polarity hammerhead structures of PLMVd have stable helices III and self-cleave *in vitro*, and most likely *in vivo*, through single hammerhead structures (Hernández and Flores, 1992; Beaudry *et al.*, 1995) (Fig. 2B). This is also probably the case with the two hammerhead structures of CChMVd, which also have stable helices III (Navarro and Flores, 1997), although the extended helix II of the minus hammerhead structure might facilitate the adoption of alternative foldings inactive for self-cleavage (Fig. 2C). In contrast, the single hammerhead structures of ASBVd have unstable helices III closed by short loops, and their self-cleavage is assumed to occur via double hammerhead structures involving longer-than-unit RNAs that allow stabilization of the catalytic core (Forster *et al.*, 1988) (Fig. 2A). ASBVd plus strands self-cleave through a double hammerhead structure during *in vitro* transcription and after gel purification, whereas ASBVd minus strands self-cleave via a double hammerhead structure during *in vitro* transcription, but mostly via a single hammerheads structure after gel purification (Davies *et al.*, 1991). This is most probably the consequence of the different stability of helix III in both hammerhead structures.

Direct enzymatic sequencing and primer extension experiments have shown that *in vitro* self-cleavage of ASBVd, PLMVd and CChMVd occurs at the positions predicted by the hammerhead structures (Hutchins *et al.*, 1986; Hernández and Flores, 1992; Navarro and Flores, 1997). The efficiency of the corresponding *in vitro* self-cleavage reactions can be high; for example, around 50-60% of PLMVd strands self-cleave under standard conditions (Hernández and Flores, 1992; Beaudry *et al.*, 1995). However, this efficiency is strongly increased (>95%) when the same RNAs are transcribed under conditions of slow polymerase activity, which favors the adoption of the active hammerhead structures catalyzing self-

cleavage reactions (Bussière, 1999). The self-cleavage efficiency is also strongly dependent on divalent ions such as Mg<sup>2+</sup>.

There is also solid evidence supporting the involvement of hammerhead structures in the *in vivo* processing of viroid RNAs with these catalytic domains. For ASBVd (Dar s *et al.*, 1994; Navarro and Flores, 2000), CChMVd (Navarro and Flores, 1997), and PLMVd (Hernández, unpublished data), linear RNAs of one or both polarities with 5'-termini identical to those generated in the corresponding *in vitro* self-cleavage reactions have been isolated from infected tissues. Moreover, the frequent occurrence in sequence variants of PLMVd (Hernández and Flores, 1992; Beaudry *et al.*, 1995; Ambrós *et al.*, 1998) and CChMVd (De la Peña *et al.*, 1999) of compensatory mutations or covariations that preserve the stability of the hammerhead structures, further support their *in vivo* role, as also does the correlation existing between the infectivity of different PLMVd and CChMVd variants and the extent of their self-cleavage during *in vitro* transcription (Ambrós *et al.*, 1998; De la Peña *et al.*, 1999).

*In vivo*, self-cleavage of viroid strands should be under regulation, with two different mechanisms appearing to operate for this purpose. In the case of PLMVd and CChMVd, their most stable secondary structures are transiently lost during transcription with the concurrent adoption of the active single hammerhead structures that promote self-cleavage before synthesis is completed and the most stable secondary structures are reformed. In ASBVd self-cleavage of monomeric strands is restricted because the single hammerhead structures are unstable whereas the multimeric replicative intermediates can adopt stable double hammerhead structures and self-cleave to their unit-length strands. Therefore, in both situations the hammerhead ribozymes are active only during replication. Self-cleavage of PLMVd RNAs *in vivo* appears almost optimal reaching near total processing of the multimeric strands into their corresponding monomeric units (Bussière *et al.*, 1999). For the reasons stated above, this high efficiency may be the result of slow progression of the host

RNA polymerase during replication. The situation seems similar in the case of CChMVd, for which the predominant RNAs accumulating in infected cells are also the monomeric linear strands of both polarities (Navarro and Flores, 1997). In contrast, the most abundant ASBVd RNA in infected tissue is the plus circular monomer, a clear indication of the low efficiency of the corresponding single hammerhead structure, although decreasing levels of multimeric strands up to octamers in size have been also detected (Bruening *et al.*, 1982).

