

Polymorphisme des régions capsidique et 3'NTR de 3 isolats tunisiens du virus Y de la pomme de terre (PVY)

H Fakhfakh ^{1*}, M Makni ¹, C Robaglia ², A Elgaaied ¹, M Marrakchi ¹

¹ Laboratoire de génétique et biologie moléculaire, faculté des sciences de Tunis, campus universitaire,
1060 Le Belvédère, Tunis, Tunisie;

² INRA, laboratoire de biologie cellulaire, route de Saint-Cyr, F-78026 Versailles, France

(Reçu le 11 mai 1995 ; accepté le 10 novembre 1995)

Résumé — En Tunisie, le virus Y de la pomme de terre (PVY) occasionne des pertes importantes sur la production des cultures maraîchères, en particulier le piment. Le séquençage de la région 3' non codante (3'NTR) et de la région codante pour la protéine capsidique (CP) de 2 isolats de PVY d'origine piment et d'un isolat d'origine pomme de terre semble indiquer une corrélation entre les manifestations symptomatologiques de ces isolats et leurs propriétés moléculaires. La structure secondaire potentielle de l'ARN viral au niveau de la région 3'NTR montre des différences entre les 3 isolats. L'analyse de la séquence de la région codante pour la protéine capsidique suggère qu'un phénomène de recombinaison serait à l'origine de l'isolat d'origine piment PVY-P21.

PVY / 3'NTR / structure secondaire / capsidique

Summary — **Sequence polymorphism in the 3'-NTR and the CP protein of 3 Tunisian isolates of the potato virus Y.** In Tunisia, potato virus Y (PVY) causes yield losses, particularly on pepper cultures. Sequence analysis from the 3'-non-translated region (3'-NTR) and from the coat protein coding region (CP) of 2 PVY isolates from pepper and 1 from potato are in agreement with the biological classification. Potential RNA secondary structure analysis of the 3'-NTR region revealed additional differences between isolates. Phylogenetic analysis of these 3 sequences suggests that 1 isolate (PVY-P21) might have emerged through a recombination process.

PVY / 3'-NTR / secondary structure / CP

INTRODUCTION

En Tunisie, l'agriculture occupe une place de choix dans l'économie du pays. La production des cultures maraîchères a été marquée, ces

dernières années, par une baisse considérable due aux maladies d'origine cryptogamique et virale. Le principal agent viral, le virus Y de la pomme de terre (PVY), est le membre type du groupe des potyvirus, le plus important des virus

* Correspondance et tirés à part

végétaux avec plus de 180 membres (Brunt, 1992). Le génome de ce groupe est constitué d'un ARN simple brin positif d'environ 10 Kb, polyadénylé en 3' (Hari, 1981) est lié en 5' de manière covalente à une protéine (VPg) (Hollings et Brunt, 1981).

Les systèmes de traduction *in vitro* et la détermination des séquences nucléotidiques ont montré l'existence d'une seule phase de lecture ouverte (ORF) conduisant à la synthèse d'un précurseur polyprotéique d'environ 3 000 acides aminés. Ce précurseur est clivé par cascade autocatalytique pour générer 7 à 8 protéines virales (Carrington et Dougherty, 1987 ; Carrington *et al*, 1989; Verchot *et al*, 1991 ; Riechmann *et al*, 1992).

L'identification et la classification des potyvirus reposent essentiellement sur la sérologie et sur la symptomatologie. La gamme d'hôtes du PVY est constituée principalement de solanacées. Chez la pomme de terre, 3 groupes de souches ont pu être définis d'après la symptomatologie sur le tabac, la pomme de terre et sur d'autres plantes hôtes (De Bokx et Huttinga, 1981 ; Le Romancer *et al*, 1994). Par ailleurs, Gèbré Sélassié *et al* (1985) ont défini plusieurs pathotypes chez les populations virales inféodées au piment. Toutefois, la richesse du groupe ainsi que sa complexité ont engendré de nombreux problèmes de classification pour l'attribution des groupes et des pathotypes à des isolats donnés (Francki, 1983; Francki *et al*, 1985). Ces problèmes sont dus essentiellement à l'absence de corrélation entre les propriétés biologiques et les relations sérologiques (Francki, 1983). Actuellement, l'analyse des relations phylogénétiques déduites à partir de l'étude des séquences nucléotidiques et d'acides aminés peut conduire à une classification moins controversée.

La comparaison des séquences de la protéine capsidique de 17 souches de 8 potyvirus différents a montré un pourcentage d'homologie entre différents potyvirus compris entre 38 et 71% ; en revanche entre souches d'un même virus l'homologie est de l'ordre de 90 à 99% (Shukla et Ward, 1988).

L'analyse biologique de 21 isolats tunisiens de PVY collectés sur les cultures de piment (Fakhfakh *et al*, 1994) a permis de les répartir en 3 groupes :

- un groupe A dont le représentant (un seul isolat) s'attaque à toutes les variétés de piment sensibles et tolérantes mais pas à la variété résistante CM334.

- Un deuxième groupe B (14 isolats) s'attaquant uniquement aux variétés sensibles et induisant des mosaïques et des liserés de nervures.

- Un troisième groupe C (6 isolats) s'attaquant également uniquement aux variétés de piment sensible et montrant, en plus des symptômes observés chez les isolats du groupe B, des nécroses.

Dans la nomenclature proposée par Gèbré Sélassié *et al* (1985), le groupe A correspond au pathotype PVY-1, les groupes B et C correspondent au pathotype PVY-0.

La séquence des régions 5' non codante (5'NTR) et de la protéine P1 de 3 isolats tunisiens (PVY-P21, PVY-P2, PVY-Tu) a été déterminée et comparée 2 à 2 avec celle de plusieurs autres isolats de PVY (Marie-Jeanne Tordo *et al*, 1995). Le pourcentage d'identité nucléotidique de la région 5'NTR et le pourcentage de similarité en acides aminés de la protéine P1 ont permis de distinguer 3 groupes phylogénétiques. Les isolats tunisiens constituent, avec d'autres isolats d'origine méditerranéenne collectés sur piment et sur pomme de terre, un seul groupe.

Le présent travail consiste à analyser, chez 3 isolats tunisiens, les séquences de la région codante pour la protéine de la capsidique et celle de la région 3' NTR. Cette analyse est entreprise en raison de l'importance de la protéine capsidique qui est le déterminant majeur des relations sérologiques. Cette protéine, multifonctionnelle, intervient dans le maintien de la structure de la particule virale et son encapsidation (Shukla et Ward, 1989), dans la vection par les aphides grâce à la présence du motif DAG (Asp-Ala-Gly) situé dans le domaine N terminal (Atreya *et al*, 1991) ainsi que dans les mouvements de cellule en cellule (Dolja *et al*, 1995).

La région 3' non codante des potyvirus, riche en A et U est une région assez variable en taille et en séquence (Lain *et al*, 1988 ; Frenkel *et al*, 1989 ; Turpen, 1989). Elle se termine par la queue poly(A) codée par le génome viral (Dolja et Carrington, 1992). Cette région 3'NTR est impliquée dans l'initiation de la synthèse du brin négatif d'ARN (Bryan *et al*, 1992 ; Dolja et Carrington, 1992), ainsi que dans la sévérité de l'expression des symptômes (Rodriguez-Cerezo *et al*, 1991).

