

# Les viroïdes, virus minima ou survivant du monde à ARN ?

Découverte	2
Une définition provisoire	2
Symptômes et contamination des végétaux	2
Voies de la contamination et traitement	4
Une biologie moléculaire hors du commun	5
Des acides nucléiques particulièrement résistants	6
Deux familles « infectant » les noyaux ou les chloroplastes	6
Déroulement d'une infection	7
Mode d'action	8
Reproduction	9
Réplication	12
Phylogénie éventuelle	12
Une structure viroïdaire infectant les cellules animales : l'agent delta	16
Références	18

## Découverte

L'existence des viroïdes commença à être suspectée lorsque le spécialiste des maladies végétales T. O. Diener rechercha l'agent causal de la maladie des tubercules fusiformes de la pomme de terre. (Diener & al, 1967). Il mit en évidence que cet agent était avait les propriétés d'un acide nucléique « libre », sans lien avec des protéines. Ce nouveau type d'élément pathogène subviral était si petit, que, comme Diener le reconnaît « beaucoup de scientifiques ont initialement douté de son existence. » (Diener, 2003). La preuve de leur nature infectieuse n'a été obtenue qu'en 1972 lorsque des infections expérimentales purent être réalisées (Diener, 1972), ce qui motiva l'étude de ces étranges acides nucléiques, tant au niveau de leur structure secondaire et de leur morphologie (Sogo *et al*, 1973) que de leur séquençage (Gross *et al*, 1978), rendu possible à l'époque par la taille minime de ces agents pathogènes d'un nouveau genre.

## Une définition provisoire

Les Viroïdes sont des molécules d'ARN de 50 nm de long environ (entre 250 et 350 nucléotides), qui adoptent une structure secondaire le plus souvent circulaire, faisant alterner de courts segments à double brin et des boucles plus lâches. Ils sont autoreplicants et capables de provoquer des pathologies (principalement au niveau de la croissance végétale) par répression de certains gènes dont ils perturbent ou bloquent l'expression par interférence, leur accumulation perturbant les voies normales du développement (Flores R, 2004).

## Symptômes et contamination des végétaux

La plupart des viroïdes ont été découverts parce qu'ils déclenchent des maladies touchant de nombreuses plantes cultivées (avocats, cocotiers ; pommes de terre, vigne, tomate). Il est possible qu'il en existe de nombreux autres touchant des végétaux sans intérêt économique. Parmi les végétaux infectés connus, les dicotylédones prédominent (seules 2 monocotylédones, cocotier et palmier à huile, sont infectables)

Les premiers viroïdes découverts ont été identifiés chez la pomme de terre (patato spindle tuber) où ils provoquent les symptômes suivants :

- modification de la position et de l'aspect (vertical, rugueux, frêle, vert sombre) du feuillage avec enroulement vers le haut des feuilles terminales
- accumulation de pigments en haut des tiges.
- prolifération des bourgeons axillaires
- diminution de la taille de la plante
- Tubercules de petite taille, cylindriques et allongés, fuselés ou en forme d'haltère, d'aspect noueux et crevassé, impropres à la consommation.
- réduction du nombre de tubercules produits
- ralentissement de la germination

À l'intérieur de cette espèce, il existe des souches virulentes et d'autres bénignes.

On connaît actuellement une trentaine de viroïdes différents. La plupart sont spécifiques d'une seule plante, mais quelques-uns peuvent infecter les différents membres d'une famille (ainsi, le CCCvd infecte 5 espèces de palmiers, le PSTvd peut infecter les solanacées (Singh, 1973), dont les tomates, les avocats, les patates douces (Salazar, 1989) et plusieurs composées alors que le CEcd infecte plusieurs espèces de citronniers, mais également des composés, des tomates, des haricots et des carottes).

Les maladies provoquées ont été nommées d'après leurs symptômes (maladie des tubercules fusiformes des pommes de terre, exocorticose des citronniers, marbrure chlorotique des chrysanthèmes...).

Leur principal effet (outre la décoloration des feuilles ou la présence de taches sur les fruits) est une perte de productivité agricole (diminution de rendement de l'ordre de 40 % chez la pomme de terre et dans les affections les plus graves, mort de la plante) pouvant se révéler extrêmement dommageable économiquement.

On peut citer, par exemple, l'infection par le viroïde de la pomme de terre des semences produites par les agriculteurs de l'Île-du-Prince-Édouard au Canada, infection qui a conduit les autorités sanitaires américaines à envisager un embargo alors que le commerce des semences canadiennes représente 250 millions de \$ chaque année.