#### **4. Viroid hammerhead structures: potential for *trans*-acting function**

In their natural context, the hammerhead structures of viroids operate in *cis* mediating the self-cleavage of the RNAs in which they are contained. However, active hammerhead structures can also be formed by annealing two different RNA fragments in *trans*, such that one RNA fragment acts as the ribozyme and the other as the substrate (see Fig. 3A). If the complementary regions between the two RNAs are short enough, the cleavage products will dissociate from the ribozyme, thus permitting the binding of new substrate molecules. Via successive rounds of binding and cleavage a single ribozyme molecule can therefore cleave many substrate molecules, thereby establishing a classic enzyme/substrate relationship (Uhlenbeck, 1987). Furthermore, by changing the complementary sequences between the ribozyme and its substrate, it is possible to create a ribozyme with new substrate specificity. A wide variety of RNAs can be targeted for cleavage by such engineered ribozymes (Fig. 3B). Because of their ability to interact directly with RNA, ribozymes, particularly those of the hammerhead class, are currently being developed as potential therapeutic agents for a wide range of applications based on the specific cleavage of different RNAs of biological relevance including viroids themselves (see the preceding chapter). In the coming years, altered forms of these versatile molecules will surely emerge as a new class of drugs.



Apart from these applications, a detailed description of which falls outside the scope of this chapter, we will consider the possibility that viroid pathogenesis of members of the family *Avsunviroidae* could result from *trans* cleavage of host RNAs recognized by the hammerhead ribozymes (Symons, 1989). No supporting evidence for such a mechanism has been reported yet. The following discussion is based on experiments performed with PLMVd as a model viroid in an attempt to put this intriguing hypothesis to test (Côté, 2000). Minimal artificial hammerhead ribozymes are prefolded into a quasi catalytically active structure and following the substrate binding, which involves the formation of helices at both sides of the cleavage site, the break of the scissile bond occurs. Natural hammerhead structures are integral features of viroid RNAs. In the most stable secondary structures of these RNAs, the hammerhead catalytic core is not formed because this is not the most stable structure. For example, active PLMVd hammerhead structures of both polarities are adopted either during the *in vitro* transcription or by a prior heat denaturation coupled to a snap-cooling treatment, that favor these active structures over others more stable but lacking catalytic activity. Therefore, the knowledge acquired from studies with minimal hammerhead ribozymes can not be simply extended to situations in which this catalytic motif is included in full-length viroid RNAs.

In order to compare the cleavage efficiency of a hammerhead catalytic sequence as a model molecule or as part of a viroid, a series of experiments were performed in which four PLMVd-derived transcripts, acting as the ribozyme, were tested for their ability to catalyze the cleavage of a short substrate (Côté, 2000). As expected, no cleavage products were detected when the ribozyme was a PLMVd 250-nt transcript lacking the hammerhead sequences, whereas most of the substrate (>85%) was cleaved by a ribozyme with the sequences corresponding to the minimal plus hammerhead structure. This efficient cleavage probably results from the absence of extra sequence interfering with the adoption of the

catalytically active folding. When the ribozyme was composed by a full-length PLMVd RNA circularized *in vitro* to have either a 3',5'- or a 2',5'-phosphodiester bond at the self-cleavage site, only a trace amounts of product (<1%) were detected in both cases. Finally, the ribozyme corresponding to the full-length PLMVd linear RNA that accumulates predominantly in infected peach cells was able to cleave the substrate, although with an extremely low efficiency (<5%). Further experiments showed that cleavage in this latter case was most likely performed by the hammerhead motifs released during the preliminary denaturation-renaturation treatment, because no cleavage was detected when this treatment was omitted. Altogether, these experiments indicate that the possibility that a viroid may function as a *trans*-acting ribozyme triggering a pathogenic cascade is unlikely. The main impediment comes from the catalytic sequences being embedded in very stable secondary structures, reducing considerably their ability to hybridize in *trans* with other RNAs.

