

DK 558743

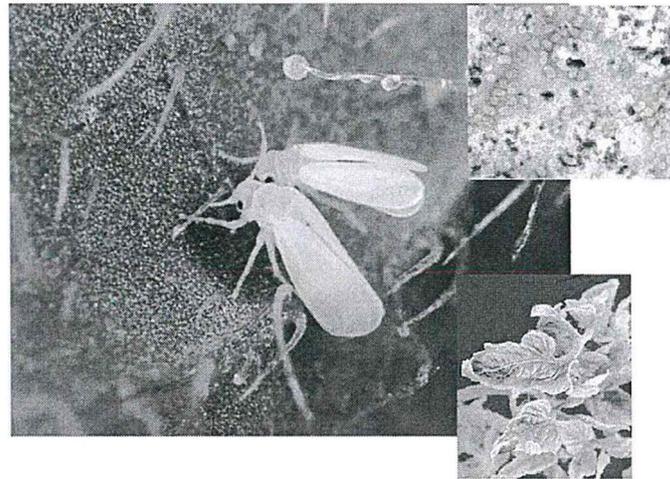
CD-TH 4514



Rapport de stage de première année de Master  
Mention : Ecologie et Evolution des Parasites

Forfert Nadège

# Impact de la recombinaison homologue aléatoire dans le cas d'un virus émergeant: Le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV)



Date : de mars à mai 2010  
Soutenu le : 16 juin 2010  
Lieu : UM2  
Organisme d'accueil : CIRAD  
UMR BGPI  
Campus International de Baillarguet  
34398 MONTPELLIER CEDEX 5

Maître de stage :  
M. Petterschmitt ([michel.petterschmitt@cirad.fr](mailto:michel.petterschmitt@cirad.fr))  
et F. Vuillaume ([florence.vuillaume@cirad.fr](mailto:florence.vuillaume@cirad.fr))

CIRAD-DIST  
Unité bibliothèque  
Lavalette



\*000111128\*

## Résumé

Le genre Begomovirus (ADN circulaire simple brin) regroupe des phytovirus qui sont transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci*. La plupart des Begomovirus sont responsables de nombreuses maladies émergentes d'importances économiques majeures sur diverses cultures. De nombreuses études ont montré que la recombinaison homologue, phénomène générant de la variabilité génétique, est directement impliquée dans leur évolution et leur émergence. Des recombinants aléatoires, issus de deux Begomovirus : le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) et le Tomato Leaf Curl Mayott Virus (ToLCYTV), ont été obtenus par la technique de « L-shuffling »<sup>TM</sup> brevetée par la société Protéus® (Nîmes). L'étude des effets de la recombinaison homologue aléatoire sur des traits phénotypiques liés à la fitness des recombinants, la transmission et la reproduction, ont été testés sur tomates, *Solanum lycopersicum*. Les résultats ont montré que tous les recombinants générés étaient viables. Certains d'entre eux ont même présentés des traits pouvant être plus avantageux par rapport à leurs parents. Dans un contexte d'émergence, des caractères phénotypiques de l'hôte pouvant être affectés par la virulence de ces clones ont été testés. Cette analyse a montré que parmi les recombinants montrant des traits phénotypiques avantageux, certains avaient plus d'impacts négatifs sur le développement de leur hôte que leurs parents. L'ensemble de ces caractères biologiques fait de ces recombinants des candidats sérieux à l'émergence, en cas de chevauchement des aires de répartition des virus modèles.

**Mots clés :** recombinaison homologue aléatoire, Begomovirus, TYLCV, ToLCYTV, *Bemisia tabaci*, fitness, virulence, transmission, reproduction, *Solanum lycopersicum*, émergence.

## Abstract

The phytoviruses of the genus Begomovirus (single stranded circular DNA) are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*. Most of them are responsible for many economically important emerging diseases of different crops. Many studies have reported that homologous recombination, a phenomenon creating genetic variability, is directly involved in their evolution and emergence. Random recombinants have been created from two Begomoviruses: the Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) and the Tomato Leaf Curl Mayotte Virus (ToLCYTV). The patent technique used is the "L-shuffling"<sup>TM</sup> from Protéus society (Nîmes). The effects of random homologous recombination on phenotypic traits due to the recombinants' fitness, transmission and reproduction, have been tested on tomato, *Solanum lycopersicum*. The results have shown that all of the recombinants were viable. In an emerging context, hosts phenotypic characters which could be affected by clones' virulence have been tested. This analyse has shown that among the recombinants with advantageous phenotypic traits, some of them had more negative impact on their host growth than their parents. All of these biological characters have demonstrated that those viruses could emerge if never their parents' distribution area overlaps.

**Keywords:** random homologous recombination, Begomovirus, TYLCV, TolCYTV, *Bemisia tabaci*, fitness, virulence, transmission, reproduction, *Solanum lycopersicum*, emergence.

## *Remerciements :*

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ces trois mois au sein du CIRAD :

Florence Vuillaume, mon encadrante, pour m'avoir intégré rapidement au sein de l'entreprise et m'accorder une grande autonomie; pour sa grande pédagogie à répondre à mes interrogations ; pour le temps qu'elle m'a consacré tout au long de mon stage et pour sa sympathie quotidienne,

Michel Petterschmitt, mon maître de stage, pour son accueil, la confiance qu'il m'a accordé dès mon arrivée, ainsi que pour le temps qu'il m'a consacré à répondre à mes questions,

Gaël Thébaud, pour sa précieuse aide en analyse statistique,

Toute l'équipe CaGeTE (Caulimoviridae et Geminiviridae : Transmission et Evolution) : les chercheurs : Stéphane Blanc, Martin Drucker, Rémy Froissart, Sérafin Gutierrez, Chiraz Jridi, Cica Urbino et Marilyne Uzest ; les ingénieurs/ techniciens : Daniel Gargani, Martine Granier, Michel Yvon et Jean-Luc Macia ; la doctorante : Juliette Doumayrou, les assistantes : Marie Christine Martinez et Marie Ange Roger, ainsi que les (nombreux !) stagiaires : Astrid, Annick, Guillaume et Elodie, pour leur accueil sympathique et leur coopération professionnelle tout au long de ces trois mois,

Les personnes que j'aurai omises et qui ont permis de rendre le plus agréable possible mes trois mois de stage.

# SOMMAIRE

---

ABREVIATIONS et LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Qu'est-ce que la recombinaison aléatoire ?

Objectifs

Modèle biologique

Présentation du lieu de stage

MATERIELS ET METHODES

Virus parentaux

Banque de recombinants aléatoires

Préparation des clones recombinant et inoculation des plantes

Extraction et analyse d'ADN virale

Test de transmission

Détection d'ADN viral

Analyse statistique

RESULTATS

Capacité de reproduction

Transmission

Virulence

DISCUSSION, CONCLUSION et PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

LEXIQUE

## ABREVIATIONS

**Cirad** : Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement

**CaGeTE**: Caulimoviridae et Geminiviridae: Transmission et Evolution

**TYLCV**: Tomato Yellow Leaf Curl Virus

**ToLCYTV**: Tomato Leaf Curl Virus from Mayott

**ORF**: Open Reading Fram

**IR**: Région Intergénique

**PC**: Protéine de la Capside

**Rep** : protéine de Réplication

**TrAP** : Protéine Activatrice de Transcription

**REn** : protéine Enhancer de Réplication

**DPI**: jour après inoculation ou «Day Post Inoculation »

**PCR** : Polymérase Chain Reaction

**qPCR**: quantitative Polymérase Chain Reaction

**DO** : Densité Optique

**AAP** : période d'acquisition ou « Acquisition Access Period »

**IAP** : période d'inoculation ou « Inoculation Access Period »

**Ct** : cycle seuil de fluorescence ou « threshold »

**NRQ** : quantité relative normalisée ou « Normalised relative quantity »

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1**: *Bemisia tabaci* (Aleyrodidae, Hemiptera)

**Figure 2** : Aires de répartitions des virus parentaux : le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) et le Tomato Leaf Curl Mayott Virus (ToLCYTV).

**Figure 3** : Carte du génome du TYLCV et ToLCYTV.

**Figure 4** : Principe de recombinaison aléatoire des génomes parentaux par la méthode « L-shuffling »<sup>TM</sup>.

**Figure 5** : Disposition des plantes testées dans la cellule de confinement de type NS3.

**Figure 6** : Principe du logiciel LinReg (version 11.0).

**Figure 7** : Principe du test de transmission.

**Figure 8** : Pouvoir infectieux des clones à 15 DPI.

**Figure 9** : Pouvoir infectieux des clones à 22 DPI.

**Figure 10** : Accumulation des clones à 15 DPI.

**Figure 11** : Accumulation des clones à 22 DPI.

**Figure 12** : Capacité de transmission des clones.

**Figure 13** : Effet des clones sur la hauteur des plantes de tomates.

**Figure 14** : Accumulation des clones à 30 DPI.

**Figure 15** : Symptômes engendrés par des recombinants.

# 1. Introduction

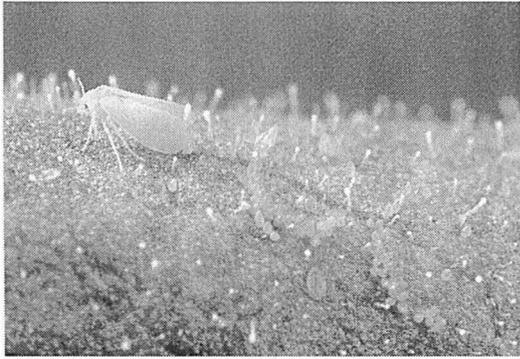
## 1.1. Qu'est-ce que la recombinaison homologue?

La recombinaison est, avec la mutation, un des mécanismes majeurs de création de **variation génétique**. Son implication dans l'évolution virale a été démontrée dans de nombreuses études (Escriu et *al.*, 2007 ; Garcia-Andres et *al.*, 2007). Lors de la **recombinaison homologue**, des régions génomiques sont échangées entre deux virus (Escriu et *al.*, 2007), créant de nouvelles combinaisons génétiques (Jones, 2009). Par ce mécanisme, les virus peuvent acquérir de nouvelles caractéristiques génétiques à partir d'autres virus et avoir accès à des **innovations évolutives** (Lefevre et *al.*, 2008). Ce processus peut engendrer des effets phénotypiques importants pouvant favoriser l'**adaptation** et l'**émergence virale** (Jones, 2009), aussi bien dans le cas de virus de plantes que d'animaux (Escriu et *al.*, 2007).