La réplication des viroïdes est favorisée par une augmentation de la durée de jour et de la température, ce qui contribue à expliquer qu'ils soient principalement impliqués dans des pathologies concernant des plantes tropicales, méditerranéennes ou élevées

sous serre (Codon, 2001) et que les symptômes soient plus graves en période de climat sec et chaud.

## Voies de la contamination et traitement

La contamination des plantes pourrait être réalisée par les pucerons (Werner-Solska, 1983). Toutefois, il apparaît que le simple contact mécanique avec un viroïde, qu'il soit transporté sur un outil ou un véhicule ou infectant une plante voisine, suffit à transmettre l'infection. Cela indique clairement que ces simples molécules d'ARN possèdent une résistance aux conditions du milieu tout à fait inhabituelle pour des acides nucléiques, molécules considérées habituellement comme étant extrêmement fragiles.

La transmission des viroïdes peut donc également s'effectuer à partir de plantes sauvages infectées de façon endémique. Ils peuvent être transmis, en dehors de tout contact mécanique, par les pollens ou les ovules (ce qui fait des viroïdes des agents de maladies « sexuellement » transmissibles !)

L'infection d'un végétal se déroule en plusieurs étapes : pénétration dans la cellule par une voie inconnue, déplacement vers le site de réplication, invasion de la cellule par les réplicants et contamination des cellules voisines, de proche en proche et d'organe en organe jusqu'à infection de toute la plante.

Il semblerait que les viroïdes progressent de cellule en cellule au niveau des plasmodesmes. Ils empruntent aussi les vaisseaux, un viroïde passant ainsi, via le phloème, d'une feuille contaminée vers les tissus en croissance (Palukaitis, 1987). Le transport à longue distance des *Pospiviroidae* se produit dans le phloème, probablement en formant un complexe la RNA-binding phloem protein 2 (PP2), impliquée dans les mouvements et les translocations de gènes se produisant au cours de greffes (Ding *et al*, 2005 ; Gómez & Pallás, 2004).

Toutefois, il semble que les viroïdes ne puissent se diriger que dans des cellules matures, les méristèmes n'étant souvent que peu ou pas infectés. Cependant, des infections peuvent être transmises par les graines chez la tomate (entre 9 et 11 % sont contaminées), ce qui implique une invasion des pièces génitales comme les ovules ou le

pollen (Weidemann, 1987). Chez la pomme de terre, les viroïdes se concentrent principalement au niveau des poils foliaires, des feuilles supérieures et des tubercules.

Il n'existe aucun traitement contre les infections viroidaires, si ce n'est la destruction des plantes contaminées. Toutefois si cette solution est envisageable pour des cultures annuelles, il n'en est pas de même pour des végétaux pérennes comme les arbres fruitiers. De plus, tous les viroïdes ne sont pas pathogènes : le viroïde latent du houblon (HL-Vd) serait ainsi présent asymptomatiquement dans de nombreuses plantes d'espèces différentes, à travers le monde. Certains viroïdes possèdent même un intérêt agricole : des citronniers nains peuvent être obtenus grâce à l'action d'un viroïde.

La recherche, limitée à quelques équipes principalement espagnoles et canadiennes, se focalise sur la mise au point de test de dépistage et d'inhibiteurs se liant aux ARN viroidaires (Perrault, 2002).

## Une biologie moléculaire hors du commun

Il existe deux familles très différentes de viroïdes, mais ils partagent les caractères suivants, qui les différencient des virus :

- Les ARN viroïdes sont répliqués par des transcriptases cellulaires DNA dépendantes qui sont « détournées » de leur fonctionnement normal.
- ils existent à l'intérieur des cellules en tant que molécules d'ARN uniquement, sans synthèse de capsidite ou d'enveloppe.
- ils sont formés d'un seul ARN circulaire contenant entre 246 et 399 nucléotides (masse de 80 à 125 kDa). Ces ARN comprennent une forte proportion de GC (53 à 60 %)
- Ils ne codent dans la majorité des cas pour aucune protéine. Un viroïde, celui du sunblotch de l'avocatier, ASB-Vd, code, tout comme l'agent delta de l'hépatite D (voir plus loin).
- Les virus recopient leur ARN dans le cytoplasme ou le noyau alors que l'ARN des viroïdes se recopie dans des organites à double membrane (noyau ou chloroplaste selon le groupe).

## Des acides nucléiques particulièrement résistants

L'ARN circulaire se replie et s'apparie partiellement : la structure secondaire d'un viroïde est un mélange d'hélices et de boucles, car leur séquence est un palindrome imparfait. De longues régions complémentaires bicaténaires espacent les « boucles ». Leur forme est susceptible de passer par plusieurs conformations dans les cellules, en liaison avec leurs fonctions à ce moment-là.