As already mentioned, minimal hammerhead structures can catalyze efficiently *trans* cleavage of small substrates. The possibility that such an active ribozyme could be released by specific hydrolysis during the viroid life cycle seems remote because there is no indication supporting the idea that if the viroid is attacked by host RNases, the hammerhead sequences would be protected against degradation. Alternatively, minimal hammerhead structures could be transiently formed during viroid replication. Such a possibility has been evaluated by testing the cleavage of a model substrate during the *in vitro* transcription of a PLMVd dimeric RNA (Côté, 2000). In the absence of either the DNA template or the T7 RNA polymerase, no cleavage was observed. However, a small fraction of the substrate was cleaved during transcription, supporting the idea that if any *trans* cleaving activity exists this should occur during viroid replication. Additional experiments performed in the presence of protein A1, which has been previously shown to enhance the *trans* cleavage activity of hammerhead ribozymes (Herschlag *et al.*, 1994), have allowed to increase slightly the extent of cleavage

(Côté, 2000). In all, these results do not exclude that *in vivo* a host protein could open the compact PLMVd structure and favor the recognition and cleavage of a host RNA possessing a sequence targeted by the viroid hammerhead ribozymes. To this aim, at least two other requisites need to be met. First, the sequences forming the binding region of the ribozyme (i.e. one strand of helices I and II), should be expected to be conserved between sequence variants, but sequencing of numerous PLMVd natural variants (Hernández and Flores, 1992, Ambrós *et al.*, 1998; Pelchat *et al.*, 2000a) has shown that this is not the case. And second, a natural substrate(s) for the viroid hammerhead ribozymes should exist. PLMVd replication intermediates have been predominantly detected in chloroplasts but attempts to retrieve with well-established procedures chloroplastic sequence(s) which could be potentially cleaved by one or the other PLMVd hammerhead structures have been unsuccessful. Therefore, the hypothesis that PLMVd, and by extension other hammerhead viroids, may exert their pathogenic effect by hammerhead-mediated cleavage of a cellular RNA appears very unlikely.

## 5. Perspective

The previous discussion points out that in their natural context, hammerhead ribozymes of viroids are not good candidates for targeting cellular RNA of biological relevance. On the other hand, there is evidence that at least two viroids of the family *Avsunviroidae* replicate and accumulate in the chloroplast (see chapter on replication in Section 3) suggesting that, since they can be genetically manipulated and are endowed with the information to be host- and organelle-specific, they could be in principle appropriate vehicles for delivery of nucleic acid-based drugs into chloroplasts. It is clear that there is still a long way to go before such a development could be reached but since the hammerhead motif has to fold into an active conformation to express its catalytic *trans* cleaving potential, one option would be to engineer

viroids with pre-folded hammerhead structures. However, whether these modified ribozymes are compatible with normal viroid functions, particularly replication, remain to be known.

### **Acknowledgments**

This work was supported in part by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada to J.-P. P. and by grants PB95-0139 and PB98-0500 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología de España to R. F. F. C. and M. D. P. were recipients of predoctoral fellowships from the NSERC and Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR, Québec), and from the Ministerio de Educación y Cultura (España). J.-P. P. is a MRC scientist.

## References

- Ambrós, S., and 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 (1998).
- Ambrós, S., Hernández, C., Desvignes, J. C., and Flores, R. 1998. Genomic structure of three phenotypically different isolates of peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi-species. *J. Virol.* 72:7397-7406.
- Beaudry, D., Bussière, F., Lareau F., Lessard, C., and Perreault, J.-P. 1995. The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.* 23:745-752.
- Branch, A. D., and Robertson, H. D. 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* 223:450-455.
- Bruening, G., Gould, A. R., Murphy, P. J., and Symons, R. H. 1982. Oligomers of avocado sunblotch viroid are found in infected avocado leaves. *FEBS Lett.* 148:71-78.
- Bussière, F., Lafontaine, D., and Perreault, J.-P. 1996. Compilation and analysis of viroid and viroid-like RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 24:1793-1798.
- Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J., and Perreault, J.-P. 1999. Subcellular localization and the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J. Virol.* 73:6353-6360.
- Bussière, F. 1999. Le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd): un modèle pour mieux comprendre l'évolution et la biologie des viroïdes du groupe A. Ph. D. thesis from Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.
- Côté, F. 2000. Caractérisation des mécanismes de réplication et de pathogénèse du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd). Ph. D. thesis from Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