Il a été montré que des réarrangements d'informations génétiques issues d'évènements de recombinaison homologue peuvent produire des génomes totalement fonctionnels et relativement bien adaptés (Monci et *al.*, 2002). Cependant, il est présumé que la **recombinaison homologue aléatoire**, à l'image de la mutation aléatoire, dont les effets phénotypiques sont majoritairement délétères ou létaux (Carrasco et *al.*, 2007 ; Sanjuan et *al.*, 2004), engendre majoritairement une **descendance mal adaptatée** (Lefevre et *al.*, 2007 ; Lefevre et *al.*, 2008). Cette hypothèse n'a cependant jamais été confirmée à ce jour par aucune étude formelle et systématique des effets phénotypiques de la recombinaison homologue aléatoire. Une étude a cependant montré que **plus la distance génétique** entre les génomes parentaux **augmente** (identité génomique <90%), **plus la fitness** des recombinants **diminue**. Cependant, dans cette étude les recombinants n'ont pas été générés aléatoirement puisque ce sont des gènes entiers qui ont été échangés (Martin et *al.*, 2005).

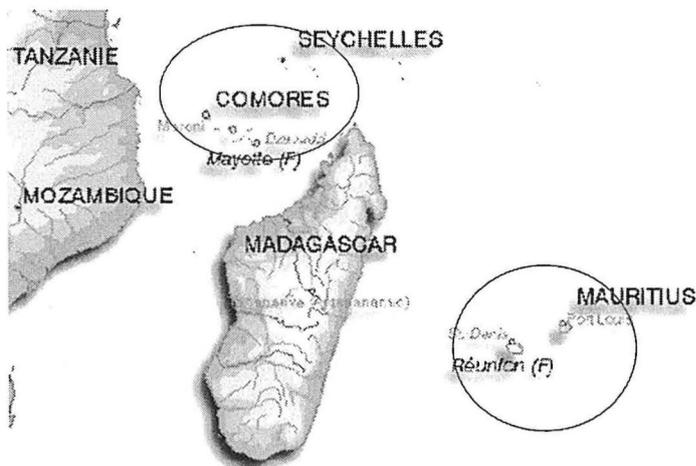
## 1.2. Objectifs

Mon stage s'inscrit dans une étude qui a pour premier objectif de comprendre dans quelle mesure les évènements de recombinaison homologue aléatoire sont létaux, délétères ou avantageux. Il s'agit de tester les **effets de la recombinaison homologue aléatoire** d'un génome entier sur la **fitness** des recombinants. Dans un premier temps, mon but a donc été de tester, sur l'ensemble des recombinants disponibles, deux proxys de la fitness : la **capacité de reproduction**, ainsi que l'**efficacité de transmission**. La capacité de reproduction, qui est le



**Figure 1**

*Bemisia tabaci* (Aleyrodidae, Hemiptera). polyphage de régions tropicales et subtropicales. Ces aleurodes peuvent se nourrir de neuf-cent espèces de plantes (tabac, tomate, poivron, pomme-de terre...) et sont également vectrices de cent-onze virus de plantes qui causent de sévères maladies, dont le TYLCV. Sur la figure, on observe *Bemisia tabaci* et des pontes en grappe (<http://www.bio-bee.com/site/pests.asp?pa id=149&pa2 id=158&page id=279>).



**Figure 2**

**Aires de répartition des virus parentaux : le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) et le Tomato Leaf Curl Virus from Mayott (ToLCYTV).** Ces deux virus proviennent de deux îles du sud ouest de l'océan Indien, la Réunion pour le TYLCV (rouge) et Mayotte pour le ToLCYTV (bleu).

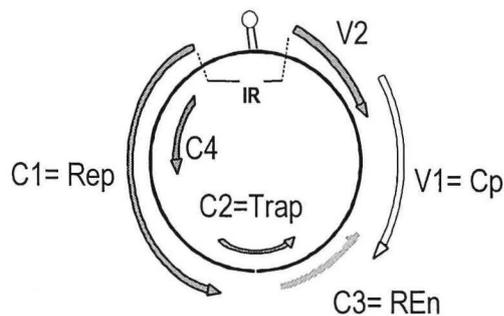
taux de multiplication d'un virus dans son hôte, a été estimée par le pouvoir infectieux puis par l'accumulation virale de chacun des clones. En phytopathologie, le **pouvoir infectieux** d'un pathogène est la fréquence d'hôtes infectés. L'efficacité de transmission, quant à elle, se définit par la capacité d'un virus à passer d'un hôte à un autre. Ces deux paramètres sont complémentaires car la fitness d'un virus dans un milieu naturel est non seulement déterminée par sa capacité à générer des descendants viables mais dépend également, entre autres, de sa transmission.

Le second objectif de l'étude découle du lien entre ce questionnement théorique sur la recombinaison et la problématique pratique de l'**émergence virale**. D'un point de vue agronomique, médical ou vétérinaire l'émergence d'un recombinant n'a d'importance que si le virus émergent est plus virulent que ses parents. En phytopathologie, la **virulence** correspond aux dégâts causés par un pathogène à son hôte. Nous avons donc cherché à savoir si les recombinants générés infligeaient des dommages différents des parents. Ces dommages infligés ont été estimés en mesurant la réduction de leur **hauteur** et de leur **poids sec**.

### 1.3. Modèle biologique

Afin de tester notre hypothèse selon laquelle la recombinaison homologue aléatoire est majoritairement délétère ou létale, des recombinants homologues aléatoires ont été générés à partir de deux virus parentaux appartenant au genre **Begomovirus**, famille **Geminiviridae** : Le Tomato Yellow Leaf Curl Virus (**TYLCV**), et le Tomato Leaf Curl Virus from Mayott (**ToLCYTV**). Comme tous les Begomovirus, ils sont transmis par la même espèce vectrice, **Bemisia tabaci** (Fig.1) et infectent seulement des dicotylédones, dont la tomate (Czosnek et al., 2001). L'isolat de TYLCV provient de l'île de la Réunion. Il y fut introduit accidentellement en 1997 et a provoqué d'importants dégâts agronomiques sur les cultures de tomate (Delatte et al., 2005). Le ToLCYTV, quant à lui, est endémique de l'île de Mayotte. Ces deux virus ont des **aires de répartition actuellement séparées** (Fig.2) mais risquent de se rencontrer prochainement avec des conséquences agronomiques imprévisibles. Cette étude a donc aussi une vocation d'anticipation d'une éventuelle émergence d'un recombinant virulent.

Le TYLCV et le ToLCYTV ont également été choisis pour leur appartenance à la famille **Geminiviridae**, une famille dans laquelle la **recombinaison est fréquente** (Garcia-Andres et al. 2006) et dans laquelle des espèces du genre Begomovirus sont responsables de **maladies**



**Figure 3**

**Carte du génome du TYLCV et ToLCYTV.** Les flèches représentent les six ORFs et sont orientées dans leur sens de transcription. La région inter-génique (IR), hautement conservée chez les Geminivirus contient l'origine de réplication (Ori) dans la région tige-boucle. Les 6 ORFs sont numérotées selon le sens virion (V) et complémentaire (C). Sur le brin sens-virion (+), se trouvent V1, qui codent respectivement les protéines de la capsid (CP), et V2, qui semble contrôler les symptômes et le mouvement (Czosnek, 2001). Sur le brin sens-complémentaire (-), C1 code pour les protéines nécessaires à la réplication du virus (Rep), C2 pour les protéines activatrices de transcription (TrAP), C3 pour les protéines enhancer de réplication (REn) et C4 semble être impliqué dans le spectre d'hôtes, la gravité des symptômes et le mouvement (Czosnek, 2001).

**émergentes** de première importance agronomique au niveau mondial (Czosnek et Laterrot, 1997). De plus, il a été prouvé que la recombinaison homologue joue un important rôle dans l'évolution, la dispersion et la survie des virus de ce genre (Fargette et *al.*, 2006). De nombreux exemples d'émergence de Begomovirus recombinants ont été décrits, et notamment le **TYLCAxV**, qui est le produit de la recombinaison entre le TYLCV-Mld[ES72/97] et le TYLCSV Sardinia (Garcia Andres et *al.* 2006). Ce recombinant a acquis par recombinaison une plus forte agressivité, une meilleure capacité à se reproduire, et un spectre d'hôte plus large, lui conférant un avantage sélectif par rapport à ses parents. Il est donc devenu dominant dans les zones où il a été détecté (Garcia Andres et *al.* 2006).

#### **1.4. Présentation du lieu de stage**

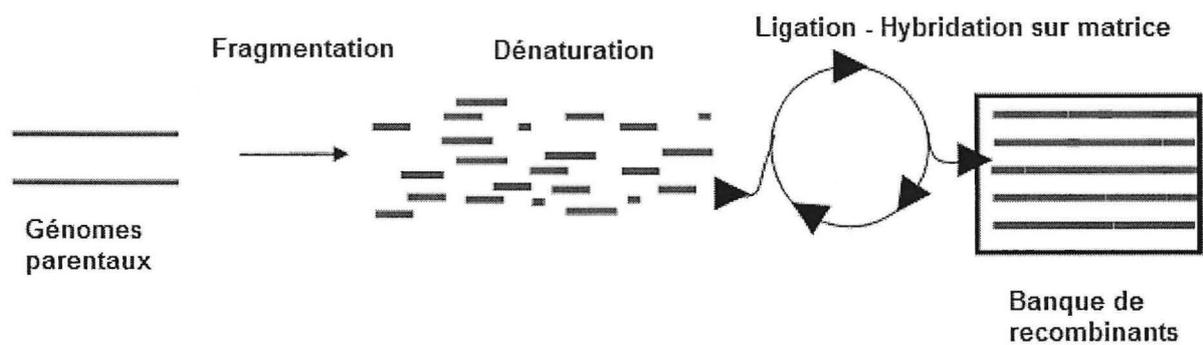
L'étude de l'impact de la recombinaison aléatoire sur la fitness des recombinants et du risque potentiel d'émergence s'inscrit dans les thématiques de recherche développées à l'Unité Mixte Recherche (UMR) Biologie et Génétique des Interactions Plantes-Parasites (**BGPI**). Cette unité développe des recherches sur les interactions plante-parasite et sur l'évolution des populations de pathogènes. Ses recherches sont conformes aux objectifs des trois institutions partenaires : l'Institut national de la recherche agronomique (Inra), Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad) et Montpellier SupAgro. Les recherches qui y sont développées ont pour objets soit des modèles théoriques, soit des maladies causant des pertes importantes dans les agrosystèmes méditerranéens et tropicaux.

