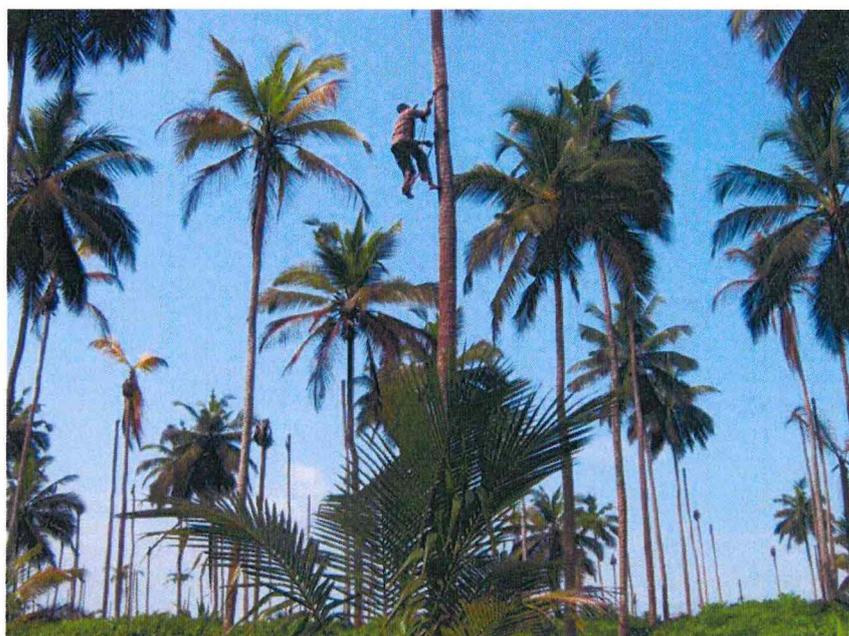


**ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DU  
PHYTOPLASME RESPONSABLE DU JAUNISSEMENT  
MORTEL DU COCOTIER AU GHANA**

**RAPPORT DE STAGE DE MASTER 2**  
Soutenance le 16 juin 2011



<b>Nom de l'étudiant :</b>	<b>POULIN Lucie</b>
<b>Diplôme préparé :</b>	<b>Master de Recherche Biodiversité et interactions parasitaires et microbiennes (BIMP) — Spécialité Systèmes microbiens (SM)</b>
<b>Laboratoire d'accueil :</b>	<b>CIRAD- UMR98 Résistance des Plantes aux Bioagresseurs</b>
<b>Nom de l'encadrant CIRAD :</b>	<b>PILET Fabian</b>
<b>Université :</b>	<b>Université Montpellier II / BGAE</b>
<b>Encadrant UM2 :</b>	<b>VALLAEYS Tatiana</b>
<b>Membres du Jury :</b>	<b>BRUNEL Brigitte CZERNIC Pierre</b>

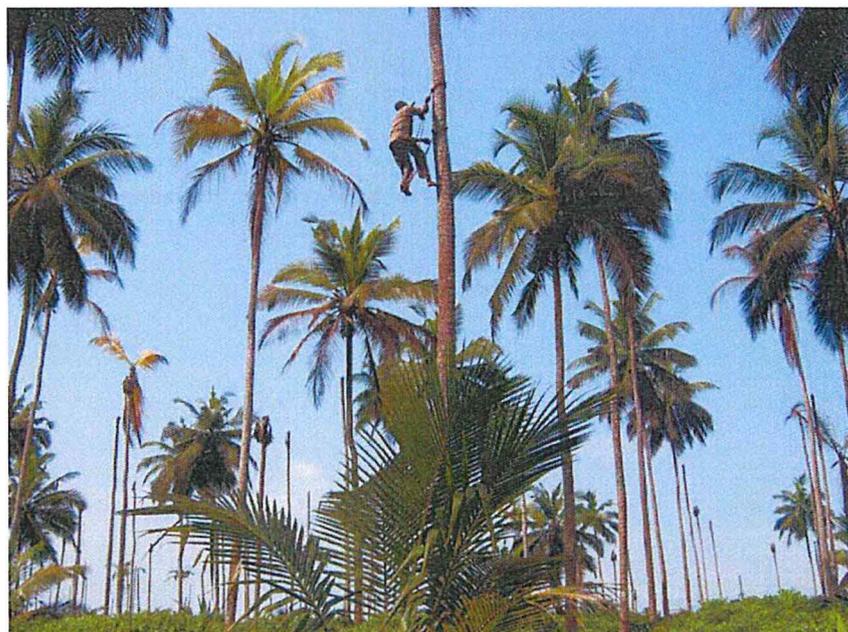
CIRAD-DIST  
Unité bibliothèque  
Lavalette

27 JUIN 2011



# ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DU PHYTOPLASME RESPONSABLE DU JAUNISSEMENT MORTEL DU COCOTIER AU GHANA

RAPPORT DE STAGE DE MASTER 2  
Soutenance le 16 juin 2011



<b>Nom de l'étudiant :</b>	<b>POULIN Lucie</b>
<b>Diplôme préparé :</b>	<b>Master de Recherche Biodiversité et interactions parasitaires et microbiennes (BIMP) — Spécialité Systèmes microbiens (SM)</b>
<b>Laboratoire d'accueil :</b>	<b>CIRAD- UMR98 Résistance des Plantes aux Bioagresseurs</b>
<b>Nom de l'encadrant CIRAD :</b>	<b>PILET Fabian</b>
<b>Université :</b>	<b>Université Montpellier II / BGAE</b>
<b>Encadrant UM2 :</b>	<b>VALLAEYS Tatiana</b>
<b>Membres du Jury :</b>	<b>BRUNEL Brigitte CZERNIC Pierre</b>

## Remerciements

---

Je tiens tout particulièrement à remercier Fabian Pilet de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce stage. Je le remercie également pour sa précieuse aide quant à l'organisation du stage et pour tous ses conseils aussi bien pratiques qu'analytiques.

Merci également à Sandrine Fabre, Lisa Fontaine-Bodin et Frédéric Gatineau pour leur assistance au laboratoire et au bureau ainsi que pour leur accueil agréable.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont apportées leur aide au cours de ces six mois. Merci notamment à Michel Dollet, Denis Farget et Luc Beaudoin pour leurs conseils.

Je remercie enfin le CIRAD pour m'avoir accueillie au sein de ses structures. Merci à tout son personnel qui a rendu ce stage agréable et passionnant.

## Abréviations

---

CSPWD	Cape Saint Paul Wilt Disease
ITS	Internal Transcribed Spacer
JMC	Jaunissements mortels des cocotiers
LY	Lethal Yellowing
MLSA/ MLST	Multi Locus Sequence Analysis/Multi Locus Sequence Typing
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TAE	Tampon Tris, Acétate, EDTA

## Table des matières

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>1</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>2</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>5</b>
1.1. <i>Le cocotier</i> .....	5
1.1.1. Généralités .....	5
1.1.2. Importance économique .....	5
1.2. <i>Les phytoplasmes</i> .....	6
1.2.1. Généralités .....	6
1.2.2. Variabilité des phytoplasmes.....	7
1.3. <i>Le jaunissement mortel du cocotier (JMC)</i> .....	8
1.3.1. Généralités .....	8
a. L'agent pathogène .....	8
b. Les vecteurs.....	9
c. Méthodes de lutte .....	9
1.3.2. Répartition et épidémiologie.....	9
a. Distribution mondiale.....	9
b. Epidémiologie .....	10
<b>2. Matériels et méthodes</b> .....	<b>11</b>
2.1. <i>Echantillons</i> .....	11
2.2. <i>Amplification par PCR</i> .....	12
2.2.1. Définition des amorces .....	12
2.2.2. Conditions de PCR .....	12
2.3. <i>Clonage</i> .....	12
2.3.1. Ligation.....	12
2.3.2. Transformation .....	13
2.3.3. Repiquage et culture des colonies transformées .....	13
2.3.4. Purification de produits clonés et vérification .....	13
2.4. <i>Séquençage</i> .....	13
2.5. <i>Alignement de séquences</i> .....	14
2.6. <i>Analyses phylogénétiques</i> .....	14
2.7. <i>Profils RFLP</i> .....	15
2.7.1. Choix des enzymes de restriction .....	15
2.7.2. Restriction enzymatique .....	15

<b>3. Résultats</b> .....	<b>15</b>
3.1. Séquences 16S.....	15
3.2. Séquence <i>rp</i> .....	16
a. Analyse de séquences.....	16
b. Analyse de restriction.....	16
3.3. Séquence <i>secY-map</i> .....	17
a. Analyse de séquences.....	17
b. Analyse de restriction.....	17
3.4. Séquence <i>secA</i> .....	18
3.5. Séquence <i>imp</i> .....	19
a. Analyse de séquences.....	19
b. Analyse de restriction.....	19
3.6. <i>Multiple loci sequence analysis (MLSA)</i> .....	20
<b>4. Discussion</b> .....	<b>20</b>
<b>5. Conclusions et perspectives</b> .....	<b>24</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>25</b>

## **1. Introduction**

### **1.1. Le cocotier**

#### ***1.1.1. Généralités***

Le cocotier appartient à la famille des arécacées (*Arecaceae*) ou plus communément appelés palmacées (*Palmae*) et à la sous-famille des cocoidés (*Arecoideae*). Le cocotier est constitué d'un tronc sans cortex ou stipe, dominé par une couronne de feuille, les palmes. Un cocotier peut être mature de 4 à 8 ans selon sa variété et produit des fruits, les noix de coco. Son âge maximal peut atteindre une centaine d'années mais son intérêt économique ne dépasse pas cinquante ans. Une température élevée et une hygrométrie importante sont nécessaires au développement du cocotier, c'est pourquoi il est retrouvé principalement dans les régions intertropicales (Bourdeix *et al.*, 2005).

#### ***1.1.2. Importance économique***

La culture du cocotier s'est développée principalement le long des côtes intertropicales sur des sols peu propices au développement d'autres espèces végétales. Le cocotier est qualifié « d'arbre de la vie » chez certaines tribus ou « d'arbre aux 100 usages ». La noix de coco peut être valorisée de multiples façons : l'amande immature est un aliment complet, le coprah (amande mûre, séchée) sert à la fabrication d'huile de coco, la coque permet de produire du charbon actif. Le stipe et les palmes sont utilisés pour construire des maisons (Taffin & Sangaré, 1989 ; Bourdeix *et al.*, 2005).

La production mondiale de noix de coco est essentiellement sud-asiatique (80% des plantations). C'est notamment la quatrième ressource agricole en Indonésie, la troisième aux Philippines. Les principaux producteurs africains sont la Tanzanie et le Mozambique avec les surfaces de cultures de cocotiers les plus grandes d'Afrique. D'après les données FAO 2009, le Ghana est le treizième producteur mondial de noix de coco avec une production de 316500 tonnes et près de 30M\$ pour une surface cultivé de 55500 ha.

Les cultivateurs de cocotiers sont confrontés à de nombreuses difficultés. En plus d'une inconstance des prix de l'huile de cocotier et de la compétition avec les huiles d'autres oléagineux comme l'huile de palme, les producteurs ont des cocoteraies vieillissantes et

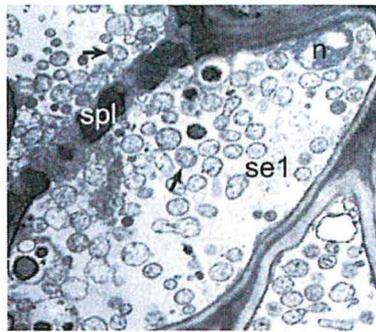


Figure 1: Phytoplasmes dans les cellules criblées du phloème (<http://www.jic.ac.uk/staff/saskia-hogenhout/>)

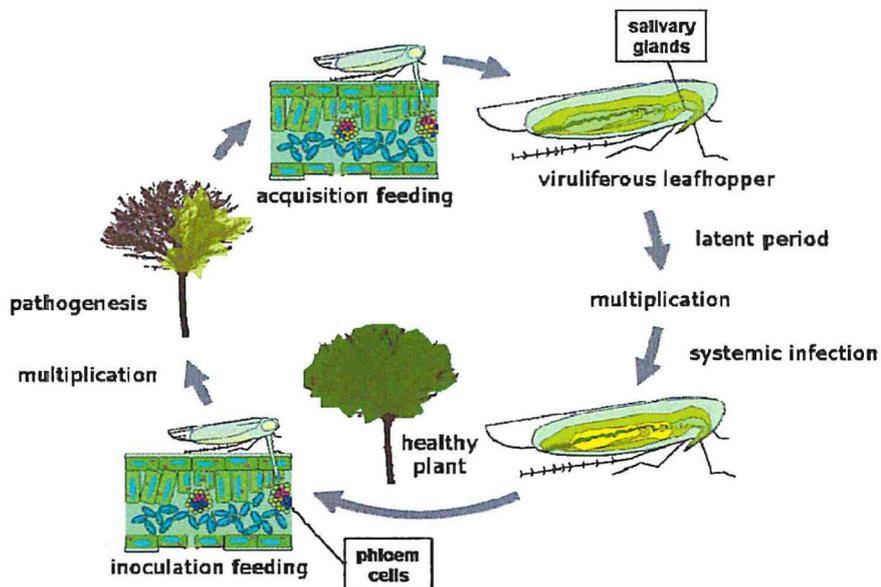


Figure 2 : Cycle de transmission des phytoplasmes par les insectes piqueurs-suceurs de sève (<http://www.sporometrics.com/2010/04/02/phytoplasma/>)

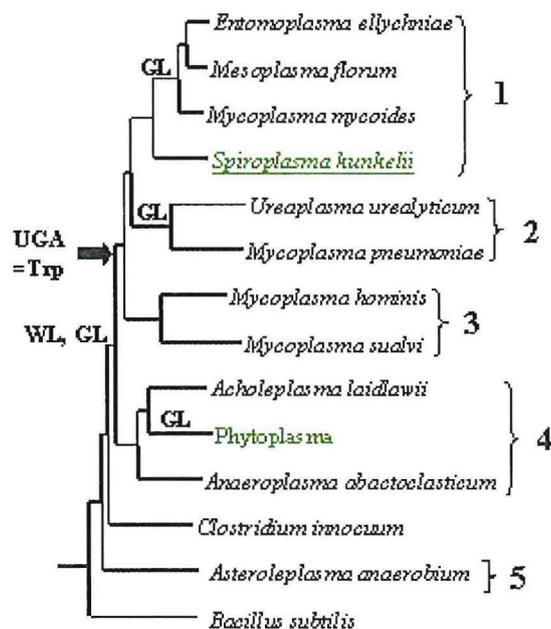


Figure 3 : A. Relations de parentés entre les 5 groupes phylogénétiques Mollicutes. GL : pertes de gènes (1-5); WL : perte de la paroi cellulaire. (<http://www.jic.ac.uk/staff/saskia-hogenhout/>)

subissent l'impact de nombreuses maladies. La maladie qui a le plus fort impact sur les cocotiers est le jaunissement mortel du cocotier (JMC) qui provoque un dépérissement des arbres entraînant leur mort. Cette maladie est causée par des phytoplasmes (Taffin and Sangaré, 1989 ; Bene *et al.*, 2009).

## 1.2. Les phytoplasmes

### 1.2.1. Généralités

Les phytoplasmes sont des bactéries phytopathogènes intraphloémiques sans paroi (Figure 1). Ils ne sont pas cultivables *in vitro*. Les phytoplasmes sont transmis par l'intermédiaire d'insectes piqueurs-suceurs se nourrissant de sève élaborée comme représenté en Figure 2. Ils appartiennent à la classe des Mollicutes. Proches phylogénétiquement des *Mycoplasmas*, Mollicutes pathogènes d'animaux, les phytoplasmes sont affiliés à l'ordre des *Acholeplasmatales* (Figure 3) (Cousin *et al.*, 2001). L'IRPCM a instauré un système universel pour nommer les espèces de phytoplasmes '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma*'. Chaque nouveau *Candidatus* doit être caractérisé par une seule séquence d'ADNr 16S, de taille supérieure à 1200 pb et avoir moins de 97,5% d'homologie de séquence avec d'autres '*Ca. Phytoplasma*' connus. D'autres propriétés écologiques ou moléculaires peuvent être prises en compte (IRPCM, 2004). Ces bactéries ont un génome relativement petit variant de 530 Kpb à 1,35 Mpb et ont perdu au cours de l'évolution de nombreux gènes dont certains, comme des gènes codant des protéines de la sous-unité de l'ATP-synthétase, sont essentiels (Oshima *et al.*, 2004).

A ce jour, seulement quatre génomes de phytoplasmes ont été entièrement séquencés et publiés : onion yellows (OY-M) (Oshima *et al.*, 2004), aster yellow strain witches'broom (AY-WB) (Bai *et al.*, 2006), Australian grapevine yellows (AUSGY) (Tran-Nguyen *et al.*, 2008) et apple proliferation (AP) (Kube *et al.*, 2008). Il existe une forte variabilité interspécifique, autant au niveau de la synténie des gènes (essentiellement due à des recombinaisons), qu'au niveau des séquences nucléotidiques (Bai *et al.*, 2006).

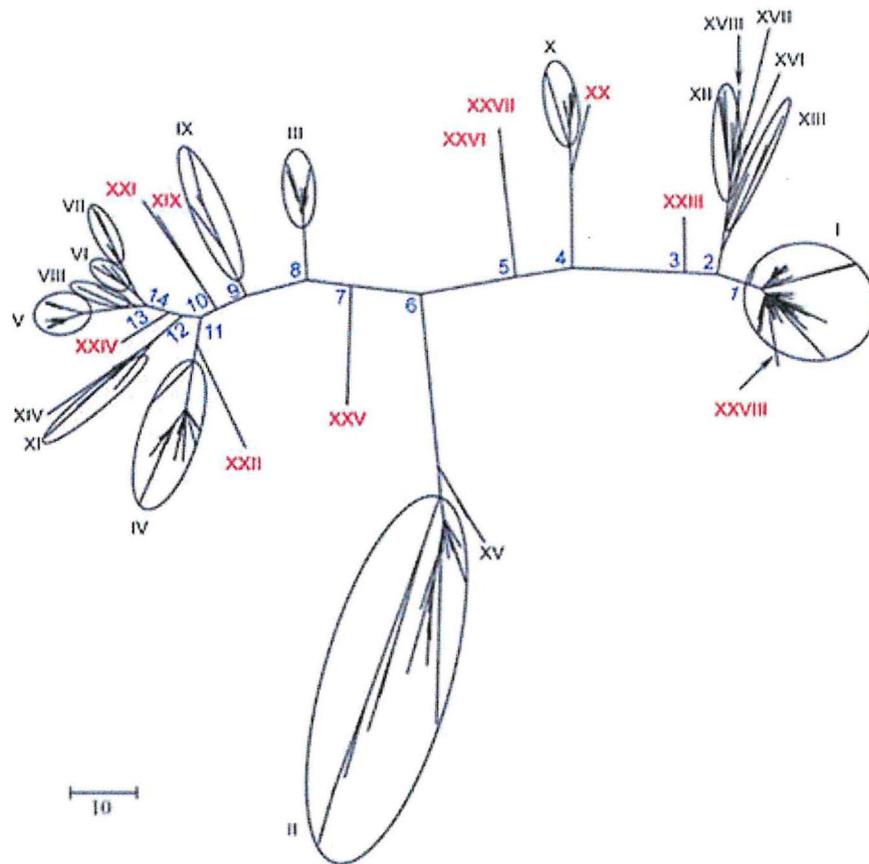


Figure 4 : Analyse cladistique de maximum de parcimonie des *Phytoplasmes* basé sur la région F2nR2 de l'ADNr 16S à partir de 524 *Phytoplasmes*. Barre 10 nt. (Wei et al. 2007)

### 1.2.2. Variabilité des phytoplasmes

La classification des phytoplasmes est basée sur les séquences de l'ADNr 16S. Deux approches sont généralement conduites. Une première approche est basée sur l'homologie des séquences d'ADNr 16S.