- Davies, C., Sheldon, C. C., and Symons, R. H. 1991. Alternative hammerhead structures in the self-cleavage of avocado sunblotch viroid RNAs. *Nucleic Acids Res.* 19:1893-1898.
- De la Peña, M., Navarro, B., and 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. USA* 96:9960-9965.
- Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M., and Diener, T. O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.* 143:623-629.
- Flores, R., Hernández, C., De la Peña, M., Vera, A., and Daròs, J. A. 2000. Hammerhead ribozyme structure and function in plant RNA replication. Pages XXX-XXX in: *Ribonucleases*. A. Nicholson, ed. *Meth. Enzymol.* J. N. Abelson and M. I. Simon, eds-in-chief. Vol XX (in press). Academic Press, New York.
- Forster, A. C., and Symons, R. H. 1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49:211-220.
- Forster, A. C., Davies, C., Sheldon, C. C., Jeffries, A. C., and Symons, R. H. 1988. Self-cleaving viroid and newt RNAs may only be active as dimers. *Nature* 334:265-267.
- Hernández, C., and Flores, R. 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3711-3715.
- Herschlag, D., Khosla, M., Tsuchihashi, Z., and Karpel, R. L. 1994. An RNA chaperone activity of non-specific RNA binding proteins in hammerhead ribozyme catalysis. *EMBO J.* 13:2913-2924.
- Hertel, K. J., Pardi, A., Uhlenbeck, O. K., Koizumi, M., Ohtsuka, E., Uesugi, S., Cedergren, R., Eckstein, F., Gerlach, W. L., Hodgson, R., and Symons, R. H. 1992. Numbering system for the hammerhead. *Nucleic Acids Res.* 20:3252.

- Hutchins, C. J., Rathjen, P. D., Forster, A. C. and Symons, R. H. 1986. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res.* 14:3627-3640.
- Navarro, B., and Flores, R. 1997. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11262-11267.
- Navarro, J. A., and 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
- Pelchat, M., Lévesque, D., Ouellet, J., Laurendeau, S., Lévesque, S., Lehoux, J., Thompson, D. A., Eastwell, K. C., Skrzeczkowski, L. J., and Perreault, J. P. 2000a. 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.
- Pelchat, M., Deschênes, P., and Perreault, J.-P. 2000b. The database of the smallest known autoreplicable RNA species: viroids and viroid-like RNAs. *Nucleic Acids Res.* 28:179-180.
- Pley, H., Flaherty, K. M., and McKay, D. B. 1994. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 372:68-74.
- Prody, G. A., Bakos, J. T., Buzayan, J. M., Schneider, I. R., and Bruening, G. 1986. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231:1577-1580.
- Rakowski, A. G., and Symons, R. H. 1989. Comparative sequence studies of variants of avocado sunblotch viroid. *Virology* 173:352-356.
- Stage-Zimmermann, T. K., and Uhlenbeck, O. C. 1998. Hammerhead ribozyme kinetics. *RNA* 4:875-889.

- Symons, R. H. 1981. Avocado sunblotch viroid: Primary sequence and proposed secondary structure. *Nucleic Acids Res.* 9:6527-6537.
- Symons, R. H. 1989. Self-cleavage of RNA in the replication of small pathogens of plants and animals. *Trends Biochem. Sci.* 14:445-450.
- Symons, R. H. 1997. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* 25:2683-2689.
- Uhlenbeck, O. C. 1987. A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 328:596-600.



## Legends to figures

**Fig. 1.** Consensus hammerhead structure derived from 23 natural hammerhead sequences, schematically represented as originally proposed with its numbering system and names of helices and loops (Hertel *et al.*, 1992) (left), and according to X-ray crystallography data (Pley *et al.*, 1994) (right). Letters on a dark background refer to absolutely conserved residues in all natural hammerhead structures and N to residues involved in Watson-Crick base pairs. Arrows indicate self-cleavage sites. Watson-Crick base pairs and non-canonical interactions are denoted with continuous and broken lines, respectively.