Par ailleurs, au niveau de cette région 3'NTR, une différence de séquences assez significative a permis de discriminer entre les divers potyvirus, d'une part, et entre les souches d'un même virus, d'autre part (Frenkel *et al*, 1989). Les résultats obtenus pour les isolats tunisiens sont discu-

tés en relation avec certaines différences symptomatologiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel biologique

Hôtes de multiplication du PVY

Les isolats tunisiens de PVY collectés sur la variété tunisienne de piment sensible «Beldi» ont été multipliés, après inoculation mécanique en présence d'un abrasif (carborundum), sur les variétés de tabac suivantes : *Nicotiana tabacum* var *xanthi*, *N. glutinosa* et *N. occidentalis*.

Isolats viraux utilisés

Les 3 isolats tunisiens de PVY analysés sont :

- PVY-P2 du groupe B qui induit des mosaïques et des liserés de nervures sur les variétés de piment sensible Beldi et Anaheim ;
- PVY-P21 du groupe C qui provoque, en plus des symptômes sus-cités, des nécroses ;
- PVY-Tu, un isolat prélevé sur pomme de terre mais qui ne provoque aucun symptôme sur les variétés de piment sensible Beldi et Anaheim (Fakhfakh *et al.*, 1994).

Chacun de ces isolats a été cloné biologiquement suite à au moins 2 passages successifs sur *Chenopodium amaranticolor*.

Méthodes

Purification du PVY

Le virus a été purifié selon le protocole de Dougherty et Hiebert (1980) avec quelques modifications. En effet, après précipitation au PEG 6000, le culot renfermant les particules virales est remis en suspension dans le tampon Hepes 20 mM pH 7,5 et laissé sous agitation lente à 4°C durant une nuit. Après clarification, les virions sont reprécipités par centrifugation à 110 000 *g* pendant 2 h. Le culot viral, repris dans le tampon Hepes 20 mM, EDTA 2 mM est soumis à une centrifugation à 35 000 rpm dans le rotor SW40 sur gradient de saccharose 10–40% pendant 2 h à 4°C. Après fractionnement (ISCO), la bande virale est diluée dans le tampon Hepes/EDTA. Les virions sont centrifugés et le culot repris dans de l'eau stérile.

Extraction de l'ARN viral

L'ARN viral est extrait en ajustant la solution virale à 1 mg/ml de protéinase K et 1% de SDS. Après extrac-

tion au phénol/chloroforme et précipitation à l'éthanol, l'ARN viral est remis en suspension dans de l'eau stérile.

Synthèse d'ADNc des régions capsidale et 3'NTR

Le premier brin d'ADNc capsidale a été synthétisé grâce à la transcriptase réverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV-TR, Boehringer) en initiant sur l'ARN viral avec un oligonucléotide anti-sens (A), complémentaire des nucléotides 9400-9418 de la séquence de la souche PVYⁿ-Fr (Robaglia *et al.*, 1989). La synthèse du second brin d'ADNc se fait par amplification enzymatique *in vitro* (PCR) en utilisant la Taq DNA polymérase (Promega), l'oligo anti-sens (A), ainsi que l'oligo sens (B) complémentaire aux nucléotides 8504-8522 de la séquence de la souche PVYⁿ-Fr.

– Oligo antisens (A) : 5' GCATATGTAAATACTTA 3'.

– Oligo sens (B) : 5' GCCTTCACTGAAATGAT 3'.

La région 3'NTR a été amplifiée grâce à l'oligo sens (B) décrit précédemment et l'oligo (C) comprenant 6 nucléotides complémentaires aux 6 derniers nucléotides du PVY suivis de 15 thymidines :

– oligo (C) : 5' TTTTTTTTTTTTTTTGTCTCC 3'.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée dans un thermocycler Perkin Elmer selon les conditions suivantes : 2 cycles (94°C 1 mn, 37°C 1 mn, 72°C 2mn), 28 cycles (94°C 1 mn, 45°C 1 mn, 72°C 2 mn) et 1 cycle (94°C 1 mn, 45°C 1 mn, 72°C 10 mn).

L'ADNc correspondant à la région capsidale a été cloné dans le vecteur pBluescript (Stratagene) selon la méthode de Marchuk *et al.* (1990).

Séquençage

Pour séquencer la totalité de l'ADNc capsidale, des sous-clones ont été obtenus par la méthode des délétions séquentielles (Steggles, 1989). Le séquençage de ces sous-clones dans un séquenceur automatique (Applied Biosystem) a été réalisé selon la méthode enzymatique (Sanger *et al.*, 1977) en utilisant le kit «Dye Primer». L'ADNc correspondant à la région 3'NTR a été séquencé directement à partir des produits d'amplification PCR en utilisant le kit «Dye Terminator» (Applied biosystem).

La séquence des isolats tunisiens a été comparée avec celle de 6 autres isolats de PVY au niveau de la région 3' NTR (tableau I) et 7 au niveau de la région capsidale (tableau II). Les comparaisons et les alignements de séquences en nucléotides et en acides aminés, les cartes de restriction ainsi que les structures secondaires ont été établis grâce aux programmes Seqed, Map, Translate, Gap, Pileup et Fold disponibles dans le serveur GCG (Genetic Computer Group) de l'INRA de Versailles (Devereux *et al.*, 1984).

Tableau I. Origine géographique et classification des isolats de PVY utilisés pour la comparaison avec les isolats tunisiens au niveau de la région 3'NTR (Pdt: Pomme de terre ; NTN : isolat du type N nécrogène sur tubercules de pomme de terre).

Isolats	Origine	Hôte		Référence
PVY ^{NTN} -Lib	Liban	Pdt	NTN	Le Romancer <i>et al</i> , 1994
PVY ^{NTN} -M	Hongrie	Pdt	NTN	Le Romancer <i>et al</i> , 1994
PVY ⁿ -Fr	France	Pdt	N	Robaglia <i>et al</i> , 1989
PVY ⁰ -CRNA	Japon		O	Hidaka <i>et al</i> , 1992
PVY ^{NTN} -H	Hongrie	Pdt	NTN	Thole <i>et al</i> , 1993
PVY ⁰ -A	Argentine	Pdt	O	Bravo-Almonacid et Mentaberry, 1989

Tableau II. Origine géographique et classification des isolats de PVY utilisés pour la comparaison avec les isolats tunisiens au niveau de la région codant pour la protéine capsid (Pdt : Pomme de terre ; NTN : isolat du type N nécrogène sur tubercules de pomme de terre).

