

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①① N° de publication : **2 884 259**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **05 03519**

⑤① Int Cl<sup>8</sup> : C 12 Q 1/70 (2006.01), C 12 Q 1/68, C 07 H 21/00,  
C 12 R 1/94

①②

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 08.04.05.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 13.10.06 Bulletin 06/41.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été  
établi à la date de publication de la demande.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA  
RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA — FR, FEDERA-  
TION NATIONALE DES PRODUCTEURS DE PLANTS  
DE POMMES DE TERRE — FR et GROUPEMENT  
NATIONAL INTERPROFESSIONNEL DES SEMEN-  
CES, GRAINES ET PLANTS — FR.

⑦② Inventeur(s) :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤④ PROCÉDE DE DETECTION D'ISOLATS DU VIRUS DE LA POMME DE TERRE Y (PVY) RESPONSABLES DE  
NECROSES.

⑤⑦ La présente invention concerne un procédé de détec-  
tion de souches du virus PVY consistant en un test SNP de  
mutations correspondant à R/K<sub>400</sub> et D/E<sub>419</sub>, la présence  
d'au moins une desdites mutations étant une indication de  
la présence d'une souche de PVY virulente responsable de  
la nécrose chez les plantes de la famille des Solanacées, en  
particulier chez la pomme de terre.

FR 2 884 259 - A1



5 La présente invention concerne un procédé de détection du virus PVY consistant en un test SNP de mutations correspondant à R/K<sub>400</sub> et D/E<sub>419</sub>, la présence d'au moins une desdites mutations étant une indication de la présence d'une souche de PVY virulente pouvant être responsable de la nécrose chez les plantes de la famille des *Solanacées*, en particulier chez la pomme de terre.

10

Le virus de la pomme de terre Y (PVY), appartenant à la famille *Potyvirus*, est l'un des pathogènes des plantes les plus importants d'un point de vue économique (Milne, 1988 ; Shukla *et al.*, 1994). Tout d'abord signalé dans les années 1930 chez la pomme de terre (Smith, 1931), le PVY est maintenant distribué dans le monde entier sur de nombreux hôtes différents. Le virus est transmis par des pucerons selon le mode non persistant (Sigvald, 1984) et infecte plusieurs espèces de plantes cultivées appartenant à la famille des *Solanacées* (De Bokx et Huttinga, 1981 ; Brunt *et al.*, 1996).

Le génome viral est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 10 kb de longueur, avec une protéine VPg liée de manière covalente à son extrémité 5' et une queue poly-A à son extrémité 3'. L'ARN viral code une polyprotéine, qui est clivée en 9 produits par trois protéases codées par le virus (Dougherty et Carrington, 1988). Selon l'hôte dont on les a récolté à l'origine, les isolats de PVY ont été classés en quatre souches différentes correspondant aux souches pomme de terre, piment, tabac et tomate. Au sein de la souche pomme de terre, les isolats ont été caractérisés sur la base de leur propriétés biologiques (symptômes et réponses à différentes sources de résistance). Cette caractérisation a permis de définir différents groupes de virus. Ainsi, trois groupes de souches de pomme de terre : PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>C</sup> (De Bokx et Huttinga, 1981) ont été identifiées. Ces groupes sont notamment définis par le caractère systémique ou local des symptômes induits sur *Nicotiana tabacum* et *Solanum tuberosum*.

Les isolats appartenant au groupe PVY<sup>N</sup> induisent une nécrose des nervures sur les feuilles de *N. tabacum* cv. Xanthi et une très légère marbrure, avec seulement rarement des feuilles nécrotiques sur pomme de terre. Les isolats PVY<sup>O</sup> induisent seulement des symptômes de marbrure et de mosaïque sur tabac et une mosaïque légère à grave et une chute des feuilles sur pomme de terre. Finalement, les isolats PVY<sup>C</sup> induisent des symptômes de stries nécrotiques sur certains cultivars de pomme de terre.

Les isolats PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> sont responsables de pertes à haut rendement allant jusqu'à 40 à 70 % dans le cas des pommes de terre. Ainsi, la détection et l'identification efficace des isolats de PVY nécrotiques et non nécrotiques dans les cultures de pomme de terre sont un problème majeur pour les producteurs.

La caractérisation des isolats « pomme de terre » de PVY à tout d'abord reposé sur des tests biologiques. Cependant, une telle approche prend à la fois du temps et de l'espace et n'est pas facilement adaptable soit pour un diagnostic rapide soit pour un test à grande échelle.

Puis, pour remplir les besoins en un test fiable et rapide, des tests immuno-enzymatiques en sandwich à double ou triple anticorps (DAS- ou TAS-ELISA), utilisant des anticorps polyclonaux et/ou monoclonaux (Gugerli et Fries, 1983 ; Matt et Huttinga, 1987 ; Oshima et al., 1990 ; Sanz et al., 1990 ; Singh et al., 1993 ; Ellis et al., 1996), une approche par immuno microscopie électronique (Walkey et Webb, 1984) et par agglutination au latex (Berckx, 1967 ; Tallay et al., 1980) ont été développés.

Néanmoins, aucun de ces tests ne s'est avéré capable de discriminer les isolats capable ou non d'induire une nécrose (Mac Donald et Singh, 1996 ; Boonham et Barker, 1998 ; Ounouna, 2002).

En effet, la récente émergence de nouveaux variants de PVY<sup>N</sup> comprenant les isolats PVY<sup>NTN</sup> de la nécrose en tache annulaire sur tubercule (Le Romancer et al., 1994 ;

Kerlan et al., 1999) et les isolats PVY<sup>N</sup>-W (Chrzanowska, 1991) a souligné les limites des outils sérologiques disponibles. En effet, les anticorps monoclonaux et/ou polyclonaux spécifiques de PVY placent les isolats PVY<sup>N</sup>-W dans le groupe PVY<sup>O</sup>. De plus, les outils sérologiques ne sont pas capables de faire la distinction entre les isolats  
 5 PVY<sup>NTN</sup> et les isolats PVY<sup>N</sup>.

Quatre séquences complètes de PVY<sup>N</sup> (Robaglia et al., 1989 ; Jakab et al., 1997 ; Abdelmaksoud et Gamal Eldin, 2002 ; Nie et Singh, 2003), deux séquences complètes de PVY<sup>NTN</sup> (Thole et al., 1993 ; Nie et Singh, 2003) et une séquence complète de  
 10 PVY<sup>O</sup> (Singh et Singh, 1996) (numéro d'accès : PVYN-Fr : Do00441 ; PVYN-605 : X97895 ; PVYN-Egypte : AF522296 ; PVYN-Jg : AY166867 ; PVYNTN-H : M95491 ; PVYNTN-Tu660 : AY16866 ; PVYO-139 : U09509) ont été publiées.

En complément des outils sérologiques décrit ci-dessus, des tests moléculaires ont été  
 15 développés par différentes équipes. Cependant aucun de ces outils n'est capable de caractériser précisément les isolats de PVY inducteurs de nécroses. Pour résoudre ce problème, nous avons développé des outils moléculaires plus rapides, fiables et plus spécifique pour la détection des virus capable d'induire la nécrose de la plante infectée. En d'autres termes, l'invention apporte pour la première fois un test  
 20 permettant une telle discrimination entre les différents isolats et plus particulièrement une détection très sensible des PVY selon leurs propriétés biologiques différentes (par exemple, nécrose (Y<sup>N</sup>) ou marbrure (Y<sup>O</sup>)) liées aux propriétés biologiques réelles utilisées dans la classification du PVY.