**Fig. 2.** Nucleotide sequence and alternative secondary structure of the hammerhead self-catalytic motifs of ASBVd (A), PLMVd (B) and CChMVd (C). At the left, delimited by flags, are represented the fragments of the most stable secondary structure proposed for these viroids that contain the sequences involved in forming both polarity hammerhead structures. Extracatalytic sequences are indicated by broken lines, conserved hammerhead residues by bars and self-cleavage sites by arrows. Closed and open symbols refer to plus and minus polarities, respectively. Within the right panels are the plus and minus hammerhead sequences folded into their active secondary structures. Stems I, II and III are shown and the arrowheads indicate self-cleavage sites. Letters on a dark background refer to conserved hammerhead residues. In the case of ASBVd, the double hammerhead structures are also shown. Sequence were retrieved from the viroid and viroid-like database (<http://www.callisto.si.usherb.ca/~jpperra>; Pelchat *et al.*, 2000b). Other details as in Fig. 1.

**Fig. 3.** Schematic representation of *trans*-acting hammerhead ribozymes. A. Two different formats depending on where the separation between the ribozyme itself (black letters) and the

substrate (grey letters) is established. **B.** A hammerhead ribozyme targeting a long mRNA substrate. Letters on a dark background refer to conserved hammerhead residues. Other details as in Fig. 1 and 2.