Isolats	Origine	Hôte		Référence
PVY ^{NTN} -H	Hongrie	Pdt	NTN	Thole <i>et al</i> , 1993
PVY ⁿ -Fr	France	Pdt	N	Robaglia <i>et al</i> , 1989
PVY-T	Japon	Pdt	N	Oshima <i>et al</i> , 1991
PVY-capf	États-Unis	Tabac	O	Sudarsono <i>et al</i> , 1993
PVY-capb	États-Unis	Tabac	Potato US	Sudarsono <i>et al</i> , 1993
PVY-GO16	Allemagne	Pdt	O	Wefels <i>et al</i> , 1989

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Comparaison des séquences de la région 3'NTR

L'alignement de séquences des régions 3'NTR (fig 1) permet de mettre en évidence certaines différences entre les isolats tunisiens. En effet, l'isolat PVY-P2 se distingue des 2 autres par les substitutions en position 83, 110, 181, 215 et 247. L'isolat PVY-P21 se caractérise par une insertion en position 13 et l'isolat PVY-Tu présente par rapport aux autres une délétion en position 14.

Afin de définir des critères moléculaires permettant d'évaluer le polymorphisme entre les isolats tunisiens, les séquences de la région 3'NTR ont été comparées à des séquences d'isolats de PVY disponibles dans les banques de données (tableau I).

Le pourcentage d'identité en nucléotides a permis de distinguer 2 groupes au niveau du dendrogramme produit par le programme Pileup (fig 2). Le groupe (I) est constitué par les 3 isolats tunisiens, qui présentent entre eux une

homologie de l'ordre 99% ; le groupe (II) est constitué d'isolats du type O et du type N dont l'homologie intragroupe varie entre 93 et 99%. Cette analyse montre que les 3 isolats tunisiens sont regroupés, suggérant, comme pour les régions 5'NTR et P1, qu'ils auraient une origine commune (Marie-Jeanne Tordo *et al*, 1995). Dans cette comparaison, la souche PVYⁿ-Fr présente le plus faible niveau d'homologie (86–89%).

L'étude, par le programme Fold (GCG), de la structure secondaire potentielle de l'ARN des isolats tunisiens au niveau de cette région 3'-NTR suggère la présence respectivement de 5, 4 et 3 structures «tige-boucle» pour les isolats PVY-P21 (fig 3), PVY-Tu et PVY-P2. La séquence de la boucle I (AUAUGCA), située en position 40–42 à partir du codon stop, caractéristique du groupe O (Van der Vlugt *et al*, 1993), est strictement la même pour les 3 isolats. La séquence des boucles II (UUUCG) et III (UUUUG) situées respectivement en position 134 et 241-243 est identique chez les isolats PVY-P21 et PVY-Tu. L'isolat PVY-P2 présente des structures tige-boucle II et III différentes de celles des autres isolats conduisant à une structure secondaire

	1	**			50
PVY-Tu	TGATTGTGAT	GC..CTCTCC	GGACGATATA	TAAGTATTTA	CATATGCAGT
PVY-P21	TGATTGTGAT	GCCT TCTCTCC	GGACGATATA	TAAGTATTTA	CATATGCAGT
PVY-P2	TGATTGTGAT	GC.TCTCTCC	GGACGATATA	TAAGTATTTA	CATATGCAGT
	51		*		100
PVY-Tu	AAGTATTTTG	GCTTTTCCTG	TACTACTTTT	ATT TATAACTA	ATAATCAGTT
PVY-P21	AAGTATTTTG	GCTTTTCCTG	TACTACTTTT	ATT TATAACTA	ATAATCAGTT
PVY-P2	AAGTATTTTG	GCTTTTCCTG	TACTACTTTT	ATC TATAACTA	ATAATCAGTT
	101	*			150
PVY-Tu	TGAATATTAT	TAATAGATAG	AGGTGGCAGG	GTGATTTTCGT	CATTGTGGTG
PVY-P21	TGAATATTAT	TAATAGATAG	AGGTGGCAGG	GTGATTTTCGT	CATTGTGGTG
PVY-P2	TGAATATTAC	TAATAGATAG	AGGTGGCAGG	GTGATTTTCGT	CATTGTGGTG
	151		*		200
PVY-Tu	ACTCTATCTG	TTAATTCTGC	ATTATTAAGT	TTT TAGATAAA	AGTGCCGGGT
PVY-P21	ACTCTATCTG	TTAATTCTGC	ATTATTAAGT	TTT TAGATAAA	AGTGCCGGGT
PVY-P2	ACTCTATCTG	TTAATTCTGC	ATTATTAAGT	CTT TAGATAAA	AGTGCCGGGT
	201	*		*	250
PVY-Tu	TGTCGTTGTT	GT AGGTGAAC	CATCGATTAG	GTGATGTTGC	GATTT T TGTCG
PVY-P21	TGTCGTTGTT	GT AGGTGAAC	CATCGATTAG	GTGATGTTGC	GATTT T TGTCG
PVY-P2	TGTCGTTGTT	GT GGGTGAAC	CATCGATTAG	GTGATGTTGC	GATTT C TGTCG
	251				300
PVY-Tu	TAGCAGTGAC	TATGTCTGGA	TCTATCTACT	TGGGTGGTGT	TGTGATTT C G
PVY-P21	TAGCAGTGAC	TATGTCTGGA	TCTATCTACT	TGGGTGGTGT	TGTGATTT C G
PVY-P2	TAGCAGTGAC	TATGTCTGGA	TCTATCTACT	TGGGTGGTGT	TGTGATTT C G
	301			333	
PVY-Tu	TCATAACAGT	GACTGTAAAC	TTCAATCAGGA	GAC	
PVY-P21	TCATAACAGT	GACTGTAAAC	TTCAATCAGGA	GAC	
PVY-P2	TCATAACAGT	GACTGTAAAC	TTCAATCAGGA	GAC	

Fig 1. Alignement multiple des séquences en nucléotides de la région 3'NTR des isolats tunisiens. Les changements de nucléotides sont indiqués en gras et par un astérisque. L'isolat PVY-P2 se caractérise par 5 substitutions par rapport aux 2 autres isolats tunisiens. L'isolat PVY-P21 se caractérise par une insertion en position 13. L'isolat PVY-Tu présente une délétion en position 14.

totallement différente. La boucle IV située en position 296–302 est absente chez l'isolat PVY-P2. La boucle V située en position 313 n'est présente que chez l'isolat PVY-P21.

Le rôle des structures «tige-boucle» de la région 3'NTR a été démontré dans les interactions spécifiques entre l'ARN viral et la protéine capsidiale chez le phage R17 (Carey *et al*, 1983), dans la transactivation de la protéine «tat» chez le virus de l'immunodéficience humaine (HIV) (Feng et Holland, 1988), et dans l'induction des symptômes caractéristiques de l'infection virale chez le TMV (Rodriguez-Cerezo *et al*, 1991). Chez les isolats tunisiens, la structure secondaire potentielle de la région 3'NTR ainsi que la séquence de ses boucles semblent donc être impliquées dans l'expression des symptômes, ce qui pourrait expliquer l'apparition de nécroses sur les variétés de piment sensible

Beldi et Anaheim, uniquement suite à l'infection par l'isolat PVY-P21 (Fakhfakh *et al*, 1994).

