



HAL
open science

Amplification pleine longueur et clonage par recombinaison dans la levure d'ADNc infectieux de l'Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)

Fater Youssef, Armelle Marais, Chantal Faure, Pascal Gentit, Thierry T. Candresse

► To cite this version:

Fater Youssef, Armelle Marais, Chantal Faure, Pascal Gentit, Thierry T. Candresse. Amplification pleine longueur et clonage par recombinaison dans la levure d'ADNc infectieux de l'Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV). 13. Rencontres de Virologie Végétale (RVV2011), Jun 2011, Aussois, France. hal-02809420

HAL Id: hal-02809420

<https://hal.inrae.fr/hal-02809420>

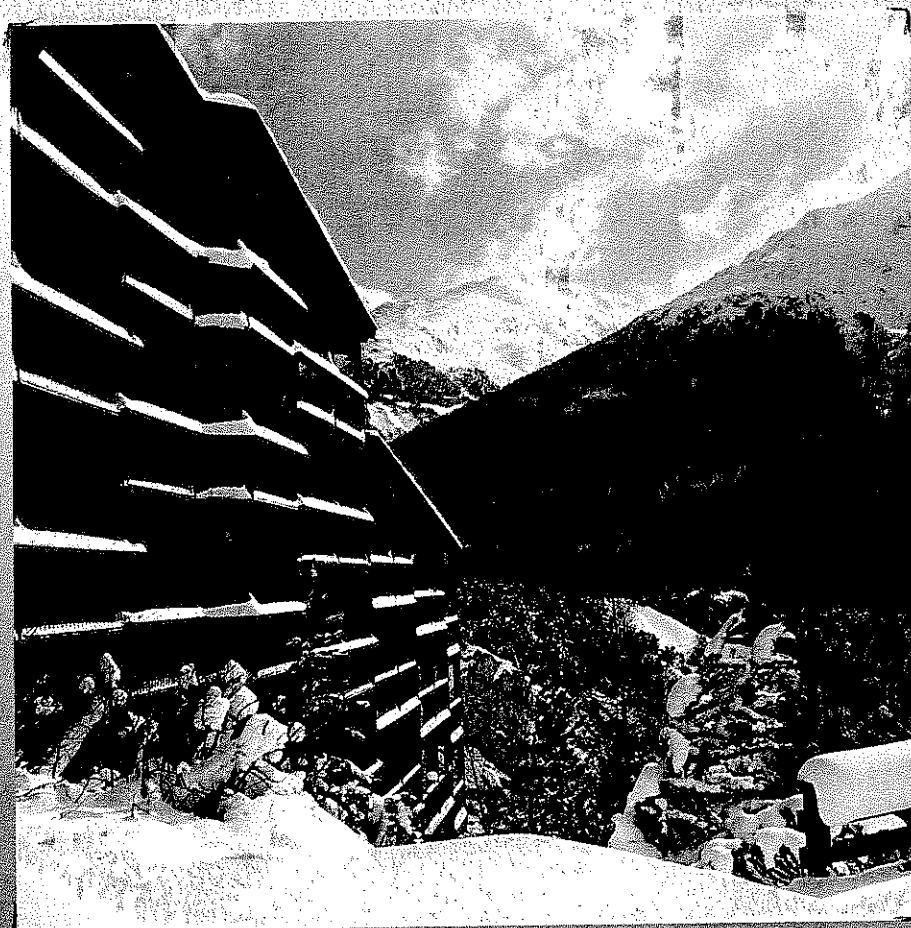
Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

The logo for the Rencontres de Virologie Végétale (RVV), consisting of the letters 'RVV' in a bold, sans-serif font.

13^{èmes} rencontres de virologie végétale



Aussois du 16 au 20 janvier 2011



Amplification pleine longueur et clonage par recombinaison dans la levure d'ADNc infectieux de l'*Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)

Fater YOUSSEF¹, Armelle MARAIS¹, Chantal FAURE¹, Pascal GENTIT² et Thierry CANDRESSE¹

¹ UMR GDPP, INRA, Université Bordeaux 2, IBVM, BP81, 33883 Villenave-d'Ornon Cedex, France.

² Laboratoire de Virologie, Ctifl, Centre de Lanxade, 24130 La Force, France

Bien qu'un nombre important de clones d'ADNc infectieux aient été obtenus pour les virus de plantes à ARN, la construction de tels clones demeure complexe, lourde et parfois problématique. Par ailleurs, les progrès réalisés dans le domaine de la détection et des nouvelles technologies de séquençage ont permis de caractériser ces dernières années de nombreux nouveaux virus, sans que leur contribution dans une pathologie particulière n'ait pu être élucidée. La mise en œuvre d'ADNc complets infectieux pourrait permettre de progresser dans la compréhension de la pathogénicité de ces agents. Nous avons donc cherché à développer un ensemble de techniques et de stratégies destinées à produire de façon générique des ADNc viraux infectieux (clonés ou non clonés) utilisables en tant qu'outils pour la vérification d'hypothèses étiologiques.

Parmi les améliorations souhaitables, on peut citer (1) la capacité d'utiliser des extraits d'acides nucléiques totaux obtenus à partir des hôtes infectés comme matrice pour réaliser l'amplification directe des génomes complets en une seule étape, éliminant ainsi d'avoir à purifier des particules virales, (2) la possibilité d'inoculer des plantes par des ADNc infectieux non-clonés, ou encore (3) la simplification des procédures de clonage, quand un ADNc infectieux cloné est souhaité.

Ce travail de développement méthodologique a été réalisé en utilisant le génome de l'*Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV, *Trichovirus*, 7,55 kpb) comme modèle. Deux approches ont été menées en parallèle : l'une permettant la génération rapide d'ADNc pleine longueur sous le contrôle du promoteur du bactériophage T7 et l'inoculation des plantes hôtes par les transcrits produits *in vitro* ; l'autre générant des ADNc viraux sous le contrôle du promoteur 35S du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) directement inoculables par biolistique. Dans les deux stratégies, l'infectivité des ADNc ou ARN transcrits obtenus par amplification longue distance à partir d'ARN totaux extraits de plantes infectées. De façon surprenante, l'infectivité des transcrits a été validée sur *Chenopodium quinoa* mais pas sur un autre hôte de l'ACLSV, *Nicotiana occidentalis* 37B.

Nous avons également démontré l'utilité du système de recombinaison homologue de la levure pour simplifier le clonage des ADNc complets amplifiés par PCR. Nous avons ainsi pu réaliser en une seule étape la construction d'un vecteur navette ternaire levure-*E. coli*-*A. tumefaciens* et le clonage d'ADNc infectieux pour obtenir un clone inoculable par agroinfiltration.

Les différentes stratégies présentées dans ce travail devraient trouver une large application, en particulier pour tester plus rapidement des hypothèses d'étiologie pour les virus de plantes réputés "difficiles", tels que ceux infectant des hôtes ligneux.

Mots clés : *Apple chlorotic leaf spot virus*, ADNc infectieux, T7, transcrits, 35S promoteur, recombinaison homologue, levure