Une deuxième approche est basée sur les analyses RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de l'ADN ribosomal 16S par 17 enzymes (Lee *et al.*, 1993 & Seemüller *et al.*, 1994). Ces analyses génèrent des coefficients de similarité F (Lee *et al.*, 1998) qui permettent la distinction des phytoplasmes en différents groupes 16Sr, regroupant généralement les phytoplasmes responsables de mêmes maladies, et en différents sous-groupes 16Sr qui différencient les phytoplasmes proches ayant des hôtes différents, transportés par des vecteurs différents ou géographiquement éloignés. L'analyse des séquences d'ADNr 16S par des programmes bioinformatiques (restrictions *in silico* par différentes enzymes) facilite les analyses (Figure 4) (Wei *et al.*, 2007 & 2008, Zhao *et al.*, 2009). Jusqu'à présent, 30 groupes 16Sr ont été distingués (Zhao *et al.*, 2010).

Cependant, de plus en plus d'études sur la variabilité des phytoplasmes montrent les limites de l'ADNr 16S. D'autres gènes plus résolutifs sont utilisés pour étudier la variabilité de phytoplasmes à une échelle plus fine.

Plusieurs gènes ont été étudiés chez différents groupes de phytoplasmes. Les gènes de protéines ribosomales sont beaucoup plus variables que l'ADNr 16S (Martini *et al.*, 2007). Les phytoplasmes comptent environ une vingtaine de protéines ribosomales, dont les plus utilisées pour l'étude de leur variabilité sont *rpIV* (*rpl22*) et *rpsC* (*rps3*) (Martini *et al.*, 2007). La variabilité du gène *secY* (Danet *et al.*, 2007 ; Malembic *et al.*, 2007 et Lee *et al.*, 2010) ainsi que la variabilité du gène *map* (Arnaud *et al.*, 2006) ont été utilisées pour une différenciation assez fine des isolats de phytoplasmes responsables de la Flavescence Dorée (groupe 16SrV) de la vigne. Le gène *secA*, codant comme *secY* pour une sous unité de la protéine membranaire Sec, a été utilisé pour approfondir les phylogénies des phytoplasmes basées sur l'ADNr 16S (Hodgetts *et al.*, 2008). La variabilité du gène *imp* (immunodominant membrane protein) codant

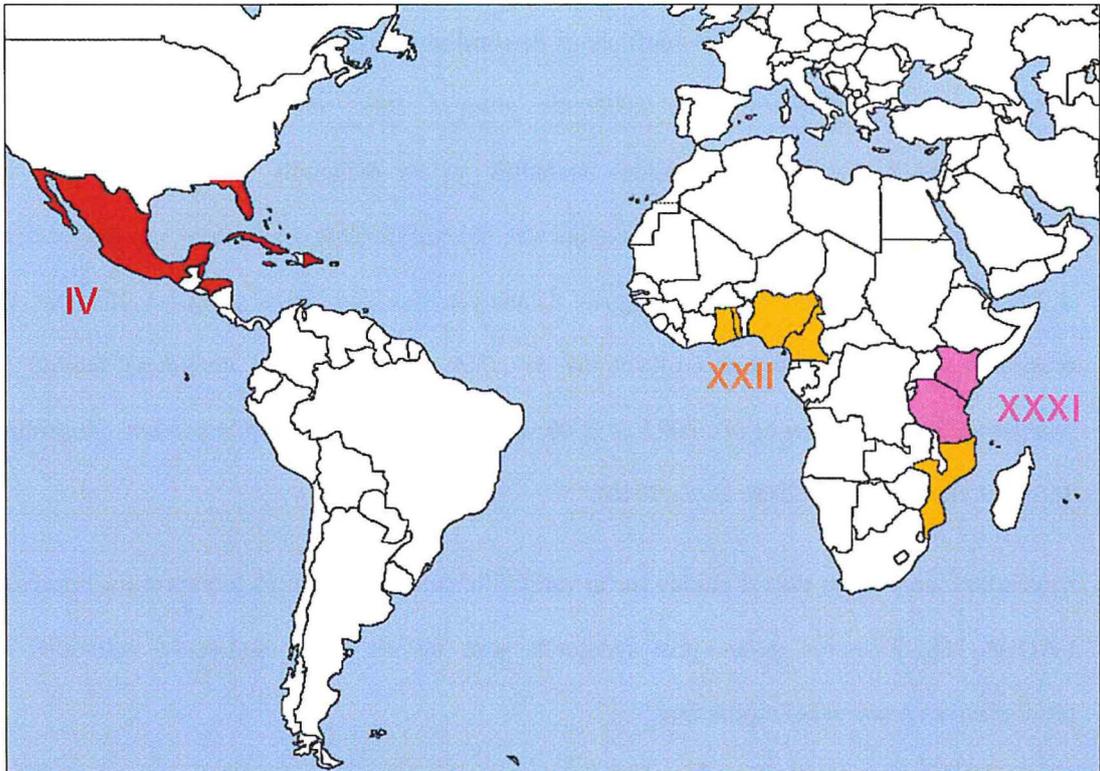


Figure 5 : Localisation des trois groupes 16Sr de phytoplasmes responsables du jaunissement mortel du cocotier

pour une protéine membranaire, a été utilisée en parallèle avec d'autres gènes dans le cas d'études MLSA (Multi Locus Sequence Analysis) pour discriminer de façon assez résolutive des phytoplasmes du groupe 16SrX (Danet *et al.*, 2007).

De façon générale, de par leur diversité, il existe de nombreuses maladies à phytoplasmes infectant des hôtes très divers, soient plus de 600 maladies connues (Cousin *et al.*, 2001) parmi lesquelles on peut compter le jaunissement mortel du cocotier.

### **1.3. Le jaunissement mortel du cocotier (JMC)**

Les jaunissements mortels du cocotier peuvent être causés par différents agents pathogènes comme les trypanosomes (Waters, 1978) ou des phytoplasmes... Aussi, d'autres phytoplasmes peuvent provoquer d'autres maladies chez le cocotier comme par exemple la maladie de dépérissement des racines (root wilt disease) (Manimekalai *et al.*, 2010). Nous ne nous intéresserons ici uniquement aux phytoplasmes responsables du JMC.

#### ***1.3.1. Généralités***

##### ***a. L'agent pathogène***

Les phytoplasmes responsables du JMC appartiennent à trois groupes différents: un groupe caraïbe (16SrIV), un groupe Afrique de l'Ouest et Mozambique (16SrXXII) (Wei *et al.*, 2007) et un groupe Tanzanie (16SrXXXI) (Figure 5) (Pilet, com. perso.). A chaque groupe 16Sr de phytoplasmes responsables du Jaunissement Mortel du Cocotier correspond un nom d'espèce *Candidatus* Phytoplasma soient *Candidatus* Phytoplasma palmae (caraïbes), *Candidatus* Phytoplasma cocosnigeriae (Afrique de l'ouest et Mozambique), *Candidatus* Phytoplasma cocostanzaniae (Tanzanie et Kenya). Le spectre d'hôtes des phytoplasmes responsables du JMC dans les caraïbes (groupe 16SrIV) inclut une trentaine de palmiers dont le cocotier. En revanche, jusqu'à présent, en Afrique, seul le cocotier a été répertorié comme hôte des phytoplasmes des groupes 16SrXXII et XXXI (Cousin *et al.*, 2002).

Le JMC est caractérisé par une symptomatologie bien définie. Dans un premier temps les noix (y compris les noix immatures) tombent, suivies par une nécrose des inflorescences. Dans un second temps, les vieilles feuilles jaunissent suivies par les plus jeunes feuilles. Pour finir, ce

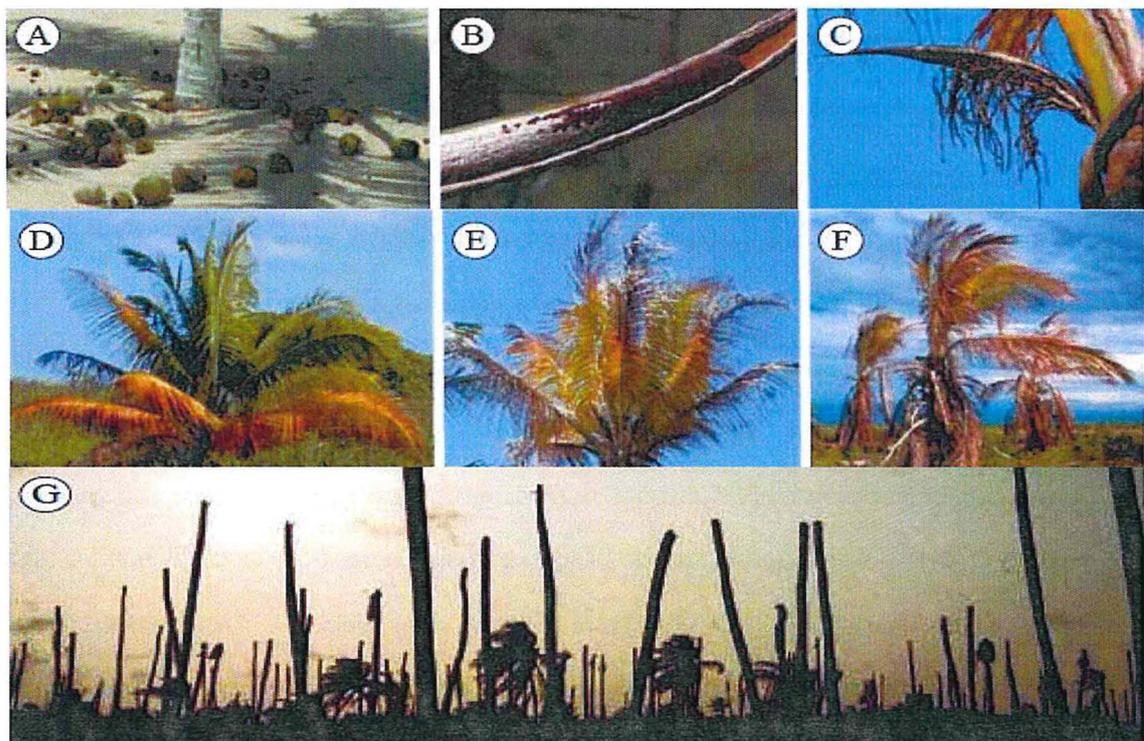


Figure 6 : Evolution des symptômes du Jaunissement Mortel du Cocotier (A->G)

qui reste de la couronne meure pour ne laisser qu'un tronc nu (Figure 6). Les symptômes du JMC sont proches de symptômes conséquents à des stress environnementaux ou à d'autres maladies et/ou parasites. Il est donc nécessaire d'effectuer un diagnostic par PCR pour confirmer une infection par les phytoplasmes.

#### ***b. Les vecteurs***

Les vecteurs du JMC sont mal connus. *Haplaxus (Myndus) crudus* est le seul insecte vecteur avéré dans les caraïbes (groupe 16SrIV) (Harrison *et al.*, 1997). En Jamaïque et à Cuba, des phytoplasmes ont aussi été détectés chez d'autres espèces d'insectes : respectivement *Cedusa spp.* (Brown *et al.*, 2006) et *Nymphoxicia caribea* (Dollet *et al.*, 2010). Pour ce qui est de l'Afrique, des hypothèses quant à des vecteurs potentiels sont avancés comme *Diostrombus mkurangai* et *Meenoplus spp.* en Tanzanie (Mpunami *et al.*, 2000). Au Ghana, aucun vecteur n'a été identifié malgré les nombreux efforts de criblages d'insectes réalisés.

#### ***c. Méthodes de lutte***

Le JMC causé par les phytoplasmes peut être limité par injection régulière de tétracycline (Maust *et al.*, 2003). Néanmoins, pour contrôler la maladie, la prévention est privilégiée par rapport au traitement qui est onéreux. Cela implique l'entretien des parcelles de cocotiers, la coupe et l'incinération des plantes symptomatiques, la plantation de variétés supposées moins sensibles. Des suivis de l'évolution de la maladie sont effectués comme au Ghana où des surveillances aériennes et au sol permettent d'identifier de nouveaux foyers (Nkansah-Poku, 2009). Des essais variétaux de cocotiers au Ghana ou au Mozambique ont été mis en place pour évaluer la résistance de différentes variétés et ont mis en évidence un comportement intéressant de variétés comme NVS (Nain Vert du Sri Lanka) x GV (Grand Vanuatu) vis-à-vis de la maladie au Ghana (Baudouin *et al.*, 2009 ; Quicoe *et al.*, 2009).

### ***1.3.2. Répartition et épidémiologie***

#### ***a. Distribution mondiale***

Les premières descriptions du syndrome du jaunissement mortel du cocotier datent du milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle dans les Iles Cayman. La maladie a ensuite été identifiée à Haïti, en République Dominicaine, à Cuba, en Jamaïque et en Floride. Elle a été reportée pour la première fois au

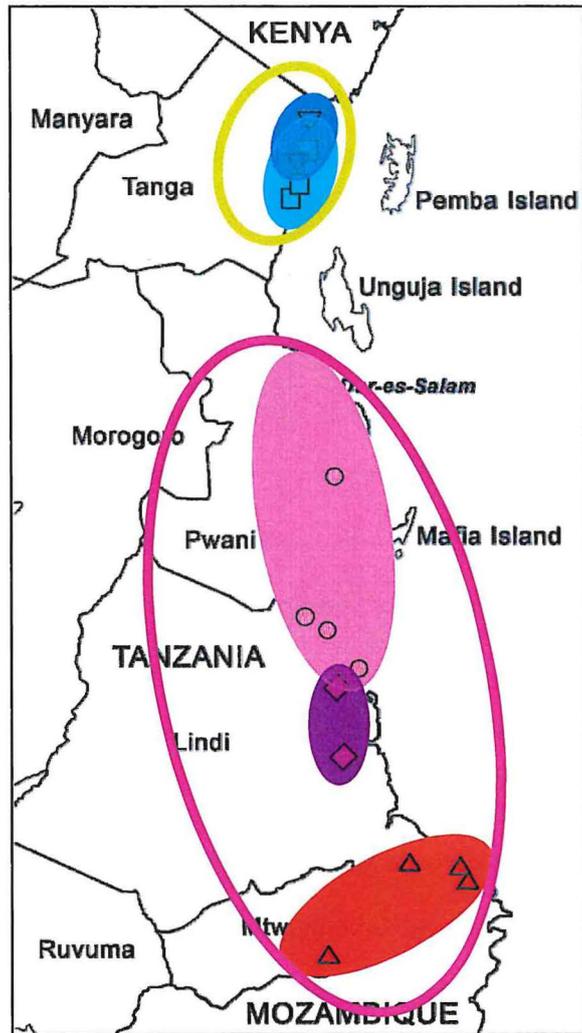


Figure 7 : Distribution des cinq génotypes de l'ADNr 16S des phytoplasmes responsables du JMC du groupe 16SrXXXI (cercles pleins) et des deux sous-groupes différenciés par RFLP de l'ADNr 16S (cercles vides)

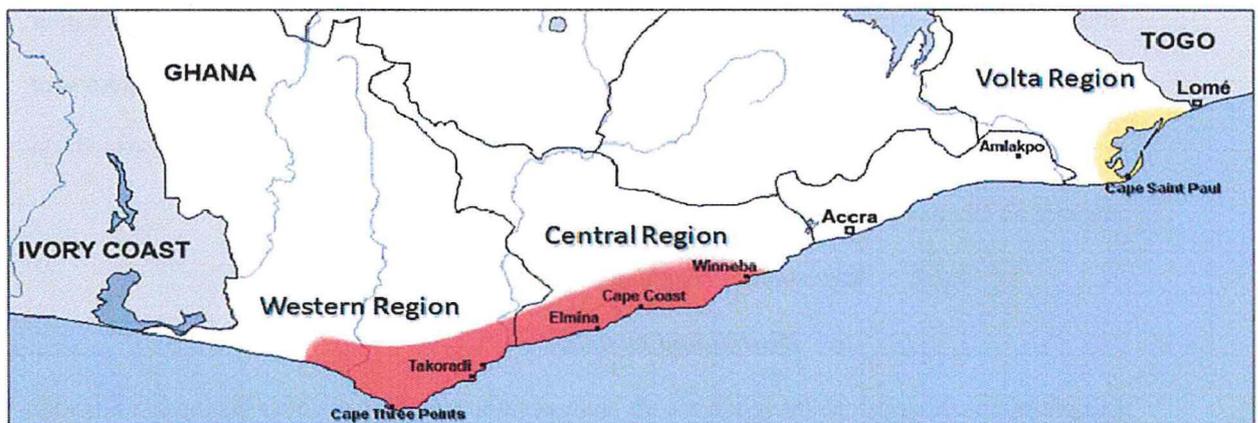


Figure 8 : Distribution des deux foyers du JMC causés par des phytoplasmes du groupe 16SrXXII au Ghana

Yucatán (Mexique) en 1977 et s'est propagée depuis au Belize, au Honduras et au Guatemala (Harrison *et al.*, 1995).

En Afrique de l'est, la maladie a été reportée en Tanzanie au début du XXe siècle, mais elle est aussi présente au Kenya (Mpunami *et al.*, 1999). Mpunami *et al.* (1999) ont aussi détecté la maladie au Mozambique. En Afrique de l'Ouest, des symptômes similaires à la maladie ont été reportés dans les années 1930 au Togo (maladie de Kaincopé), au Cameroun (maladie de Kribi) au Nigeria (maladie d'Awka) et au Ghana (Cape Saint-Paul Wilt disease) (Mpunami *et al.*, 1999 ; Bonnot *et al.*, 2010).

### ***b. Epidémiologie***

L'incidence de la maladie en Tanzanie est assez élevée au sud, où 56 % de cocotiers ont été tués depuis 1965, tandis que dans les régions du nord seulement 8.5 % ont été affectés (Mpunami *et al.*, 1999). Des études sur la variabilité nucléotidique de l'ADN 16S ont montré la présence de 5 génotypes différents formant deux sous-groupes : 16SrXXXI-A au nord et 16SrXXXI-B au centre et au sud correspondant aux deux régions avec une incidence de la maladie différente (Figure 7) (Mpunami *et al.*, 2010 ; Pilet, com perso.).