Analyse des séquences de la région capsid

Les séquences nucléotidiques des 3 isolats tunisiens ont été déterminées (fig 4). La comparaison de ces séquences montre que l'isolat PVY-P21 se distingue des 2 autres isolats par 50 substitutions dont la position est indiquée par un astérisque. L'isolat PVY-Tu se distingue des autres isolats par 2 substitutions en position 630 et 705. Le nucléotide en position 615 est différent chez les 3 isolats. Par ailleurs, parmi les sites de restriction polymorphes (17 enzymes de restriction impliquées), seule l'enzyme BsrI possède un site de coupure au niveau de la séquence des isolats tunisiens sur piment (PVY-P2 et PVY-

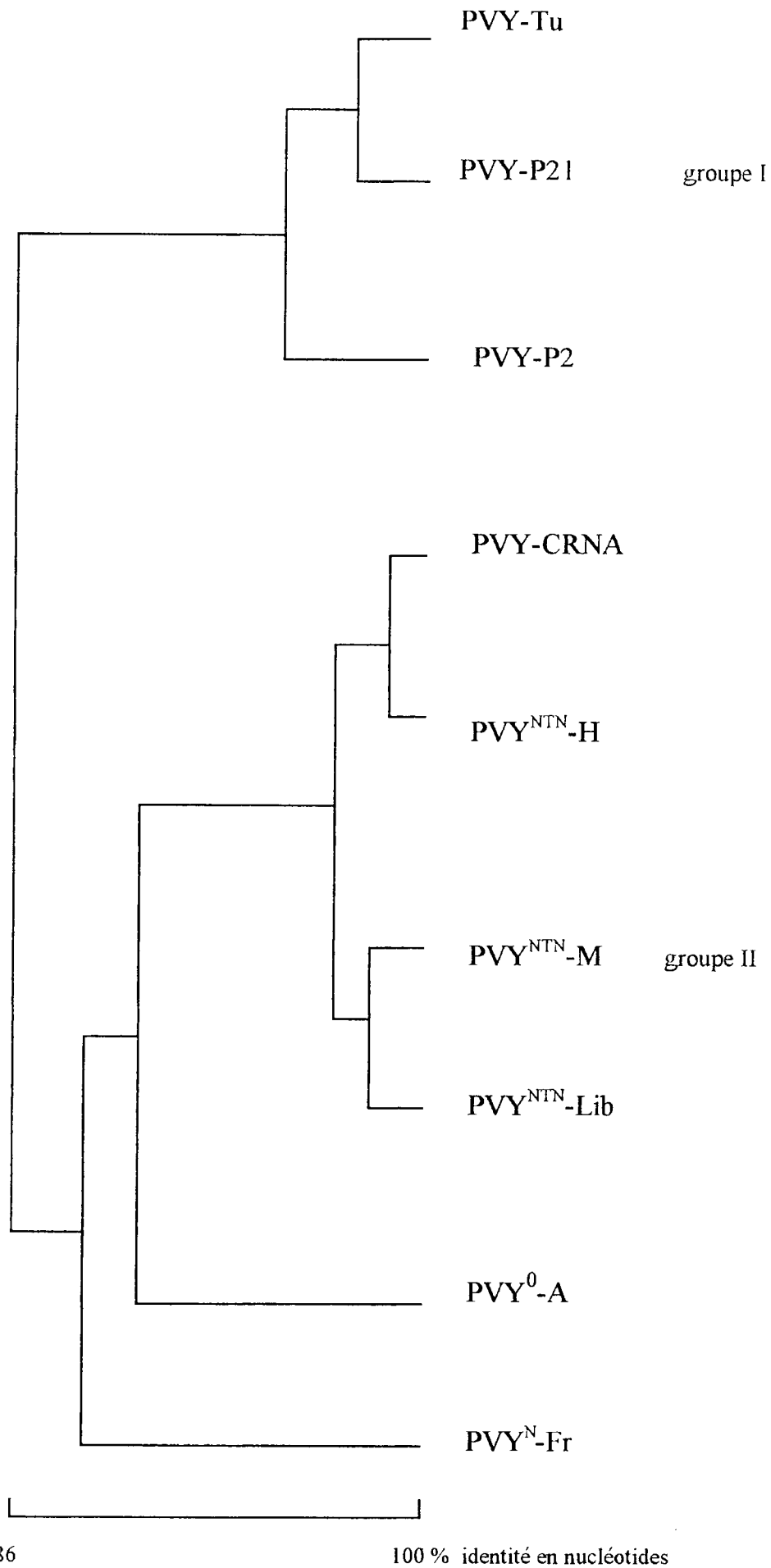


Fig 2. Dendrogramme établi à partir de l'alignement multiple des séquences en nucléotides de la région 3'NTR des différents isolats de PVY comparés.

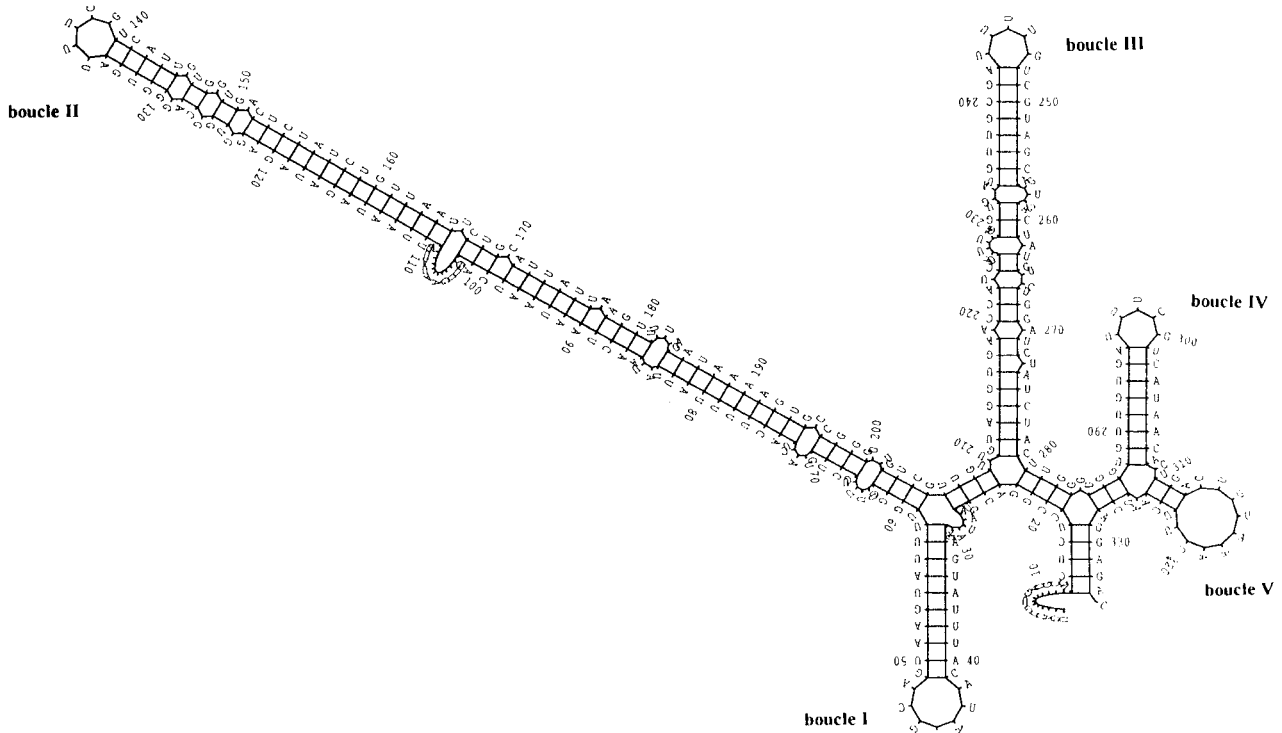


Fig 3. Structure secondaire potentielle de l'ARN viral de l'isolat PVY-P21 au niveau de la région 3'NTR. Cette structure montrant 5 repliements en «tige-boucle» a été obtenue par le programme Fold du serveur GCG.