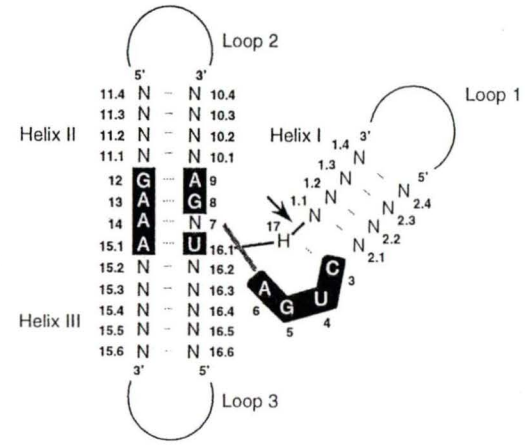
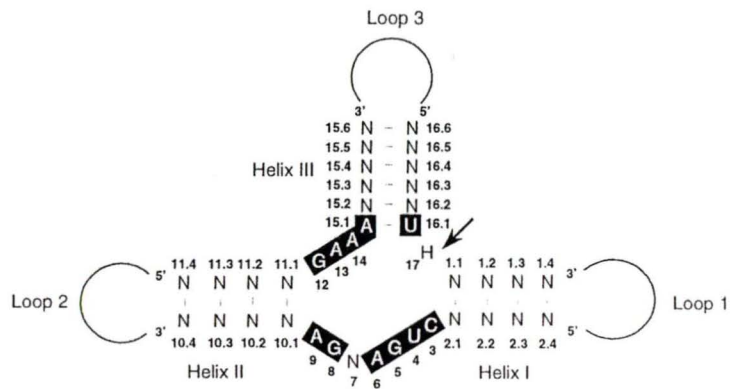
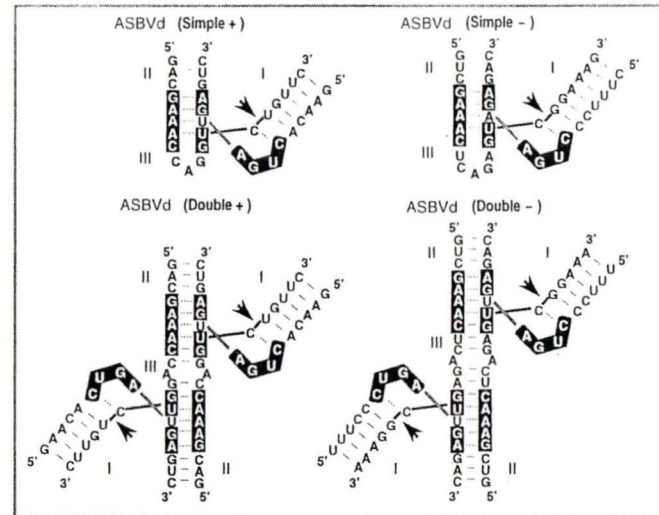
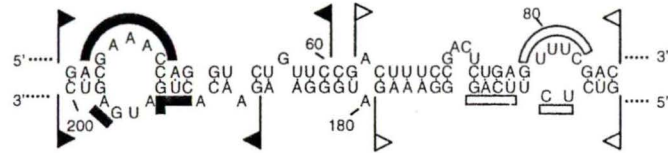
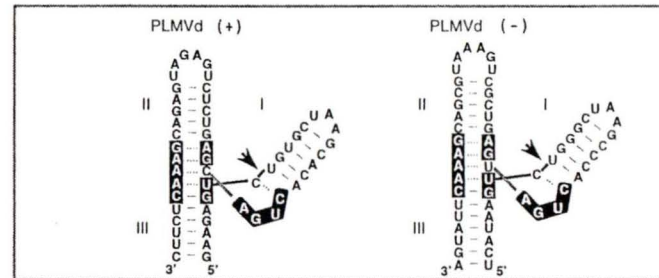
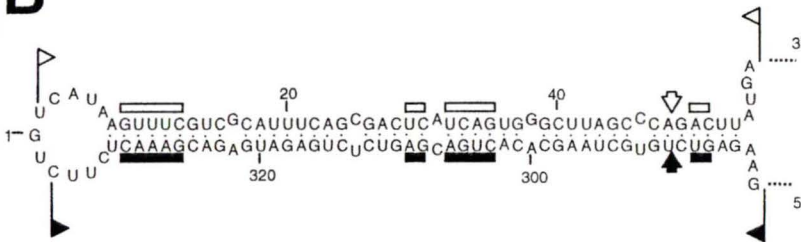
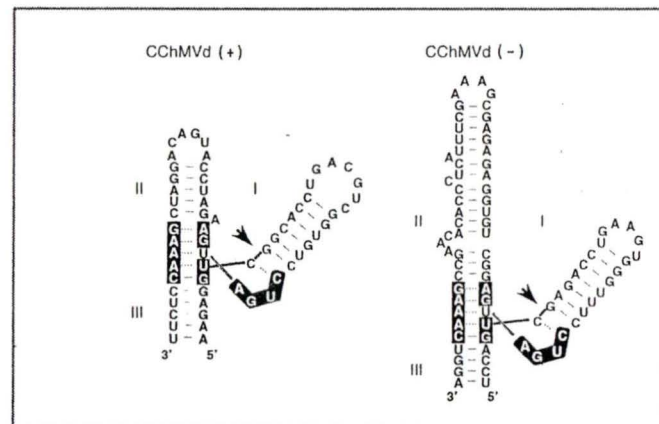
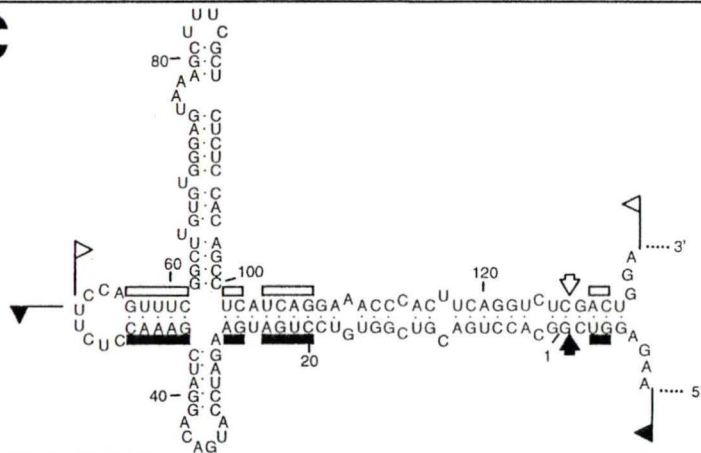