Au Ghana, la maladie a été identifiée pour la première fois vers 1930 à Cape Saint Paul en Volta Region -située au sud-est du Ghana proche de la frontière Togolaise- d'où le nom de 'Cape Saint-Paul disease wilt' (CSPDW). Dans les années 1950s, la maladie se développe autour des villes de Woe et de Keta, dans la région Volta détruisant l'industrie du cocotier. En 1964, la maladie est détectée à Cape Three Points en Western Region, puis bien plus tard en 1983 à Ayensudo en Central Region. Malgré les programmes de réhabilitation et les coupes d'arbres infectés, la maladie se propage à partir des foyers initiaux. En Western Region les différents foyers ont une incidence et une expansion variables. Environ 20-30% de perte sur 12000 ha plantés ont été répertoriées dans la région. En Central Region, entre 1995 et 1998, de nouveaux foyers apparaissent et la maladie progresse en direction d'Accra. L'incidence est très variable : jusqu'à 70% de pertes sont observées dans cette région. La maladie ayant disparu de Volta Region dans les années 60-70s est réapparu en 1995 mais apparaît moins agressive et plus sporadique qu'en Western-Central Region entraînant de faibles pertes agricoles allant jusqu'à

Tableau 1 : Liste des échantillons étudiés pour le séquençage avec leur date et lieu d'échantillonnage. Les échantillons en vert ont été séquencés pour le 16S et *rp* (sauf l'échantillon \*). Les échantillons en noir ont été séquencés pour tous les gènes sauf GH09-022 pour *imp*

Echantillon	Pays	Région	Lieu	Année	
<b>GH06-GLI*</b>	Ghana	Volta	Glidze	2006	
<b>GH06-TET</b>			Tettevikope		
<b>GH06-WOE</b>			Woe		
<b>GH09-001</b>		Volta	Dzelukope	2009	
<b>GH09-006</b>			Tettevikope		
<b>GH09-015</b>			Woe Light Hse		
<b>GH09-022</b>			Glidze		
<b>GH09-051</b>		Central	Ankamu		
<b>GH09-058</b>			Ayensudo		
<b>GH09-069</b>			Asebu		
<b>GH09-090</b>			Elmina		
<b>GH09-102</b>		Western	Cape Three Points		
<b>GH09-121</b>			Aluku		
<b>GH09-125</b>			Près d'Ampain	2008	
<b>GH09-127</b>			Près d'Ampain	2009	
<b>MZ11-004</b>		Mozambique	Zambezie	Gobone	2011
<b>MZ11-011</b>				Zalale	
<b>TZ08-001</b>	Tanzanie	Mtwara	Mnawene	2008	
<b>TZ08-016</b>		Tanga	Kisimatiu		

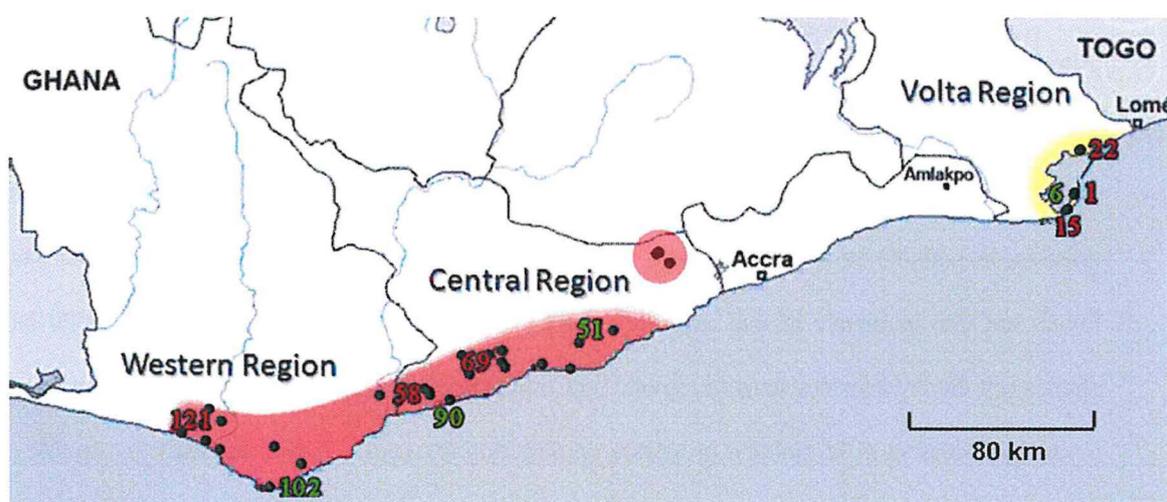


Figure 9 : Carte de l'échantillonnage réalisé sur des cocotiers de la côte Ghanéenne selon les deux foyers de la maladie (un nouveau foyer apparaît à l'est de la Central Region). Les échantillons en vert ont été séquencés pour l'opéron 16S et *rp*. Les échantillons en rouge ont été séquencés pour l'opéron 16S, *rp*, *secY*, *imp* (sauf pour GH09-022) et *secA*. Les autres échantillons non numérotés ont été utilisés pour la RFLP sur *rp*

2% (Nkansah-Poku *et al.*, 2009). Deux grands foyers de la maladie sont donc observables à l'échelle du pays : un foyer en Volta région et un autre en Western-Central Region. Ces deux foyers sont séparés par une zone de près de 160 km, incluant la capitale Accra (Figure 8).

L'étude de la variabilité génétique des isolats des phytoplasmes responsable du JMC au Ghana peut apporter des informations sur ces différences épidémiologiques entre la Volta Region et les Western et Central Regions.

L'objet de ce stage de recherche de Master 2 était dans un premier temps d'identifier les gènes les plus pertinents et discriminants pour étudier la variabilité des isolats de phytoplasmes responsables du JMC en Afrique. Dans un second temps, il s'agissait de vérifier l'hypothèse selon laquelle il y a effectivement une distinction génétique des isolats de phytoplasmes présents en Volta Region et ceux de Western Region et de Central Region.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Echantillons**

L'analyse prospective de la variabilité nucléotidique des différents gènes a été réalisée sur les échantillons d'ADN de la collection du CIRAD.

Les séquences *rp* ont été obtenues pour 14 isolats : 6 de Volta Region dont 2 de 2006 et 4 de 2009, 3 de Central Region de 2009 et 5 de Western Region dont 1 de 2008 et 4 de 2009. Ces échantillons ont tous été séquencés pour l'opéron ribosomal 16S ainsi qu'un autre échantillon de 2006 de Volta Region. Pour étudier la variabilité des séquences *secY*, *secA* et *imp*, 6 échantillons de 2009, provenant de Volta Region (3), de Central Region (2) et de Western Region (1) ont été sélectionnés. Deux échantillons du Mozambique échantillonnés en 2011 et 2 échantillons de Tanzanie échantillonnés en 2008 ont été intégrés à l'étude des 5 gènes. Les détails de chaque échantillon sont listés dans le Tableau 1.

L'analyse RFLP a été réalisée sur 79 échantillons Ghanéens de 2009 répartis dans la Volta Region, la Central Region et la Western Region (Figure 9). Les échantillons proviennent de



Tableau 2 : Liste des amorces utilisées au cours de cette étude

Région concernée	Nom	Séquence 5'-3'	Source
ADNr 16S	P1	AAGAGTTTGCCTGGCTCAGGATT	Deng & Hiruki, 1991
	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	Smart <i>et al.</i> , 1996
<i>rpsS-rplV</i>	rpLYF1	TTTAAAGAAGGTATTAACATGA	Marinho <i>et al.</i> , 2006
	rpLYR1	TAATACCTATAACTCCGTG	
<i>secY-map</i>	rplO	AAGGRCAATTAGCACGTTC	Pilet, Travaux non publiés
	secY2-f	GGCAAGAACAAGGAGAAAGAGG	
	Map2-r	CAATACTAACCACATCACCTAA	
	rpmJ3r	CTTTWCGACGWACAATRATATC	
<i>secA</i>	secAfor1	GARATGAAAAGTGGGAAGG	Hodgett <i>et al.</i> , 2008
	secAfor2	GAYGARGSWAGAACKCCT	
	secArev3	GTTTTRGCAGTTCCTGTCATNCC	
	secALYF	GAGATGTGAAAAGTGGGAAGGTAA	Cette étude
	secALYR	GTTTTRGCAGTTCCTGTCATBCC	
<i>imp</i>	imp-r	AYGAAAGACATCGTCATCG	Pilet, Travaux non publiés
	preDNAD-f	GCYATTTATTTAGATTTAGGYT	

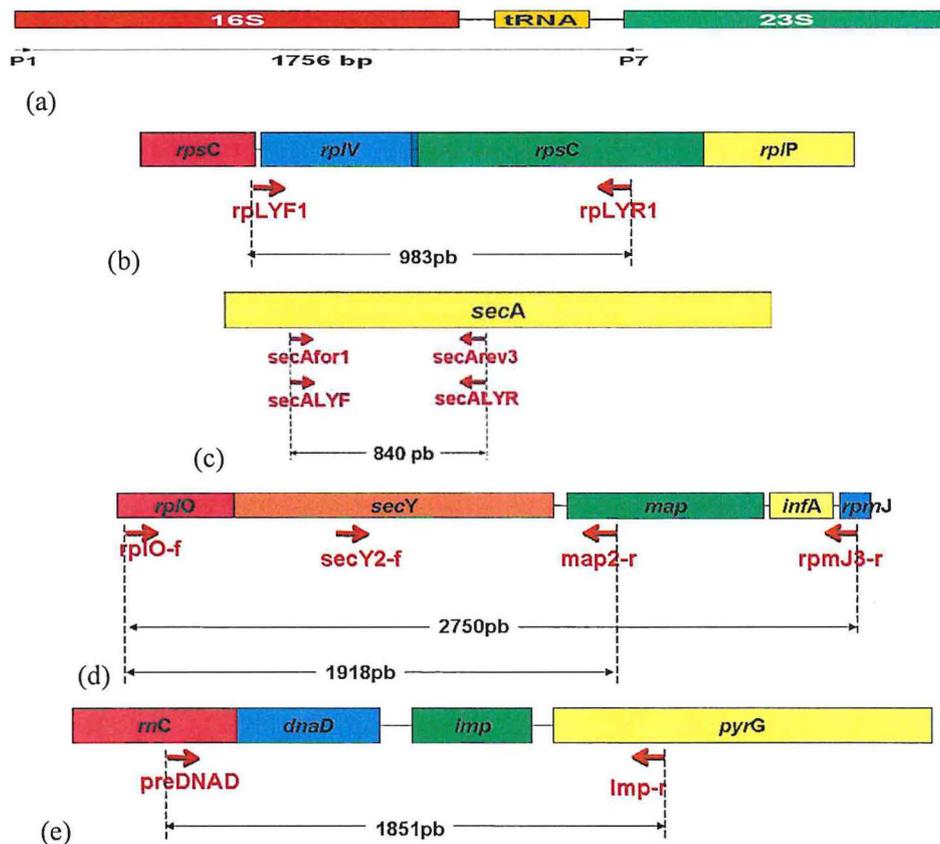


Figure 10 : Schémas des fragments amplifiés (a) de l'opéron 16S, (b) de *rplV* et *rpsC* (Marinho *et al.*, 2006), (c) de *secA* amplifiée (Hodgett *et al.*, 2008), (d) de *rplO*, *secY* et *map*, (e) de *rnC*, *dnaD*, *imp* et *pyrG*.

**Tableau 3 : Quantité en  $\mu\text{L}$  des réactifs contenus dans les mélanges PCR pour l'amplification des séquences 16S, *rp*, *secY-map*, *imp* et *secA***

Mélanges PCR (x1)	16S	RP	SEY-MAP	IMP	SECA
Coralload®	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub>	0	1	0	0	0
Solution Q	0	0	5	0	0
dNTPs	0,5	0,5	0,75	0,5	0,5
Amorce 1	1	1	2	2	2
Amorce 2	1	1	2	2	2
Taq polymerase	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H <sub>2</sub> O	18,75	16,75	10,5	15,75	15,75

**Tableau 4 : Programmes PCR pour l'amplification des séquences 16S, *rp*, *secY-map*, *imp* et *secA***

16S	RP	SECY-MAP	IMP	SECA
94°C 1'30	94°C 5'	94°C 1'30	94°C 1'30	94 °C 2'
94°C 30" } X35	94 °C 30" } X35			
56°C 50" } X35	50°C 1' } X35	50°C 50" } X35	52°C 50" } X35	53 °C 1' } X35
72°C 1'30	72°C 2'	68°C 3'50	72°C 2'	72 °C 1'30
72°C 10'	72°C 7'	72°C 10'	72°C 10'	72 °C 15'

cocotiers Ghanéens infectés par des phytoplasmes responsables du JMC. L'échantillonnage a été réalisé en 2009 par Robert Quaioco (Oil Palm Research Institute, Ghana)

## **2.2. Amplification par PCR**

### **2.2.1. Définition des amorces.**

Les séquences des amorces utilisées dans cette étude sont détaillées dans le Tableau 2. L'amplification de l'opéron ribosomal 16S a été réalisée avec les amorces P1 (Deng & Hiruki, 1991) et P7 (Smart *et al.*, 1996) (Figure 10a). L'amplification des gènes *rpIV* et *rpsC* a été réalisée avec les amorces rpLYF1-rpLYR1 (Almeida Marinho *et al.*, 2006) (Figure 10b). Le gène *secA* a d'abord été amplifié avec les amorces d'Hodgetts *et al.*, (2008) puis avec de nouvelles amorces plus spécifiques définies durant le stage (secALYF/secALYR) (Figure 10c). Les amorces et les conditions de PCR pour l'amplification des gènes *secY-map* et *imp* ont été optimisées par Fabian Pilet (Figures 10d et 10e).

### **2.2.2. Conditions de PCR**

Les PCR ont été réalisées dans un volume final de 25µL à l'aide du *Taq* PCR Core Kit (Qiagen). Pour chaque PCR, un témoin négatif (H<sub>2</sub>O UP) et un témoin positif ont été inclus. Les mélanges PCR et les programmes PCR sont précisés dans les Tableaux 3 et 4. La vérification de la PCR a été réalisée par migration des produits sur gel d'agarose à 0,8% contenant 5µL de Gelred®. Entre 2,5 et 10 µL de produits ont été déposés selon l'efficacité attendue de la PCR, et la migration a été réalisée dans du TAE 1x (Tris, Acétate, EDTA) sous 120V durant 45 min à 1h30 selon les tailles de bandes amplifiées.

## **2.3. Clonage**

Le séquençage direct a été privilégié mais les produits PCR montrant une faible amplification ou présentant plusieurs bandes sur gel ont été clonés.

### **2.3.1. Ligation.**

Le kit pGEM-T vector system I (Promega) a été utilisé. Cinq µL de 2x Rapid Ligation Buffer, 1µL de vecteur pGEM-T, 1µL de T4 DNA ligase ont été ajoutés à 3µL de produit PCR. L'incubation a été réalisée au minimum 1h à température ambiante.

Tableau 5 : Quantité de produits en  $\mu\text{L}$  dans  $10\mu\text{L}$  pour la restriction par *Bst*ZI de produits clonés

	x1
Buffer RE 10X	2
BSA 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	0,2
<i>Bst</i> ZI 10U/ $\mu\text{L}$	0,5
H2O QSP	14,3
Produit PCR	3

### **2.3.2. Transformation.**

Deux microlitres des produits de chaque ligation ont été ajoutés avec précaution dans un tube de cellules compétentes *E.coli* Top 10 (Invitrogen) préalablement décongelées dans la glace. Les tubes ont été incubés pendant 15min dans la glace puis les cellules ont subi un choc thermique de 30s à 42°C sans agitation. Les tubes ont été à nouveau placés dans la glace pendant 2min. Puis 250µL de milieux SOC ont été ajoutés. Les tubes ont été agités pendant 1h à 37°C, 220rpm. Puis, 50µL et 75µL des cultures de cellules transformées ont été étalés sur des boîtes sélectives LB agar-Ampicilline 1%-Xgal (32µL à 50mg/mL étalés) et les boîtes ont été incubées à 37°C pour la nuit.

### **2.3.3. Repiquage et culture des colonies transformées**

**Repiquage et PCR sur colonies.** Huit colonies transformées ont été repiquées. Les colonies ont été prélevées avec un cure-dent et striées sur un milieu LB agar-Ampicilline 1%. Le cure-dent a été immergé dans des tubes PCR contenant 10µL d'eau UP. La PCR sur colonies a été réalisée en ajoutant 15µL de mix PCR adéquat.

**Réensemencement en milieu LB liquide.** Après confirmation par PCR, les colonies ayant intégré le plasmide avec le bon fragment ont étéensemencées dans du milieu liquide LB-Ampicilline 1% (5mL) et incubées pendant 24h à 37°C, 220rpm.

### **2.3.4. Purification de produits clonés et vérification**

Les fragments clonés ont été purifiés à l'aide du kit Qiaprep mini kit (Qiagen) suivant les instructions du fabricant (Annexe 1).

La vérification finale de la présence du bon insert a été faite par restriction grâce à l'enzyme *Bst*ZI (Tableau 5). La restriction a été effectuée à 50°C pendant au minimum 1h puis les produits ont été déposés sur gel d'Agarose à 0,8% avec 5µL de Gelred® et ont migré sous 120V dans du TAE 1x durant environ 1h.

## **2.4. Séquençage**

Le séquençage a été effectué par Beckman Coulter Genomics. La préparation et l'envoi des produits à séquencer et des amorces ont été réalisés selon leurs recommandations (Annexe 2). Les produits PCR de moins de 850 pb ont été séquencés en une fois, les produits PCR compris



entre 900 et 2000 pb ont été séquencés en deux fois (amorces sens et anti-sens) et les produits PCR compris entre 2000 et 3000 pb ont été séquencés en trois fois après définition d'une amorce interne. Un total de 122 séquences a été réalisé.

## **2.5. Alignement de séquences**

Les séquences ont été vérifiées manuellement à l'aide des chromatogrammes et les séquences d'un même fragment d'ADN ont été assemblées en une séquence consensus ou contig grâce à l'outil 'CAPCONTIG' du logiciel *Bioedit* version 7.0.5.3. Les alignements de séquences ont été réalisés grâce à l'outil 'CLUSTAL W' de *Bioedit*.

## **2.6. Analyses phylogénétiques**

Deux approches phylogénétiques différentes ont été conduites pour confirmer la tendance des analyses. Le Neighbour-joining est basée sur le critère d'évolution minimale pour des arbres phylogénétiques, c'est-à-dire que la topologie qui donne la plus petite longueur de branche totale est préférée. Il est apprécié pour sa simplicité et sa rapidité d'exécution. Le Neighbour Joining est implémenté par le modèle Jukes-Cantor (JC). Le nombre de répétitions de bootstrap est de 1000. L'analyse par NJ-JC a été réalisée avec *MEGA 5.05*.

Cette méthode a été beaucoup testée et génère des arbres généralement très proches de l'arbre optimal. Néanmoins, elle a été largement remplacée en phylogénie par des méthodes de phylogénie probabilistes qui sont plus fiables.

L'inférence bayésienne est une approche statistique basée sur la probabilité de vraisemblance et la probabilité de distribution des arbres. Les arbres phylogénétiques par inférence bayésienne dans cette étude ont été générés par le logiciel *MrBayes*. Le modèle d'approximation bayésien utilisé est MCMCMC (Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo) afin d'obtenir des arbres avec des probabilités postérieures de nœuds les plus proches possibles de 1. La loi gamma modélise l'évolution des nucléotides. Un million de réarrangements ont été exécutés et l'échantillonnage est réalisé tout les 100 arbres. L'allumage du nombre d'arbre est de 1000. L'arbre phylogénétique par inférence bayésienne est visualisé par *Seeview*.