	1	*	*	*		**	*		50								451	*											500	
PVY - P2	GCAAACGADA	CAAUUGAUGC	UGGAGGGAGC	AGUAAAGAAAG	AUGCGAAGCU												AAUGCAAAC	CGACCCUUAG	GCAAUAUCAG	GCACAUUUUCU	CAGAUGUUGC									
PVY - Tu	GCAAACGADA	CAAUUGAUGC	UGGAGGGAGC	AGUAAAGAAAG	AUGCGAAGCU												AAUGCAAAC	CGACCCUUAG	GCAAUAUCAG	GCACAUUUUCU	CAGAUGUUGC									
PVY - P21	GCAAUUGACA	CAAUCGUGAC	AGGAGAAAGC	AGCAAGAAAG	AUGCAAGACC						*	*	*				AAUGCAAAC	CAACCCUUAG	GCAAUAUCAG	GCACAUUUUCU	CAGAUGUUGC									

	51	*	*		**		***	*	*	100							501											550		
PVY - P2	GGAAACAGGU	AGCAUCCAAC	CAAUUCUAA	CAAGGAAAG	GAUAAAGGACG												AGAAGCGUAU	AUAGAAUUC	GCAACAAAA	GGAAACAUAU	AUGCCACGAU									
PVY - Tu	GGAAACAGGU	AGCAUCCAAC	CAAUUCUAA	CAAGGAAAG	GAUAAAGGACG												AGAAGCGUAU	AUAGAAUUC	GCAACAAAA	GGAAACAUAU	AUGCCACGAU									
PVY - P21	AGAGCAAGGC	AGCAUCGAGU	CAAACCQAA	CAAAGGAAAG	GAUAAAGGAG			*	*								AGAAGCGUAU	AUAGAAUUC	GCAACAAAA	GGAAACAUAU	AUGCCACGAU									

	101	*				*		*	150								551	*		***	*	600							
PVY - P2	UGAAUCUGG	CACAUUCGGG	ACACAUAUCG	UACCAAGAAU	AAAGGCUAUA												AUGGUUAAGU	UCGAAAUUCG	CGGGAUGGAA	GUUUAGCGCG	CUAUGCCUUC								
PVY - Tu	UGAAUCUGG	CACAUUCGGG	ACACAUAUCG	UACCAAGAAU	AAAGGCUAUA												AUGGUUAAGU	UCGAAAUUCG	CGGGAUGGAA	GUUUAGCGCG	CUAUGCCUUC								
PVY - P21	UGAAUCUGG	UACAUUCGGG	ACACAUAUCG	UCCGAGAAU	CAAGGCUAUA				*								AUGGUUUAU	UCGAAAUUCG	CGGGAUGGAG	GUUUAGCGCG	DUAUGCCUUC								

	151	*		*	*	*	*	200									601		**	Barr	*	650							
PVY - P2	ACGUCAAJAA	UGAGAAUGCC	UAAAGCAAA	GGAGCAGCCG	CGCUAAACUU												GACUUUUAUG	AAUGUACAUC	ACGAACACCA	GUGAGGGCUA	GAGAGCGCA								
PVY - Tu	ACGUCAAJAA	UGAGAAUGCC	UAAAGCAAA	GGAGCAGCCG	CGCUAAACUU												GACUUUUAUG	AAUGUACAUC	ACGAACACCC	GUGAGGGCUA	GAGAGCGCA								
PVY - P21	ACGUCAAJAA	UGAGAAUGCC	CAAAAAGCAAG	GGAGCAACCG	UCGCUAAACUU												GACUUUUAUG	AAUGUACAUC	ACGAACACCA	GUGAGGGCUA	GAGAGCGCA								

	201			*	*			250									651		*									700	
PVY - P2	AGAACACUUA	CUCGAGUAUG	CUCCACAACA	GAAAGACAUU	UCAAAUACUC												UAUACAGUAG	AAGGCCGCGAG	CAUUAAAUAU	AGCCCAACCU	CGACUUUUCG								
PVY - Tu	AGAACACUUA	CUCGAGUAUG	CUCCACAACA	GAAAGACAUU	UCAAAUACUC												UAUACAGUAG	AAGGCCGCGAG	CAUUAAAUAU	AGCCCAACCU	CGACUUUUCG								
PVY - P21	AGAACACUUA	CUUGAGUAUG	CUCCACAACA	AAUUGAUUUC	UCAAAUACUC												CAUUCAAUUG	AAGGCCGCGAG	CAUUAAAUAU	AGCCCAACCU	CGACUUUUCG								

	251				*			300									701		*									750	
PVY - P2	GGCAACUCA	AUCACAGUUU	GUAUCGUGU	AUGAGAGCAGU	GCAGUUGGCA												GGUUGGACGG	UGGCAUCAGU	ACACAAAGAGG	AGAACACAGA	GAGGCACACC								
PVY - Tu	GGCAACUCA	AUCACAGUUU	GUAUCGUGU	AUGAGAGCAGU	GCAGUUGGCA												GGUUGGACGG	UGGCAUCAGU	ACACAAAGAGG	AGAACACAGA	GAGGCACACC								
PVY - P21	GGCAACUCA	AUCACAGUUU	GUAUCGUGU	AUGAGGAGAGU	GCAGUUGGCA												GGUUGGACGG	UGGCAUCAGU	ACACAAAGAGG	AGAACACAGA	GAGGCACACC								

	301	*	*	*	*			350									751	*										800	
PVY - P2	UACGACAUAG	GGAACAACAG	AAUUGCCAAUC	GUGAUGAAUG	GGCUUAUUGU												ACCAGGAGU	UUUUCUCCAG	UAUGCAUACU	CUACUUGGAG	UCAAGAACAU								
PVY - Tu	UACGACAUAG	GGAACAACAG	AAUUGCCAAUC	GUGAUGAAUG	GGCUUAUUGU												ACCAGGAGU	UUUUCUCCAG	UAUGCAUACU	CUACUUGGAG	UCAAGAACAU								
PVY - P21	UACGACAUAG	GGAACAACAG	GAUUGCCAAUC	GUGAUGAAUG	GGCUUAUUGU												ACCAGGAGU	UUUUCUCCAG	UAUGCAUACU	CUACUUGGAG	UCAAGAACAU								