## **2. Matériel et Méthode**

### **2.1. Virus parentaux**

Le TYLCV et le ToLCYTV sont des virus de **quarantaine** en France Métropolitaine qui nécessitent que leur inoculation sur plante et leur transmission par vecteur se fassent sous serre de confinement de type S3.

Ces deux virus ont un génome à ADN simple brin circulaire de 2,8 kb. Il comporte (Fig.3) six cadres de lecture ouverts ou open reading frames (ORFs) partiellement chevauchants et une région en tige-boucle hautement conservée chez les Begomivirus qui porte l'origine de répllication (Garcia-Andres, 2006). Le brin viral (+), porte le gène V1, qui code pour la



**Figure 4**

**Principe de recombinaison aléatoire des génomes parentaux par la méthode de « L-shuffling »<sup>TM</sup>.** Les génomes entiers du TYLCV (rouge) et du ToLCYTV (bleu) Dans notre cas, des génomes parentaux entiers ont été fragmentés aléatoirement, puis ont subi des cycles de dénaturation-hybridation-ligation. Cette technique innovante a permis de créer une banque constituée de milliers de recombinants aléatoires.

protéine de capsid (PC), et V2, qui code pour une protéine impliqué dans les symptômes et le mouvement (Czosnek, 2001). Le brin complémentaire (-), porte le gène C1 qui code pour une protéine nécessaire à la réplication du virus (Rep), C2 pour une protéine activatrice de transcription (TrAP), C3 pour une protéine stimulant la réplication (REn) et C4 semble être impliqué dans le spectre d'hôtes, la gravité des symptômes et le mouvement (Czosnek et al., 2001). Un clone viral a été obtenu pour chacun de ces virus en clonant leur génome complet dans le plasmide pGEMT d'*Escherichia coli* (Delatte et al., 2005). Ces génomes ont ensuite été excisés et reliqués dans un plasmide binaire pCambia 0380 à l'aide d'un site unique XhoI selon le protocole décrit par Urbino et al. (2008). Ce vecteur permet d'obtenir les génomes sous une forme infectieuse après les avoir introduit dans *Agrobacterium tumefaciens*. Ce sont ces génomes infectieux qui ont été utilisés pour la génération de recombinants *in-vitro* comme décrit ci-dessous.

## 2.2. Banque de recombinants aléatoires

Des recombinants ont été générés *in vitro* de façon aléatoire par la technique de « **L-shuffling** »<sup>TM</sup> brevetée par la société Protéus<sup>®</sup> (Nîmes). Cette technique est principalement utilisée par l'industrie pharmaceutique afin d'augmenter la performance des protéines à usage thérapeutique. Par recombinaison aléatoire de gènes parentaux codant pour une ou des protéines non optimales, on obtient très rapidement une banque de gènes de seconde génération qui est exprimée puis criblée pour en sélectionner les protéines ayant des performances améliorées. Dans notre cas, des **génomés parentaux** entiers et infectieux ont été recombinaisonnés par ce procédé basé sur des cycles de dénaturation-hybridation-ligation (Fig.4). Cette technique innovante et jamais utilisée auparavant à l'échelle génomique, permet d'éviter tout risque potentiel de mutation généré par d'autres techniques de « gene-shuffling » faisant appel à de l'amplification PCR. Les génomes parentaux ont été fragmentés de façon aléatoire et réassemblés sur ces mêmes génomes parentaux utilisés comme matrice de réassemblage. Les génomes ainsi réassemblés ont été ré-insérés dans le plasmide binaire pCambia0380. Les génomes recombinants sont ensuite sous clonés dans *Agrobacterium tumefaciens* pour tester leurs propriétés phénotypiques.

A partir de cette banque comprenant des **milliers de recombinants**, quarante-sept ont été pris au hasard pour mesurer leur pouvoir infectieux et leur accumulation *in planta*. Parallèlement, vingt-sept et dix-huit de ces quarante-sept ont été utilisés pour estimer respectivement leur virulence et leur transmissibilité par leur vecteur naturel, *Bemisia tabaci*.



**Figure 5**

**Disposition des plantes testées dans la cellule de confinement de type NS3.** Les plantules de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Monalbo agro-infiltrées sont disposées de façon aléatoire à travers la cellule de la serre de confinement de type S3. Pour chaque plante, le nom du clone testé (flèche blanche) ainsi que le numéro de la répétition (flèche jaune) sont indiqués.

### 2.3. Préparation des clones recombinants et inoculation des plantes

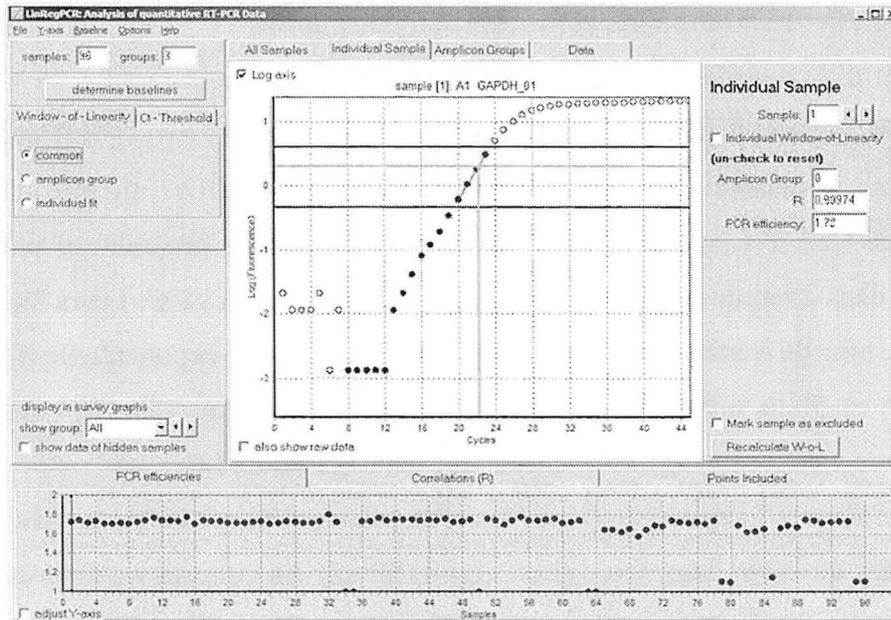
Les colonies transformées d'*A. tumefaciens* ont été mises en pré-culture over-night à 28°C dans 1,5 ml de milieu LB contenant deux antibiotiques : la kanamycine (1,67 mg/ml) qui permet de sélectionner pour le plasmide pCambia 0380 et la gentamicine (0,67 mg/ml) qui sélectionne pour la souche C58 d'*A. tumefaciens*. Trois-cent µl de chaque pré-cultures ont ensuite été mis en culture dans 15ml du milieu sélectif pendant environ 24h à 28°C. Leurs DO ont ensuite été mesurées, afin de vérifier si les bactéries étaient en phase exponentielle de croissance (DO entre 20 et 50 à une longueur d'onde de 595 nm). Pour éliminer les antibiotiques, chaque culture a été centrifugée et resuspendue dans 1,5 ml de LB.

Des plantules de tomate (*Solanum lycopersicum*) cv. Monalbo, une variété sensible aux virus parentaux, ont été inoculées au stade deux feuilles en agro-infiltrant les cultures à l'aide de seringue sur la face inférieure des feuilles cotylédonaires. Ces plantes ont été cultivées dans une cellule de confinement de type S3 (Fig.5) et avec une photopériode de 16 heures. Comme contrôles négatifs, des plantes ont été inoculées avec *A. tumefaciens* contenant un plasmide de pCambia sans insert d'origine viral.

### 2.4. Extraction et analyse d'ADN virale

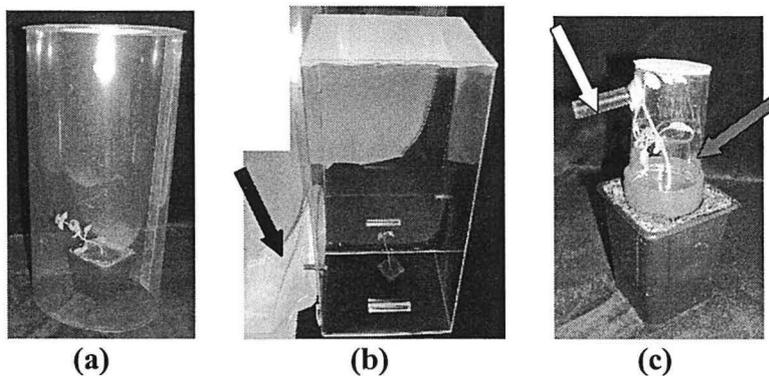
A différents temps suivant les tests, une rondelle de 4mm de diamètre a été prélevée de la première feuille apicale de chaque plantes, à l'aide d'un emporte pièce. L'ADN total de chaque échantillon a été extrait grâce à 100 µL de tampon QuickExtract Plant DNA Extraction Solution™ (Epicentre), puis dilué au 10<sup>ième</sup>.