25 Dans le cadre de nos investigations, nous avons découvert deux mutations chez ces différents isolats directement impliquées dans la nécrose, notamment la nécrose tuberculaire de la pomme de terre, et d'autres plantes de la famille des *Solanacées*.

Cette découverte n'a été rendue possible que par une approche de génétique inverse  
 30 lors de laquelle des mutations d'acides aminés situés dans la partie carboxy-terminale de la protéine HC-Pro ont été identifiées comme étant responsables de la nécrose.

L'invention ouvre désormais la voie à une détection systématique des isolats de PVY nécrotiques et non nécrotiques, ce qui permettra aux producteurs de diminuer très sensiblement le risque de perte de récolte.

5

## DESCRIPTION

Dans la description, on fera référence à la numérotation correspondant à la séquence NCBI numéro d'accèsion X97895 (**Jakab G.**, Droz E., Brigneti G., Baulcombe D.  
10 and Malnoe P. Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. J. Gen. Virol. 78 (Pt 12), 3141-3145 (1997)). La séquence nucléotidique et la séquence peptidique sont présentées respectivement aux SEQ ID No 1 et 2. Pour les souches PVY<sup>o</sup>, une séquence de référence est accessible dans NCBI sous le numéro U09509 (Singh M.  
15 and Singh R.P., Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of potato virus Y (PVY<sup>o</sup>). Can. J. Plant Pathol. 18, 209-214 (1996) (SEQ ID No 3 et 4), mais la numérotation se fera selon Jakab et al. (1997) par alignement.

20 Ainsi, dans un premier aspect, l'invention concerne un procédé de détection de la présence ou de l'absence de souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) extraction des acides nucléiques d'un échantillon de plante,
- 25 b) amplification RT-PCR d'une région de l'ARN viral de PVY comprenant les codons 738 et 757 (SEQ ID No 1 et 3) correspondant aux acides aminés 400 et 419 respectivement de la protéine HC-Pro (SEQ ID No 2 et 4, fig 7A et 7B),
- c) détection sur les cDNA obtenus à l'étape b) de la présence ou de l'absence de mutations correspondant à R/K<sub>400</sub> et D/E<sub>419</sub> au moyen i) d'au moins une sonde marquée  
30 spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et ii) d'au moins une sonde marquée

spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) présentant des marqueurs émettant un signal de fluorescence différent,  
la présence d'au moins une desdites mutations R/K<sub>400</sub> et D/E<sub>419</sub> étant une indication de la présence d'une souche de PVY virulente responsable de la nécrose chez les plantes  
5 de la famille des *Solanacées*.

Grâce à ce procédé, on détecte en un seul test les 4 génotypes/phénotypes suivants :

- [R<sub>400</sub> , D<sub>419</sub>] (souche incapable d'induire la nécrose)
- [R<sub>400</sub> , E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- 10 - [K<sub>400</sub> , D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub> , E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose)

Des exemples de séquences détectées comportant une de ces combinaisons de polymorphismes sont présentés à la figure 6B (SEQ ID No 14 à 19).

15 A titre d'exemple, on peut mettre en œuvre ce procédé chez la pomme de terre. Dans ce cas, la détection à l'étape d) de souches de PVY [R<sub>400</sub> , E<sub>419</sub>] et/ou [K<sub>400</sub> , D<sub>419</sub>] et/ou [K<sub>400</sub> , E<sub>419</sub>] est une indication que la plante de pomme de terre est contaminée avec une ou plusieurs souche(s) pouvant induire des nécroses tuberculaires (Figure 6A).

20 Dans un mode préféré de réalisation, on utilise comme **sonde i)** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 (correspondant à R/K<sub>400</sub>), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AAA avec le polymorphisme A<sub>2213</sub>. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :

25 K (Lysine) : AAA, AAG

De préférence, on utilise une sonde comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence capable de s'hybrider avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213,  
30 notamment la SEQ ID No 7 : ctcaaatgaaatattctac

On peut utiliser en outre une **sonde i) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AGA avec le polymorphisme G<sub>2213</sub>. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :

5 R (Arginine) CGT, CGC, CGA, CGG, **AGA**, AGG

A ce effet, on peut utiliser une sonde contrôle comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence capable de s'hybrider avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment la SEQ ID No 8 : **ctcaaatgagaatattcta**

10

Avantageusement, la sonde i) et la sonde i) contrôle sont marquées différemment.

Egalement dans un mode préféré de réalisation, on utilise comme **sonde ii)** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757 (correspondant à D/E<sub>419</sub>), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAA avec le polymorphisme A<sub>2271</sub>. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :

15

E (Glutamique) : GAA, GAG

20 De préférence, on utilise une sonde comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2271, notamment avec la SEQ ID No 9 ou SEQ ID No 10 qui sont des sondes spécifiques YN :

**5'- cgatcacgaacgcagaca - 3'** (SEQ ID No 9)

25 **5'- atcacgaacgcagaca - 3'** (SEQ ID No 20)

On peut utiliser en outre une **sonde ii) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAC avec le polymorphisme C<sub>2271</sub>. Le test peut être complété avec d'autres sondes en fonction d'autres polymorphismes sur ce codon :

30

D (Aspartique) : GAT, GAC

A ce effet, on peut utiliser une sonde ii) contrôle comportant de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment avec la SEQ ID No 10 : 5'- **accatgacactcaaa** -3' ou avec la SEQ ID No 21 : 5'- **tgacatgacactcaa** -3'

Avantageusement, la sonde ii) et la sonde iii) contrôle sont marquées différemment.

On peut utiliser des sondes telles que décrites ci-dessus comportant un marqueur fluorescent (reporter) et une molécule captant le signal lorsqu'elle se trouve à proximité du marqueur fluorescent (quencher).

Les étapes de RT et de PCR ont lieu l'une après l'autre dans le même tube. Lors de l'étape b), la transcription inverse est effectuée avec au moins 2 ou 4 paires d'amorces sens et antisens, plus particulièrement au moins une première paire permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY-N, au moins une deuxième paire permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY<sub>o</sub>.

Ladite première paire d'amorces (FpN et RpN) comprend de préférence une amorce sens FpN et une amorce antisens RpN pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 1 ou 5. L'amorce sens FpN se situe de préférence en amont du codon 738 polymorphique et l'amorce RpN se situe de préférence en aval du codon 757 polymorphique.

Dans une autre alternative, on met en œuvre deux premières paires :

- FpN1 en amont du codon 738
- RpN1 en aval du codon 738
- FpN2 en amont du codon 757
- RpN2 en aval du codon 757



Ladite deuxième paire d'amorces (FpO et RpO) comprend de préférence une amorce sens FpO et une amorce antisens RpO pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 3 ou 6. L'amorce sens FpO se situe de préférence en amont du codon 738 polymorphique et  
 5 l'amorce RpO se situe de préférence en aval du codon 757 polymorphique.

Dans une autre alternative, on met en œuvre deux deuxième paires :

- FpO1 en amont du codon 738
- RpO1 en aval du codon 738
- FpO2 en amont du codon 757
- 10 - RpO2 en aval du codon 757

Ce mode de réalisation préféré n'est pas limitatif. En effet, l'invention vise également un procédé tel que défini ci-dessus dans lequel l'étape b) comprend l'utilisation de nombreuses paires d'amorces couvrant l'ensemble du spectre des virus PVY.

15

Un exemple de réalisation est illustré à la figure 2. Parmi ces amorces, on peut citer les SEQ ID No 11 et 12.