Enfin, une analyse MLSA a été conduite en réalisant les analyses phylogénétiques sur les séquences obtenues assemblées. Les séquences étudiées pour les arbres phylogénétiques ont été

Tableau 6 : Quantité de produits en  $\mu\text{L}$  dans  $20\mu\text{L}$  pour la restriction de produits PCR *rp* par *Tsp45I*, le volume de produits PCR ajouté dépend de l'intensité de la bande du produit sur gel

	x1
Buffer Neb 10x	2
BSA 100x	0,2
<i>Tsp45I</i> 4U/ $\mu\text{L}$	0,25
H2O QSP	9,55-14,55
Produit PCR	3-8

Tableau 7 : Liste des SNPs portés par les séquences génétiques entre les différentes régions

SNPs	16S	<i>rp</i>	<i>imp</i>	<i>secY</i>	<i>secA</i>
Ghana-Tanzanie	118	127	N.D	N.D	128
Ghana-Mozambique	10	32	78	58	26
Volta-Western	0	1	2	1	4
Intra Ghana (6)	0	11	14	9	8
Intra Mozambique (2)	0	0	2	0	1
Intra Tanzanie (2)	6	3	N.D	N.D	8
Taille gène	1692	890	1795	1818	748

Tableau 8 : Distance génétique en pourcentage d'homologie des échantillons Ghana, du Mozambique et de Tanzanie par séquence génétique (intervalles des valeurs)

		Gh(6)	Mz (2)	Tz (2)
Ghana (6)	ADNr 16S	1	0,9946	0,9368-0,9381
	<i>rp</i>	0,9945-0,9989	0,9591-0,9633	0,7765-0,7813
	<i>secA</i>	0,9906-1	0,9571-0,9641	0,7777-0,7808
	<i>secY</i>	0,9966-1	0,9605-0,9641	
	<i>imp</i>	0,9953-0,9988	0,9497-0,9517	
Mozambique (2)	ADNr 16S		1	0,9320-0,9334
	<i>rp</i>		1	0,7696-0,7706
	<i>secA</i>		0,9870	0,7818-0,7832
	<i>secY</i>		0,9955	
	<i>imp</i>		0	
Tanzanie (2)	ADNr 16S			1
	<i>rp</i>			0,9670
	<i>secA</i>			0,9878
	<i>secY</i>			
	<i>imp</i>			

mises bout à bout comme suit : 16S-*rp-secY-secA-imp* pour les 6 échantillons Ghana de 2009 et les 2 échantillons Mozambique de 2011 ainsi que pour *P.mali* comme outgroup.

## **2.7. Profils RFLP**

### **2.7.1. Choix des enzymes de restriction**

Afin d'examiner un grand nombre d'isolats et de confirmer les résultats du séquençage, des enzymes de restriction reconnaissant les SNPs signatures entre les isolats des deux foyers ont été recherchées. Pour ce faire, les séquences ont été traitées par le logiciel *pDRAW32*.

### **2.7.2. Restriction enzymatique**

La restriction a été réalisée sur les amplicons *rp* de 68 échantillons. Selon l'intensité des produits *rpLYF1-rpLYR1*, 4 à 8µL d'ADN ont été digérés dans un volume final de 20µL de mix de digestion (Tableau 6) à 65°C durant 4 à 5h.

La visualisation a été faite sur gel d'Agarose à 2% avec 5µL de Gelred®. Les 20µL de produits de digestion ont été mélangés à 3µL de Coraload® 10x (Qiagen) puis déposés. La migration a été réalisée dans du TAE 1x à 120V pendant 1h30 environ.

## **3. Résultats**

### **3.1. Séquences 16S**

La variabilité de l'opéron 16S sur les 15 échantillons séquencés à partir des produits PCR du Ghana est nulle (100% d'homologie) (Tableaux 7 et 8). Les arbres phylogénétiques par Neighbour Joining et par inférence bayésienne montrent une distinction des échantillons du Mozambique, de Tanzanie et du Ghana (Annexe 3).

Cependant, en intégrant les échantillons clonés à l'analyse, une variabilité peut être observée. Ainsi sur l'arbre phylogénétique en Neighbour Joining, une différenciation des échantillons clonés (notés 'pGH') est visible (Annexe 3). Les produits PCR des échantillons GH09-022 et GH09-051 ont à la fois été séquencés après clonage et séquencés directement. Le séquençage direct confirme une homologie de 100% des deux échantillons aux autres échantillons

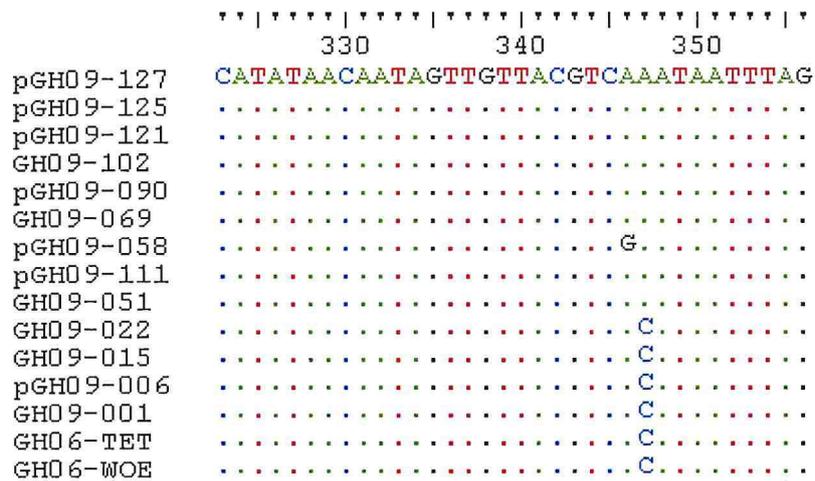


Figure 11: Base signature différenciant la Western Region de la Volta Region sur l'alignement de séquences *rp*

séquencés pour l'ADNr 16S. Trois nucléotides de pGH09-051 diffèrent de GH09-051 sur 1672 pb, et 1 nucléotide de pGH09-022 diffère de GH09-022 sur 1515 pb.

L'homologie Ghana/Mozambique pour l'opéron 16S est de 0,9946 alors que l'homologie entre les séquences du Ghana et de Tanzanie est comprise entre 0,9368 et 0,9381, et entre 0,9320 et 0,9334 pour les séquences des échantillons du Mozambique et de Tanzanie (Tableau 8).

### **3.2. Séquence *rp***

#### ***a. Analyse de séquences***

Les gènes *rpIV* et *rpsC* présentent une plus forte variabilité que l'ADNr 16S entre les isolats Ghanéens, Mozambicains et Tanzaniens. Les séquences *rp* entre les isolats du Mozambique et du Ghana présentent 35 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) sur 930 pb contre 10 SNPs pour 1692 pb pour l'ADNr 16S ce qui induit une homologie des isolats de 0,9591 à 0,9633. De même pour la variabilité entre les isolats du Ghana et ceux de Tanzanie, la variabilité sur les 890 pb de *rp* étudiés est de 128 SNPs, contre 118 SNPs sur 1692 pb pour l'ADNr 16S soit une homologie de 0,7765 à 0,7813. L'homologie entre les isolats du Mozambique et de Tanzanie est de 0,7696 à 0,7706 (Tableaux 7 et 8). La variabilité de l'ensemble des isolats Ghanéens clonés et non clonés est de 8 SNPs dont un SNP signature à 341 pb (Figure 11) qui permet de différencier les phytoplasmes de la Volta Region de ceux de la Western et de la Central Region. Cependant, l'homologie entre les séquences des échantillons non clonés de Western et de Central Region (soit GH09-051, GH09-069 et GH09-102) est de 100% de même qu'entre les échantillons non clonés de Volta Region (GH09-001, GH09-015, GH09-022, GH06-TET, GH06-WOE).

Les arbres phylogénétiques par Neighbour Joining et par inférence bayésienne ont la même tendance (Annexes 4 et 5). La séparation des isolats de Volta Region et ceux de Central et Western Region est visible avec une valeur de bootstrap de 62% pour le Neighbour Joining et une probabilité de nœud de 0,50 par inférence bayésienne.

#### ***b. Analyse de restriction***

Une enzyme de restriction, *Tsp45I*, reconnaît le site signature de la séquence *rp* chez les phytoplasmes de la Volta Region. Les RFLP *in silico* générées pour les séquences *rp* avec



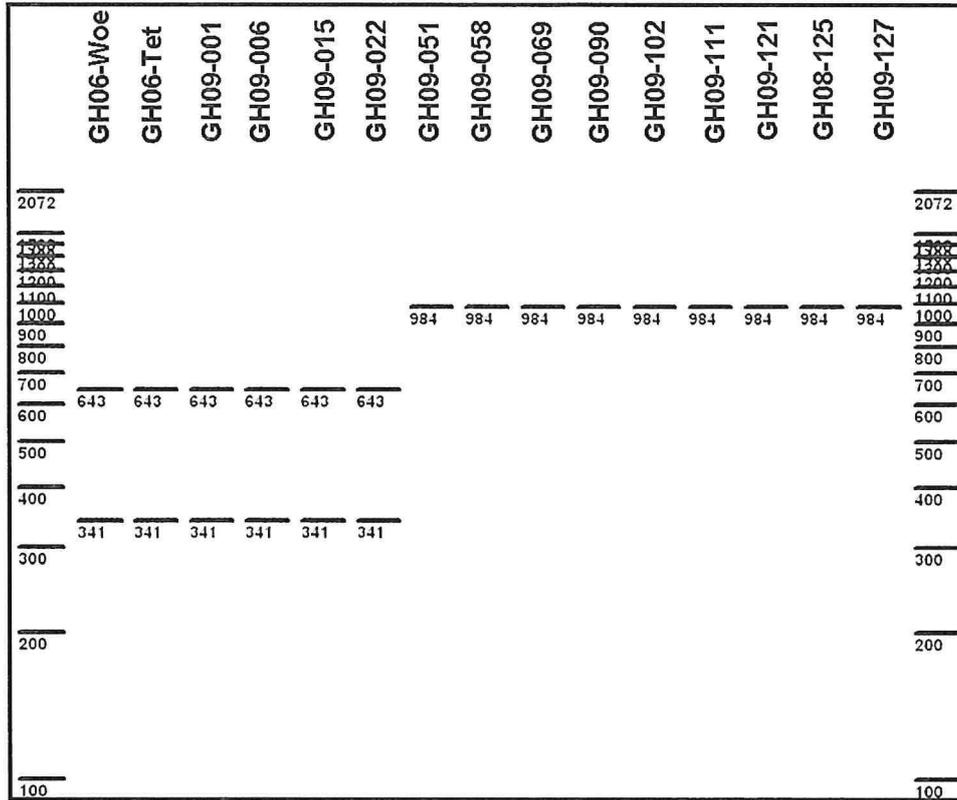


Figure 12 : Gel virtuel des produits de restriction *Tsp45I* des échantillons séquencés de Western et de Volta Region. Paramètres pDRAW32 : Gel d'agarose à 2% et ladder 100pb Invitrogen

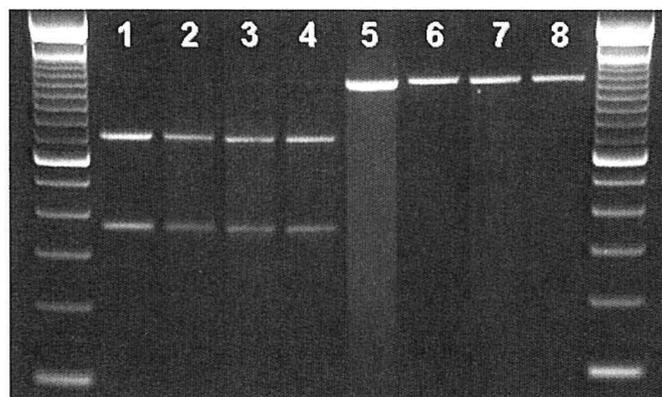


Figure 13 : Gel des produits de restriction *Tsp45I* des échantillons de Volta Region : 1.GH09-001, 2.GH09-002, 3.GH09-007, 4.GH09-019 et échantillons de Western Region : 5.GH09-118, 6.GH09-067, 7.GH09-068, 8. GH09-071. Gel à 2% d'agarose et ladder 100pb (Invitrogen)



l'enzyme d'intérêt sont présentées en Figure 12. Les 6 échantillons Volta présentent une bande à 341 pb et une bande à 643 pb tandis que les 9 échantillons de Western et de Central Region présentent une bande unique à 983 pb.

Pour confirmer ce résultat, des analyses par RFLP ont été entreprises sur les produits PCR *rp* de 68 échantillons du Ghana. De la même façon que pour les résultats *in silico*, les échantillons de Western et de Central Region (55) se différencient des échantillons de Volta Region (13) (exemple en Figure 13).

### 3.3. Séquence *secY-map*

#### a. Analyse de séquences

Les amorces n'ont pas pu amplifier la séquence *secY* pour les échantillons de Tanzanie. Les isolats du Ghana et du Mozambique diffèrent de 58 SNPs et ont une homologie de séquence comprise entre 0,9605 et 0,9641 (Tableaux 7 et 8). Les séquences Ghana montrent la présence d'une base signature entre les isolats de la Volta Region et ceux de la Western et de la Central Region sur un total de 1818 pb lisibles (Figure 14). La variabilité intra-Ghanéenne parmi les 6 isolats est de 8 SNPs. Sur les 7 SNPs détectés en intra-Ghana, 6 sont portées par les deux seuls fragments clonés pour *secY*: 3 sont portés par la séquence pGH09-015 et 3 sont portés par la séquence pGH09-058. Les séquences GH09-001 et GH09-022 de Volta Region présentent une homologie de 100% entre elles. De même, les isolats de Western Region et de Central Region, GH09-069 et GH09-121, sont identiques.

Les arbres phylogénétiques montrent une séparation des échantillons de Volta Region et de Western-Central Region avec une valeur de bootstrap de 62% en Neighbour Joining et une probabilité de nœud de 0,97 en inférence bayésienne illustrés en Annexes 6 et 7.

#### b. Analyse de restriction

Plusieurs enzymes de restriction sont capables de reconnaître le site 3'-CATG-5' différenciant les échantillons de la Western et de la Central Region de ceux de la Volta Region: *FatI*, *CviAII* et *NlaIII* (Figure 15). Les analyses RFLP *in silico* montrent que les enzymes coupent 3 fois les séquences Volta et 4 fois les séquences Western-Central. Le site de restriction unique à la

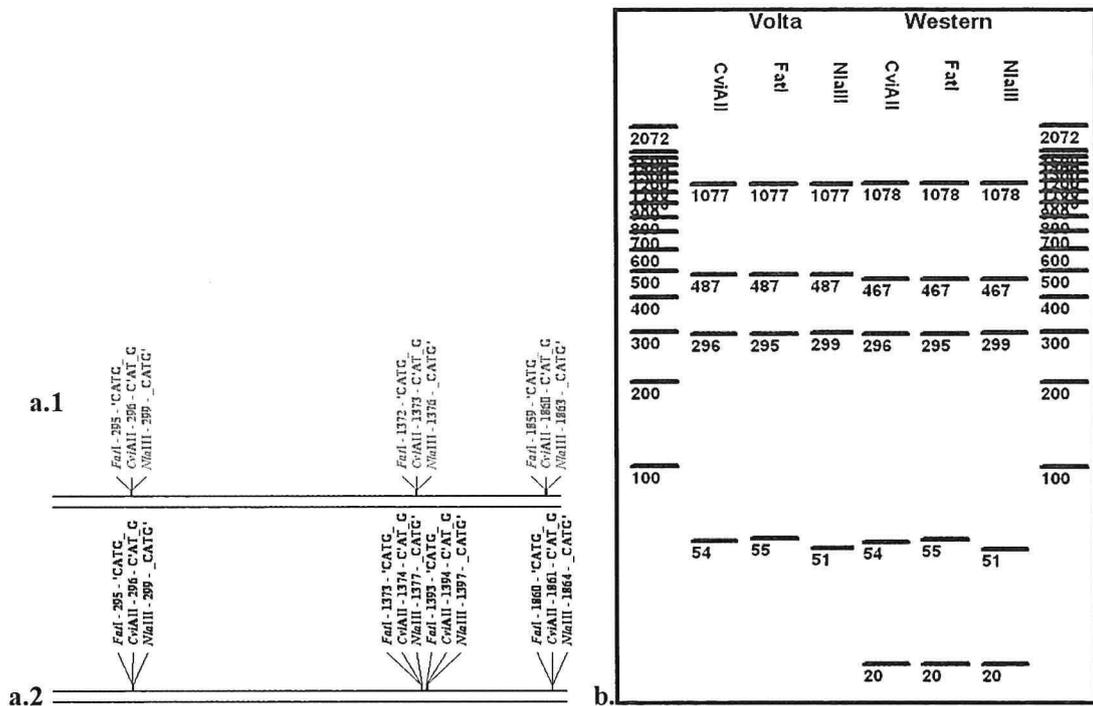


Figure 16 : (a) Schéma des sites de restriction pour la Volta Region (a1) et pour la Western Region (a2) (b) Gel virtuel des produits de restriction par *FatI*, *CviAII* et *NlaIII* des échantillons de Western et de Volta Region. Paramètres pDRAW32 : Gel d'agarose à 2% et ladder 100pb Invitrogen

Western-Central Region est distant de 20 pb d'un autre site de restriction et les profils RFLP sont difficilement différenciables (Figure 16).

Des difficultés d'amplification de *map* dues à l'amorces rpmJ-r n'ont pas permis d'étudier la variabilité de ce gène pour les échantillons Ghana de 2009. Seule la dernière amorce définie (rpmJ3-r) a permis une amplification correcte. Un échantillon de Volta Region (GH09-001) et un échantillon de Western Region (GH09-069) de 2009 ont été séquencés en direct et il apparaît qu'ils ont deux nucléotides différents sur environ 900 pb.

### 3.4. Séquence *secA*

Hodgetts *et al.*, (2008) ont utilisé les amorces secAfor1/secArev3 puis secAfor2/secArev3 en semi-nested PCR pour étudier des fragments de 420 pb. Afin de réduire les risques d'erreurs dues aux nested PCR et afin de maximiser la taille de la séquence à étudier, les amplicons secAfor1/secArev3 ont été étudiés. Cependant, la PCR secAfor1/secArev3 seule n'est pas assez spécifique puisque deux bandes sont générées : une à 840 pb et une deuxième à ~500 pb. Pour étudier la bonne séquence, la bande de 840 pb a été clonée. Ainsi, pGH09-001, pGH09-015, pGH09-069 et pGH09-121 ont été séquencées ainsi que pMZ11-004 et pTZ08-001. Les séquences ont été étudiées par l'outil BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) et seule la séquence pGH09-069 n'est similaire à aucune séquence de la base de données NCBI. De nouvelles amorces plus spécifiques ont donc été dessinées : secALYF et secALYR (Figure 10c). GH09-069 ainsi que les échantillons GH09-022, GH09-058, MZ11-011 et TZ08-016 ont été séquencés en direct avec ces nouvelles amorces.

Les 750 pb analysés pour *secA* ne permettent pas de différencier les échantillons de Volta Region de ceux de Western et de Central Region. La variabilité des isolats Ghanéens est de 8 SNP sur 748 pb. Les SNPs sont portés par les échantillons clonés. En effet, les échantillons non-clonés soit GH09-022, GH09-058 et GH09-069 montrent une homologie de 100% entre eux.

La proximité génétique des isolats Ghanéens avec les isolats Tanzaniens est de 0,7777-0,7808 et de 0,7818-0,7832 des isolats Ghanéens avec les isolats Mozambicains (Tableau 8). Par conséquent, la distinction des échantillons du Ghana et du Mozambique avec ceux de Tanzanie est assez claire en Neighbour Joining ou en inférence bayésienne (Annexe 8 et 9).



Les échantillons du Mozambique ont une proximité génétique de ceux du Ghana comprise entre 0,9571 et 0,9641.

### **3.5. Séquence *imp***

#### ***a. Analyse de séquences***

La séquence *imp* n'a pas pu être amplifiée pour les échantillons Tanzaniens et l'échantillon GH09-022. Le clonage s'est révélé nécessaire pour la plupart des échantillons car ils présentaient une double bande interférente à environ 1350 pb. Ainsi pGH09-001, pGH09-069 et pGH09-121 ont été clonés puis séquencés. GH09-015 et GH09-058 ont été séquencés en direct.