Deux microlitres d'ADN extrait de chaque échantillon ont été analysés par PCR quantitative (qPCR), dans un volume final de 8µl, dans des plaques de 384 puits, en utilisant un Lightcycler (Roche) et le kit de qPCR LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) pour le mélange réactionnel. Les conditions de réaction étaient de 95°C pendant 5 min pour le premier cycle, suivi de 60 cycles de 15 s à 95°C, 20 min à 66°C et 30 s à 72°C. Les amorces choisies pour quantifier l'ADN viral: Ty2164+ (5'CTAAGAGCCTCTGACTTACTGC3') et Ty2339- (5'AACATTCAGGGAGCT AAATCCAG 3'), générant des amplicons de fragments du gène C1 de 176 bp. Pour éviter des différences de concentration d'ADN viral qui proviendraient d'une variation dans l'efficacité d'extraction ou d'une différence de densité de cellules entre deux rondelles de feuilles, l'ADN viral a été dosé par rapport à un nombre de cellules extraites. Pour cela nous avons déterminé parallèlement la quantité d'un gène de la plante, l'actine2. Les amorces choisies pour quantifier ce gène sont: act 1+ (5' CCCRGA



**Figure 6**

**Principe du logiciel LinReg (version 11.0).** Le logarithme de la fluorescence en fonction des cycles de PCR s'appelle la courbe d'amplification, qui est représentée par des points sur la figure. Pour chaque échantillon, le logiciel corrige la fluorescence en enlevant les bruits de fond de fluorescence dû par exemple à la fluorescence des amorces ou du SYBR Green en solution. Pour chaque échantillon, l'efficacité de PCR va être calculée à partir de la pente de la courbe et exprimée entre 1 et 2. Idéalement, l'efficacité doit être de 2 (100%), ce qui signifie qu'à chaque cycle le nombre d'amplicons double. Le logiciel calcule ensuite le cycle de seuil de fluorescence (Ct) de chaque échantillon, qui est le nombre de cycle nécessaire pour atteindre un cycle seuil de fluorescence. Le cycle seuil de fluorescence est une valeur déterminée soit par l'utilisateur soit par défaut par le logiciel. Les échantillons ayant une concentration élevée auront une valeur de Ct basse.



**Figure 7**

**Principe du test de transmission.** Des *Bemisia tabaci* sont mises en présence d'une plante infectées depuis 30 jours, pour une période d'acquisition de 48h (a). A l'aide d'une cage en plexiglas (b), les insectes sont recueillis dans des tubes. Le manchon en tulle (flèche noire) permet d'éviter de propager les insectes dans la cellule de transmission. Le tube contenant deux insectes femelles (c) (flèche blanche) est vissé sur un pot en plastique permettant d'isoler les insectes avec une plante receveuse saine pour une période d'inoculation (IAP) de 2 jours.

GGTHCTCTTCCARC 3') et act 148- (5' TMCGRTCAGCAATACCAGGG 3') (GenBank), générant des amplicons de 148 bp.

La quantité de produit PCR a été monitorée à l'aide d'un fluorophore : le SYBR Green. Un contrôle négatif contenant de l'eau pure à la place de l'ADN et un échantillon positif de référence identique pour toutes les plaques ont été inclus sur chaque plaque. Les échantillons ont été déposés en duplicat. Les données obtenues ont ensuite été analysées en utilisant le logiciel LinReg PCR (version 11.1) (Fig.6).

### 2.5. Test de transmission

La transmissibilité des clones viraux par *B. tabaci* a été évaluée en déterminant si le virus pouvaient être transmis et avec quelle efficacité, de plantes infectées par agro-inoculation à des plantes saines. Des centaines d'insectes adultes de biotypes Q ont subi une période d'acquisition (AAP) d'au moins 48h sur plantes sources infectées depuis 30 jours (Fig.7). Ces insectes ont ensuite été transférés sur des plantes receveuses saines, pour une période d'inoculation (IAP) de deux jours. Trente jours après l'IAP, la présence d'ADN viral a été testée par qPCR en utilisant les amorces décrites précédemment.

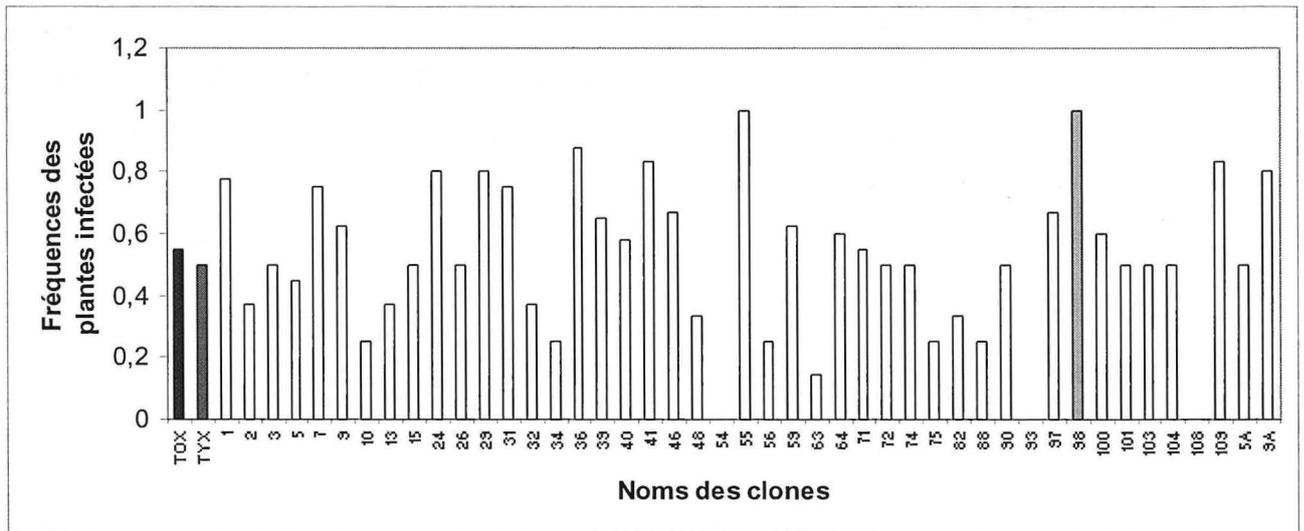
### 2.6. Détection d'ADN viral

Afin de déterminer si une plante était infectée ou non, un seuil de détection d'ADN viral a été estimé à partir du cycle seuil (Ct) de fluorescence des plantes saines. La valeur du Ct étant inversement proportionnelle la concentration initiale d'ADN de la cible, un échantillon présentant un Ct au dessous de ce seuil a été considéré comme positif. Ensuite, pour quantifier l'accumulation virale, un ratio a été quantifié, la quantité relative normalisée ou **NRQ** (Normalized Relative Quantity), dont la formule est :

$$\text{NRQ} = \frac{\text{Efficacité (virus)}^{(-\text{Ct (virus)})}}{\text{Efficacité (actine)}^{(-\text{Ct (actine)})}}$$

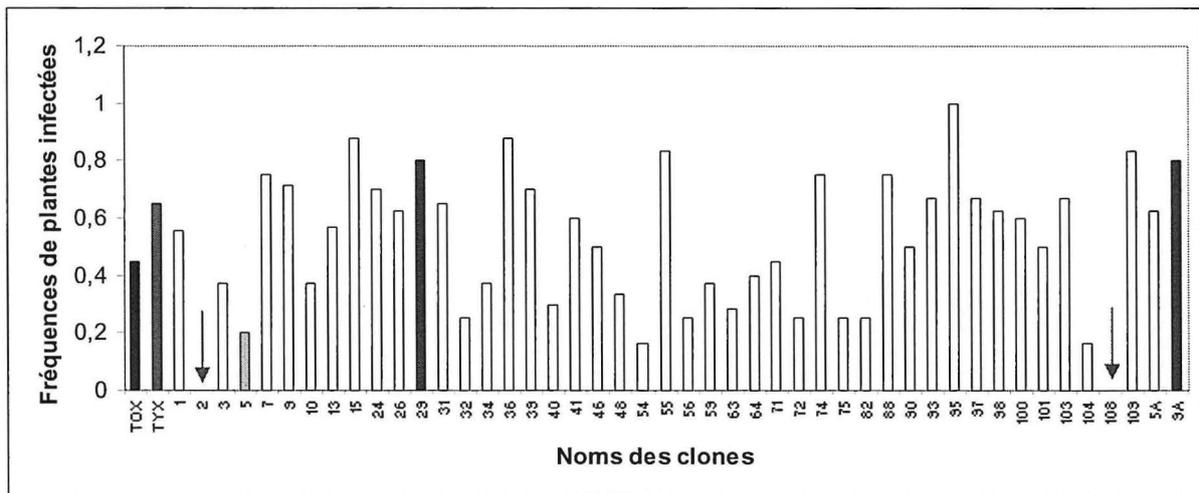
### 2.7. Analyse statistique

Le pourcentage de plantes infectées, l'accumulation virale, le poids sec et la hauteur ont été analysés à l'aide du logiciel R (version 2.10.1). Afin de comparer les traits phénotypiques des recombinants à ceux des parents, le test de comparaison non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été appliqué. Ce test a été choisi car notre échantillon est petit et la distribution de nos données ne suit pas une loi normale. Puis, pour corriger l'effet des comparaisons



**Figure 8**

**Pouvoir infectieux des clones à 15 DPI.** Fréquence des plantes infectées pour chaque clone. Le TYLCV (TYX) et le ToLCYTV (TOX) sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Les flèches rouges indiquent les clones ayant une fréquence de plantes infectées significativement inférieure à celle des deux parents. Le clone représenté en orange a un pouvoir infectieux significativement supérieur virus parentaux.



**Figure 9**

**Pouvoir infectieux des clones à 22 DPI.** Fréquence des plantes infectées suivant les clones. Le TYLCV (TYX) et le ToLCYTV (TOX) sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Les clones en blanc n'ont pas infectés un nombre significativement différent de celui des parents. Les flèches rouges indiquent les clones ayant une fréquence de plantes infectées significativement inférieure à celle des deux parents. Le clone représenté en gris a un pouvoir infectieux significativement inférieur à celui du ToLCYTV et les clones représentés en violet ont infecté significativement plus de plantes que le ToLCYTV.

multiples sur les p-value, un post-test de Benjamini-Hochberg a été appliqué. Les fréquences de plantes infectées ont quant à elles été comparées par un test de exact Fisher.

### **3. Résultats**

#### **3.1. Capacité de reproduction**

Dans deux expériences indépendantes, dix plantes par recombinants et témoins et vingt par parents ont été inoculées. Les échantillons ont été extraits à 15 et 22 jours après inoculation (DPI).