Dans un mode préféré de réalisation, les amorces des deux paires sont choisies parmi :

20 Amorces sens pour YN

SEQ ID No 22 F1 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGT-3'

SEQ ID No 23 F2 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGTC-3'

SEQ ID No 24 F3 : 5'-CATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTA-3'

Amorces anti-sens pour YN :

25 SEQ ID No 28 R1 : 5'-GTGAGCCAAACGAGTCAACTACAT-3'

SEQ ID No 29 R2 : 5'-TTTGTGAGCCAAACGAGTCAACTA-3'

SEQ ID No 30 R3 : 5'-TTGTGAGCCAAACGAGTCAACT-3'

Amorces sens pour YO

SEQ ID No 25 F1 : 5'-GCAGAGCTGCCTAGTTTATTGGTT-3'

30 SEQ ID No 26 F2 : 5'-ATGATGCAGAGCTGCCTAGTTTATT-3'

SEQ ID No 27 F3 : 5'-TGCAGAGCTGCCTAGTTTATTGG-3'

Amorces anti-sens pour YO :

SEQ ID No 31 R1 : 5'-GCCAAATGAGTCAACCACATGA-3'

SEQ ID No 32 R2 : 5'-AGCCAAATGAGTCAACCACATG-3'

SEQ ID No 33 R3 : 5'-CCAAATGAGTCAACCACATGACA-3'

5

L'invention porte également sur un procédé de sélection sanitaire de plants appartenant à la famille des Solanacées susceptibles d'être contaminés par des souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires, notamment de  
 10 systématique du procédé de détection mentionné ci-dessus sur les semences, plants et/ou plantes susceptibles d'être mis en culture et procéder à la destruction ou mise sous quarantaine desdites semences, plants ou plantes contaminés avec une souche présentant au moins un des polymorphismes correspondant à

- [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- 15 - [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose)

Le contrôle sanitaire peut être effectué comme mentionné ci-dessus avec des semences, plants et/ou plantes importés dans un territoire donné, par exemple entrant  
 20 dans l'Union Européenne ou au Canada ou encore provenant de zones à risque.

Dans un autre aspect, l'invention concerne un kit de détection de la présence ou de l'absence du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend :

25

- au moins une première paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY<sup>N</sup>, au moins une deuxième paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY<sup>O</sup>.

30

- au moins une sonde marquée i) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et au moins une sonde marquée ii) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) étant telle que décrite ci-dessus et présentant des marqueurs émettant des signaux de fluorescence différents.

5

Le kit peut comprendre également les sondes i) et ii) de contrôle telles que décrites précédemment, les sondes i) et contrôle i) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents, les sondes ii) et contrôle ii) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents.

10

Le kit peut également comprendre des moyens d'extraction des acides nucléiques d'un échantillon de plante, par exemple un tampon de broyage et un tampon d'extraction des ARN viraux tels que décrits ci-après. Le Kit peut également comprendre les réactifs nécessaires à l'amplification et/ou un dispositif de détection qualitative et quantitative des signaux de fluorescence.

15

A titre d'exemple, le kit peut comprendre une solution comprenant les amorces pour qu'elles puissent être utilisées à une concentration optimale se situant entre 400 nM et 1200 nM, notamment 800 nM et une solution comprenant les sondes à une concentration se situant entre 100 nM et 300 nM, notamment 200 nM.

20

Dans un autre aspect, l'invention se rapporte à une sonde ou amorce et aux collections de sondes et collection d'amorces mentionnées ci-dessus.

25 Dans un autre aspect, l'invention concerne l'utilisation desdites sondes et amorces et collections de sondes et amorces pour la détection de la présence ou de l'absence du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, notamment chez la pomme de terre et aussi l'aubergine, la tomate, les piments ou le tabac.

30

Ainsi, dans la présente invention, nous proposons un dosage à base de polymorphisme nucléotidique pour la détection des isolats PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup>, qui cible un marqueur moléculaire spécifique lié à la capacité des membres du groupe de PVY<sup>N</sup> à provoquer une nécrose. Le protocole développé comprend un mode opératoire rapide pour  
5 l'échantillonnage des plantes, un processus d'extraction de l'acide nucléique rapide ("feuille humide") et une réaction de RT-PCR fluorescente en une seule étape (en utilisant au moins deux sondes TaqMan®), qui ne nécessitent pas de manipulation post-PCR.

10 De telles caractéristiques font qu'il est possible d'effectuer jusqu'à 96 tests en moins de 3 heures, à partir de l'échantillonnage de la plante jusqu'à la génération des résultats diagnostiques.

Le test de diagnostic à base de SNP tel que décrit ci-dessus a permis la détection fiable  
15 de 42 isolats de pomme de terre de PVY de 13 pays et a été capable de les assigner de manière correcte dans les groupes PVY<sup>N</sup> ou PVY<sup>O</sup>. Les échantillons contenant plus de 10<sup>4</sup> copies de l'ARN de PVY<sup>N</sup> et/ou PVY<sup>O</sup> ont été efficacement détectés par ce test et ce dernier rend possible la co-détection de PVY<sup>N</sup> et de PVY<sup>O</sup> dans les infections mixtes.

20

Ce nouvel outil de détection combine une sensibilité élevée des techniques de détection moléculaire avec rapidité (séries de RT-PCR effectuées en environ deux heures), simplicité (pas de kit d'extraction nécessaire pour la préparation de l'échantillon et mode opératoire sans gel) et une compatibilité avec les postes de travail  
25 robotiques utilisés pour les dosages sérologiques. Les principales améliorations offertes par ce test pour la détection de PVY sont tout d'abord le choix d'utiliser la technologie SNP, habituellement appliquée pour les dosages de discrimination allélique, les études de ségrégation génique et la cartographie chromosomique d'organismes diploïdes (pour une revue, voir Oefner, 2002).

30 En outre, nous apportons pour la première fois un test permettant de détecter spécifiquement les isolats de PVY qui induisent la nécrose par rapport aux isolats

avirulentes grâce à l'identification des caractéristiques des nucléotides polymorphes cités ci-dessus. Appliquée à des organismes haploïdes (tels que des virus à ARN simple brin), la technologie de l'invention a le potentiel d'identifier des échantillons contenant seulement une (visualisée comme homozygote) soit une combinaison de  
 5 deux variants (considérées par le test comme hétérozygote) de la séquence polymorphe ciblée.

Ainsi, l'invention porte également sur un lot de semences, plants et/ou plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de semences, plants ou  
 10 plantes contaminés par le PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :

- [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose).

15

Parmi ces lots, l'invention vise des lots de tomates, piments, tabac, poivron et aubergines. De préférence, l'invention vise un lot de plants ou tubercules de pomme de terre, caractérisé en ce que qu'il est dépourvu de plants ou tubercules contaminés avec une souche de PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :

- 20 - [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose).

Les lots précités sont susceptibles d'être obtenus par la mise en œuvre du procédé ou  
 25 du kit décrit ci-dessus.

Pour la suite de la description, on fera référence aux légendes des figures.