L'alignement des séquences met en évidence une variabilité de 14 SNPs entre les échantillons Ghana (sur 5 échantillons) et 2 SNPs en intra-Mozambique (sur deux échantillons) sur 1795 pb analysés. Les échantillons Ghana et Mozambique diffèrent par 78 SNPs sur les 1795 pb analysés et montre une proximité génétique comprise entre 0,9497 et 0,9517 (Tableau 8). Aussi, il y a deux SNPs signatures entre les échantillons de Volta Region et ceux de Western et Central Region (Figure 17 et Tableau 7).

Les arbres phylogénétiques montrent une séparation des échantillons de Volta Region des échantillons Western-Central Region avec une valeur de bootstrap de nœud de 84 pour le Neighbour Joining et une valeur de probabilité a posteriori de nœud de 0,90 en inférence bayésienne (Annexes 10 et 11).

Sur les 14 SNPs intra-Ghana, 12 sont portés par les 4 échantillons clonés et 2 SNPs correspondent à des bases signatures différenciant Volta des Western et Central Regions. Etant donné qu'il y a seulement un échantillon par foyer qui a été séquencé en direct, GH09-015 pour la Volta Region et GH09-058 pour la Western-Central Region, l'étude de l'homologie des échantillons séquencés en direct n'est pas possible. Cependant, GH09-015 a une homologie plus forte avec GH09-058 (99,89%) qu'avec pGH09-069 (99,66%) par exemple.

#### ***b. Analyse de restriction***

Sur les séquences *imp*, le premier SNP signature est situé à 1350 pb et n'est reconnu par aucune enzyme commerciale. Le deuxième est situé à 1671 pb et le site 3'-TGCA-5' des séquences de la Western et de la Central Region est reconnu par l'enzyme *Hpy*CH4V contrairement au site de



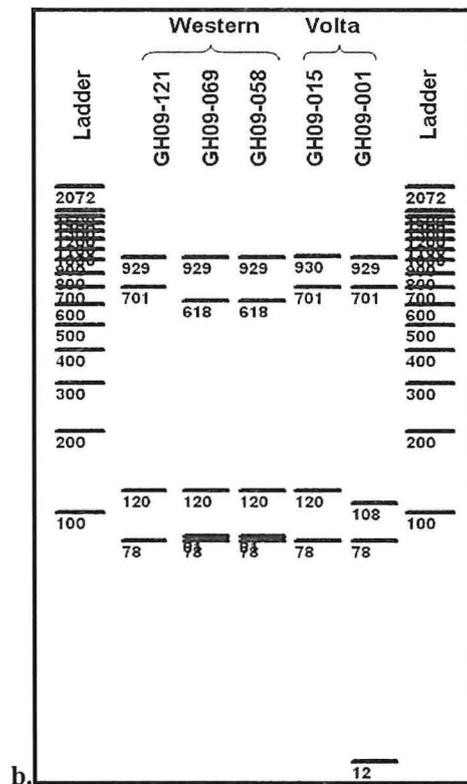
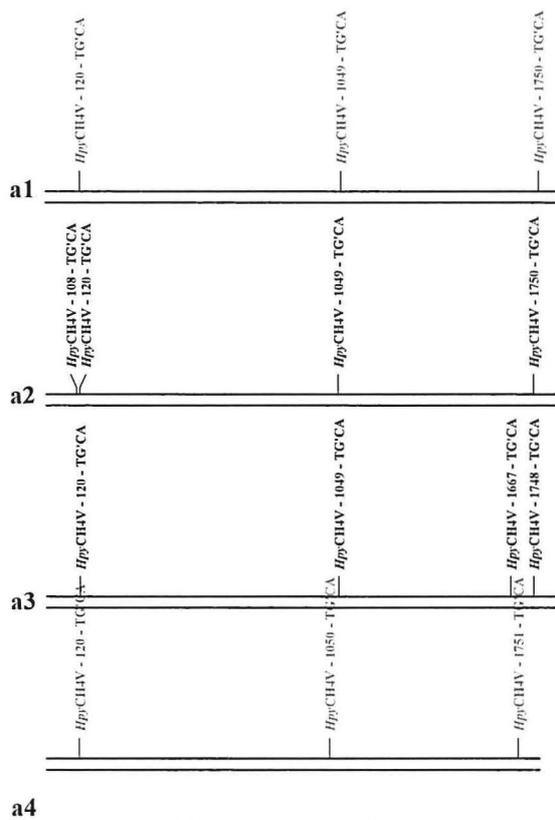
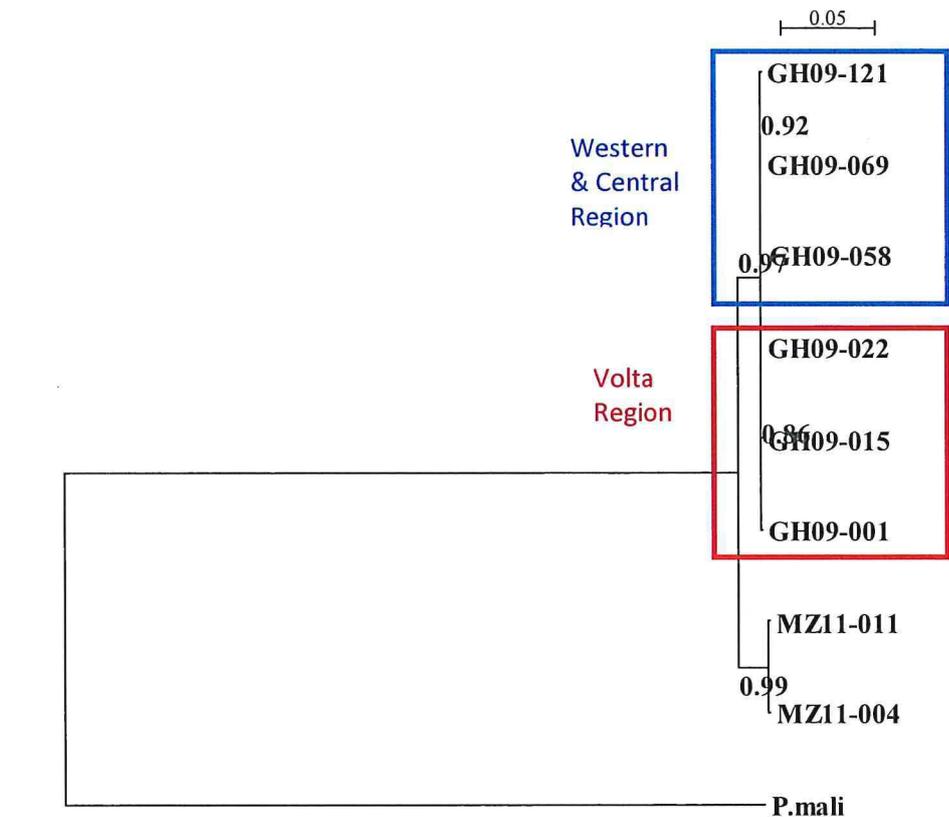
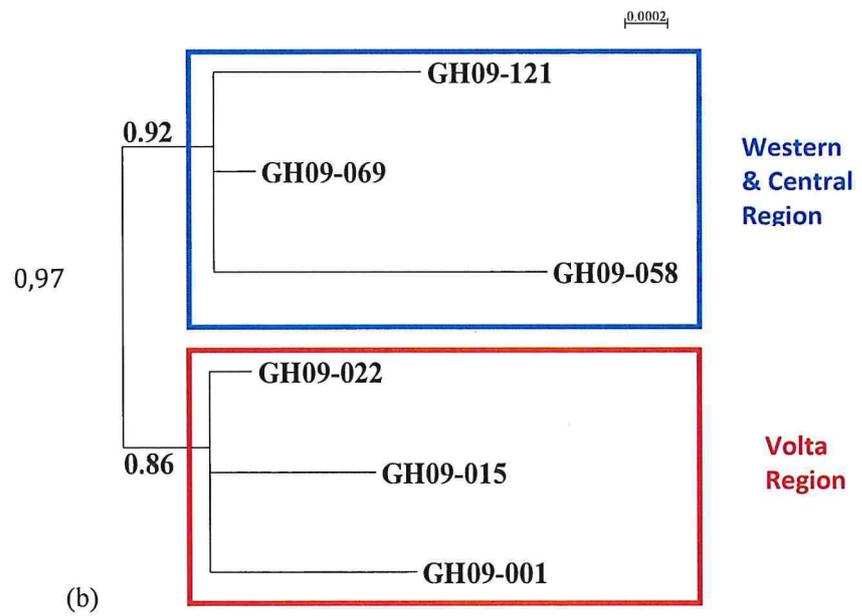


Figure 18 : (a) Schéma des sites de restriction de *HpyCH4V* sur *imp* pour la Volta Region : a1. GH09-015 et a2. GH09-001 et pour la Western Region : a3. GH09-069 & GH09-058 et a4. GH09-121 (b) Gel virtuel des produits de restriction par *HpyCH4V* des échantillons de Western et de Volta Region. Paramètres pDRAW32 : Gel d'agarose à 2% et ladder 100pb Invitrogen



(a)



(b)

Figure 19 : Arbre phylogénétique sur MLSA (16S, *rp*, *secY*, *secA*) par inférence bayésienne (a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup (b) Sous arbre zoomé sur les échantillons du Ghana

la Volta Region (3'-CGCA-5'). Les analyses RFLP virtuelles par pDRAW montrent que la variabilité intra régionale induit des profils différents selon les échantillons. Les profils de restriction des produits des échantillons GH09-001 et GH09-015 diffèrent entre eux de même que le profil de GH09-121 diffère de ceux de GH09-058 et de GH09-069. De plus, le site de restriction unique à la Western-Central Region génère une bande de 81 pb qui se confond avec une bande à 78 pb (Figure 18).

### 3.6. Multiple loci sequence analysis (MLSA)

Une analyse intégrant toutes les séquences étudiées a été réalisée. Les arbres générés sont plus robustes. En effet, à la fois en Neighbors Joining et par inférence bayésienne, les valeurs de bootstrap ou de probabilité à posteriori des nœuds sont plus élevées.

Une première MLSA est réalisée pour les 6 échantillons de Ghana et les deux du Mozambique de 2011 en intégrant les séquences 16S-*rp-secY-secA* à la suite et une deuxième analyse est réalisée sans l'échantillon GH09-022 (pour lequel *imp* n'a pas été amplifié) en intégrant les séquences 16S-*rp-secY-secA-imp*.

Pour la première analyse la valeur de bootstrap du nœud séparant la Western-Central Region de la Volta région en Joining est de 100% (Annexe 12). En inférence bayésienne, la probabilité du nœud est de 0,97 (Figure 19).

Pour la deuxième analyse, en Neighbour Joining, la valeur de bootstrap du nœud ségrégant les échantillons de Volta de ceux de Western-Central Region est de 100%. En analyse bayésienne, la valeur de probabilité de nœud est de 0,75 (Annexes 13 et 14).

## 4. Discussion

L'analyse de l'opéron 16S n'a pas permis de différencier les phytoplasmes responsables du JMC échantillonnés au Ghana en 2009. En revanche, les valeurs d'homologie de l'opéron 16S entre les isolats Ghanéens, Mozambicains et Tanzaniens concordent avec les phylogénies connues et vont dans le sens de l'appartenance des échantillons Tanzaniens à un autre groupe (Hodgetts *et al.*, 2008). Le gène *secA* qui montre pourtant une variabilité inter-spécifique plus

élevée que l'ADNr 16s chez les phytoplasmes (Hodgetts *et al.*, 2008) ne révèle pas de variabilité intra-spécifique intéressante parmi les phytoplasmes responsables du JMC au Ghana. Ce gène s'avère très intéressant pour différencier les isolats de phytoplasmes du Ghana, du Mozambique et de Tanzanie. Par comparaison avec les valeurs d'Hodgetts *et al.* (2008), l'étude en Neighbour Joining montre une distinction plus manifeste entre les isolats du Ghana et ceux de Tanzanie. Bien que l'échelle des branches soit comparable entre les deux études, l'arbre publié par Hodgetts *et al.* (2008) montre une valeur de bootstrap du nœud séparant Tanzanie et Ghana de 71% alors que l'étude présente montre une valeur de bootstrap plus élevée. Cependant, notre étude a inclus plus d'échantillons (6 du Ghana et 2 de Tanzanie) que celle d'Hodgetts *et al.* (2008) qui n'avait pris qu'un seul échantillon par *Ca. Phytoplasma* africain. De plus le fragment amplifié pour *secA* dans notre étude est de 840 pb alors qu'Hodgetts *et al.* (2008) n'ont étudiés que 420 pb après clonage des produits issus de semi-nested PCR.

Les gènes ribosomiaux *rplV* et *rpsC* s'avèrent être de bons marqueurs pour différencier les isolats de la Volta Region des isolats de la Western et de la Central Region. Bien que dans l'analyse phylogénétique la séparation des phytoplasmes de Volta Region et de Western Region et Central Region est peu mise en évidence car la robustesse du nœud est assez faible (Annexes 4 et 5), le SNP signature des isolats de Volta Region est facilement reconnaissable par l'enzyme *Tsp45I* et génère deux profils RFLP associés aux isolats des deux foyers qui se différencient distinctement.

Contrairement à d'autres études au niveau régional chez des phytoplasmes du sous-groupe 16SrV-A (Jović *et al.*, 2010), *secY* est très conservé chez des isolats du Ghana. Sur 1818 pb analysées seulement un SNP signature Volta/Western-Central a été détecté. La séquence *imp* est un peu plus discriminante.

Le marqueur *imp* est intéressant pour différencier les isolats du Ghana et ceux du Mozambique. En effet, c'est avec cette séquence que l'homologie entre les deux populations de phytoplasmes est la plus faible (Tableau 8). Ces deux populations appartiennent d'ores et déjà à deux sous-groupes 16SrXXII-A et 16SrXXII-B respectivement (Pilet, com pers.). Parmi les trois

séquences génétiques obtenues pour les échantillons Tanzaniens, *rp* s'avère le plus discriminant en confrontant les isolats Tanzaniens avec les isolats Ghanéens et Mozambicains.

Pour le gène *map*, plus de recherche doit être effectuée pour voir si le SNP qui différencie la Volta Region de la Central Region se confirme pour les autres échantillons. Cette piste n'a pas été approfondie par manque de temps et parce qu'elle ne s'avérait pas indispensable étant donné la possession de nombreuses séquences.

Les gènes *secY* et *imp* n'ont pas été amplifiés avec succès pour les isolats Tanzaniens. Cela peut être dû au fait que les phytoplasmes du Mozambique et du Ghana appartiennent à l'espèce *Candidatus Phytoplasma cocosnigeriae*, alors que ceux de Tanzanie sont des *Candidatus Phytoplasma cocostanzaniae*. Bien qu'ils soient géographiquement proches, les phytoplasmes de Tanzanie et du Mozambique sont des *Candidatus* différents.

L'échantillonnage a été effectué le long de la côte, ce qui représente près de 450km. Les cocotiers échantillonnés en Volta Region et ceux échantillonnés en Western et en Central Region sont séparés d'approximativement 160km par la Greater Accra Region et une barrière naturelle, la rivière Volta. Il se peut que les populations de phytoplasmes responsables du JMC aient divergé génétiquement rejoignant ainsi la théorie évolutive des îles où des isolats séparés géographiquement se différencient avec le temps par dérive génétique. Ainsi, les phytoplasmes responsables du JMC au Ghana proviendraient d'une même souche ayant divergée ce qui est assez vraisemblable compte tenu de la faible variabilité génétique observée.

Cette différenciation génétique des phytoplasme responsables du JMC de Volta Region et ceux de Western Region et de Central Region pourrait aussi être liée à des vecteurs différents ou des variétés de cocotiers différentes entre les deux foyers. Il est aussi envisageable que les origines des phytoplasmes responsables du JMC en Volta Region et en Western Region soient différentes. Etant donné que la maladie a été détectée plus tard en Western Region, la maladie peut aussi bien provenir de Volta Region, que d'un autre pays Ouest Africain.

Les résultats ont aussi mis en évidence que les erreurs de l'enzyme de réplication, la *Taq polymérase*, sont révélées par le clonage. L'analyse de variabilité de l'opéron ribosomal 16S a permis de mettre en évidence ces erreurs. A ce faible niveau de variabilité, les valeurs d'homologie sont fortement influencées par la moindre mutation d'un nucléotide. Les données du fournisseur sur l'enzyme de réplication (<http://www.qiagen.com>) donnent un taux d'erreur de la *Taq* polymérase de  $\sim 4 \times 10^{-6}$  nucléotide<sup>-1</sup> cycle<sup>-1</sup>. Avec un taux d'erreur de *Taq* polymérase de  $2.28 \times 10^{-5}$  et pour un fragment de 1750 pb, 100% des produits répliqués par la *Taq* ont en moyenne 1 erreur de réplication et 39% des produits en possèdent deux d'après les simulations avec le calculateur *PCR fidelity calculator* ([http://www.finnzymes.com/pcr/fidelity\\_calc.php](http://www.finnzymes.com/pcr/fidelity_calc.php)) de Thermo Scientific. En utilisant un taux à  $2.8 \times 10^{-6}$  proche des données Qiagen, cela implique que 17,15% de produits PCR ont une erreur.

Il est donc préférable d'envoyer les produits pour un séquençage en direct pour éviter les biais du clonage. Cette observation doit être prise en compte pour l'étude de variabilité entre les séquences clonées et non clonées qui sont analysées dans cette étude ainsi que pour les analyses futures. La démarche du clonage n'est pas conseillée dans une optique d'étude de variabilité afin d'améliorer la robustesse des résultats.

En effet, pour les autres gènes, les SNPs introduisant de la variabilité régionale, entre les isolats au sein de chaque foyer, sont portés exclusivement par les échantillons clonés, ce qui incite à être critique vis-à-vis de l'analyse. De même que pour l'ADNr 16S, étant donné le peu de variabilité du gène *secA* parmi les échantillons Ghana 2009, les erreurs de séquençages induites ont une influence directe sur les valeurs d'homologie.

Il serait donc intéressant de réussir à séquencer tous les échantillons en direct et de vérifier l'hypothèse selon laquelle la seule variabilité des phytoplasmes responsables du JMC au Ghana correspond aux SNPs signatures différenciant les deux foyers.

## 5. Conclusions et perspectives

Le travail mené durant ce stage a montré que les populations de phytoplasmes responsables du JMC en Volta Region et ceux en Western Region et en Central Region sont différenciables génétiquement. Les analyses phylogénétiques montrent une concordance avec les phylogénies publiées concernant les isolats Ghanéens, Mozambicains et Tanzaniens et les arbres sont plus résolutifs.

Le travail réalisé introduit certaines perspectives. La diversité intra-spécifique chez les phytoplasmes du groupe 16SrXXII doit être étudiée en détail. Avec les gènes décrits dans ce rapport, *secY* ou plus particulièrement *imp*, la variabilité entre les isolats Ghanéens et Mozambicains est assez élevée. Il serait intéressant d'étudier ces marqueurs sur des échantillons provenant d'autres pays Ouest Africains où la maladie est présente pour approfondir les relations de proximité des populations de phytoplasmes responsables du JMC dans cette région en les comparant entre elles et avec celles du Mozambique.