Leur compacité les rend très résistants aux enzymes de dégradation (nucléase et RNases), ce qui est plus qu'inhabituel pour des ARN, ainsi qu'aux facteurs physiques : si on prend l'exemple du PST-Vd, la dénaturation ne commence qu'à 55°C à pression atmosphérique, et n'augmente fortement qu'après 65°C (viroïdes, 17)

## Deux familles « infectant » les noyaux ou les chloroplastes

Les viroïdes sont classés à partir des motifs structuraux conservés de leurs séquences. On considère, arbitrairement, qu'une nouvelle espèce nécessite un taux de similitude < 90 %, mais il existe une dizaine de viroïdes « non classés » de façon précise. On distingue deux groupes de viroïdes :

— les pospoviroidae (ou groupe A), majoritaires (31 espèces), comprennent les espèces à répllication nucléaire possédant une région centrale identique (CCR) et différents domaines caractéristiques. Leur structure secondaire leur confère une forme en paillette sur laquelle on identifie 5 domaines différents. Deux domaines terminaux gauche et droit (TI et Tr, conservés, en boucle TCH ou linéaire TCR) encadrent la région C (Centrale) contenant des motifs fortement conservés qui jouerait un rôle pendant la répllication, assurant le clivage et la ligation chez PTSVd. La région C est flanquée par le domaine P (Pathogénèse) dont la séquence varie en conditionnant la « virulence » de la souche (sévère ou atténuée pour le PSTVd et CEVd) et par le domaine V (Variable).

Ces viroïdes sont dépendants, pour leur clivage, des RNAses de leur hôte.

TI-P-C (avec CCR)— V-Tr

Ces viroïdes possèdent une structure secondaire en tige constituée d'une alternance de régions double brin séparées par des boucles simple brin

— les *asunviroidae* (ou groupe B), regroupent quatre viroïdes à répllication chloroplastique possédant des séquences à activité autocatalytique intervenante au cours de leur répllication. Ces zones sont des ribozymes « en tête de marteau » (les plus courts des ribozymes connus) existant aussi sur des ARN satellites de virus végétaux. Ils ne possèdent pas de région centrale CCR. Ce sont les seuls pathogènes connus capables de pénétrer et de se reproduire dans les chloroplastes.

La structure secondaire de ces viroïdes est le plus souvent circulaire, mais deux espèces (infectant les pêchers et les chrysanthèmes) possèdent une structure secondaire ramifiée, comportant plusieurs boucles et « épingles à cheveux ». (Hernández & Flores, 1992 ; Bussière *et al*, 2000 ; Gago *et al*, 2005)

## Déroulement d'une infection

La répllication et l'action des viroïdes, processus purement moléculaire, sont favorisées par des températures (et une luminosité) élevées (ils sont donc particulièrement virulents sur les cultures des zones intertropicales, ou sur les cultures sous serre).

Après pénétration de la cellule, le transport vers le noyau, indépendant de l'hydrolyse du GTP, est réalisé spécifiquement par un facteur encore inconnu.

Même des RNA viroïdes de synthèse (presque le premier être « vivant » synthétique) se dirigent rapidement dans le noyau, alors que les ARN de même taille restent habituellement dans le cytoplasme. Dans le noyau, les viroïdes peuvent se répartir dans le nucléoplasme ou se concentrer au niveau du nucléole. Pour le PSTvd au moins, cette concentration pourrait être liée à un transport par une protéine cellulaire impliquée en temps normal dans le transport des ARNr 5S, avec lesquelles certains viroïdes possèdent des analogies structurales (régions formant des structures tertiaires semblables, fortement conservées dont d'une importance fonctionnelle majeure — Branch *et coll.*, 1985). En effet, il existe dans la séquence de ce viroïde (au niveau de la boucle terminale E) des motifs en boucles (réseau de liaisons non Watson-Crick) qui sont également présents chez cet ARN ribosomal et sont impliqués dans sa synthèse et son transport du nucléoplasme vers le nucléole.

Après réplication, certains des viroïdes répliquants sortent du noyau en empruntant une voie inconnue, alors que d'autres y demeurent.

Des séquences correspondant à des motifs (formes) spécifiques permettent le transfert des viroïdes d'une cellule à l'autre par les plasmodesmes (le transport à longue distance étant réalisé par le phloème).

Les viroïdes chloroplastiques (avec ribozymes) peuvent aussi se répliquer dans les amyloplast, les proplast, les étioplast et chromoplast. Ils s'accumulent au niveau de la membrane des thylakoïdes.

La façon dont ils entrent et sortent du chloroplaste est totalement inconnue. Il est possible que le mécanisme permettant leur entrée soit voisin de celui utilisé pour pénétrer dans le noyau et soit lié à l'existence d'une double membrane.