### Légendes des figures

30

**Figure 1 : Séquences encadrant les polymorphismes responsables de la nécrose**

**Figure 2 : Séquences de PVY<sup>N</sup>-605 et de PVY<sup>O</sup>-139 utilisées comme cible dans un test à base de polymorphisme nucléotidique.** Sont présentés les sites de liaison pour les amorces sens (FpN et FpO), les amorces anti-sens (RpN et RpO) et les deux sondes TaqMan® (Sonde<sup>N</sup> et Sonde<sup>O</sup>). On a indiqué le nucléotide polymorphe A/G<sub>2213</sub>.  
 5 L'indicateur spécifique (rapporteur) de la sonde (FAM et Vic pour la Sonde<sup>N</sup> et la Sonde<sup>O</sup> respectivement) est illustré par un carré gris et un cercle respectivement. Les quencheurs, molécules de liaison à petit sillon non fluorescentes (MGB [Applied Biosystems]) liées à l'extrémité 3' des sondes fluorescentes, sont indiquées par des étoiles grises. <sup>a</sup> : les positions des nucléotides données sont comme dans Jakab et al.,  
 10 (1997).

**Figure 3 : Signal fluorescent brut (CFS) obtenu en utilisant des échantillons de contrôle positif (PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>O</sup> et Y<sup>N</sup>/Y<sup>O</sup> mélangés) et négatif (contrôle sans matrice).** A. CFS associé avec des sondes spécifiques de PVY<sup>N</sup>(FAM) et PVY<sup>O</sup> (Vic). Sont indiquées les valeurs moyennes et écarts types calculés avec quatre réplifications  
 15 de NTC, PVY<sup>N</sup>-605 purs et PVY<sup>O</sup>-139 purs. Les valeurs obtenues avec les deux réplicats des échantillons mélangés Y<sup>N</sup>/Y<sup>O</sup> sont listées. B. représentation schématique des données de CFS. Chaque point correspond aux données (FAM ; Vic) associées à un des échantillons testés. On a défini quatre zones n'ayant pas de chevauchement selon la nature des échantillons testés.

**Figure 4 : Représentation schématique des données fluorescentes brutes (A) cibles (B) et normalisées (C).** Les triangles, les carrés et les cercles correspondent aux échantillons de PVY<sup>O</sup> purs, NTC et PVY<sup>N</sup> purs. La quantité d'ARN de PVY théorique présente dans chaque échantillon testé est indiquée. FAMt et Vict correspondent aux seuils pour la détection efficace de PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> respectivement. Les zones de  
 25 détection et de caractérisation sont indiquées sur les graphiques bruts (A) et normalisés (C).

**Figure 5 : Représentation graphique de la co-détection de PVY<sup>N</sup> et de PVY<sup>O</sup> en utilisant des données fluorescentes cibles par SNP.** Les limites de détection seuil pour PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> sont indiquées par FAMt et Vict, respectivement. La détection  
 30 simple de PVY<sup>N</sup> et ou PVY<sup>O</sup> correspond aux zones ❶ et ❷, respectivement. Les groupes de la zone ❸ n'ont pas détecté d'échantillon. Les rapports Y<sup>N</sup>/Y<sup>O</sup>

correspondant à 1/100, 1/10, 1,10/1 et 100/1 sont représentés par des triangles, des cercles, des carrés, des étoiles et des losanges, respectivement.

**Figure 6 : Analyse des propriétés nécrotiques des isolats PVY chimères sur pomme de terre.**

5 **Figure 7 : Sequence PVY<sup>N</sup>-605 et zone d'intérêt et HC-PRO**

A - Sequence nucleotidique (codon d'initiation de la traduction en **gras**, bases polymorphes d'intérêt en *gras italique*) B - Sequence en aa de la polyprotéine (qui contient la protéine HC-Pro séquence soulignée), aa d'intérêt en **gras**.

**Figure 8 : Sequence PVY<sup>O</sup>-139 et zone d'intérêt et HC-PRO**

10 A- Sequence nucleotidique (codon d'initiation de la traduction en **gras**, bases polymorphes d'intérêt en *gras italique*)

B - Sequence en aa de la polyprotéine (qui contient la protéine HC-Pro séquence soulignée), aa d'intérêt en **gras**.

15 **Exemple 1 : Origines des souches de PVY et préparation des échantillons**

**1.1 Virus et plantes hôtes**

On a utilisé dans cette étude 42 isolats de PVY de pomme de terre caractérisés de manière sérologique et moléculaire appartenant aux différents groupes de PVY (PVY<sup>N</sup> ou PVY<sup>O</sup>) et variants (Y<sup>NTN</sup> ou Y<sup>N</sup>-W) –tableau 1). On a utilisé PVY<sup>N</sup>-605 (Jakab et al., 1997) et PVY<sup>O</sup>-139 (Singh et Singh, 1996) comme isolats de référence pour les groupes PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> respectivement. On les a utilisés pour développer le test alors qu'on a utilisé d'autres isolats de PVY dans le processus d'évaluation du dosage développé. On a maintenu les isolats dans une serre par inoculation mécanique sur *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. On a utilisé ce dernier comme plante test dans un test biologique pour la caractérisation des isolats PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup>, sur la base de leur capacité ou leur incapacité à induire des symptômes de nécrose des feuilles.

**Tableau I :** Origine et références des isolats PVY testés dans le cadre de l'invention

	Souche	isolat	origine	référence
5	N	605	Switzerland	Jakab <i>et al.</i> , 1997
		C3VN	Scotland	Glais <i>et al.</i> , 1996
		Irl	Ireland	Glais <i>et al.</i> , 1996
		607	The Netherlands	Glais <i>et al.</i> , 1996
		P21	Tunisia	Fakhfakh <i>et al.</i> , 1996
		B203	France	Glais <i>et al.</i> , 1998
		Sp20	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
		Sp125	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
10		TVNQ	Canada	Mc Donald and Kristjansson, 1993
		B4	France	From this report
	O	B7	France	From this report
		B8	France	From this report
		139	Canada	Singh and Singh, 1996
		Irl	Ireland	Glais <i>et al.</i> , 1998
		Sc	Scotland	Glais <i>et al.</i> , 1998
		N1702	The Netherlands	Glais <i>et al.</i> , 1998
15		Lw	Poland	Glais <i>et al.</i> , 1998
		B18	France	From this report
		i-P	Poland	Glais <i>et al.</i> , 1998
		N242	France	Glais <i>et al.</i> , 1998
	N-W	B11	France	Glais <i>et al.</i> , 2002
		Sp17	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
		B15	France	From this report
		N5	France	From this report
20		N10	France	From this report
		N12	France	From this report
		N15	France	From this report
		N324	France	From this report
		N341	France	From this report
		N362	France	From this report
	NTN	Lb	Lebanon	Glais <i>et al.</i> , 1996
		FrOrl	France	Glais <i>et al.</i> , 1996
		H	Hungary	Glais <i>et al.</i> , 1996
25		CzLuk1	Czech Republic	Glais <i>et al.</i> , 1996
		Sp47	Spain	Blanco-Urgoiti <i>et al.</i> , 1998
		Lx2	Tunisia	From this report
		B6	France	From this report
		B9	France	From this report
		N4	France	From this report
		N18	France	From this report
		May2	France	From this report
30		Dk	Denmark	From this report



## 1.2 Préparation de l'échantillon

On a extrait le jus brut des plantes de *N. tabacum* sains ou infectées par PVY en pressant les feuilles (0,5 g) dans une presse à cylindre, en présence de 1 mL de tampon  
5 de broyage froid (PBS ; 0,05 % (v/v) de Tween 20). On a immédiatement utilisé ces échantillons pour effectuer un test ELISA ou une extraction des acides nucléiques.

On a effectué un mode opératoire d'extraction "par feuilles humides" rapide adapté de Robert *et al.*, 2000, en utilisant trois disques de feuille (0,2 cm<sup>2</sup> chacun récoltés en  
10 utilisant un bouchon de microtube comme dispositif de perforation) de chaque plante. On a incubé le matériau récolté pendant 15 min à 95 °C dans 100 µL de tampon de broyage et on l'a placé à 4°C pendant 10 min. Après une étape de centrifugation (8 000 g pendant 5 min), on a récolté le surnageant, on l'a transféré dans un nouveau tube et on l'a dilué 10 fois dans de l'eau sans RNase. On a stocké les extraits à – 20 °C  
15 jusqu'à utilisation.