##### 3.1.1. Pouvoir infectieux des clones

**A 15 DPI.** La figure 8 représente les résultats d'un seul test. En effet, les faibles effectifs de nos échantillons ne nous ont pas permis de « pooler » les données de nos deux tests. Les pouvoirs infectieux des parents ne diffèrent pas entre eux. Trois clones n'ont infectés aucune plante, et parmi eux, le 108 et le 54 infectent significativement moins de plantes que le TYLCV. Quarante-trois autres clones ne présentent pas de pouvoirs infectieux différents de ceux des parents. Un seul clone, le 98, a un pouvoir d'infection supérieur à ses deux parents.

**A 22 DPI.** Comme à 15 DPI, les faibles effectifs de nos échantillons ne nous ont pas permis de « pooler » les données de nos deux tests. La figure 9 représente donc les résultats du même test que précédemment à 22 DPI. Le pouvoir infectieux des parents ne diffèrent pas, comme à la date précédente. Le 108 n'a infecté aucune plantes aux deux dates et infecte significativement moins d'hôtes que ses parents. Certains clones qui étaient infectieux à 15 DPI, ne sont plus détectés à 22 DPI. Le pouvoir infectieux d'un seul des recombinants est significativement inférieur au TYLCV : le 5. Ce dernier ne diffèrait ni du TYLCV ni du ToLCYTV à 15 DPI. Quarante-et-un clones ne présentent pas de différence de taux d'infection par rapport à leurs parents, dont le 98 qui a infecté significativement plus d'hôtes que ses parents à 15 DPI. Deux clones ont infectés significativement plus de plantes que les parents : le 9A et le 29, alors qu'à 15 DPI ils ne diffèrent pas de leurs parents.

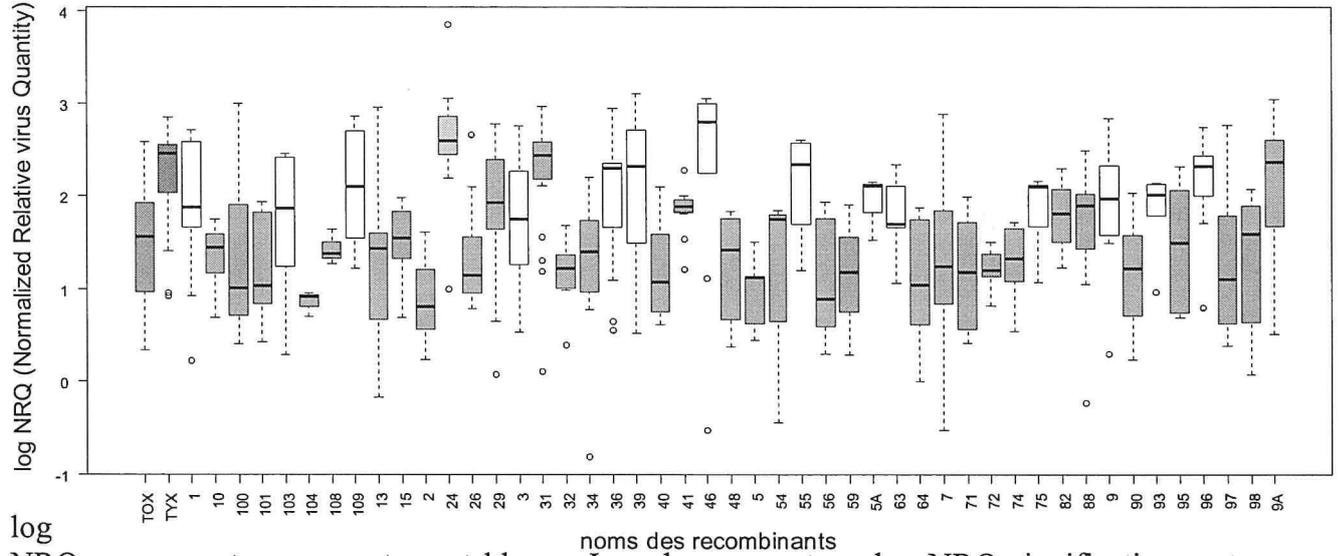
##### 3.1.2. Accumulation virale

**A 15 DPI.** Pour ce paramètre, les deux tests ont pu être « poolés ». Tous les recombinants ont été détectés au moins une fois en qPCR (Fig.10). Le TYLCV s'accumule significativement plus que le ToLCYTV (p-value = 0.00064).

Quatorze

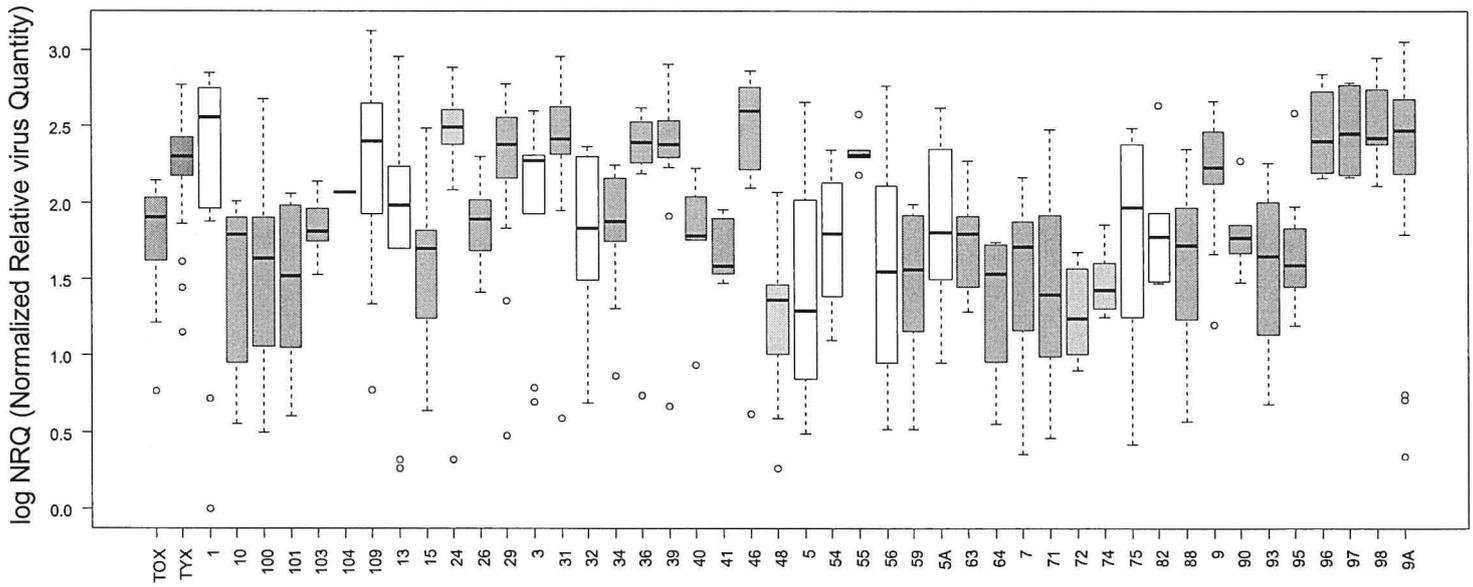
**Figure 10**

**Accumulation des clones à 15 DPI.** L'accumulation virale est quantifiée par le logarithme de la quantité relative normalisée, le NRQ. Les parents, le TYLCV (Tyx) et ToLCYTV (Tox), sont respectivement représentés en rouge et en bleu. Ceux ne présentant pas de différence de



log NRQ par rapport aux parents sont blancs. Les clones ayant un log NRQ significativement inférieurs au TYLCV sont représentés en rouge clair, les clones significativement supérieurs au ToLCYTV en violet. Le clone représenté en orange a un log NRQ supérieur à ses parents.

**Figure 11**



**Accumulation des clones à 22 DPI.** L'accumulation virale est quantifiée par le logarithme de la quantité relative normalisée, le NRQ. Les parents, le TYLCV (Tyx) et ToLCYTV (Tox), sont respectivement représentés en rouge et en bleu. Le clone représenté en gris à une accumulation significativement inférieure à celles des parents. Le code de couleur est le même que pour la figure 10.

de ces recombinants ne se reproduisent pas différemment des parents. Trente clones présentent une accumulation significativement inférieure à celle du TYLCV mais pas différente de celle du ToLCYTV. Les plantes infectées par le 31 et le 9A présentent une charge virale significativement supérieure à celles infectées par le ToLCYTV. Le seul recombinant ayant une accumulation supérieure à celles des parents est le 24.

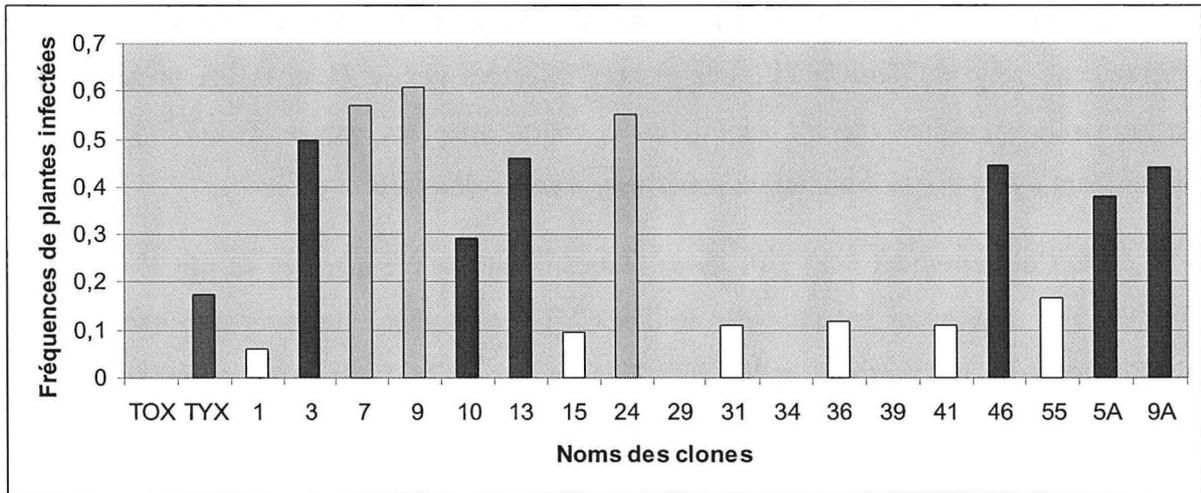
**A 22 DPI.** Contrairement à 22 DPI, deux clones n'ont pas été détectés en qPCR : le 2 et le 108 (Fig.11). Les hôtes infectés par le ToLCYTV présentent toujours une charge virale significativement inférieure à celles infectées par le TYLCV (p-value = 0.00029). Trois recombinants qui se multiplient moins que le TYLCV à 15 DPI, se reproduisent significativement moins que les deux parents à 22 DPI. Parmi les recombinants ne présentant pas de différence d'accumulation, sept se multiplient moins que le TYLCV à la date ultérieure et cinq ne diffèrent pas des parents aux deux dates. L'accumulation virale de onze recombinants est significativement supérieure à celle du ToLCYTV. Parmi eux, six ont une capacité de reproduction similaire aux parents à 15 DPI et quatre se reproduisent moins que le TYLCV à la date ultérieure. Comme précédemment, les plantes infectées par le 24 présente une charge virale supérieure à celles des parents est le 24.