La plante utilise divers mécanismes de défense contre les viroïdes : les quantités de polyamines, de protéines PR et d'éthylène sont modifiées pendant une infection.

## Mode d'action

il se pourrait que les viroïdes inactivent certains gènes à distance dans « l'organisme plante ». Cette inactivation est produite selon les modalités du « gene silencing » (Sanger & al, 1996), les viroïdes étant inducteurs ou cibles de ce mécanisme (Itaya *et al*, 2001 ; Martínez de Alba *et al*, 2002 ; Papaefthimiou *et al*, 2001 ; Vogt *et al*, 2004).

C'est la région P (Keese & symons, 1985), pauvre en adénine, qui a pu être reliée tout d'abord à l'effet pathogène, mais d'autres résultats (Sano & al, 1992) indiquent que l'intégralité du viroïde peut se trouver impliquée. En effet, des ANR viroïdaires (de 21 à 25 nucléotides) ressemblent fortement aux ARNi de petite taille majoritairement impliqués dans le RNA silencing. (Martínez de Alba *et al*, 2002 ; Papaefthimiou *et al*, 2001). Les ARN viroïdaires constituent dans la cellule une véritable population de taille variée pouvant

influer à des niveaux multiples. Ainsi, leurs effets délétères ne sont pas liés à une médiation protéique.

## Reproduction

Les viroïdes, bien que constitués uniquement d'ARN, ne codent pour aucune protéine. Ces agents infectieux étant uniquement de nature nucléique, ils agissent dans le monde des gènes. Ils utilisent le protéome cellulaire préexistant à leur avantage pour se reproduire.

Pendant leur réplication, ils adoptent des structures secondaires métastables en épingle à cheveux, préservées dans différents types de viroïdes, ce qui signale leur importance.

L'utilisation de divers inhibiteurs des RNAPol (α-amanitine) a permis de montrer que c'est la RNAPol II qui est impliquée dans la réplication des viroïdes ( PSTVd and related viroids) Warrilow & Symons, 1999). Cette enzyme est donc détournée de son rôle physiologique (synthèse d'ARNm à partir de l'ADN). Les chercheurs ignorent encore les modalités de ce détournement enzymatique, qui pourrait être lié à la présence de séquences spécifiques (créant une forme spécifique ?) initiant la transcription et signalant sa fin.

Certains viroïdes (ASB-Vd) semblent utiliser la RNAPol d'origine chloroplastique codée par le noyau cellulaire ( nuclear-encoded chloroplastic RNA polymerase - NEP), qui ressemble à une RNAPol bactérienne. On doit remarquer que cette polymérase, résistante à la tagetitoxin, présente une similarité structurale avec les RNAPol des phages T3 et T7. Les viroïdes se reproduisent en utilisant un mécanisme de « cercles roulants », lui-même servant de modèle pour leur réplication. Certains viroïdes ont des propriétés enzymatiques, réalisant le clivage et la liaison de morceaux d'ARN à partir de précurseurs plus long, et créant ainsi de nouvelles séquences viroïdaires.

Les Pospiviroidae se reproduisent dans le noyau cellulaire. La RNAPol recopie l'ARN circulaire des viroïdes en une copie linéaire, complémentaire (et non identique) à la première. Ce premier brin d'ARN est dit « négatif » de l'autre. Il devra être recopié une

seconde fois pour obtenir un brin identique à celui initial (un brin linéaire, dit positif). Des enzymes cellulaires découpent cette copie à chaque début de répétition du génome, ce qui aboutit à la libération de plusieurs copies positives qui se refermeront en cercle pour donner de nouveaux viroïdes.

La seconde famille de viroïdes, les Avsunviroidae (ils ne sont que deux:avocado sunblotch viroid et peach latent mosaic viroid) se reproduisent dans les chloroplastes (sont ils les descendants de formes de vies infectant les bactéries photosynthétiques ancêtre des chloroplastes avant que celles-ci ne deviennent des organistes des cellules eucaryotes?). La RNA polymérase crée une longue copie négative de l'ARN viroïdaire. Cette copie « - » contient des séquences à activité enzymatique, des ribozymes, qui catalysent sa formation elle-même. Ces ribozymes en « tête de marteau » se forment transitoirement pendant l'élongation du brin, l'emplacement du site d'initiation de la copie étant crucial pour la formation du ribozyme lui-même (Delgado *et al*, 2005). Plusieurs ribozymes doivent s'associer pour être actifs (Forster *et al*, 1988).

Les ribozymes viroïdaires découpent l'ARN en morceaux contenant 5'— hydroxyl et du 2', 3' — phosphate cyclique. Ce n'est pas là une réaction d'hydrolyse, car le nombre de liaisons phosphodiester est maintenu et la réaction de transestérification est théoriquement réversible.