	351					*	*	400									PVY - P2	GUGA											
PVY - P2	UUGUGUCAUU	GAAAAGUGAA	CCUCGCCAAA	UAUCAACCGA	GUUUGGGUUA												PVY - Tu	GUGA											
PVY - Tu	UUGUGUCAUU	GAAAAGUGAA	CCUCGCCAAA	UAUCAACCGA	GUUUGGGUUA												PVY - P21	GUGA											
PVY - P21	UUGUGUCAUU	GAAAAGUGAA	CCUCGCCAAA	UUUCAACCGA	GUUUGGGUUA																								

	401	*	*	*	*			450									PVY - P2	UGAUGGAUGG	AAUGGAACAA	GUUGAAUUGC	CGUUGAAACC	AAUCGUUGAG							
PVY - P2	UGAUGGAUGG	AAUGGAACAA	GUUGAAUUGC	CGUUGAAACC	AAUCGUUGAG												PVY - Tu	UGAUGGAUGG	AAUGGAACAA	GUUGAAUUGC	CGUUGAAACC	AAUCGUUGAG							
PVY - Tu	UGAUGGAUGG	AAUGGAACAA	GUUGAAUUGC	CGUUGAAACC	AAUCGUUGAG												PVY - P21	UGAUGGAUGG	AAUGGAACAA	GUUGAUGC	CGUUGAAACC	AAUCGUUGAG							
PVY - P21	UGAUGGAUGG	AAUGGAACAA	GUUGAUGC	CGUUGAAACC	AAUCGUUGAG																								

Fig 4. Alignement multiple des séquences en nucléotides de la région codant pour la protéine capsid des isolats tunisiens. Les changements de nucléotides sont indiqués en gras et par un astérisque.

P21) mais pas au niveau de la séquence de l'isolat tunisien d'origine pomme de terre (PVY-Tu).

Pour déterminer l'importance de ces changements nucléotidiques, les séquences en acides aminés de la protéine capsidiale ont été déduites (fig 5). Ces séquences ont été comparées à celles de 6 autres isolats de PVY (tableau II).

L'étude comparative de la structure primaire de la protéine de la capsidiale, prédite à partir de la séquence nucléotidique de tous les isolats, fait apparaître l'existence de domaines conservés et de domaines variables. Chez les 9 isolats comparés, la protéine capsidiale est constituée de 268 résidus et le motif DAG impliqué dans la transmission par les pucerons est conservé. Toutes les séquences commencent par le motif consensus du PVY déterminé par plusieurs auteurs A/G,NDTIDAG... (Shukla *et al*, 1986 ; Robaglia *et al*, 1989 ; Rybicki et Shukla, 1992). D'autre part, les résultats obtenus montrent que pour les 3 isolats tunisiens, la séquence de la protéine capsidiale commence par le résidu (A), ce qui est en corrélation avec l'appartenance de

l'isolat PVY-Tu au groupe O, comme il a été montré par Van der Vlugt *et al* (1993). Nos résultats montrent que la protéine capsidiale des isolats d'origine piment appartenant au pathotype O commence également par le résidu A. Il est important également de remarquer la présence dans la séquence en acides aminés de l'isolat PVY-P21, de 13 changements par rapport à celles des 2 autres isolats tunisiens.

La comparaison de la structure primaire de la protéine capsidiale avec celles d'autres isolats décrits dans la littérature permet de distinguer, au niveau du dendrogramme, 3 groupes selon le degré de similarité en acides aminés (fig 6). Le premier groupe comprend uniquement des isolats du type N. Le second rassemble les 2 isolats tunisiens PVY-Tu et PVY-P2, alors que dans le troisième, plus hétérogène, on remarque la présence d'isolats de différentes classification biologiques (type N et type O en même temps). Dans ce troisième groupe figure l'isolat PVY-P21, classé dans le pathotype O, qui n'est plus associé aux 2 autres isolats tunisiens. Un dendrogramme de même allure a été obtenu à partir de l'alignement global

	1	*	**	***		50
PVY-P2	ANDTIDAGGS	SKKDAKLEQG	SIQPSSNKGK	DKDVNAGTSG	THTVPRIKAI	
PVY-Tu	ANDTIDAGGS	SKKDAKLEQG	SIQPSSNKGK	DKDVNAGTSG	THTVPRIKAI	
PVY-P21	ANDTIDAGES	SKKDARPEQG	SIQSNPNKGK	DKDVNAGTSG	THTVPRIKAI	
	51	**				100
PVY-P2	TSKMRMPKSK	GAAALNLEHL	LEYAPQQIDI	SNTRATQSQF	DTWYEAVRMA	
PVY-Tu	TSKMRMPKSK	GAAALNLEHL	LEYAPQQIDI	SNTRATQSQF	DTWYEAVRMA	
PVY-P21	TSKMRMPKSK	GATVLNLEHL	LEYAPQQIDI	SNTRATQSQF	DTWYEAVRMA	
	101		*	*		150
PVY-P2	YDIGETEMPT	VMNGLMVWCI	ENGTSPNING	VWVMDGSEQ	VEYPLKPIVE	
PVY-Tu	YDIGETEMPT	VMNGLMVWCI	ENGTSPNING	VWVMDGSEQ	VEYPLKPIVE	
PVY-P21	YDIGETEMPT	VMNGLMVWCI	ENGTSPNVNG	VWVMDGNEQ	VEYPLKPIVE	
	151			*	**	200
PVY-P2	NAKPTLRQIM	AHFSDVAEAY	IEMRNKKEPY	MPRYGLVRNL	RDGSLARYAF	
PVY-Tu	NAKPTLRQIM	AHFSDVAEAY	IEMRNKKEPY	MPRYGLVRNL	RDGSLARYAF	
PVY-P21	NAKPTLRQIM	AHFSDVABAY	IEMRNKKEPY	MPRYGLIRNL	RDVGLARYAF	
	201					250
PVY-P2	DFYEVTSRTP	VRAREAHIQM	KAAALKSAQP	RLFGLDGGIS	TQEENTERHT	
PVY-Tu	DFYEVTSRTP	VRAREAHIQM	KAAALKSAQP	RLFGLDGGIS	TQEENTERHT	
PVY-P21	DFYEVTSRTP	VRAREAHIQM	KAAALKSAQP	RLFGLDGGIS	TQEENTERHT	
	251	268				
PVY-P2	TEDVSPSMHT	LLGVKNM _{stop}				
PVY-Tu	TEDVSPSMHT	LLGVKNM _{stop}				
PVY-P21	TEDVSPSMHT	LLGVKNM _{stop}				

Fig 5. Alignement multiple des séquences en acides aminés (jusqu'au codon stop) de la région codante pour la protéine capsidiale des isolats tunisiens. Les changements d'acides aminés sont indiqués en gras et par un astérisque.