## 1.3 Dosage par méthode immunoenzymatique. (ELISA)

On a réalisé une détection de PVY dans une plante en utilisant un protocole DAS-  
20 ELISA. On a rempli les puits des plaques de microtitrage avec 1 µg/mL d'anticorps polyclonal de PVY (FNPPPT-INRA, France) dans un tampon carbonate (pH 9,6) pendant 2 h à 37 °C. Entre chaque étape du protocole ELISA, on a lavé les plaques trois fois avec un tampon PBST (PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20). On a ajouté 100 µL des jus bruts de plante dans les puits et on les a laissés jusqu'au lendemain à 4 °C. On a  
25 dilué les anticorps monoclonaux de souris conjugués à une phosphatase alcaline et dirigés contre le PVY<sup>N</sup> [Bioreba, Suisse] ou le PVY<sup>O/C</sup> [Adgen, Royaume-Uni] au 1/1000 ou au 1/2000 respectivement, dans un tampon de broyage complété avec 0,2 % d'ovalbumine (p/v). Selon la spécificité attendue de la détection, on a ajouté 100 µL de l'un de ces anticorps monoclonaux aux puits de la plaque pendant 2 heures à 37 °C. On  
30 a rempli les puits de la plaque avec 100 µL de phosphate de p-nitrophényle (1 mg/mL) dans un tampon substrat (diéthanolamine à 1 N, pH 9,6). Après incubation pendant 1

heure à température ambiante, on a lu l'absorbance des échantillons à 405 nm en utilisant un lecteur de plaque de microtitrage (Titertek Multiscan [MCC]).

#### 1.4 Préparation des standard d'ARN viral pour les test par SNP

5 On a extrait l'acide nucléique total de 100  $\mu$ L de jus brut pris dans des plantes infectées par PVY<sup>N</sup>-605 ou PVY<sup>O</sup>-139, en utilisant un mode opératoire de phénol/chloroforme et on l'a remis en suspension dans 50  $\mu$ L d'une eau sans nucléase. On a réalisé une transcription inverse de l'ARN viral avec 3 U de transcriptase inverse AMV  
10 [Promega], 10 pmoles de l'oligonucléotide 5'-<sup>9702</sup>GTCTCCTGATTGAAGTTTAC<sup>9682</sup>-3' (SEQ ID No 13) (positions nucléotidiques selon l'isolat PVY<sup>N</sup>-605), 20 nmoles de dNTP, 20 U de RNasin [Promega] et 10  $\mu$ L de l'extrait d'acide nucléique total. On a effectué la réaction selon les instructions du fabricant de l'enzyme dans un volume final de 20  $\mu$ L. On a ensuite amplifié par PCR la région de l'ADNc correspondant à  
15 une partie des gènes HC-Pro/P3 de PVY<sup>N</sup>-605 ou PVY<sup>O</sup>-139 en utilisant 2,5 U de la polymérase AmpliTaq [Applied Biosystems], 40 pmoles de l'amorce avant 5'-aacgtgtttctcgcgatgctaattaacattggcgaggagg-3' (SEQ ID No 11 correspondant à nt 2079 à 2108 de PVY<sup>O</sup>-139 et comprenant un site *Nru*I) et l'amorce inverse 5'-agccatcagtataccaggggataatattgatagaatcaac-3' (SEQ ID No 12 correspondant à nt de  
20 2592 à 2561 PVY<sup>O</sup>-139, et comprenant un site *Bst*ZI 7I), 20 nmol de dNTP, 75 nmol de MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ L d'ADNc et on a ajusté un volume final de 50  $\mu$ L avec de l'eau stérile. On a fait des cycles de réaction avec un cycleur thermique Hybaid Express® pendant 40 cycles de 94°C pendant 1 min, 52 °C pendant 1 min et 72 °C pendant 1 min. On a cloné séparément les produits de la PCR correspondant aux  
25 séquences de PVY<sup>N</sup> ou PVY<sup>O</sup> dans les sites *Nru*I et *Bst*ZI 7I dans d'un vecteur pBluescript modifié (pMTlink), dans lequel la cassette de clonage multiple de pBluescriptKS [Statagene] a été remplacée entre les sites *Kpn*I et *Sac*I par une courte séquence nucléotidique, comprenant les sites de restriction unique *Kpn*I-*Nru*I-*Bst*ZI 7I-*Sac*I. On a utilisé les plasmides résultants pMT<sub>NB</sub><sup>N</sup> et pMT<sub>NB</sub><sup>O</sup> pour produire des  
30 produits de la transcription de l'ARN viral correspondant aux nucléotides 2086 à 2591 de PVY<sup>N</sup>-605 et PVY<sup>O</sup>-139 respectivement. On a séparément linéarisé 1  $\mu$ g de

pMT<sub>NB</sub><sup>N</sup> et pMT<sub>NB</sub><sup>O</sup> par *SacI*, on l'a purifié en utilisant un protocole d'extraction par phénol/chloroforme et on l'a remis en suspension dans 5 µL d'eau sans nucléase. On a généré les produits de la transcription de l'ARN de PVY en présence de 15 U de l'ARN polymérase T3 [Promega], 10 mM de rNTP et 5 mM de dithiotreitol pendant 3 heures à 37 °C. On a complété le processus de la transcription *in vitro* par la digestion du plasmide en utilisant une ADNase I dépourvue d'activité ARNase pendant 15 min à 37 °C. On a extrait les produits de transcription viraux en utilisant la procédure d'extraction au phénol/chloroforme, de l'alcool isoamylique, on les a précipités et mis en suspension dans 100 µL d'eau sans ARNase. On a déterminé la concentration d'ARN final (µg/µL et copies/µL) par spectrophotométrie. On a effectué des dilutions des produits de la transcription *in vitro* de PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> afin d'obtenir des solutions contenant 10<sup>8</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> ou 10<sup>2</sup> copies de l'ARN viral produit *in vitro* dans 2,5 µL.

## Exemple 2 : Conception d'une amorce et d'une sonde et détection SNP

On a choisi le nucléotide 2213 de PVY (numéroté selon Jakab et al., 1997), signalé comme étant impliqué dans la nécrose des nervures du tabac de l'isolat PVY<sup>N</sup>-605 (Balme-Sinibaldi et al., 2004), pour définir deux sondes marquées par FAM-(Sonde<sup>N</sup>) ou Vic-(Sonde<sup>O</sup>) de TaqMan®-MGB, [Applied Biosystems] correspondant aux séquences de PVY<sup>N</sup>-605 ou PVY<sup>O</sup>-139 respectivement (figures 1 et 2). On a conçu les paires d'amorce sens (Fp) et anti-sens (Rp) (figure 2) qui encadrent les séquences ciblées par la sonde pour PVY<sup>N</sup>-605 (FpN et RpN) et PVY<sup>O</sup>-139 (FpO et RpO) en utilisant le logiciel Primer Express [Applied Biosystems].