La réaction de coupure est une attaque nucléophile d'un 2'— hydroxyle sur un phosphate au site de coupure. Les fragments obtenus possèdent des extrémités 2',3'— phosphate cyclique et 5' — hydroxyle.

Les ribozymes des viroïdes sont bien plus simples que ceux identifiés chez certains eucaryotes et chargés de l'excision des introns lors de la transcription.

Le brin négatif restant reprend sa forme circulaire et est recopié en un brin +. C'est alors que le ribozyme (-) intervient encore, en découpant le long brin + pour donner des unités qui, se refermant sur elles-mêmes, donnent de nouveaux viroïdes. Ce type de réplication ne nécessite qu'une RNAPol cellulaire, c'est donc une voie principalement basée sur les propriétés de l'ARN en tant que génome et enzyme. Ainsi, il semble bien que la soudure des brins +, pour former des boucles, soit réalisée automatiquement par l'ARN lui-même

ou sa partie ribozyme (Une RNA ligase pourrait intervenir, mais cette molécule n'a jamais été mise en évidence dans le chloroplaste où se passe la réplication). Ainsi, pour le viroïde PLM, les monomères linéaires, provenant du découpage réalisé par un ribozyme, peuvent s'autoassembler au moyen d'une liaison phosphodiester 2',5'.

On doit remarquer que la forme circulaire des viroïdes leur permet de ne pas posséder de séquences spécifiques signalant le début et la fin de la réplication.

Ces deux modes de reproduction sont peut être liés à deux origines évolutives différentes.

Le brin négatif n'est donc pas qu'un simple intermédiaire : il présente des propriétés spécifiques, et pas seulement au niveau de la formation des ribozymes, pour les enzymes cellulaires.

Les brins positifs, au niveau nucléaire, sont ainsi transportés jusqu'au nucléole, où les précurseurs des ARNt et ARNm sont aussi exportés. Tout ce passe comme si un récepteur spécifique à ce brin existait dans le noyau, assurant un transport des brins indépendant du cytosquelette et distinct du Cycle Ran GTPase dépendant qui assure le transport nucléaire de beaucoup de protéines et d'acides nucléiques (Woo *et al*, 1999 ; Zhao *et al*, 2001).

Cinq domaines structurels et fonctionnels ont été identifiés : le central, le pathogène, le variable et deux domaines terminaux. La région conservée à l'intérieur du central (CCR) est propre aux Pospiviroidae. Elle correspond à une structure secondaire spécifique jouant un rôle important dans la réplication viroïdaire.

Les Avsunviroidae n'ont pas de CCR, mais possèdent des propriétés autocatalytiques. (Góra-Sochacka 2004). Leur reproduction fait appel à un mécanisme par « cercle roulant » s'effectuant en 2 temps, selon 2 voies dépendant des deux familles principales, avec des formes intermédiaires principalement constituées d' RNA (Branch & Robertson, 1981, 1984)

On retrouve dans les 2 cas :

- synthèse de brins de longueur très supérieure à l'original par une RNA polymérase DNA dépendante détournée de sa fonction et « forcée » à transcrire de l'ARN à partir d'ARN.
- ajustement par coupure, autocatalytique ou pas, de la longueur des brins copiés
- soudure (par une ARN ligase cellulaire ou autocatalysée) des extrémités et repliement pour former un nouvel « individu » circulaire (Flores 2004)

## Réplication

### première voie de reproduction (mode asymétrique) :

Le viroïde, dit cercle +, est recopié par RNA polymérase RNA dépendante cellulaire. On obtient un ARN linéaire qui est le « négatif » de la séquence infectieuse. Cette réplication est inhibée par l'alpha amanitine, molécule inhibitrice de la RNAPol II. Le brin obtenu est ensuite recopié par les enzymes cellulaires, et cette copie se circularise pour donner un nouveau viroïde.

le clivage est réalisé par une RNase, la soudure par une RNAligase cellulaire

Dans le chloroplaste, deux autres polymérases, dont l'une est similaire à celle de Ecoli, seraient impliquées dans la synthèse des répliants.

### deuxième voie (symétrique, d'intérêt évolutif majeur)

Le viroïde circulaire est recopié en une séquence négative qui se clive seule grâce aux activités des séquences ribozyme en forme de tête de marteau. Ces séquences sont les plus courtes connues possédant une activité catalytique. La copie clivée se circularise et est recopiée en positif avec de nouveau clivage autonome. On obtient un nouveau viroïde.

## Phylogénie éventuelle

Ceci semblerait indiquer que le codage aurait été perdu de façon secondaire, faisant des viroïdes les parasites ultimes, où qu'il résulterait d'un transfert de gène au cours d'une longue histoire évolutive...