### **3.2. Transmission**

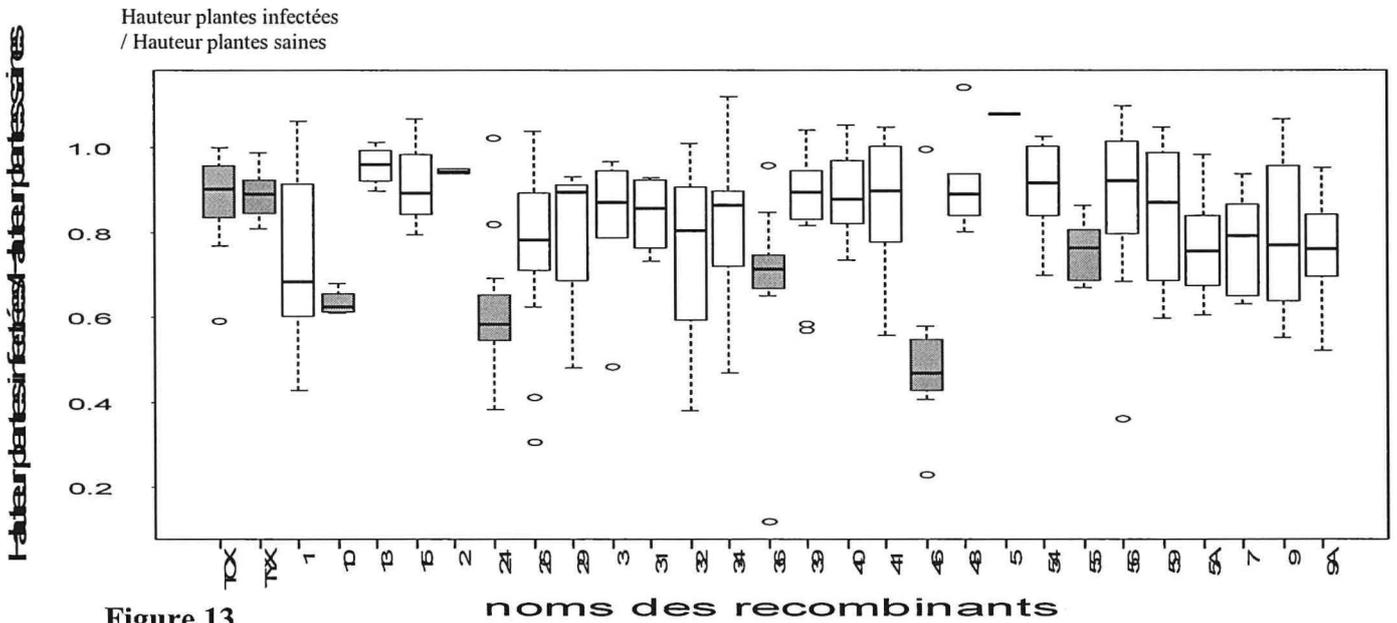
Pour ce test, dix-huit recombinants ont été testés ; trois plantes sources par clones, six plantes receveuses par plantes sources et deux *B. tabaci* femelles par plantes receveuses ont été utilisés. Les résultats de la figure 12 représentent les fréquences de plantes receveuses infectées. Les parents ne présentent pas de différence de capacité de transmission, malgré le fait que le ToLCYTV n'ait pas été transmis. Neufs des recombinants n'ont pas de capacité de transmission différente des parents, dont le 29, 34, 39, qui n'ont été transmis à aucune plante receveuse. Six recombinants ont été significativement mieux transmis que le ToLCYTV. Trois recombinants présentent une capacité à être transmis significativement supérieure à celles des deux parents : le 7, 9, et 24.

### **3.3. Virulence**

Vingt-sept des quarante-sept recombinants testés pour leur capacité reproductrice à 15 et 22 DPI ont été testés. Afin de comparer la virulence des recombinants à celles des parents, entre six et dix plantes par recombinants et par parents ont été testées dans quatre expériences indépendantes. Préalablement, avant mon arrivée dans l'équipe, les échantillons avaient été prélevés, la hauteur des plantes avait été mesurée et ces dernières avaient été séchées afin de



**Figure 12**  
**Capacité de transmission des clones.** Fréquences des plantes infectées par transmission de clones recombinants via *B. tabaci*. Le code de couleur est le même que pour les histogrammes précédents (Fig. 8 et 9).



**Figure 13**  
**Effet des clones sur la hauteur des plantes de tomates.** Le rapport de hauteur des plantes infectées sur la hauteur des plantes saines est représenté en fonction du nom des clones. Le TYLCV (Tyx) est représenté en rouge et le ToLCYTV (Tox) en bleu. Les clones représentés en blanc ne changent pas la valeur de ce rapport par rapport aux parents, et ceux en rouge le diminuent de façon significative par rapport au TYLCV.

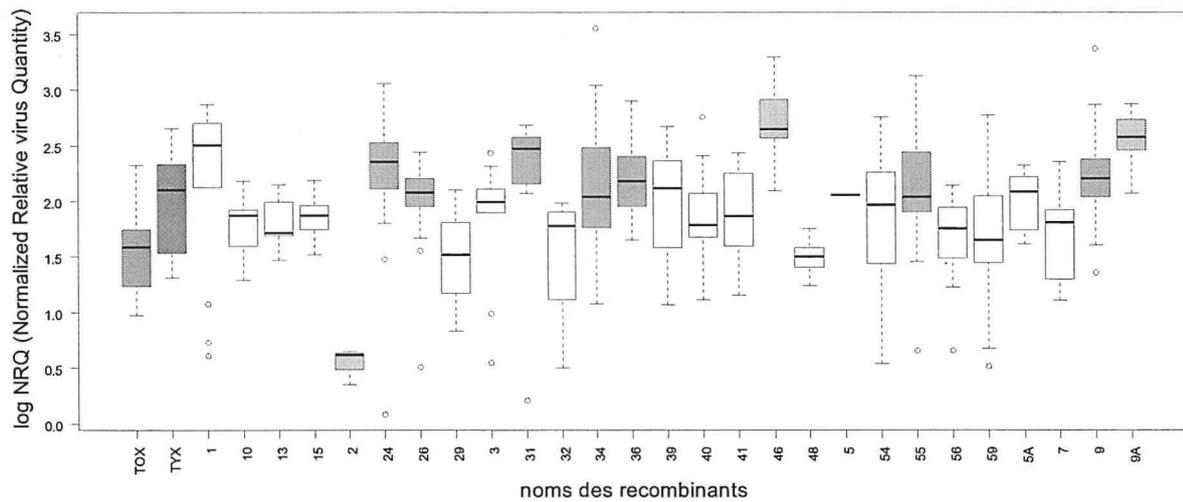
déterminer le poids sec, à 30 DPI. Afin de minimiser l'effet test, chaque mesure de hauteur et de poids sec ont été rapportés à ceux des plantes saines de chaque test.

**Hauteur et poids sec.** Les plantes infectées par les parents ne présentent ni de différence de rapport de hauteur (Fig.13) ni de différence de rapport de poids sec. Aucun des 27 recombinants testés n'affectent différemment la hauteur ou le poids sec de leur hôte par rapport au ToLCYTV. Les plantes infectées par les recombinants 10, 24, 36 46 et 55 présentent une réduction significative de rapport de hauteur par rapport au TYLCV. Concernant le rapport de poids sec (cf annexe 2), seul le 36 et 46 affectent significativement plus le poids sec de leur hôte que le TYLCV.

**Accumulation virale.** Contrairement aux résultats des tests de capacité de reproduction, les parents ne présentent pas de différence d'accumulation à 30 DPI, cependant ce test de virulence a été réalisé indépendamment que les tests sur la capacité de reproduction. Le clone 2 s'accumule significativement moins que ses parents (Fig.14). Ce dernier n'est pas détecté à 22 DPI et se multiplie moins que ses parents à 15 DPI, lors des tests sur la capacité de reproduction. Dix-sept ne présentent pas de différence d'accumulation virale à 30 DPI par rapport à leurs parents. Parmi eux, le 48, qui à 22 DPI diffère de ses parents et à 15 DPI se multiplie moins que le TYLCV. Six des dix-sept clones ont une capacité d'accumulation inférieure au TYLCV aux deux autres DPI. Cinq des clones ne présentant pas de différence d'accumulation avec leurs parents n'en présente pas non plus à 22 DPI et se multiplient tous significativement moins que le TYLCV à 15 DPI. Trois de ces dix-sept mêmes clones ne présentent pas de différence d'accumulation virale à aucune des deux autres dates. Les clones 29 et 39 se multiplient plus que le ToLCYTV à 22 DPI. A 15 DPI, le 39 ne présente pas de différence d'accumulation par rapport à ses parents, alors que le 29 s'accumule moins que le TYLCV. A 30 DPI, ces deux clones ne diffèrent pas des parents en accumulation.