### Test SNP utilisant des sondes fluorescentes TaqMan®

On a effectué des réactions de SNP basés sur la technologie TaqMan® dans un volume final de 25 µL en utilisant le kit One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit [Applied Biosystems], selon les instructions du fabricant. On a effectué des réactions de RT-PCR en une seule étape, réalisées avec 2,5 µL d'extraits de "feuilles humides" provenant de plantes saines ou infectées, ou en utilisant des produits de la transcription

*in vitro*, en utilisant le système ABI Prism 7700 Sequence Detection System [Applied Biosystems]. On a effectué la transcription inverse de l'ARN viral à 48 °C pendant 30 minutes. On a effectué la PCR avec une polymérase hot-start AmpliTaq [Applied Biosystems] et en utilisant une étape d'activation enzymatique (10 min à 95 °C), suivie  
 5 de cycles de dénaturation/hybridation/extension (15 s à 95 °C ; 1 min à 60 °C). Pour chaque échantillon, on a lu les signaux de fluorescence correspondant à FAM, Vic et au contrôle interne ROX de Applied Biosystems® au point final du programme de RT-PCR. On a mathématiquement transformé les données obtenues (fluorescence brute) en utilisant le logiciel SDS v1.7 [Applied Biosystems], afin de produire des données  
 10 correspondant au signal fluorescent du composant cible (FAMm et Vicm) et les données fluorescentes normalisées (FAMn et Vicn). On a répliqué le test SNP et le mode opération de validation complet dans au moins trois expériences indépendantes.

**Exemple 3 : Détection de PVY<sup>N</sup>-605 et PVY<sup>O</sup>-139 dans des échantillons purs et  
 15 mélangés en utilisant un dosage de SNP suivant l'exemple 2.**

Selon les recommandations du fabricant et en prenant en compte les protocoles connus de RT-PCR en temps réel publiés au préalable (Fabre et al. 2003 ; Roberts et al. 2000), on a testé les deux sondes TaqMan® (Sonde<sup>N</sup> et Sonde<sup>O</sup>) et les paires d'amorce (FpN et RpN ; FpO et RpO) à différentes concentrations allant de 50 nM à 900 M. Les  
 20 signaux fluorescents récoltés à la fin des réactions de PCR étaient optimaux quand chaque sonde était inclus à 200 nM et les quatre amorces à 800 nM. On a effectué trente-deux cycles de PCR dans toutes les expériences de détection pour éviter le clivage non spécifique des sondes observées dans les expériences utilisant plus de 35  
 25 cycles de PCR. On a effectué le test SNP sur la base de quatre répétitions, y compris un contrôle sans matrice (NTC) ou des produits de la transcription de l'ARN virale *in vitro* (10<sup>6</sup> PVY<sup>N</sup> ou 10<sup>6</sup> PVY<sup>O</sup> copies/réaction) et avec duplication des échantillons mélangés contenant PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> (10<sup>6</sup> de chaque type d'ARN). On a enregistré des signaux fluorescents bruts (CFS) associés à chaque sonde à la fin de la réaction de RT-  
 30 PCR en une seule étape (figure 3). Pour les échantillons NTC, CFS correspond au niveau fluorescent de base du système (0,782 ± 0,024 et 0,424 ± 0,008 pour la

fluorescence de FAM et de Vic respectivement), produit par les sondes non clivées (figure 3A). Quand on a testé les échantillons contenant les produits de la transcription de l'ARN, les CFS associés à une sonde ont augmenté selon le type d'ARN présent dans les échantillons testés (Sonde<sup>N</sup> (signal FAM) et Sonde<sup>O</sup> (signal Vic) pour PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> respectivement). Ce résultat prouve l'hybridation hautement spécifique des sondes à leurs cibles d'ARN et l'absence de tout niveau significatif d'interaction non spécifique. Dans les échantillons mélangés Y<sup>N</sup>/Y<sup>O</sup>, à la fois les signaux fluorescents de FAM et de Vic ont augmenté de manière significative quand on les compare aux données NTC, ce qui reflète la liaison et le clivage de deux sondes au cours de la réaction de PCR. La représentation graphique des données des signaux fluorescents bruts (figure 3B) illustre à la fois la distinction de quatre zones correspondant à chaque d'échantillon testé et dans ces zones, la variation du niveau fluorescent enregistré pour chaque réplication.

#### Exemple 4 : Test de la sensibilité du test SNP de PVY<sup>N/O</sup>

On a produit et testé des fractions issues de dilutions en série contenant de 10<sup>7</sup> à 10<sup>3</sup> copies d'ARN/2,5 µL, de transcript *in vitro* de PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> en utilisant le protocole de test SNP, afin de déterminer la limite de détection de ce nouveau procédé (figure 4). Une bonne corrélation a pu être observée entre la quantité virale décroissante dans les échantillons testés et la baisse du signal fluorescent, à la fois pour PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> (figure 4A). On a détecté de manière efficace les trois dilutions les plus concentrées et on les a identifiées comme un type PVY<sup>N</sup> ou PVY<sup>O</sup> par le dosage SNP (figure 4A) ; 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup> et 10<sup>5</sup> fractions dans les zones de PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup>). Cependant, quand on a testé les échantillons contenant seulement 10<sup>4</sup> et 10<sup>3</sup> molécules d'ARN, les données fluorescentes obtenues étaient soit proches (10<sup>4</sup>) soit non distinguables (10<sup>3</sup>) de celles associées aux échantillons NTC. Les variations de ces données pour les répliques de NTC (figures 3A et 3B) fait qu'il est difficile d'identifier clairement le seuil fluorescent qui délimite la détection de PVY positive de la détection de PVY négative. Afin de résoudre ce problème, le logiciel SDS software® [Applied Biosystems] permet des transformations mathématiques du signal fluorescent brut en données fluorescentes

cibles (figure 4B) et en données fluorescentes normalisées (figure 5C). Ces données permettent de déterminer de manière précise la dilution du critère d'évaluation du dosage SNP dans la gamme ( $10^4$  à  $10^5$ ) pour PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup>.

#### 5 Exemple 5 : Co-détection de PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> en mélange dans un échantillons (mimant une co-infection)

En utilisant des fractions contenant entre  $10^4$  et  $10^8$  de produits de la transcription *in vitro* de PVY<sup>N</sup> ou PVY<sup>O</sup> [NruI-BsZ17I], on a préparé plusieurs fractions mélangées, en créant des échantillons avec des rapports de Y<sup>N</sup>/Y<sup>O</sup> de 1/100 à 100/1 (tableau 2 et figure 5). On a testé ces fractions comme des échantillons inconnus dans un dosage SNP comprenant NTC, des échantillons de contrôle de PVY<sup>N</sup> purs ( $10^6$  produits de la transcription) et de PVY<sup>O</sup> purs ( $10^6$  produits de la transcription). Les données fluorescentes bruts obtenues à partir des échantillons purs (FAM=1,753 et Vic=1,276 pour PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup>, respectivement) étaient équivalentes à celles obtenues dans les échantillons mélangés contenant  $10^6$  copies des deux types d'ARN (rapport 1/1 ; PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> à  $10^6$  copies ; FAM=1,653 et Vic=1,198). Ceci illustre que la détection simple et la co-détection de PVY<sup>N</sup> et/ou PVY<sup>O</sup> dans des échantillons contenant des quantités similaires d'ARN ciblée étaient efficaces pour les deux cibles. Comme précédemment démontré, la quantité d'ARN de PVY présente dans les échantillons tests influence directement le niveau fluorescence brute. Les fractions contenant  $10^8$  copies des deux types d'ARN de PVY étaient associées à des valeurs de CFS élevées (proches de 2,000), alors que les fractions contenant seulement  $10^4$  copies d'ARN de PVY ont produit des données de CFS (FAM=0,860 et Vic=0,563) proches de celles attendues pour le contrôle négatif (NTC ; FAM=0,754 et Vic=0,427). L'utilisation des données fluorescentes cibles (tableau 2) avec le seuil de détection de FAMt et Vict (figure 5) fait qu'il est facile de distinguer la détection simple d'une co-détection. En prenant en compte les observations, on a efficacement caractérisé les fractions avec des quantités d'ARN de PVY allant de  $10^5$  à  $10^8$  à un rapport de Y<sup>N</sup>/Y<sup>O</sup> de 1 comme des échantillons mélangés. Quand on a testé les fractions contenant un type d'ARN de PVY en excès (rapport=1/100, 1/10, 10/1 ou 100/1), le CFS pour une quantité constante d'un type

d'ARN de PVY est réduit selon l'excès de l'autre type d'ARN de PVY ( $PVY^N=10^6$  : FAMm était 1,216, 0,970, 0,798, 0,454 et 0,68 pour les échantillons contenant  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  et  $10^8$   $PVY^O$ , respectivement)..