Dans les chloroplastes (ce qui pourrait s'expliquer par leur histoire évolutive s'ils ont déjà été parasites de la bactérie à l'origine des chloroplastes).

Plusieurs hypothèses ont été avancées concernant l'origine des viroïdes : composantes d'origine cellulaire asymptomatiques provenant de plantes sauvages, transposons ou introns devenus autonomes, ARN « signaux » impliqués dans des échanges de matériel génétique entre cellules où (et c'est ce qui nous intéresse au premier chef) reliques du monde à ARN.

De nombreuses données appuient une origine ancestrale des viroïdes :

- les structures autocatalytiques viroidales sont beaucoup plus simples que les ribozymes excisant les introns de certains eucaryotes.
- faible taille et teneur en GC favorisent la stabilité des molécules
- réduction des risques d'erreurs par les polymérases primitives
- absence de séquences d'amorçage et de terminaison rendue possible par leur forme circulaire
- ribozyme en tête de marteau (*hammerhead*) assurant traitement autocatalytique des molécules neosynthétisées. de très petite taille : (un motif de 19 nucléotides suffit pour former un ribozyme actif et spécifique)

Il est donc possible que nous soyons en présence de reliques du monde ARN devenus parasites des eucaryotes et même des virus ! Ces derniers peuvent présenter des ARN satellites de type virusoïdes. Ainsi, sobemovirus, polerovirus et Nepovirus sont « accompagnés » d'ARN « satellites » qui ressemblent fortement (présence de séquences hammerhead) à des viroïdes.

Toutefois, l'existence de capacités ribozyme inconnu chez les virus, est un argument solide en faveur d'une origine extrêmement lointaine des viroïdes, qui serait donc totalement indépendants des virus au plan phylogénique.

L'analyse des séquences (Elena, 1991) montre que les viroïdes et autres ARNsatellites constituent un groupe monophylétique (même ancêtre) comprenant deux familles, celle des 2 types de viroïdes proprement dits et celle des sARN. Les viroïdes seraient la forme

ancestrale des SARN (Diener TO, 1995). En couplant cette analyse à celle des mécanismes biochimiques de réplication, Bussière & al. (1995) que le viroïde du pêcher (PLM Viroid - peach latent mosaic) est un fossile moléculaire survivant du monde d'ARN, bien plus ancien que les premières cellules. (cette même équipe propose également un mode de réplication de ce viroïde minimisant l'utilisation de protéines, ce qui serait logique dans l'optique où cet « organisme » proviendrait d'un monde initialement sans protéines...). Elena & al. (91) remarquent aussi que les trois activités enzymatiques nécessaires à la réplication des viroïdes et des sARN (RNA polymérase ARN dépendante, RBAs et RNA ligase) sont précisément celles pour lesquelles une activité ribozyme correspondant a été mise en évidence.

Des expériences de mutagenèse dirigée montrent, de plus, que les viroïdes, exposés à des pressions de sélection, sont capables d'évoluer extrêmement rapidement, une quasi-espèce devenant dominante en quelques jours ou semaines. La plasticité de leur génome permet aux viroïdes d'être le plus rapide système biologique évolutif connu.

*Alors que les rétrovirus sont des parasites de la traduction, les viroïdes agissent en amont, se comportant en parasites de la transcription. Leur origine remonte peut être à une époque précellulaire, ils pourraient être les survivants du « monde d'ARN » apparu avant la vie sur notre Planète.*

Autre hypothèse, l'origine des viroïdes serait endogène et résulterait de la circularisation d'introns excisés d'ARN prémessagers. C'était l'hypothèse première de leur découvreur, T.O. Diener (1981 - Are viroids escaped introns ?), mais des travaux plus récents et la découverte de l'activité enzymatique des ARN mêmes chez les eucaryotes, conforte plutôt une autre hypothèse : celle de structures survivantes du monde précellulaire. Toutefois, certains chercheurs voient encore les viroïdes comme des introns dégénérés (Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures. Volume 14, Numéro 4, 405-6, juillet — août 2005, brèves )

On a émis l'hypothèse qu'il pourrait s'agir de reliques précellulaires autorépliquables qui auraient acquis des propriétés parasitaires au contact de cellules végétales ou qui se seraient associées à un virus assistant (Croden).