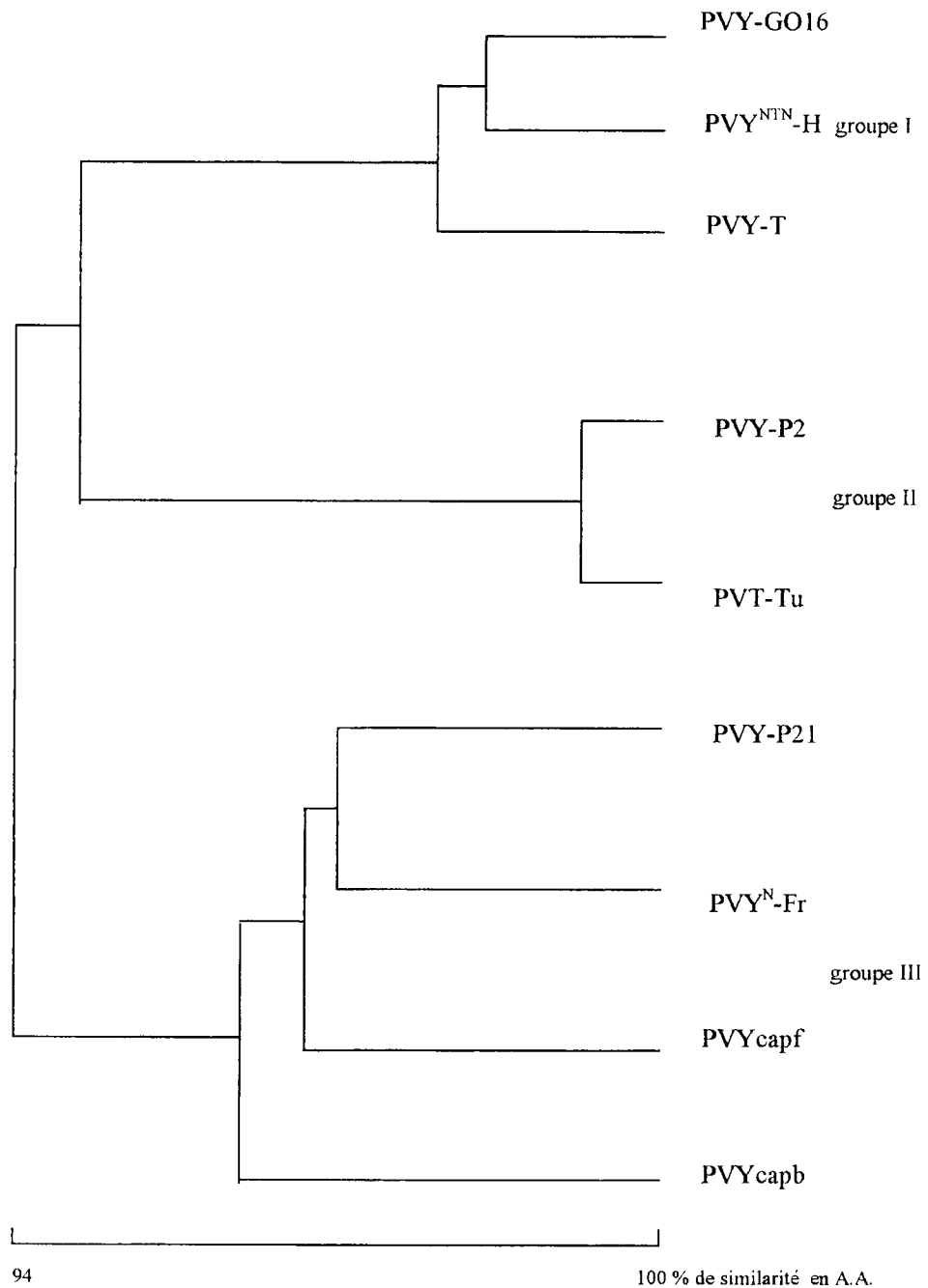


Fig 6. Dendrogramme établi à partir de l'alignement multiple des séquences en acides aminés de la région capsidale des différents isolats de PVY comparés. Le groupe II est formé uniquement des isolats tunisiens PVY-P2 et PVY-Tu.

des séquences nucléotidiques (résultat non indiqué). L'ensemble de ces données suggère qu'un phénomène de recombinaison entre un isolat tunisien et un autre isolat de PVY serait à l'origine de l'isolat PVY-P21. Dans ce cadre, le fragment transféré devrait couvrir les nucléotides allant de la position 24 jusqu'à la position 582 de la région codante pour la protéine capsidale.

Le phénomène de recombinaison a été proposé par Goldbach (1992) pour expliquer l'origine de plusieurs variants de *Potyviridae*. De plus, en comparant la séquence de plusieurs isolats de PPV (*plum pox virus*), il a été montré que la région C-terminale de la protéine N1b et N-terminale de la

protéine capsidale de l'isolat PPV-o6, proviendrait de la recombinaison entre 2 isolats sauvages de PPV (Cervera *et al*, 1993). Une situation analogue a été signalée chez des isolats de PVY d'origine pomme de terre. C'est le cas par exemple de la souche PVYⁿ-Fr qui, sur la base de ses caractères biologiques et sérologiques est classée dans le groupe N, alors que, sur la base de la séquence de la région capsidale, elle est classée dans le groupe O. Il semble donc que les variations régissant l'évolution de ces isolats peuvent être soit «groupe-spécifique» (N,O), soit «souche-spécifique» quand elles se produisent au sein du même groupe (Van der Vlugt *et al*, 1993).

CONCLUSION

Lors d'une étude précédente, 3 isolats tunisiens ont été classés sur la base d'une analyse biologique (Fakhfakh *et al*, 1994) et d'une analyse moléculaire des régions 5'NTR et de la protéine P1 (Marie-Jeanne Tordo *et al*, 1995). Nous avons poursuivi cette étude en analysant les 2 régions 3'NTR et capsid.

Les résultats obtenus pour la région 3'NTR sont en accord avec la classification biologique ainsi qu'avec les résultats obtenus lors de l'étude moléculaire au niveau des régions 5'NTR et la protéine P1. Ils confirment l'origine géographique commune des 2 isolats tunisiens d'origine piment et leur appartenance au pathotype 0 et de l'isolat tunisien d'origine pomme de terre appartenant au groupe O.

Les différences observées au niveau des structures secondaires potentielles de la région 3'NTR du génome, montrant des structures tige-boucle, pourraient expliquer les différences symptomatologiques entre les 2 isolats inféodés au piment, en l'occurrence, les nécroses qui ne sont observées que lors de l'infection par l'isolat PVY-P21.

Les différences de séquence au niveau de la région capsid de l'isolat PVY-P21 par rapport aux 2 autres isolats tunisiens suggèrent qu'un phénomène de recombinaison au niveau de cette région serait à l'origine de cet isolat. Ce dernier pourrait également provenir de l'un des 2 autres isolats suite à l'accumulation de mutations ponctuelles. Enfin, l'hypothèse que cet isolat soit introduit directement par les tubercules de pomme de terre n'est pas exclue.

L'isolat PVY-P2 aurait, quant à lui, divergé de l'isolat PVY-Tu suite à l'accumulation de certaines mutations principalement au niveau de la région 3'NTR.

Afin de confirmer ces hypothèses, il serait nécessaire d'explorer la totalité du génome de ces 3 isolats et d'analyser les effets pathologiques dus aux échanges de fragments entre les ADNc de ces 3 isolats. Par voie de conséquence, l'obtention d'un ADNc infectieux correspondant à la totalité du génome constitue une des priorités de nos recherches ultérieures.