Fig. 1. Côté et al.,

**A****B****C**

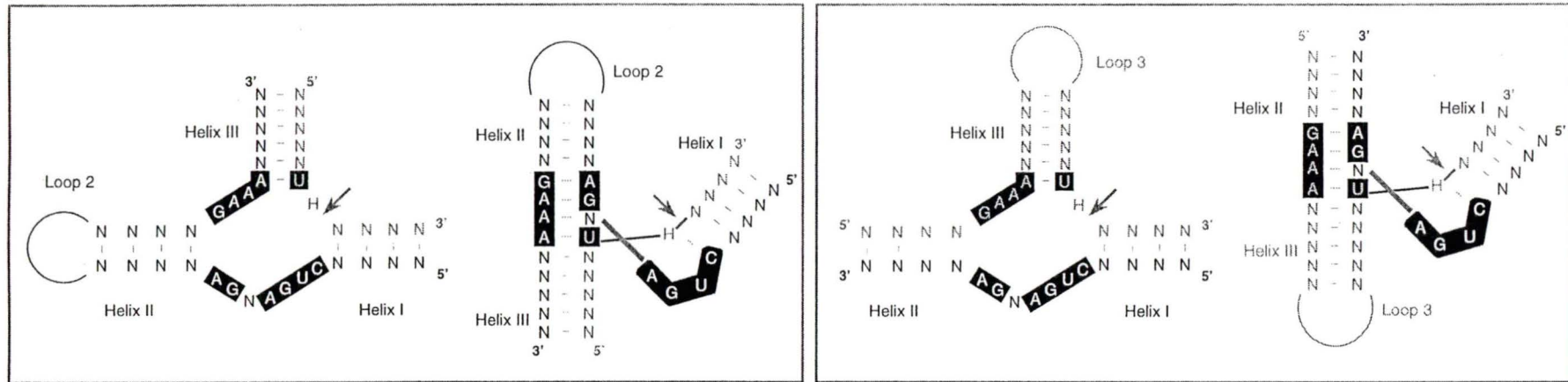
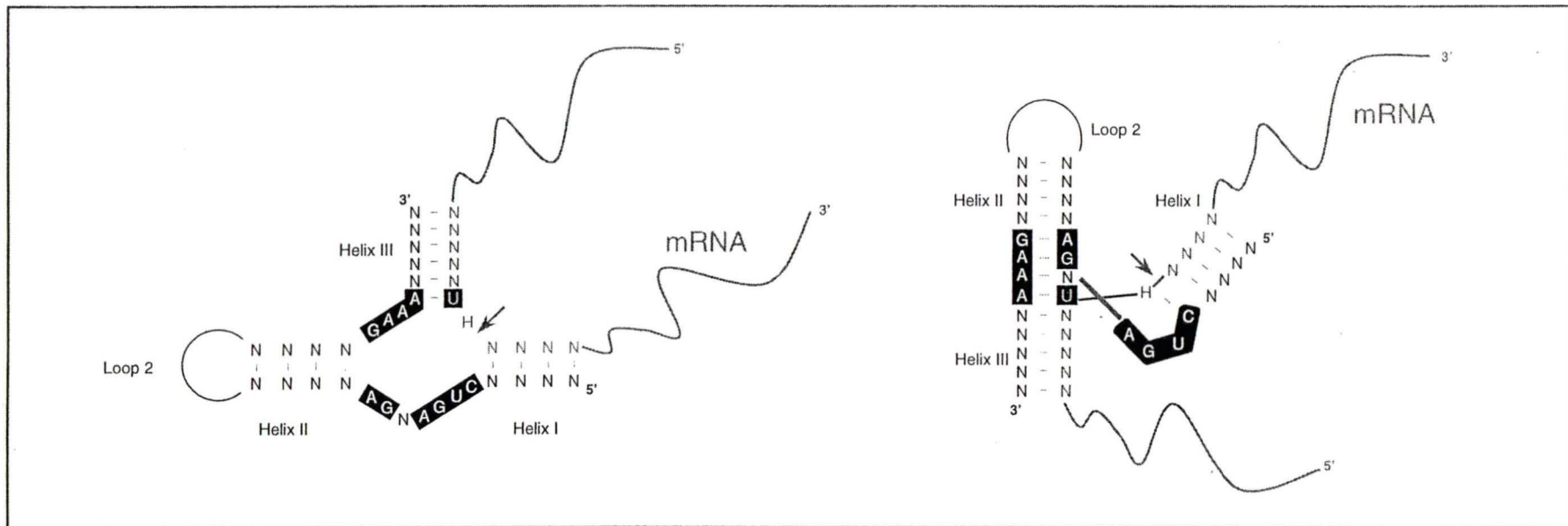
**A****B**

Fig. 3. Côté et al.,

### **3. LETTRES D'APPROBATION DES CO-AUTEUR(E)S**

Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

Frédéric Bussière, Daniel Lafontaine, Fabien Côté, **Danièle Beaudry** et Jean-Pierre Perreault.  
(1995) Evidence for a model ancestral viroid. *Nucleic acids symposium series*, 33, 143-144.