## 5 Exemple 6 : Validation du test SNP sur une large gamme d'isolats de PVY

On a validé le test SNP développé en utilisant une large gamme d'isolats de PVY comprenant trente-sept isolats européens, deux isolats africains, deux isolats nord-américain et un isolat du proche orient, appartenant aux groupes  $PVY^N$  et  $PVY^O$ ,  
 10 comprenant des variants  $PVY^{NTN}$  et  $PVY^N-W$  (tableau 1). On a caractérisé les propriétés biologiques et sérologiques des quarante-deux isolats en utilisant les observations des symptômes sur *N. tabacum* cv. Xanthi et des tests ELISA (tableau 3). Tous les résultats étaient en accord avec les résultats attendus. On a préparé des extraits de « feuilles humides » provenant de *N. tabacum* cv. Xanthi infectées par ces  
 15 isolats de PVY et on les a testées en utilisant le test SNP développé. Les données fluorescentes cibles et les résultats diagnostiques de SNP associés à chaque échantillon testé sont présentés dans le tableau 3. Tous les 42 isolats de PVY testés ont pu être correctement assignés par le test SNP dans leur groupe de PVY respectif. Les variants  $PVY^{NTN}$  et  $PVY^N-W$  ont été correctement caractérisés comme membres du groupe  
 20  $PVY^N$ . Comme on s'y attendait, aucun des échantillons testés provenant de notre collection d'isolats de PVY n'a été identifié par le test SNP comme un échantillon co-infecté.

## REFERENCES

- Abdelmaksoud, H.M., Gamal Eldin, A.S., 2002. The complete nucleotide sequence of  
 5 the Potato virus Y strain N-Egypt. Unpublished. Genbank Accession umber:  
 AF522296
- Berckx, R., 1967. Methodische untersuchungen über den serologischen nachweis  
 pflanzenpathogener viren mit dem bentonit-flockungstest, den latex-text und  
 dem bariumsulfat test. *Phytopathologische Zeitschrift* 58, 1-17.
- 10 Blanco-Urgoiti, B., Tribodet, M., Leclere, S., Ponz, F., Perez de San Roman, C.,  
 Legorburu, F.J., Kerlan, C., 1998. Characterization of potato potyvirus Y  
 (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z  
 isolates. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 811-819.
- Boonham, N., Walsh, K., Preston, S., North, J., Smith, P., Barker, I., 2002. The  
 15 detection of tuber necrotic isolates of Potato virus Y, and the accurate  
 discrimination of PVY(O), PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. *J. Virol.*  
*Methods* 102(1-2):103-12
- Boonham, N., Barker, I., 1998. Strain specific recombinant antibodies to potato virus  
 Y potyvirus. *J. Virol. Methods* 74(2):193-9.
- 20 Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E.J., 1996.  
 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database.  
 Version: 20<sup>th</sup> August 1996.' URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Chrzanowska, M., 1991. New isolates of the necrotic strain of potato virus Y (PVY<sup>N</sup>)  
 found recently in Poland. *Potato Res.* 34:179-182.
- 25 De Bokx, J.A., Huttinga, H., 1981. Potato virus Y. CMI/AAB Description of plant  
 viruses No. 242, CMI/AAB, Slough, England, 6pp.
- Dougherty, W.G., Carrington, J.C., 1988. Expression and function of potyviral gene  
 products. *Ann. Rev. Phytopathology* 26:123-143
- Ellis, P., Stace-Smith, R., Bowler, G., Mackenzie, D.J., 1996. Production of  
 30 monoclonal antibodies for detection and identification of strains of potato virus  
 Y. *Can. J. Plant Pathol.* 18, 64-70.



- Fabre, F., Kervarrec, C., Mieuze, L., Riault, G., Vialatte, A., Jacquot, E., 2003. Improvement of Barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 110(1):51-60
- 5 Fakhfakh, H., Vilaine, F., Makni, M., Robaglia, C., 1996. Cell-free cloning and biolistic inoculation of an infectious cDNA of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* 77: 519-523.
- Gugerli P., Fries, P., 1983. Characterization of monoclonal antibodies to potato virus Y and their use for virus detection. *J. Gen. Virol.* 64:2471-2477.
- 10 Glais, L., Tribodet, M., Gauthier, J.P., Astier-Manifacier, S., Robaglia, C., Kerlan, C., 1998. RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of potato virus Y. *Arch. Virol.* 143: 2077-2091.
- Glais, L., Kerlan, C., Robaglia, C., 2001. Variability and evolution of potato virus Y, the type species of the potyvirus genus. In *Plant Viruses as molecular pathogens*. Ed. Jawaid A. Khan and Jeanne Dijkstra, Food Products Press, The Haworth Press, Inc, New York.
- 15 Glais, L., Tribodet, M., Kerlan, C., 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY<sup>(N)</sup>W and PVY<sup>(NTN)</sup> variants are single to multiple recombinants between PVY<sup>(O)</sup> and PVY<sup>(N)</sup> isolates. *Arch. Virol.* 147(2):363-78.
- 20 Glais, L., Colombel, A.S., Tribodet, M., Kerlan, C., 2004. PVY<sup>N</sup>-605, the reference PVYN isolate, displays a PVY<sup>NTN</sup> non-recombinant genome. The 12<sup>th</sup> EAPR virology section meeting, Rennes-France, 2004 June 13-19<sup>th</sup>, abstracts. pp 50
- Health, R., Sward, R.J., Moran, J.R., Mason, A.J., Hallam, N.D., 1987. Biological characterization of six Australian isolates of potato virus Y and their serological detection by ELISA. *Australian Journal of Agricultural Research* 25 38, 395-402.
- Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D., Malnoe, P., 1997. Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. *J. Gen. Virol.* 78(12):3141-5.
- 30 Kerlan, C., Tribodet, M., Glais, L., Guillet, M., 1999. Variability of potato virus Y in potato crops in France. *J. Phytopathology* 147:643-651.