REMERCIEMENTS

Nous remercions C Cherif, N Hamza et G Khaldi de l'INRA de Tunisie pour leur aide à l'acquisition du

matériel biologique. Nous remercions également la DGRST, le SERST (Tunisie), le CNRS, le ministère français des Affaires étrangères pour leur appui matériel dans la réalisation de ce travail et l'UNESCO pour nous avoir accordé une bourse de stage. Ce travail rentre dans le cadre du réseau formation-recherche franco-tunisien (projet Fac Sci Tunis/INRA).

RÉFÉRENCES

- Atreya PL, Atreya CD, Pirone TP (1991) Amino acid substitutions in the coat protein result in loss of insect transmissibility of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 7887-7891
- Bravo-Almonacid F, Mentaberry AN (1989) Nucleotide cDNA sequence coding for the PVY^o coat protein. *Nucleic Acids Res* 17, 4401
- Brunt AA (1992) The general properties of potyviruses. *Arch Virol* (suppl 5), 3-16
- Bryan GT, Gardner RG, Foster RLS (1992) Nucleotide sequence of the coat protein gene of a strain of clover yellow vein virus from New Zealand: conservation of a stem-loop structure in the 3' region of potyviruses. *Arch Virol* 124, 133-146
- Carey J, Cameron V, Haseth PL, Uhlenbeck OC (1983) Sequence-specific interaction of R17 coat protein with its ribonucleic acid binding site. *Biochemistry* 22, 2601-2610
- Carrington JC, Dougherty WG (1987) Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J Virol* 61, 2540-2548
- Carrington JC, Cary SM, Parks TD, Dougherty WG (1989) A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J* 8, 365-370
- Cervera MT, Riechmann JL, Martin MT, Garcia JA (1993) 3'-Terminal sequence of the plum pox virus PS and Ô6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *J Gen Virol* 74, 329-334
- De Bokx JA, Huttinga H (1981) Potato virus Y. CMI/AAB Descriptions of plant viruses, n 242
- Devereux J, Haeberli P, Smithies O (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* 12, 387-397
- Dolja VV, Carrington JC (1992) Evolution of positive-strand RNA viruses. *Sem Virol* 3, 315-326
- Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA, Carrington JC (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206, 1007-1016
- Dougherty WG, Hiebert E (1980) Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: cell-free translation strategy and a genetic map of the potyviral genome. *Virology* 104, 183-194
- Fakhfakh H, Makni M, Khadmaoui A, Cherif C, Elgaaied A, Marrakchi M (1994) Le virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment en

- Tunisie : identification et caractérisation des souches par voie biologique, préparation d'anticorps polyclonaux anti-PVY. *Biologia* 1, 52-69
- Feng S, Holland EC (1988) HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334, 165-167
- Francki RIB (1983) Current problems in plant virus taxonomy. In : *A Critical Appraisal of Viral Taxonomy* (REF Matthews, ed), CRC Press, Boca Raton, 63-104
- Francki RIB, Milne RG, Hatta T (1985) *Atlas of Plant Virus*, vol 2. CRC Press, Boca Raton, 183-217
- Frenkel MJ, Ward CW, Shukla DD (1989) The use of 3' non-coding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N. *J Gen Virol* 70, 2775-2783
- Gébré Sélassié K, Marchoux G, Delécolle B, Pochard E (1985) Variabilité naturelle des souches du virus Y de la pomme de terre dans les cultures de piment du sud-est de la France. Caractérisation et classification en pathotypes. *agronomie* 5, 621-630
- Goldbach R (1992) The recombinative nature of potyviruses: implications for setting up true phylogenetic taxonomy. *Arch Virol* (suppl 5), 299-304
- Hari V (1981) The RNA of tobacco etch virus: further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* 112, 391-399
- Hidaka M, Yoshida Y, Masaki H, Namba S, Yamashita S, Tsuchizaki T, Uozumi T (1992) Cloning and sequencing of the 3' half of potato virus Y (O-strain) genome encoding the 5K protein, protease, polymerase, and coat protein. *Nucleic Acids Res* 20, 3515
- Hollings M, Brunt AA (1981) Potyviruses. In : *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, 731-807
- Lain S, Riechmann JL, Mendez E, Garcia JA (1988) Nucleotide sequence of the 3' terminal region of plum pox potyvirus RNA. *Virus Res* 10, 325-342
- Le Romancer M, Kerlan C, Nedellec M (1994) Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol* 43, 138-144
- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS (1990) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res* 19, 1154
- Marie-Jeanne Tordo V, Chachulska AM, Fakhfakh H, Le Romancer M, Robaglia C, Astier-Manificier S (1995) Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *J Gen Virol* 76, 939-949
- Oshima K, Hataya T, Sano T, Inoue AK, Shikata E (1991) Comparaison of biological properties, serological characteristics and amino acid sequences of coat protein between potato virus Y ordinary strain and necrotic strain. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 57, 615-622
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73, 1-16
- Robaglia C, Durand-Tardif M, Tronchet M, Boudazin G, Astier-Manificier S, Casse-Delbart F (1989) Nucleotide sequence of potato virus Y (strain N). *J Gen Virol* 70, 935-947
- Rodriguez-Cerezo E, Gamble Klein P, Shaw JG (1991) A determinant of disease symptom severity is located in the 3'-terminal non-coding region of the RNA of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9863-9867
- Rybicki EP, Shukla DD (1992) Coat protein phylogeny and systematics of potyviruses. In : *Potyvirus taxonomy* (OW Barnett, ed), Springer, Wien, 139-170 (*Arch Virol* suppl 5)
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5469
- Shukla DD, Inglis AS, McKern NM, Gouch KH (1986) Coat protein of potyvirus. 2. Amino acid sequence of the coat protein of potato virus Y. *Virology* 152, 118-125
- Shukla DD, Ward CW (1988) Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J Gen Virol* 69, 2703-2710
- Shukla DD, Ward CW (1989) Identification and classification of potyviruses on the basis of coat protein sequence data and serology. *Arch Virol* 106, 171-200
- Steggles AW (1989) A rapid procedure for creating nested sets of deletions using mini-prep plasmid DNA samples. *Biotechniques* 7, 241-242
- Sudarsono, Woloshuk SL, Xiong Z, Hellmann GM, Wernsman EA, Weissinger AK, Lommel SA (1993) Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six potato virus Y (PVY) isolates infecting tobacco. *Arch Virol* 132, 161-170
- Thole V, Dalmay T, Burgyan J, Balazs E (1993) Cloning and sequencing of potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene* 123, 149-156
- Turpen T (1989) Molecular cloning of a potato virus Y: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. *J Gen Virol* 70, 1951-1960
- Van der Vlugt RAA, Leunissen J, Golbach R (1993) Taxonomic relationships between distinct potato virus Y isolates based on detailed comparisons of the viral coat proteins and 3'-nontranslated regions. *Arch Virol* 131, 361-375
- Verchot JM, Koonin EV, Carrington JC (1991) The 35-kDa protein from the N terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185, 527-535
- Wefels E, Sommer H, Salamini F, Rohde W (1989) Cloning of the potato virus Y genes encoding the capsid protein and the nuclear inclusion protein NIb. *Arch Virol* 107, 123-134