---

Danièle Beaudry

Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

**Frédéric Bussière**, Daniel Lafontaine, Fabien Côté, Danièle Beaudry et Jean-Pierre Perreault. (1995) Evidence for a model ancestral viroid. *Nucleic acids symposium series*, 33, 143-144.

**Frédéric Bussière**, Jonathan Ouellet, Fabien Côté, Dominique Lévesque et Jean-Pierre Perreault. (2000) Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.*, 74(6), 2647-2654.

— Frédéric Bussière



Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

Fabien Côté, Marcos De la Peña, **Ricardo Flores** et Jean-Pierre Perreault. (2000) Ribozyme reactions of viroids. *Viroid diseases and their control*. (chapitre de livre soumis).

---

Ricardo Flores

Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

Frédéric Bussière, **Daniel Lafontaine**, Fabien Côté, Danièle Beaudry et Jean-Pierre Perreault. (1995) Evidence for a model ancestral viroid. *Nucleic acids symposium series*, 33, 143-144.

Daniel Lafontaine

Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

Fabien Côté, **Dominique Lévesque** et Jean-Pierre Perreault. (2000) Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. Soumis a *J. Virol.*

Frédéric Bussière, Jonathan Ouellet, Fabien Côté, **Dominique Lévesque** et Jean-Pierre Perreault. (2000) Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.*, 74(6), 2647-2654.

Dominique Lévesque

Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

Frédéric Bussière, **Jonathan Ouellet**, Fabien Côté, Dominique Lévesque et Jean-Pierre Perreault. (2000) Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.*, 74(6), 2647-2654.

Jonathan Ouellet

Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

**Martin Pelchat**, Fabien Côté et Jean-Pierre Perreault. (2000) The self-catalytic hammerhead RNA domain of peach latent mosaic viroid acts as a promoter for *Escherichia coli* RNA polymerase. Soumis à *Virology*.

---

Martin Pelchat

Sherbrooke, le 27 août 2000

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

Fabien Côté, **Marcos De la Peña**, Ricardo Flores et Jean-Pierre Perreault. (2000) Ribozyme reactions of viroids. *Viroid diseases and their control*. (chapitre de livre soumis).

---

Marcos De la Peña

**Lettre d'approbation des co-auteur(e)s.**

Par la présente j'autorise Fabien Côté à inclure dans sa thèse de doctorat les articles mentionnés ci-dessous, pour lesquels je suis co-auteur(e)s.

Article(s):

Frédéric Bussière, Daniel Lafontaine, Fabien Côté, Danièle Beaudry et **Jean-Pierre Perreault**. (1995) Evidence for a model ancestral viroid. *Nucleic acids symposium series*, 33, 143-144.

Fabien Côté et **Jean-Pierre Perreault**. (1997) Peach latent mosaic viroid is locked by a 2',5'-phosphodiester bond produced by *in vitro* self-ligation. *J. Mol. Biol.*, 273(3), 533-543.

Fabien Côté, Dominique Lévesque et **Jean-Pierre Perreault**. (2000) Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. Soumis à *J. Virol.*

Frédéric Bussière, Jonathan Ouellet, Fabien Côté, Dominique Lévesque et **Jean-Pierre Perreault**. (2000) Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virol.*, 74(6), 2647-2654.

Martin Pelchat, Fabien Côté et **Jean-Pierre Perreault**. (2000) The self-catalytic hammerhead RNA domain of peach latent mosaic viroid acts as a promoter for *Escherichia coli* RNA polymerase. Soumis à *Virology*.

Fabien Côté, Marcos De la Peña, Ricardo Flores et **Jean-Pierre Perreault**. (2000) Ribozyme reactions of viroids. *Viroid diseases and their control*. (chapitre de livre soumis).

Fabien Côté et **Jean-Pierre Perreault**. (2000) Recent discovery of peach latent mosaic viroid led to new insights in the life cycle of such RNA species. En préparation pour *Nucleic Acids Res.*