D'autres aspects de ces travaux sont à considérer par exemple en termes de mise en place d'essais variétaux de cocotiers au Ghana. Des phytoplasmes différents n'ont pas nécessairement le même mode d'action et la même virulence sur une variété donnée. Ainsi, pour avoir une méthodologie rigoureuse, la mise en place d'essais variétaux similaires en Volta Region et en Western Region ou en Central Region serait à envisager.

## Bibliographie

---

- Almeida Marinho, V.L., Fabre, S. and Dollet M. (2006) Diagnostico do “coconut lethal yellowing phytoplasma”, praga de quarentena para o Brasil, baseado no estudo de genes da proteina ribosomal. XXXIX Congresso Brasileiro Fitopatologia. Salvador, Bahia 14-18th August 2006.
- Arnaud, G., Mlembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E. and Foissac, X. (2007) Multilocus Sequence typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavenescence dorée Phytoplasma strain cluster and group 16SrV Phytoplasma infecting grapevine and alder in Europe. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 4001-4010.
- Baudouin, L., Philippe, R., Quaicoe, R., Dery, S. and Dollet, M. (2009) General overview of genetic research and experimentation on coconut varieties tolerant/resistant to Lethal Yellowing. *OCL - Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **16**(2), 127-131.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J. and Shevchenko, D.V. (2006) Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology* **188**, 3682-3696.
- Bene, S., Courbet, P., Dziwornu, A., Salinier, J. and Mensah-Bonsu, A. 2009. La filière du cocotier au Ghana et au Nigéria. *OCL - Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **16**(2), 87-96.
- Bonnot, F., de Franqueville, H., and Lourenço, E. (2010) Spatial and spatiotemporal pattern analysis of coconut lethal yellowing in Mozambique. *Phytopathology* **100**, 300-312.
- Bourdeix, R., Konan, J.L. and N'cho, Y.P. (2005) Coconut a guide to traditional and improved varieties. Collection Catalys, Editions Diversiflora. Novoprint SA, Barcelona, Spain p3-16.
- Brown, S.E., Been, B.O. and McLaughlin, W.A. (2006) Detection and variability of the lethal yellowing group (16Sr IV) phytoplasmas in the *Cedusa* sp. (Hemiptera: Auchenorrhyncha : Derbidae) in Jamaica. *Annals of Applied Biology* **149**, 53-62.
- Cousin, M-T. and Boudon-Padieu, E. (2001) Phytoplasmes et phytoplasmoses : caractéristiques, symptômes et diagnostic. *Cahiers Agricultures* **10**(6), 361-376.
- Cousin, M-T. and Boudon-Padieu, E. (2002) Phytoplasmes et phytoplasmoses : vecteurs, méthodes de lutte et thèmes de recherche. *Cahiers Agricultures* **11**(2), 115-126.
- Danet, J-L., Blakishiyeva, G., Cimerman, A., Sauvion, N., Marie-Jeane, V., Labonne, G., Laviña, A., Batle, A., Križanac, I., Škoric, D., Ermacora, P., Serçe, C-U., Çağlayan Jaraush, W. and Foissac, X. (2010) Multilocus sequence analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasma and supports the existence of inter species recombination. *Microbiology* **157**, 438-450.
- De Taffin, G. and Sangare, A. (1989) Interest of coconut on west Africa. *Oléagineux Corps Gras, Lipides* **44**(12), 585-591.
- Deng, S. and Hiruki, C. (1991) Amplification of 16S rRNA genes from culturable and non-culturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods* **14**, 53-61.
- Dollet, M., Llauger, R., Fabre, S., Julia, J.F, Gonzalez, C. and Cueto, J. (2010) Nymphocixia caribbea (Fennah) (Homoptera : Cixiidae) potential candidate as coconut lethal yellowing vector in the Caribbean. COST Action FA0807 "Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management". Sitges, Espagne 1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> February 2010.
- Harrison, N.A., Richardson, P.A. and Tsai, J.H. (1995) Detection and diagnosis of lethal yellowing: conventional methods and molecular techniques. In *Lethal Yellowing: Research and Practical Aspects* (Oropeza, C., Howard, F.W. and Ashburner, G.R., eds), pp. 79-91. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Harrison, N.A., Cordova, I., Richardson, P.A. and DiBonito, R. (1999) Detection and diagnosis of lethal yellowing. In *Current Advances in Coconut Biotechnology* (Orpeza, C., Verdeil, C.L., Ashburner, G.R., Cardeña, R. and Santamaria, J.M., eds), pp. 183-196. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Hodgetts, J., Boonham, N., Mumford, R., Harrison, N. and Dickinson, M. (2008) Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1826-1837.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group (2004) 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1257-1269.

Jović, J., Cvrković, T., Mitrović, M., Petrović, A., Krrstić, O. and Krnjajić, S. (2010) Multigene sequence data and genetic diversity among 'Candidatus Phytoplasma ulmi' strains infecting *Ulmus* spp. in Serbia. *Plant Pathology* **60**(2), 1-13.

Kube, M., Schneider, B., Kuhl, H., Dandekar, T., Heitmann, K., Migdoll, A.M., Reinhardt, R. and Seemüller, E. (2008) The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma 'Candidatus Phytoplasma mali'. *BMC Genomics* **9**, 306.

Lee, I.-M., Hammond, R. W., Davis, R. E. and Gundersen, D. E. (1993b) Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* **83**, 834-842.

Lee, I.-M., Gundersen-Rindal, D. E. and Bertaccini, A. (1998b) Phytoplasma: ecology and genomic diversity. *Phytopathology* **88**, 1359-1366.

Lee I.-M., Bottner K.D., Zhao Y., Davis, R.E. and Harrison, N.A. (2010) Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *SecY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**, 2887-2897.

Malembic-Maher, S., Salar, P., Vergnes, D. and Foissac, X. (2007). Detection and diversity of "flavescence doree" - related phytoplasmas in alders surrounding infected vineyards in Aquitaine (France). *Bulletin of Insectology* **60**, 329-330.

Manimekalai, R., Soumya, V.P., Sathish Kumar, R., Selvarajan, R., Reddy, K., Thomas, G.V., Sasikala, M., Rajeev, G. and Baranwal, V. K. (2010) Molecular Detection of 16SrXI Group Phytoplasma Associated with Root (Wilt) Disease of Coconut (*Cocos nucifera*) in India. *Plant Disease* **94**(5), 636-636.

Martini, M., Lee, I.-M., Bottner, K. D., Zhao, Y., Botti, S., Bertaccini, A., Harrison, N. A., Carraro, L., Marcone, C., Khan, A. J. and Osler, R. (2007) Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2037-2051.

Maust, B. E., Espedas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaria, J. M. and Orpeza, C. (2003) Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* **93**, 976-981.

Mpunami, A., Tymon, A., Jones, P. and Dickinson, M. J. (1999) Genetic diversity in the coconut lethal yellowing disease phytoplasmas of East Africa. *Plant Pathology* **48**, 109-114.

Mpunami, A., Tymon, A., Jones, P. and Dickinson, M.J. (2000) Identification of potential vectors of the coconut Lethal disease Phytoplasma. *Plant Pathology* **49**, 355-356.

Mpunami, A., Pilet, F., Fabre, S., Kullaya, A. and Dollet, M. (2010) Genetic variability of the coconut lethal decline phytoplasma in Tanzania. COST Action FA0807 "Current status and perspectives of phytoplasma disease research and management". Espagne 1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup> February 2010.

- Nkansah-Poku, J., Philippe, R., Nketsia Quaicoe, R., Kuuna Dery, S. and Ransford, A. (2009) Cape Saint Paul Wilt Disease of coconut in Ghana: surveillance and management of disease spread. *OCL - Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **16**(2), 111-115.
- O'Neal Campbell, M. (2006) The Sustainability of Coconut Palm *Cocos nucifera* Linnaeus 1753 Groves in Coastal Ghana. *Journal of Coastal Research* **22**(5), 1118-1124.
- Oshima, K., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Jung, H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Arashida, R., Nakata, D., Miyata, S., Ugaki, M. and Namba, S. (2004) Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics* **36**, 27-29.
- Quaicoe, R., Dery, S., Philippe, R., Baudouin, L., Owusu Nipah, J., Nkansah-Poku, J., Arthur, R., Dare, D., Ndede Yankey, Y., and Dollet, M. (2009) Resistance screening trials on coconut varieties to Cape Saint Paul Wilt Disease in Ghana *OCL - Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **16**(2), 132-136.
- Schneider, B. and Seemüller, E. (1994) Presence of two sets of ribosomal genes in phytopathogenic mollicutes. *Applied Environmental Microbiology* **60**, 3409-3412.
- Smart, C.D., Schneider, B. and Blomquist, C.L. (1996) Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer Region. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2988-93.
- Tran-Nguyen, L.T., Kube, M., Schneider, B., Reinhardt, R. and Gibb, K.S. (2008) Comparative genome analysis of 'Candidatus Phytoplasma australiense' (subgroup tuf-Australia I; rp-A) and 'Ca. Phytoplasma asteris' Strains OY-M and AY-WB. *Journal of Bacteriology* **190**, 3979-91.
- Waters, H. (1978) A wilt disease of coconuts from Trinidad associated with *Phytomonas* sp., a sieve tube-restricted protozoan flagellate. *Annals of Applied Biology* **90**, 293-302.
- Wei, W., Davis R. E., Lee I.-M. and Zhao Y. (2007) Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 1855-67.
- Wei, W., Lee, I.-M. and Davis, R. E. (2008) Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic Bacteriology* **58**, 2368-77.
- Zhao, Y., Wei, W., Lee, I.-M., Shao, J., Suo, X. and Davis, R.E. (2009b) Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**, 2582-93.
- Zhao, Y., Wei, W., Davis, R. E. and Lee, I.-M. (2010) Recent advances in 16S rRNA gene-based phytoplasma differentiation, classification and taxonomy. In P. G. Weintraub & P. Jones (Eds.), *Phytoplasmas: Genomes, plant hosts and vectors* (pp. 65-93). Oxfordshire: CAB International.

## Annexe 1 : Protocole d'utilisation du kit Qiaprep mini kit (Qiagen)

### Protocol: Plasmid DNA Purification Using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge

This protocol is designed for purification of up to 20 µg of high-copy plasmid DNA from 1–5 ml overnight cultures of *E. coli* in LB (Luria-Bertani) medium. For purification of low-copy plasmids and cosmids, large plasmids (>10 kb), and DNA prepared using other methods, refer to the recommendations on page 44.

Please read "Important Notes" on pages 15–21 before starting.

Note: All protocol steps should be carried out at room temperature.

#### Procedure

- 1. Resuspend pelleted bacterial cells in 250 µl Buffer P1 and transfer to a microcentrifuge tube.**

Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. No cell clumps should be visible after resuspension of the pellet.

If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle to ensure LyseBlue particles are completely dissolved. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.
- 2. Add 250 µl Buffer P2 and mix thoroughly by inverting the tube 4–6 times.**

Mix gently by inverting the tube. Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. If necessary, continue inverting the tube until the solution becomes viscous and slightly clear. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min.

If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.
- 3. Add 350 µl Buffer N3 and mix immediately and thoroughly by inverting the tube 4–6 times.**

To avoid localized precipitation, mix the solution thoroughly, immediately after addition of Buffer N3. Large culture volumes (e.g. ≥5 ml) may require inverting up to 10 times. The solution should become cloudy.

If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.
- 4. Centrifuge for 10 min at 13,000 rpm (~17,900 x g) in a table-top microcentrifuge.**

A compact white pellet will form.
- 5. Apply the supernatants from step 4 to the QIAprep spin column by decanting or pipetting.**
- 6. Centrifuge for 30–60 s. Discard the flow-through.**
- 7. Recommended: Wash the QIAprep spin column by adding 0.5 ml Buffer PB and centrifuging for 30–60 s. Discard the flow-through.**

This step is necessary to remove trace nuclease activity when using endA<sup>+</sup> strains such as the JM series, HB101 and its derivatives, or any wild-type strain, which have high levels of nuclease activity or high carbohydrate content. Host strains such as XL-1 Blue and DH5α™ do not require this additional wash step.
- 8. Wash QIAprep spin column by adding 0.75 ml Buffer PE and centrifuging for 30–60 s.**
- 9. Discard the flow-through, and centrifuge for an additional 1 min to remove residual wash buffer.**

Important: Residual wash buffer will not be completely removed unless the flow-through is discarded before this additional centrifugation. Residual ethanol from Buffer PE may inhibit subsequent enzymatic reactions.
- 10. Place the QIAprep column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. To elute DNA, add 50 µl Buffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) or water to the center of each QIAprep spin column, let stand for 1 min, and centrifuge for 1 min.**

**Annexe 2 : Recommandations pour la préparation des échantillons à envoyer pour séquençer chez Beckman Coulter Genomics**

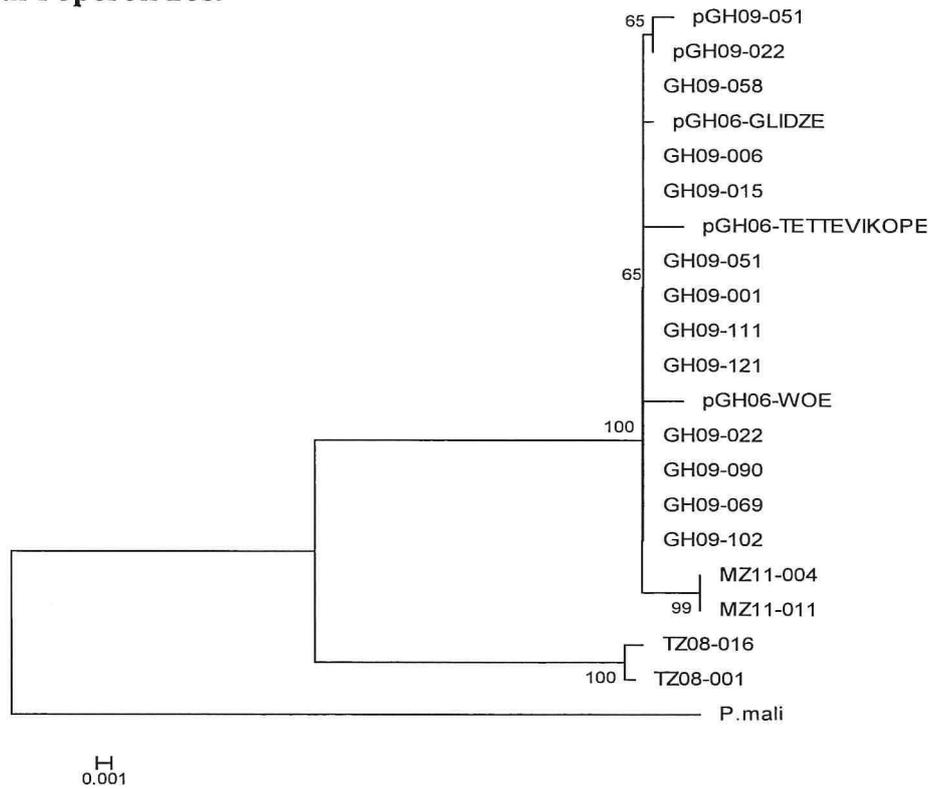
**Sample Submission Guidelines — Morrisville**

**For Gene Expression, Genotyping (US), Biologics, all GLP/CLIA Projects and Other Services.**

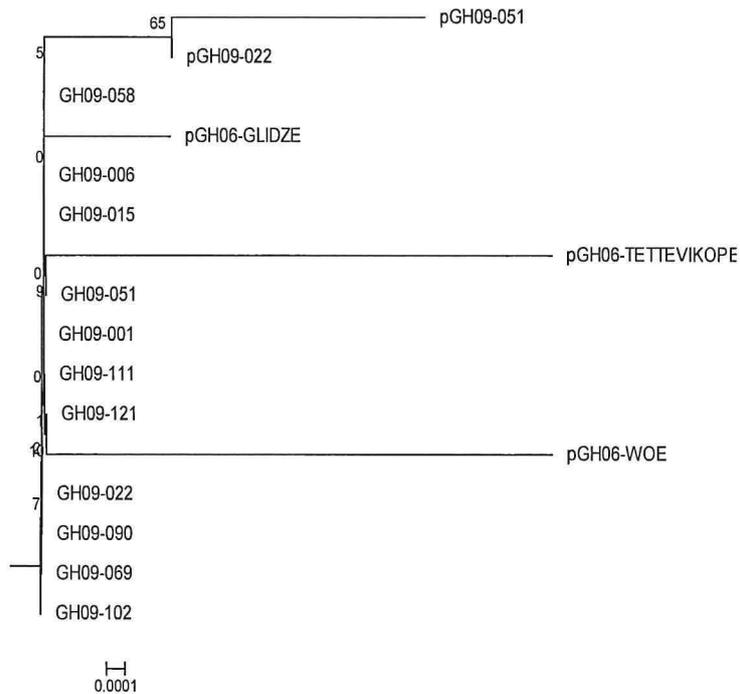
**Express Sequencing**

<b>Sample Type</b>	<b>Minimum Sample Requirements</b>
<b>Plasmid DNA or Purified PCR Products</b>	<b>500 ng per sequencing reaction at 50 ng/μl in 10 μl of water</b>
<b>Plasmid DNA and Primer Mixed</b>	<b>500 ng per sequencing reaction at 50 ng/μl - DNA 8 pmol Primer at 0.8 pmol/μl - Primer in a total volume of 10 μl</b>
<b>Primer</b>	<b>8 pmol per sequencing reaction at 0.8 pmol/μl in 10 μl</b>

**Annexe 3 : Arbre phylogénétique par méthode de distance Neighbour Joining basé sur l'opéron 16s.**

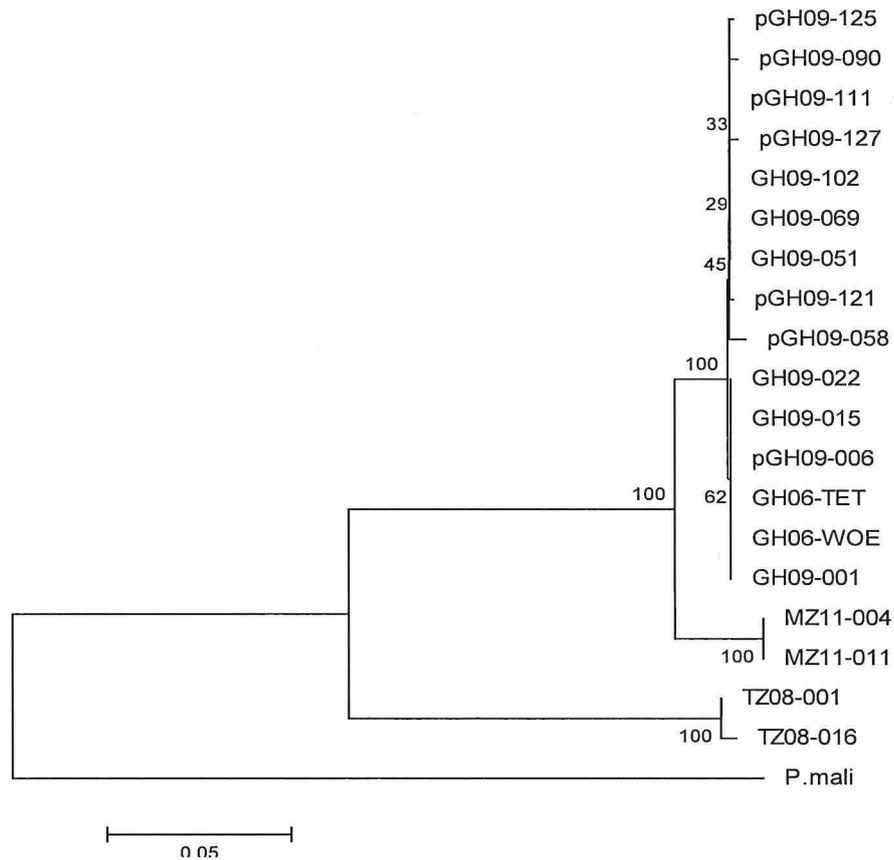


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

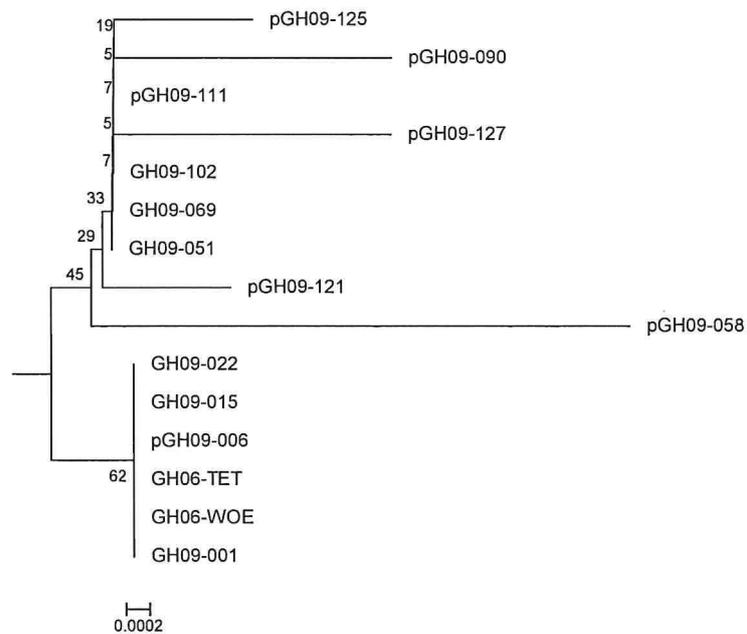


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 4: Arbre phylogénétique par méthode de distance Neighbour Joining basé sur la séquence rp.**