Quelques propriétés des viroïdes, en particulier la présence des ribozymes, suggèrent qu'ils pourraient avoir apparus très tôt lors de l'évolution et pourraient représenter des « fossiles vivants » du monde précellulaire à ARN qui a probablement précédé notre monde actuel basé sur l'ADN et les protéines. (A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid FLORES Ricardo ;)

On peut remarquer une analogie structurale entre les viroïdes et les ARNt des cellules eucaryotes. On retrouve les mêmes motifs boucle et lignes, organisés en trèfles. Les ARNt sont 3 fois plus courts (60 à 95 nucléotides) que les viroïdes et comprennent dihydro-uridine et pseudo uridine dont on ne trouve pas trace chez les viroïdes. Cette convergence de forme peut être une simple homologie moléculaire, mais peut-être (et c'est là une idée personnelle) que les ARNt pourraient dériver des premiers ARN formés à l'aube de la vie. ARNt et viroïdes posséderaient alors un ancêtre commun.

La petite taille, la structure circulaire, la richesse en CG, l'activité autocatalytique et leur structure périodique font des viroïdes des candidats au titre de reliquats du monde précellulaire, du monde à ARN. (Diener, 1989). Après le développement des formes de vies à ADN, les viroïdes auraient évolué pour parasiter certaines cyanobactéries, ancêtres des chloroplastes, puis les cellules eucaryotes elles-mêmes. La divergence des viroïdes en deux groupes (ou plus, nous n'observons que les survivants les plus « visibles »...) aurait été causée par des mutations et des recombinaisons au cours de leur histoire. (Elena *et al*, 2001).

Plusieurs observations permettent de conforter cette hypothèse :

- le motif « boucle E » initialement mis en évidence sur les rRNA5S, est également présent dans le CCR des PSTVd et joue un rôle dans la ligature des brins.
- Retrovirus et viroïdes possèdent des motifs similaires à ceux retrouvés dans les ARNt
- le viroïde PSTV (Potato Spindle Tuber Viroïd) et l'ARNt de la tyrosine contiennent les mêmes motifs structuraux en « feuille de trèfle ». (Marie-Christine Maurel,) «

Autre structure surprenante : chez le virus TYMV (Turnip Yellow Mosaic Virus), l'amorce de la traduction du génome du virus en protéine se fait par le biais d'une structure de type ARNt qui amorce sa propre traduction et qui fixe un acide aminé.

## Une structure viroïdique infectant les cellules animales : l'agent delta

L'agent delta (ainsi nommé à cause de spécificité) n'infecte que les porteurs du virus de l'hépatite B. Il a été mis en évidence sous l'acronyme VHD par M Rizzetto (1977).

Tout comme les viroïdes, cet agent est constitué d'un ARN circulaire simple brin de 1679 nucléotides. Toutefois, cet ARN donne naissance à une copie (antigénome) comportant une zone codante permettant la synthèse d'une protéine, l'antigène delta, qui se fixera ensuite à l'ARN viral (plus petit génome de virus connu). L'antigénome sert de modèle pour la synthèse de plusieurs génomes complets, synthèse se produisant dans le noyau des hépatocytes. La partie du génome non codante se clive et se lie toute seule, par activité ribozyme (Chanberlain, 2000). Le génome de l'agent delta se réplique selon le même mécanisme que les viroïdes (cercle roulant) et dans le même lieu. On a donc bien là une interaction entre ARN/protéine dans une même structure. Cette molécule dirige la réplication, la morphogénèse et la libération des nouveaux virus.

Une fois répliqué, cet ARN se fabrique une première enveloppe (nucléocapside) constituée de l'antigène delta et de deux autres protéines qui en dérivent, p27D et p29D, mais cette capsid ne lui permet pas de sortir de la cellule : pour cela, il est nécessaire qu'il trouve dans la même cellule une enveloppe "clef en main" fournie par l'activité d'un autre virus d'hépatite, le VHB. Ces deux virus sont donc "associés", le virus de l'hépatite B étant également une "cible" de l'agent delta qui peut être décrit comme étant également un parasite de virus. Il existe trois génotypes différents de VHD liés à la sévérité des affections provoquées et à leur emplacement géographique)

Le VHD recouvert de l'enveloppe du VHB (et portant les antigènes de ce dernier) mesure 35 à 37 nanomètres.

Il existe une grande complémentarité entre l'ARN viroïdique et l'ARN7S des hépatocytes. En agissant sur cet ARN (appariement et destruction), le viroïde provoque la mort des hépatocytes.

À l'échelle mondiale, plus de 5 % des personnes infectées par le virus de l'hépatite B le sont aussi par celui de l'hépatite D. On considère qu'il existe plus de 20 millions de personnes infectées par le VHD, virus susceptible de déclencher des épidémies (Naples en 1977, Indiens Yupca du Venezuela en 1981, Colombie, Brésil et en République

centrafricaine). Ce virus est également présent chez d'autres primates, avec de très légères différences.

— La taille du VHD dépasse de 3 à 7 fois celle des viroïdes, mais ne représente que le quart de la taille des plus petits virus humains

— Le génome présente des homologies de structure avec les viroïdes, richesse en liaisons guanidine-cytosine, séquences d'appariement de ses nucléotides (82).