#### **4. Discussion et perspectives**

A ce jour, aucune étude sur les effets de la recombinaison homologe aléatoire sur le fitness des descendants n'a été menée et il est présumé que celle-ci serait majoritairement délétère ou létale, comme il l'a été prouvé pour la mutation aléatoire. Contrairement à ces attentes, les résultats présentés ici sur quarante-sept recombinants aléatoires montrent que tous ont été capables de se reproduire et que par conséquent aucune des recombinaisons aléatoires n'est



**Figure 14**  
**Accumulation des clones à 30 DPI.** L'accumulation virale est exprimée par le log NRQ. Le code de couleur est le même que dans les figures 10 et 11.

létales. L'analyse plus fine révèle cependant un large spectre phénotypique des recombinants. Bien qu'ils soient tous capables de se reproduire in planta, ils ne sont pas égaux en termes de pouvoir infectieux et ni d'accumulation virale. De plus, d'après les résultats il ne semble pas exister de **lien entre le pouvoir infectieux d'un clone et son accumulation virale**. En effet, le recombinant 24, par exemple, se reproduit quantitativement plus que ses parents à 15 et 22 DPI, alors que celui-ci ne présente pas de différence d'infectivité par rapport à ses parents ni à 15 ni à 22 DPI. Le recombinant 98 montre la tendance inverse à 15 DPI : il est plus infectieux que ses parents mais s'accumule moins que le TYLCV. A l'inverse, les clones 9A et 29 sont plus infectieux que le ToLCYTV et se multiplie plus que ce parent à 22 DPI. Afin de déterminer si une corrélation peut être faite entre l'infectivité et l'accumulation, plusieurs autres tests à plus grands effectifs seraient nécessaires.

Il est intéressant de noter également que les clones semblent présenter des **cinétiques d'accumulation** différentes. En effet, certains clones augmentent en accumulation au cours du temps, comme le cas du 46. Celui-ci ne s'accumule pas de façon différente de ses parents à 15 DPI, alors qu'à 22 DPI il se multiplie plus que le ToLCYTV et finit par avoir une accumulation supérieure à ses parents. A l'inverse, certains s'accumulent beaucoup dès 15 DPI et diminuent en accumulation au cours du temps, comme par exemple le 24. Selon les résultats, ce clone se multiplie plus que ses parents à 15 et 22 DPI puis seulement plus que le ToLCYTV à 30 DPI. Cependant, comme il l'a été précisé, le test de virulence a été réalisé dans d'autres conditions que les tests sur la capacité de reproduction. La comparaison de l'accumulation virale aux premières dates puis à 30 DPI nécessite de déterminer si un effet test existe.

En ce qui concerne la virulence, les résultats suggèrent que les clones affectant le plus les caractéristiques biologiques de l'hôte sont ceux qui présentent une accumulation élevée tôt. En effet, à l'exception du 10, les clones affectant le plus la hauteur, le 36, 46 et 24, s'accumulent plus dès le début de l'infection. Bien que le 46 ne présente pas de différence d'accumulation à 15 DPI, il se trouve quand même dans la limite supérieure. Il semblerait donc que plus une jeune plante a une charge virale élevée, plus sa croissance sera affectée. Cependant, le clone 31 qui s'accumule beaucoup et très tôt ne présente pas une forte virulence. Un test de corrélation nous permettrait de savoir s'il existe un lien entre l'accumulation virale et la virulence. De plus, parmi les clones affectant le plus la hauteur, seuls le 36 et 46 ont une incidence significative sur le poids sec. Il aurait été également intéressant de tester la corrélation de ces deux paramètres.

Bien que les quarante-sept recombinaux testés soient capables de se multiplier dans leur hôte, il est indispensable pour leur survie qu'ils soient capables d'être transmis à un hôte. Les résultats de transmission ont montré qu'aucun clone n'avait une capacité de transmission inférieure à celle des parents. Par ailleurs, certains ont montré qu'ils pouvaient être transmis de façon plus efficace que leurs parents. A priori, il ne semble pas y avoir de lien entre l'accumulation des clones et leur transmission, à l'image du 3 et 7 par exemple. Cependant, parmi les clones mieux transmis, on retrouve le 24 et les 46. Un test de corrélation entre l'accumulation virale et la transmission nous permettrait de confirmer ou non cette hypothèse. Les résultats obtenus indiquent que des nouveaux recombinaux peuvent avoir une meilleure fitness, du point de vue de leurs capacités à se multiplier et à être transmis, par rapport à leurs parents. Ces recombinaux sont le 24 et le 46 qui non seulement s'accumulent plus que ses parents, mais sont également capables d'être transmis par vecteur et provoquer des dommages plus sévères que leurs parents. Cela suggère que si les aires de répartition du TYLCV et du ToLCYTV venaient à se chevaucher et si de tels recombinaux s'adaptent bien dans la nature, ils pourraient être maintenus dans les populations et éventuellement se répandre et provoquer de nouvelles épidémies.

Cependant pour que deux virus recombinent *in natura*, il doit d'abord y avoir co-infection. Cette étude ne donne aucune information concernant la fréquence de recombinaison entre deux virus. Lorsqu'un tel événement se produit, la persistance du recombinaux dépend de sa fitness. Bien que cette étude ait montré que certains clones pourraient présenter une fitness supérieure à leurs parents, rien ne laisse supposer que ces derniers seraient plus compétitifs que leurs parents *in natura*. Une des perspectives de cette étude serait donc de tester les recombinaux en condition de **compétition**.

Une autre perspective intéressante serait de tester le **spectre d'hôtes** des recombinaux de la banque de recombinaux. En effet, il n'est pas impossible que certains clones soient mieux adaptés à d'autres espèces de dicotylédones que la tomate, telles que le haricot, le tabac ou encore le poivron. Certains pourraient se présenter plus généralistes que d'autres, ce qui pourrait leur conférer un avantage sélectif en cas d'émergence. En effet, un virus émergent présentant une gamme d'hôtes plus élargie que les autres espèces virales en compétition est avantagé dans le sens où celui-ci aura moins de difficulté à rencontrer des et donc à survivre.

Une perspective plus fondamentale de cette étude serait de séquencer et de localiser les sites de recombinaison de chacun des clones lors de co-infection par les deux virus parentaux.

Chez les Begomovirus, des régions à haute fréquence de recombinaison, appelés « hot-spot » ont été détectés (Lefeuvre et *al.*, 2007). Une étude a suggéré que la distribution de ces « hot-spots » serait due à l'intervention de facteurs mécanistiques et/ou sélectifs (Lefeuvre et *al.*, 2007). Ces facteurs mécanistiques résultant de conflits entre les complexes de réplication et de transcription pourrait être à l'origine de la création des recombinants. L'étude du niveau de perturbation des protéines après recombinaison montre qu'une fois créés, les recombinants sont soumis à une forte sélection, éliminant les recombinants présentant des réarrangements délétères (Lefeuvre et *al.*, 2007). Seuls les recombinants pour lesquels les fonctions biologiques n'auraient pas été perturbées, et présentant une fitness suffisante devraient persister. Cependant, cette étude a été élargit à d'autres virus à ADN circulaire simple brin, présentant pourtant des gammes d'hôtes très variées (animaux, végétaux et bactéries), et a permis de montrer l'importance de la sélection purificatrice sur l'élaboration des profils de recombinaison. En comparant la localisation des sites de recombinaison des clones de notre étude à ceux des hot-spots, cela permettrait de comprendre dans quelle mesure les facteurs mécanistiques et/ou sélectif interviennent dans l'émergence.

Cette étude tout à fait originale a donc montré qu'aucun des évènements de recombinaison homologue aléatoires *in vitro* n'ont générés de virus délétères à la génération suivante, et que certains pouvaient se montrer plus avantageux que d'autre d'un point de vue de la fitness et de la virulence. L'aptitude des Begomovirus à échanger du matériel génétique par recombinaison semble être décisive dans l'adaptation à de nouvelles niches écologiques offertes par leur vecteur et sa dissémination mondiale. Ces virus sont donc de sérieux candidats à l'émergence, domaine dans lequel ils font parler d'eux depuis des dizaines d'années.

## BIBLIOGRAPHIE

**Carrasco P., de la Iglesia F., Elena S. F.** (2007). Distribution of fitness and virulence effects caused by single-nucleotide substitutions in tobacco etch virus. *Journal of Virology* 81 (23):12979-12984.

**Czosnek H., Laterrot H.** (1997). A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Arch Virology* 142(7): 1391-406.

**Czosnek H., Ghanim M., Morin S., Rubinstein G., Fridman V., Zeidan, M.** (2001). Whiteflies: vectors, and victims (?), of geminiviruses. *Advances in Virus Research* 57: 291-322.

**Delatte H., Martin D. P., Naze F., Goldbach R., Reynaud B., Peterschmitt M., Lett J. M.** (2005). South West Indian Ocean islands tomato begomovirus populations represent a new major monopartite begomovirus group. *Journal of Virology* 86:1533-1542.

**Escriu F., Fraile A., Garcia-Arenal F.** (2007). Constraints to genetic exchange support gene coadaptation in a tripartite RNA virus. *PloS Genet* 3(1): e8.

**Fargette D., Konate G., Fauquet C., Muller E., Peterschmitt M., Thresh J.M.** (2006). Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 44: 235-60.

**Garcia-Andres S., Monci F., Navas-Castillo J., Moriones E.** (2006). Begomovirus genetic diversity in the native plant reservoir *Solanum nigrum*: Evidence for the presence of a new virus species of recombinant nature. *Virology* 350(2): 433-42.

**Garcia-Andres S., Tomas D. M., Sanchez-Campos S., Navas-Castillo J., Moriones E.** (2007). Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 365(1): 210-9.

**Jeske H., Lutgemeier M., Preiss W.** (2001). DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. *EMBO Journal* 20 (21):6158-6167.

**Jones R. A.** (2009). Plant virus emergence and evolution: origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research* 141(2): 113-30.

**Lefeuvre P., Lett J.M., Martin D.P.** (2007). Avoidance of protein fold disruption in natural virus recombinants. *PloS Pathogens* 3(11): e181.

**Lefeuvre P., Lett J. M., Varsani A., Martin D. P.** (2009). Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *Journal of Virology* 83(6): 2697-707.

**Martin D. P., van der Walt E., Posada D., Rybicki E. P.** (2005). The evolutionary value of recombination is constrained by genome modularity. *Plos Genetics* 1 (4):475-479.

**Monci F., Sanchez-Campos S., Navas-Castillo J., Moriones E.** (2002). A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303(2): 317-26.