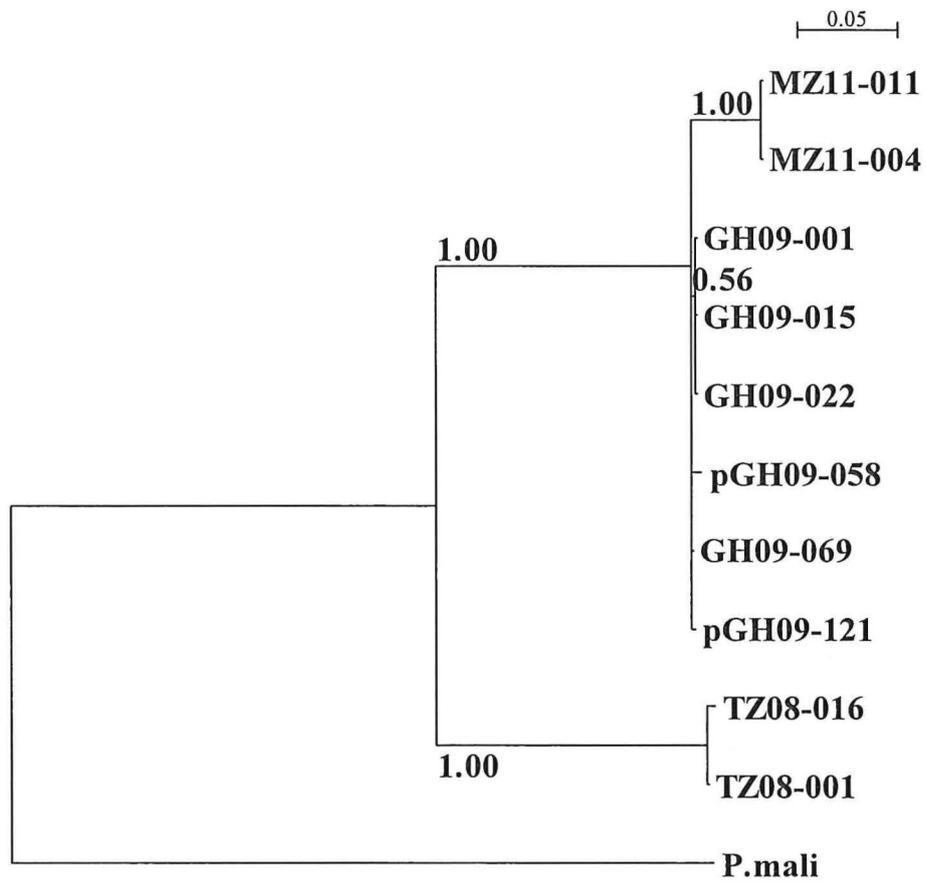


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

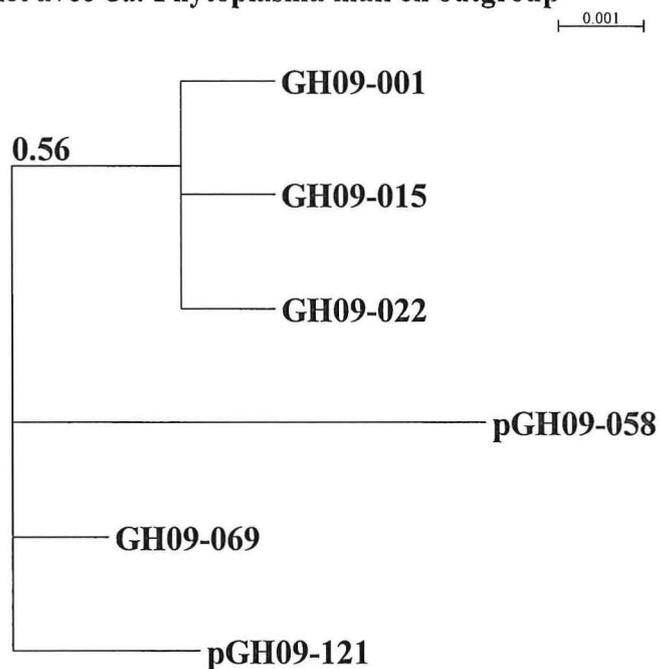


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 5 : Arbre phylogénétique, par inférence bayésienne basé sur la séquence *rp***

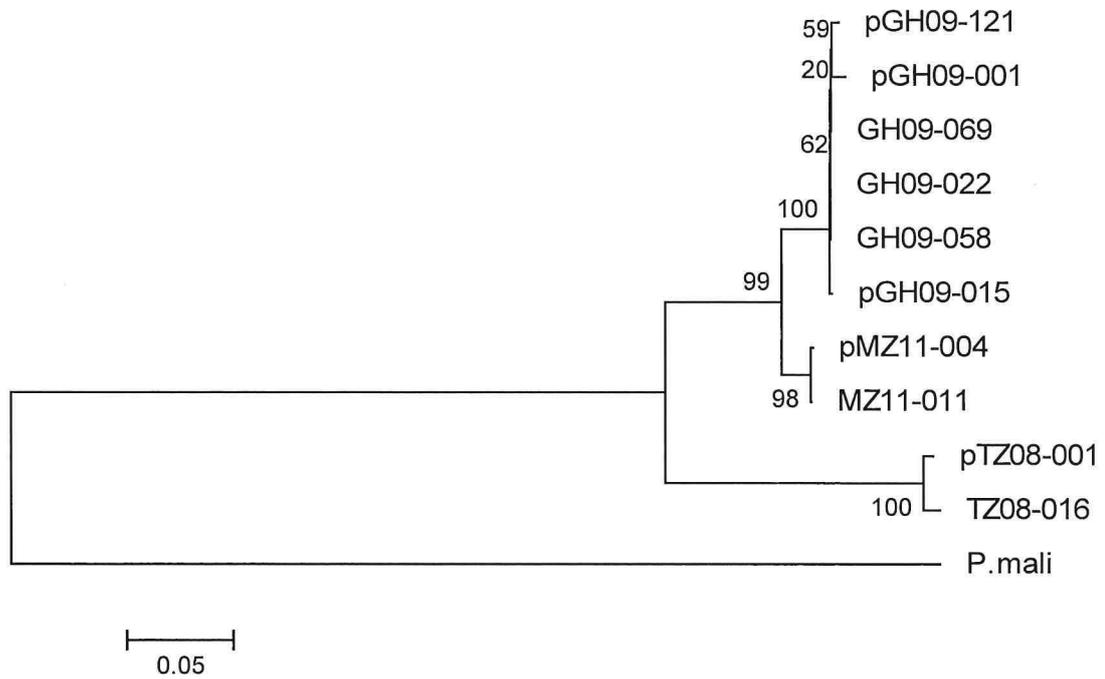


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

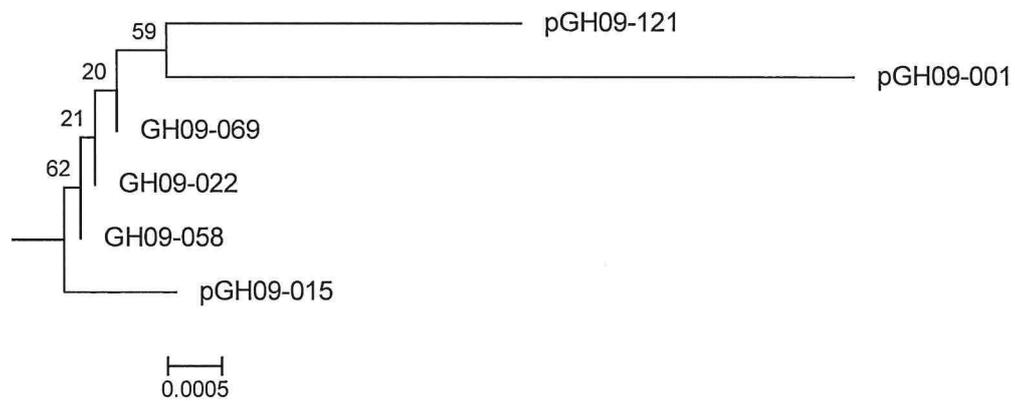


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 6 : Arbre phylogénétique par méthode de distance Neighbour Joining basé sur la séquence secA**

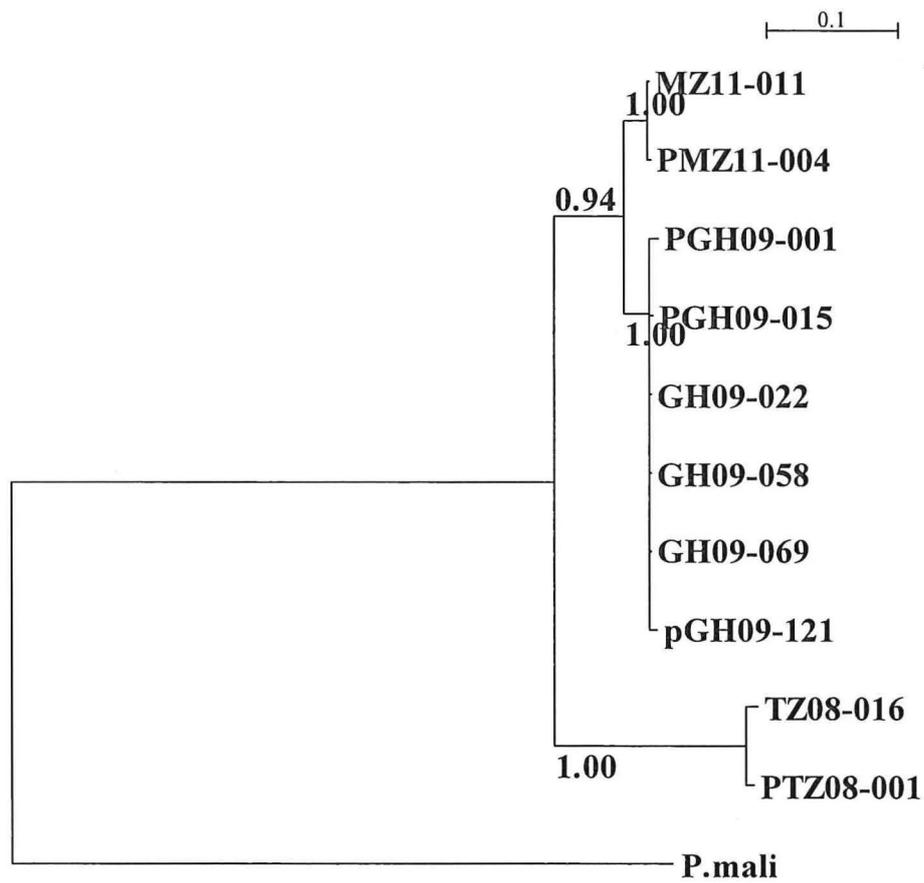


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

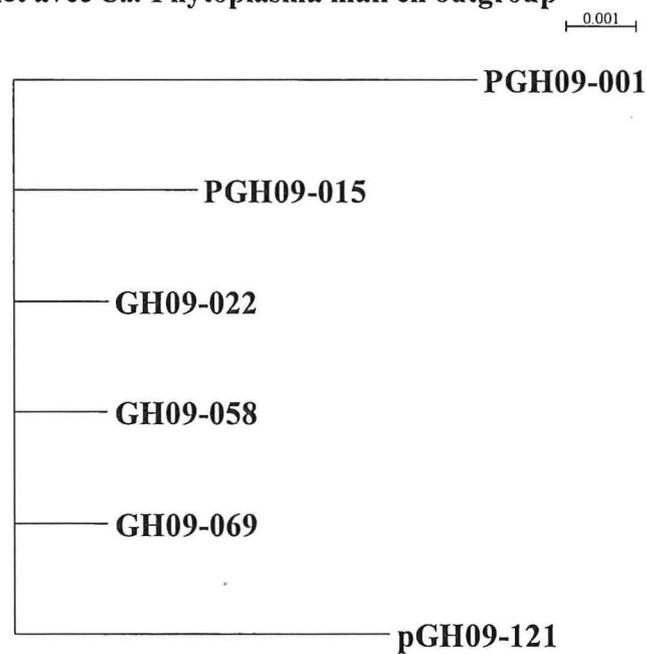


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 7 : Arbre phylogénétique par inférence bayésienne basé sur la séquence *secA***

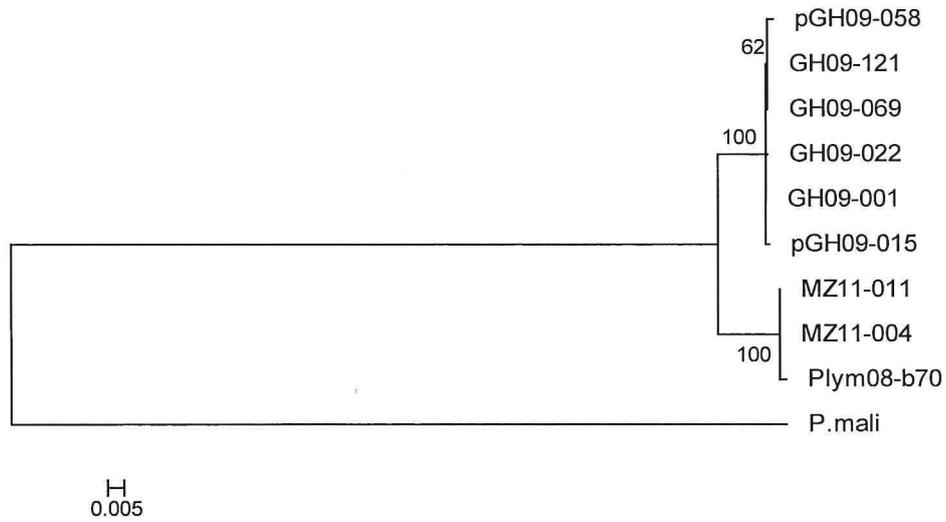


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

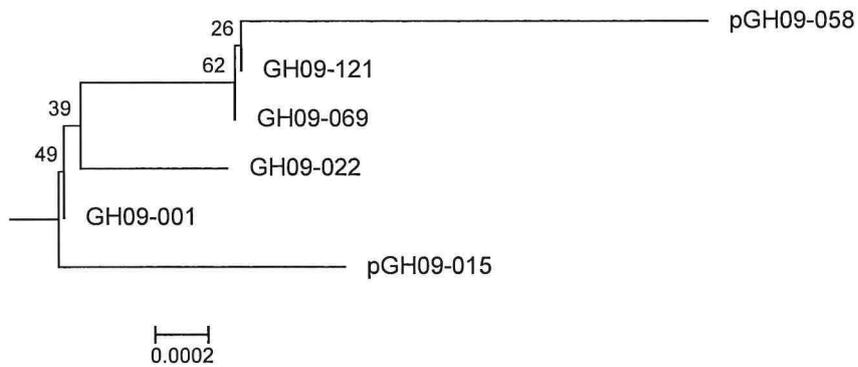


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 8 : Arbre phylogénétique par méthode de distance Neighbour Joining basé sur la séquence secY.**

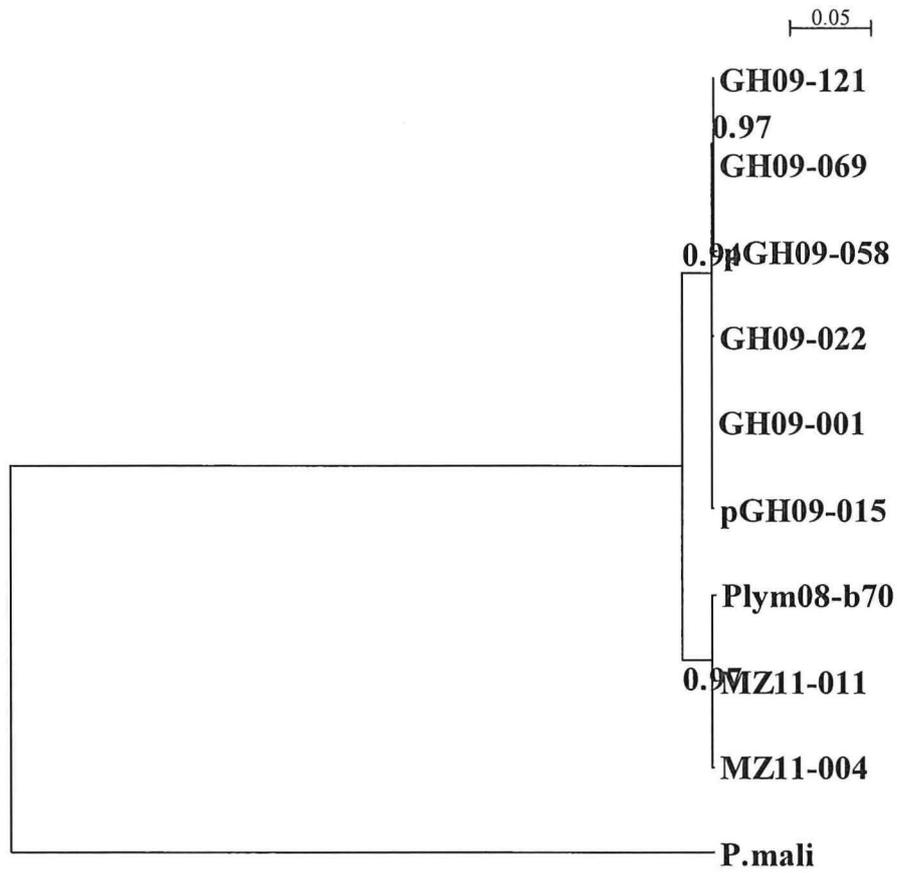


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

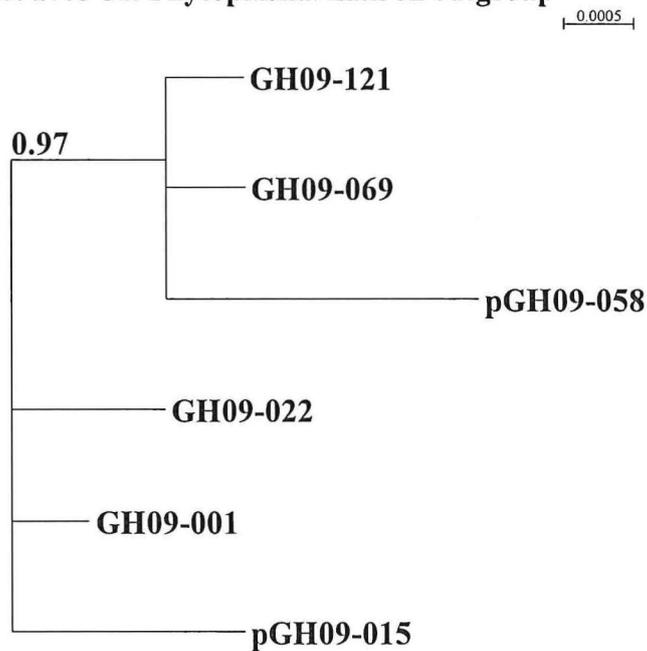


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 9: Arbre phylogénétique par inférence bayésienne basé sur la séquence *secY***