Toutes ces constatations apparentent plutôt le VHD aux virus des plantes, ce qui pose le problème de son origine (43).

Le VHD représente un des éléments d'une nouvelle classe d'agents, les virusoïdes. Ces derniers possèdent un génome court (220 à 388 nucléotides) non codant et se répliquent dans le cytoplasme, en présentant une activité autocatalytique. Leur réplication est similaire à celle des viroïdes, excepté sur un point capital : elle ne peut se produire qu'en présence d'un autre virus, le "helper" qui, pour les 5 virusoïdes connus, fait toujours parti de la famille des Sobemovirus. Les enzymes virales peuvent faciliter la réplication de l'ARN virusoïdaire, lequel se retrouve embarqué comme "génome clandestin" dans la capsid virale de l'helper.

## Références

BRANCH A.D., BONNIE J. BENENFELD, AND HUGH D. ROBERTSON. Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 82, pp. 6590-6594, October 1985

Bussière F, Lafontaine D, Côté F, Beaudry D, Perreault JP. Evidence for a model ancestral viroid. Nucleic Acids Symp Ser. 1995 ; (33) : 143-4.

Chamberlain N - Microbiology and Immunology Department - Kirksville college of osteopathic medicine

CODEN CRASEV. Les agents pathogènes des plantes : champignons, bactéries, virus, viroïdes (Plant Pathogenic Agents: Fungi, Bacteria, Viruses, Viroids). Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie (C. r. Acad. sci., Sér. 3, Sci. vie)

*Daròs J.A. et al Viroids : models for RNA structure and biology. EMBO reports VOL 7 I NO 6 I 2006*

*Daròs JA, Santiago F. Elena & Ricardo Flores. Viroids : an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. EMBO reports (2006) 7, 593–598. doi:10.1038/sj.embor.7400706*

Diener TO, Raymer WB (1967) Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science* 158 : 378–381

Diener TO. Discovering viroids--a personal perspective. Nat Rev Microbiol. 2003 Oct;1(1): 75-80. University of Maryland Biotechnology Institute, College Park, Maryland 20742, USA. diener@umbi.umb.edu

Diener TO. Origin and evolution of viroids and viroid-like satellite RNAs. Virus Genes. 1995;11(2-3):119-31. <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/PRIONS.HTM>

Flores R, Delgado S, Gas ME, Carbonell A, Molina D, Gago S, De la Peña M. Viroids : the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. FEBS Lett. 2004 Jun 1;567(1): 42-8. Links

Flores Ricardo. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. 2001, vol. 324, no 10, pp. 873-963 (49 ref.), pp. 943-952

Góra-Sochacka A. Viroids : unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochim Pol.* 2004 ; 51(3) : 587-607.

Hadidi A., Flores R, Randles JW, Semancik. viroids. JS 2003, CSIRO publishing

Hadidi A. (Editor), Ricardo Flores (Editor), John W. Randles (Editor), Joseph S. Semancik (Editor) Viroids. Science Publishers (March 2003)

HEINZ L. SANGER, GUNTHER KLOTZ, DETLEV RIESNER, HANS J. GROSS, AND ALBRECHT K. KLEINSCHMIDT. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 73, No. 11, pp. 3852-3856, November 1976

Lepivre P. phytopathologie Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes, de boek université, 2003 ,64-66

Palukaitis, P. (1987) Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology* 158, 239-241.

Maramorosch K. Viroids and Satellites: Molecular Parasites at the Frontier of Life

Salazar, L.F. (1989) Research activities in CIP on sweet potato virus diseases. In : *Improvement of sweet potato (Ipomoea batatas) in Asia*, pp. 189-194. International Potato Center, Lima, Pérou.

Salazar, L.F. ; Owens, R.A. ; Smith, D.R. ; Diener, T.O. (1983) Detection of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization with tuber sprouts and true potato seed. *American Potato Journal* 60, 587-597.

Salazar, L.F. ; Balbo, I. ; Owens, R.A. (1988) Comparison of four radiocative probes for the diagnosis of potato spindle tuber viroid by nucleic acid spot hybridization. *Potato Research* 31, 431-442.

Singh, R.P. (1973) Experimental host range of the potato spindle tuber "virus". *American Potato Journal* 50, 111-123.

Werner-Solska, J. (1983) [Transmission du potato tuber viroid par les insectes — analyse des données bibliographiques]. *Biuletyn Instytutu Ziemiaka* No. 29, pp. 57-62.

Weidemann, H.L. (1987) The distribution of potato spindle tuber viroid in potato plants and tubers. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 17, 45-50.