**Morilla G., Krenz B., Krenz B., Jeske H., Bejarano E. R., Wege C.** (2004). Tête à tête of tomato yellow leaf curl virus and tomato yellow leaf curl sardinia virus in single nuclei. *Journal of Virology* 78(19): 10715-23.

**Sanjuan R., Moya A., Elena S. F.** (2004). The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (22):8396-8401.

**Urbino C., Thebaud G., Granier M., Blanc S., Peterschmitt M.** (2008). A novel cloning strategy for isolating, genotyping and phenotyping genetic variants of geminiviruses. *Virology Journal* 5: 135.

Sites visités :

[http://www.bio-bee.com/site/pests.asp?pa\\_id=149&pa2\\_id=158&page\\_id=279](http://www.bio-bee.com/site/pests.asp?pa_id=149&pa2_id=158&page_id=279)

<http://www.proteus-psi.com/en/dreamline/diversity-generation/l-shuffling/>

<http://www.proteus.fr/fr/integrated-plateform/proprietary-technologies/evolution-dirigee-des-proteines/>

## LEXIQUE

**Recombinaison homologue:** échange de fragments d'ADN entre deux molécules (d'ADN) au niveau des séquences nucléotidiques homologues.

**Mutation :** altération du matériel génétique (ADN ou ARN) d'une cellule ou d'un virus.

**Emergence virale :** virus nouvellement découvert.

**Distance génétique :** pourcentage d'identité entre deux génomes.

**Fitness :** nombre de descendants viables et fertiles que produit en moyenne chaque individu d'un génotype donné à la génération suivante. Synonymes : valeur sélective, succès reproducteur.

**Capacité de reproduction:** taux de multiplication d'un pathogène dans son hôte.

**Pouvoir infectieux :** en phytopathologie, fréquence d'hôtes infectés.

**Efficacité de transmission:** capacité d'un pathogène à passer d'un hôte à un autre.

**Virulence:** aptitude d'un agent pathogène à se multiplier dans un organisme vivant et à y causer des dommages.

**Monopartite :** constitué d'une seule molécule d'ADN.

ANNEXE

## Analyse de l'accumulation virale à 15 DPI sous le logiciel R

```
> htp<-inf8j15[inf8j15$qPCR=="y",]
```

```
#les données de NRQ sont-elles normales?#
```

```
> shapiro.test(htp$NRQ)
```

```
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: htp$NRQ
```

```
W = 0.7114, p-value < 2.2e-16
```

```
#non, les données de NRQ ne sont pas normales#
```

```
#on va effectuer une transformation en log et tester la normalité#
```

```
> shapiro.test(htp$logNRQ)
```

```
Shapiro-Wilk normality test
```

```
data: htp$logNRQ
```

```
W = 0.9629, p-value = 5.702e-06
```

```
# les données ne sont toujours pas normales#
```

```
#on va utiliser un test non-paramétrique de comparaison de moyenne pour comparer  
tout les clones positifs en qPCR#
```

```
> kruskal.test(logNRQ ~ name, htp)
```

```
Kruskal-Wallis rank sum test
```

```
data: logNRQ by name
```

```
Kruskal-Wallis chi-squared = 95.8375, df = 41, p-value = 2.778e-06
```

```
#il y a des différences entre les parents#
```

```
#où sont les différences? On va comparer chacun des clones un par un à chacun  
des parents#
```

```
> levels(htp$name)
```

```
[1] "1" "10" "100" "101" "103" "104" "108" "109" "13" "15" "2" "24"
```

```
[13] "26" "29" "3" "31" "32" "34" "36" "39" "40" "41" "46" "48"
```

```
[25] "5" "54" "55" "56" "59" "5A" "63" "64" "7" "71" "72" "74"
```

```
[37] "75" "82" "88" "9" "90" "93" "95" "97" "98" "9A" "TOX" "TYX"
```

```

> spinf7<-split(htp,htp$name,drop=TRUE)

> tyx<-htp[htp$name=="TYX",]

> tox<-htp[htp$name=="TOX",]

> pval7<-vector()

> for(i in 1:(length(spinf7))){wt<-
wilcox.test(x=spinf7[[i]]$logNRQ,y=tyx$logNRQ);pval7<-c(pval7,wt$p.value)}

> pval7
[1] 0.108802962 0.272727273 0.024916260 0.065694678 0.692307692
0.027972028
[7] 0.953046953 0.937062937 0.105894106 0.121212121 0.018947635
0.105894106
[13] 0.616526263 0.573426573 0.885880273 0.160839161 0.161250514
0.922869700
[19] 0.005196042 0.129204129 0.453546454 0.030303030 0.006787330
0.859140859
[25] 0.363636364 0.007992008 0.484848485 0.545454545 0.039960040
0.147102897
[31] 0.002182728 0.121212121 0.272727273 0.545454545 0.545454545
1.000000000
[37] 0.272727273 0.121212121 0.020521962 0.598098876 0.069150664
1.000000000
# il y a 10 clones différents du tyx#

> pval8<-vector()

> for(i in 1:(length(spinf7))){wt<-
wilcox.test(x=spinf7[[i]]$logNRQ,y=tox$logNRQ);pval8<-c(pval8,wt$p.value)}

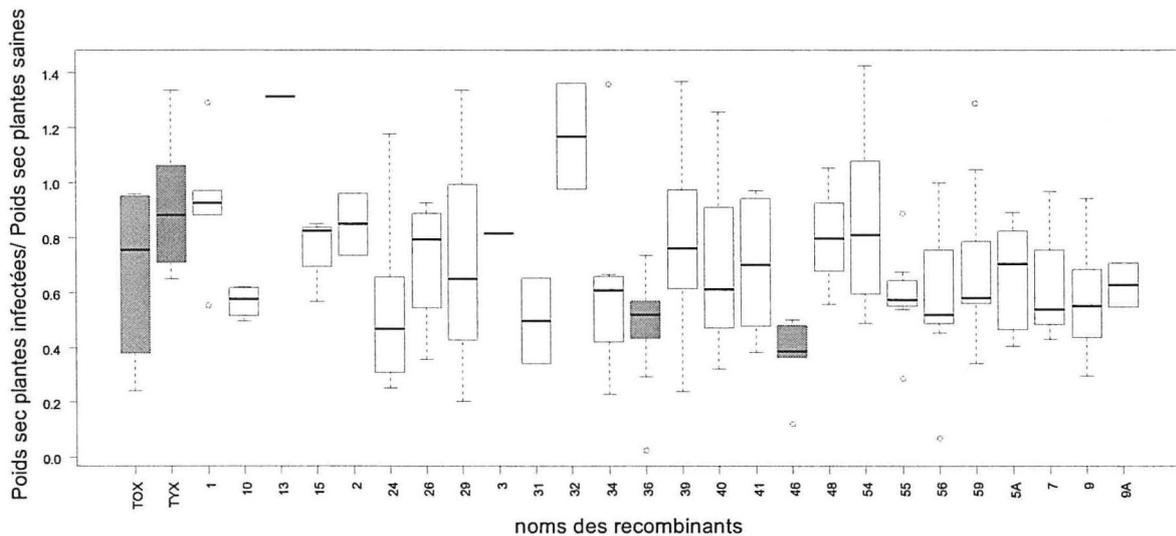
> pval8
[1] 0.9018020164 0.9230769231 0.5898757320 0.5989010989 0.2945054945
[6] 0.2329670330 0.1945701357 0.3648351648 1.0000000000 0.6593406593
[11] 0.0003190442 0.5208791209 0.0600505022 0.8395604396 0.0640320265
[16] 0.6329670330 0.8369453044 0.1135023275 0.5386594829 0.5743374273
[21] 0.1329670330 0.3516483516 0.1673414305 0.1599870718 0.7912087912
[26] 0.1032967033 0.5494505495 0.7692307692 0.7213962508 0.9635854342
[31] 0.2813387976 0.5494505495 0.7912087912 1.0000000000 0.9230769231
[36] 0.1037491920 0.9230769231 0.6593406593 0.8506311026 0.0256919432
[41] 1.0000000000 0.0691506636
#il y a 2 clones différents du tox#

#on va appliquer une correction de Benjamini-Hochberg à ces 2 tests#

```

```
> p.adjust(pval7,method="BH")
[1] 0.28282828 0.45818182 0.14141414 0.24202732 0.83076923 0.14141414
[7] 1.00000000 1.00000000 0.28282828 0.28282828 0.14141414 0.28282828
[13] 0.76159127 0.75262238 1.00000000 0.30784189 0.30784189 1.00000000
[19] 0.08391608 0.28560913 0.70551671 0.14141414 0.08391608 1.00000000
[25] 0.58741259 0.08391608 0.72727273 0.73900293 0.16783217 0.30784189
[31] 0.08391608 0.28282828 0.45818182 0.73900293 0.73900293 1.00000000
[37] 0.45818182 0.28282828 0.14141414 0.76121675 0.24202732 1.00000000
# après correction, aucun clone n'est différent du tyx"
```

```
> p.adjust(pval8,method="BH")
[1] 1.00000000 1.00000000 1.00000000 1.00000000 0.82461538 0.75266272
[7] 0.68099548 0.90135747 1.00000000 1.00000000 0.01339986 1.00000000
[13] 0.58086557 1.00000000 0.58086557 1.00000000 1.00000000 0.59588722
[19] 1.00000000 1.00000000 0.62051282 0.90135747 0.63894001 0.63894001
[25] 1.00000000 0.59588722 1.00000000 1.00000000 1.00000000 1.00000000
[31] 0.82461538 1.00000000 1.00000000 1.00000000 1.00000000 0.59588722
[37] 1.00000000 1.00000000 1.00000000 0.53953081 1.00000000 0.58086557
#après correction, 1 seul clone est différent du tox#
```



## Annexe 2

**Effet de la virulence des clones sur le poids sec des plantes.** Le rapport de poids sec des plantes infectées sur le poids sec des plantes saines est représenté en fonction du nom des clones. Les parents, le TYLCV (TYX) et le ToLCYTV (TOX), sont représentés respectivement en rouge et en bleu. Les clones représentés en blanc ne réduisent pas le poids sec. Ceux en rouge diminuent de façon significative la valeur de ce rapport.