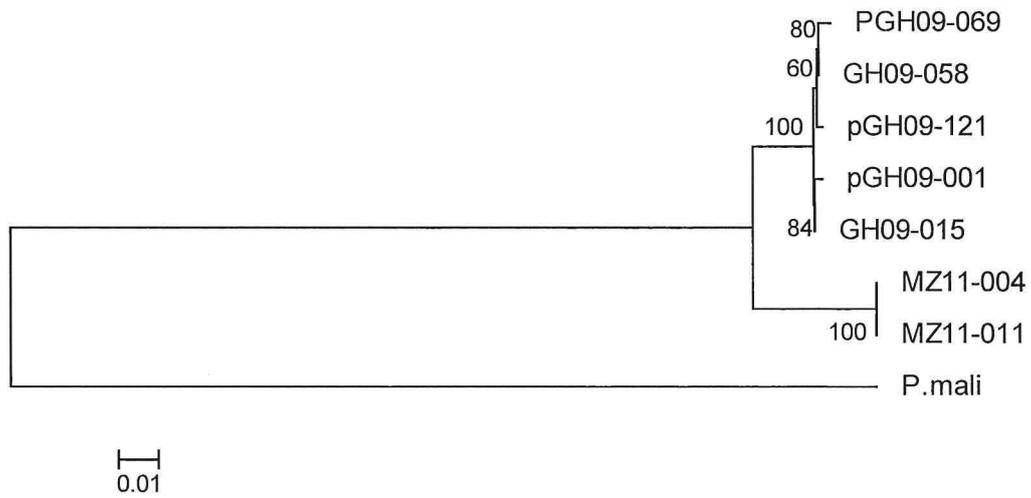


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

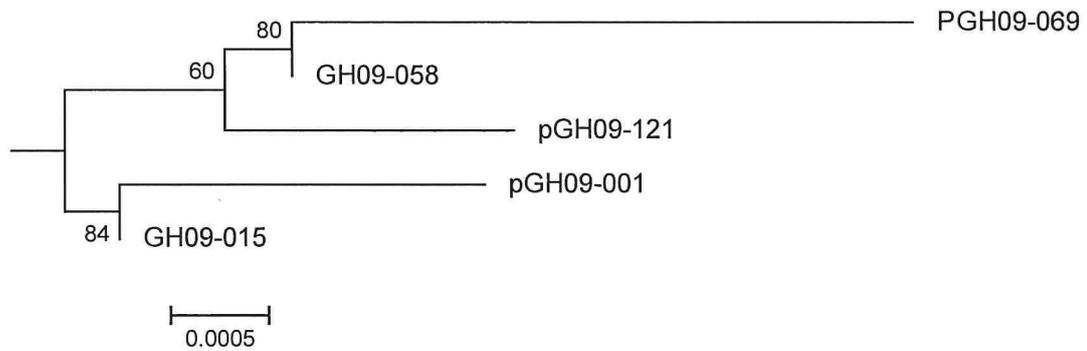


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 10 : Arbre phylogénétique par méthode de distance Neighbour Joining basé sur la séquence imp.**

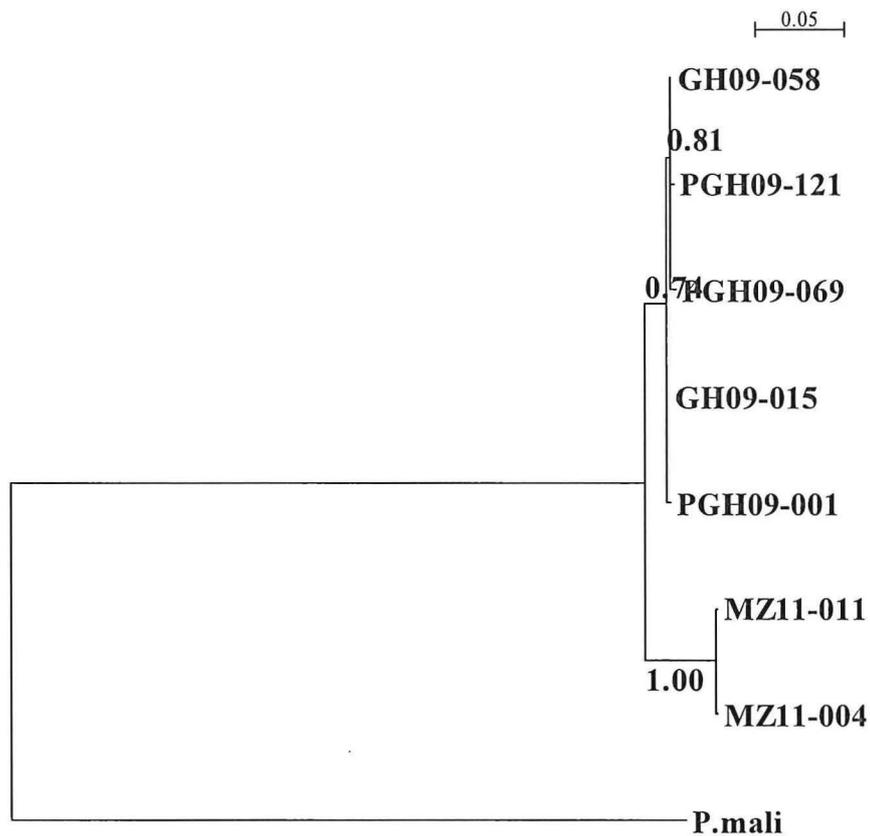


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

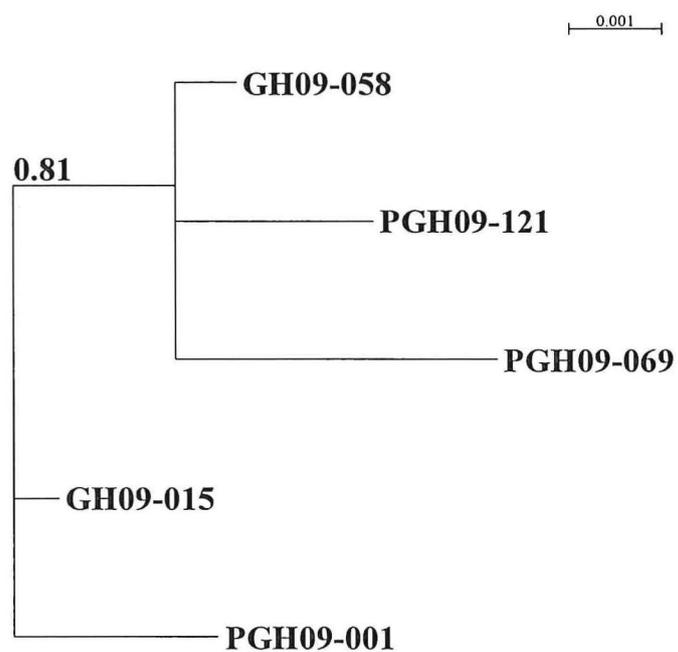


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 11: Arbre phylogénétique par inférence bayésienne basé la séquence *imp* (sans l'échantillon GH09-022)**

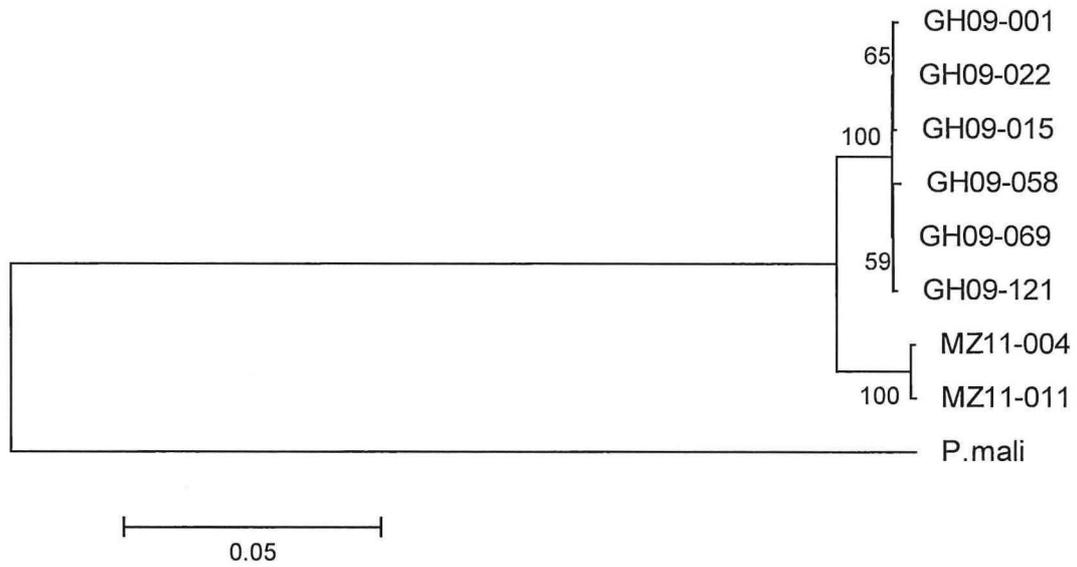


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

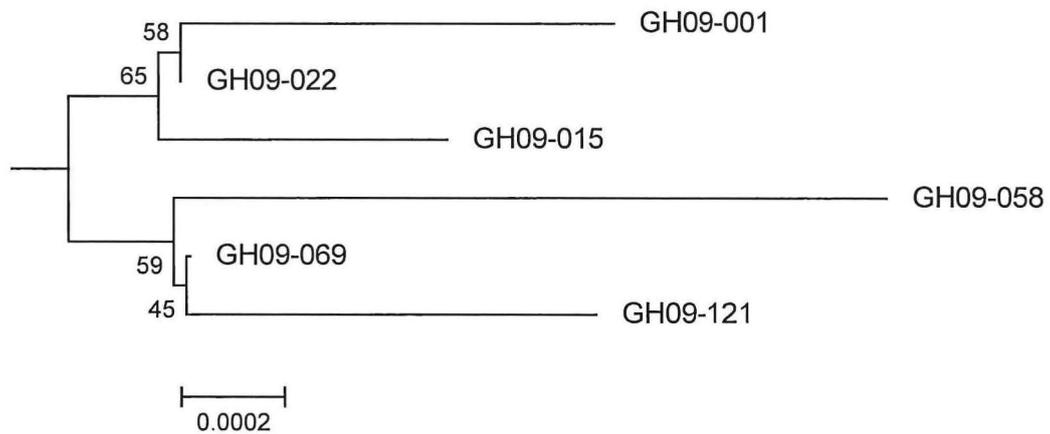


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 12 : Arbre phylogénétique sur MLSA (16S, *rp*, *secY*, *secA*) par Neighbour Joining-JC**

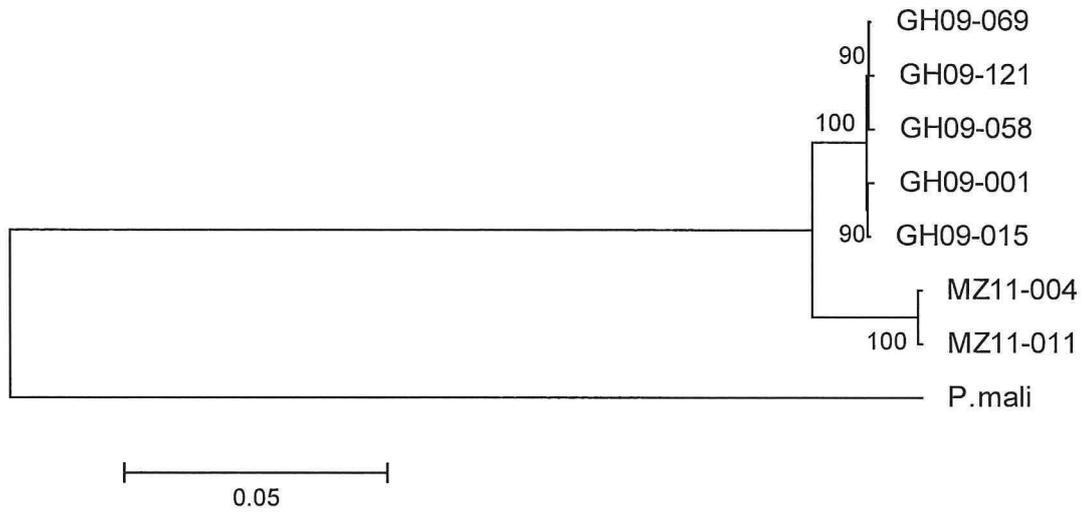


**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

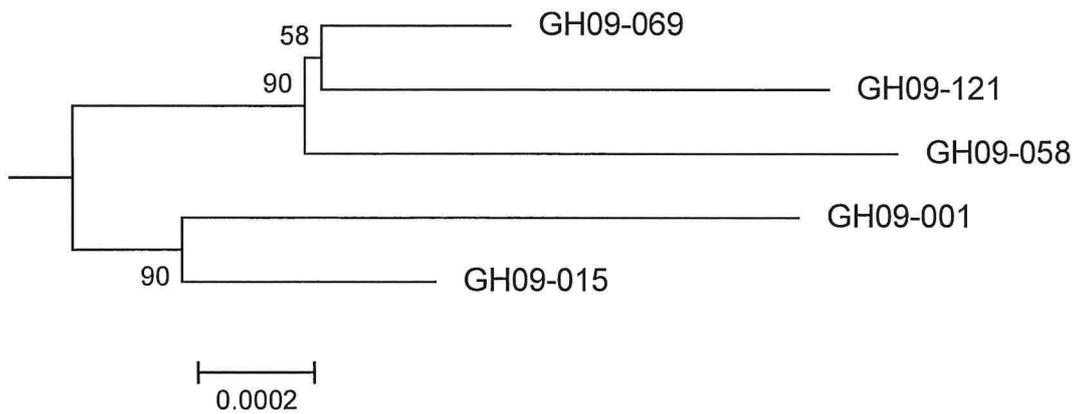


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 13: Arbre phylogénétique sur MLSA (16S, *rp*, *secY*, *secA*, *imp*) par méthode de distance Neighbour Joining (sans l'échantillon GH09-022)**



**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**

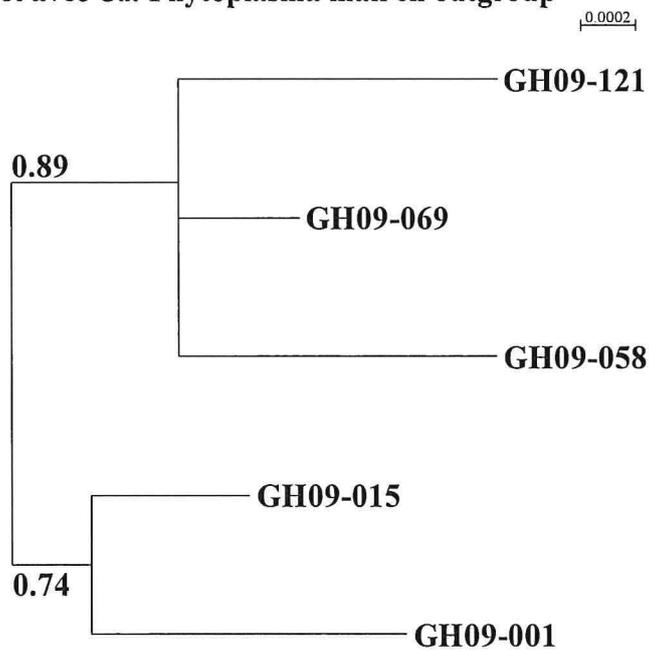


**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

**Annexe 14 : Arbre phylogénétique sur MLSA (16S, *rp*, *secY*, *secA*, *imp*) par inférence bayésienne (sans l'échantillon GH09-022)**



**(a) Arbre complet avec *Ca. Phytoplasma mali* en outgroup**



**(b) Sous arbre zoomé sur les échantillons Ghana**

Poulin, L. Etude de la variabilité génétique du phytoplasme responsable du jaunissement mortel du cocotier au Ghana.

**Résumé** - Au Ghana, la maladie du jaunissement mortel du cocotier (JMC) a largement affecté les cultures de cocotiers depuis sa première détection à Cape Saint-Paul en 1932. Actuellement, un foyer en Volta region et un foyer en Western Region et Central Region peuvent être distingués. La variabilité du 16S n'ayant pas permis de mettre en évidence une différenciation génétique des phytoplasmes provenant des deux foyers, la variabilité d'autres gènes est recherchée. L'analyse prospective a consisté au séquençage des gènes *rp* pour 14 échantillons et au séquençage de *secY*, *imp*, et *secA* pour 6 échantillons ghanéens de 2009. Si le gène *secA* n'est pas suffisamment variable, les gènes *rp*, *secY* et *imp* présentent des SNPs permettant de différencier les phytoplasmes des deux foyers. Les fragments PCR *rp* de 79 échantillons du Ghana de 2009 ont ensuite été digérés avec l'enzyme de restriction *Tsp45I*. Les profils RFLP générés confirment une différenciation géographique des phytoplasmes responsables des JMC au Ghana.

**Mots clefs** : Phytoplasmes, Jaunissement Mortel du Cocotier, Cape Saint-Paul Wilt Disease, variabilité génétique

Poulin, L. Genetic variability study of the coconut lethal yellowing disease phytoplasma in Ghana.

**Abstract** - In Ghana, lethal yellowing has been widely affecting coconut palms since its first report in Cape Saint Paul in 1932. Two foci can be distinguished, the first one is located in Western Region and Central region and the second one is located in Volta region. Since the 16S did not succeed in showing a genetic differentiation between strains from the two foci, the variability of several genes was examined in this study. The prospective study was done by sequencing *rp* genes for 14 isolates and by sequencing *secY*, *imp* and *secA* genes for 6 samples from Ghana of 2009. *secA* gene did not show variability while *rp*, *secY* and *imp* genes showed SNPs discriminating samples from the two foci. Then, *rp* PCR fragments from 79 Ghanaian samples from 2009 were restricted by the enzyme *Tsp45I*. RFLP profiles confirm a geographic differentiation of phytoplasmas in Ghana.

**Keywords**: Phytoplasmas, Coconut Lethal Yellowing Disease, Cape Saint-Paul Wilt Disease, genetic variability.