- Le Romancer, M., Kerlan, C., Nedellec, M., 1994. Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathol.* 43, 138-144.
- Maat, D.Z., Huttinga, H., 1987. Serology. In *Viruses of potatoes and seed-potato production*. Ed. by De Bokx, J.A. and van der Want, J.P.H., Pudoc Wageningen, NL.
- Marie-Jeanne Tordo, V., Chachulska, A.M., Fakhfakh, H., Le Romancer, M., Robaglia, C., Astier-Manifacier, S., 1995. Sequence polymorphism in the 5'NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 76:939-49.
- Matousek, J., Ptacek, J., Dedic, P., Schubert, J., 2000. Analysis of variability of P1 gene region of N strain of potato virus Y using temperature-gradient gel electrophoresis and DNA heteroduplex analysis. *Acta Virol.* 44(1):41-6.
- Mc Donald, J.G. and Kristjansson, G.T., 1993. Properties of strains of potato virus YN in North America, *Plant Disease*, 77(1): 87-89.
- Mc Donald, J.G., Singh R.P., 1996. Host range, symptomatology, and serology of isolates of Potato virus Y (PVY) that share properties with both the PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>O</sup> strain groups. *American Potato Journal* 73:309-315.
- Milne, R.G., 1988. *The Plant Viruses-4. The filamentous plant viruses*, ed. by R.G. Milne, Plenum Press New York & London, 1988.
- Moravec, T., Cerovska, N., Boonham, N., 2003. The detection of recombinant, tuber necrosing isolates of Potato virus Y (PVY<sup>NTN</sup>) using a three-primer PCR based in the coat protein gene. *J. Virol. Methods* 109(1):63-8.
- Nie, X., Singh, R.P., 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves, and tubers. *J. Virol. Methods* 91, 37-49.
- Nie, X., Singh R.P., 2002. A new approach for the simultaneous differentiation of biological and geographical strains of Potato virus Y by uniplex and multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 104(1):41-54.
- Nie, X., Singh, R.P., 2003. Specific differentiation of recombinant PVY<sup>(N:O)</sup> and PVY<sup>(NTN)</sup> isolates by multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods* 113(2):69-77.

- Oefner, P.J. 2002. Sequence variation and the biological function of genes: methodological and biological considerations. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 25;782(1-2):3-25.
- 5 Ounouna, H., Kerlan, C., Lafaye P., Loukili M.J., ElGaaied, A. 2002. Production of monoclonal antibodies against synthetic peptides of the N-terminal region of Potato virus Y coat protein and their use in PVY strain differentiation. *Plant Pathol.* 51: 487-494
- 10 Oshima, K., Inoue, A.K., Ishikawa, Y., Shikata, E., Takashi, H., 1990. Production and application of monoclonal antibodies specific to ordinary strain and necrotic strain of potato virus Y. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 56: 508-514.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S., Casse-Delbart, F., 1989. Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* 70:935-947.
- 15 Roberts, C.A., Dietzgen, R.G., Heelan, L.A., Maclean, D.J., 2000. Real-time RT-PCR fluorescent detection of tomato spotted wilt virus. *J. Virol. Methods* 88, 1-8.
- Rosner, A., Maslenin, L., 1999. Differentiating PVYNTN by unique single-restriction cleavage of PCR products. *Potato Res.* 42, 215-221.
- Rosner, A., Maslenin, L., 2001. Differentiating PVY<sup>(NTN)</sup> from PVY<sup>(N)</sup> by annealing to reference RNA transcripts. *J. Virol. Methods.* 97(1-2):125-31.
- 20 Rosner, A., Maslenin, L., 2003. Tagging of viral RNA transcripts with strain-specific oligonucleotides: characterization and application. *J. Virol. Methods.* 110(1):105-9.
- Sanz, A., Cambra, M., Perez de San Roman, C., Miguët, J.G., Cortés, E., Gorris, M.T., Vela, C., 1990. Preparation of additional monoclonal antibodies for detection and discrimination of potato virus Y isolates infecting potato. *Potato Res.* 33: 365-375.
- 25 Shukla, D.D., Ward, C.W., Brunt, A.A., 1994. *The Potyviridae*. Cambridge University Press, Cambridge, 516p.
- Singh, R.P., Boucher, A., Somerville, T.H., Dhar, A.K., 1993. Selection of monoclonal antibody to detect PVY<sup>N</sup> and its use in ELISA and DIBA assays. *Can. J. Plant Pathol.* 15, 293-300.
- 30

- Singh, M., Singh, R.P., 1996. Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of potato virus Y (PVYO). *Can. J. Plant Pathol.* 18:209-224.
- Sigvald, R., 1984. The relative efficiency of some aphid species as vector of potato virus Y. *Potato Res.* 27, 285-290.
- Smith, K.M., 1931. Composite nature of certain potato viruses of the mosaic group as revealed by the use of plant indicators. *Proc. Royal Soc. London, B* 109: 251-267.
- Szemes, M., Klerks, M.M., van den Heuvel, J.F., Schoen, C.D., 2002. Development of a multiplex AmpliDet RNA assay for simultaneous detection and typing of potato virus Y isolates. *J. Virol. Methods* 100(1-2):83-96.
- Talley, J., Warren, F.H.J.B., Torrance, L., Jones, R.A.C. 1980. A simple kit for detection of plant viruses by the latex serological test. *Plant Pathol.* 29: 77-79.
- Thole, V., Dalmay, T., Burgyan, J., Balazs, E., 1993. Cloning and sequencing of Potato virus Y (Hungarian isolate) genomic RNA. *Gene* 123:149-156.
- Walsh, K., North, J., Barker, I., Boonham, N., 2001. Detection of different strains of Potato virus Y and their mixed infections using competitive fluorescent RT-PCR. *J. Virol. Methods* 91(2):167-73.
- Walkey, D.G.A., Webb, M.J.W., 1984. The use of a simple electron microscope serology procedure to observe relationships of seven potyviruses. *Phytopathologische Zeitschrift* 110: 319-327.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Procédé de détection de la présence ou de l'absence de souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
  - a) extraction des acides nucléiques d'un échantillon de plante,
  - b) amplification RT-PCR d'une région de l'ARN viral de PVY comprenant les codons
 10 738 et 757 (SEQ ID No 1 et 3) correspondant aux acides aminés 400 et 419 respectivement de la protéine HC-Pro (SEQ ID No 2 et 4, fig 7A et 7B),
  - c) détection sur les cDNA obtenus à l'étape b) de la présence ou de l'absence de mutations correspondant à R/K<sub>400</sub> et D/E<sub>419</sub> au moyen i) d'au moins une sonde marquée spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et ii) d'au moins une sonde marquée
 15 spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) présentant des marqueurs émettant un signal de fluorescence différent, caractérisé en ce que la présence d'au moins une desdites mutations R/K<sub>400</sub> et D/E<sub>419</sub> est une indication de la présence d'une souche de PVY virulente responsable de la nécrose chez les plantes de la famille des *Solanacées*.
 20
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'en un seul test, on détecte les 4 génotypes/phénotypes suivants :
  - [R<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche incapable d'induire la nécrose)
  - [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
  - 25 - [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
  - [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose).
3. Procédé selon l'une des revendications 1 à 2, caractérisé en ce qu'il est effectué chez la pomme de terre.
 30

4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la détection à l'étape d) de souches de PVY [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] et/ou [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] et/ou [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] est une indication que la plante de pomme de terre est contaminée avec une ou plusieurs souche(s) induisant des nécroses tuberculaires.
- 5
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on utilise comme **sonde i)** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 (correspondant à R/K<sub>400</sub>), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AAA avec le polymorphisme A<sub>2213</sub>.
- 10
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la sonde i) comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment la SEQ ID No 7 : **ctcaaatgagaatattctac**
- 15
7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'on utilise en outre une **sonde i) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 738 est AGA avec le polymorphisme G<sub>2213</sub>.
- 20
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la sonde i) contrôle comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment la SEQ ID No 8 : **ctcaaatgagaatattcta**
- 25
9. Procédé selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisé en ce que la sonde i) et la sonde i) contrôle sont marquées différemment.
- 30
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'on utilise comme **sonde ii)** à l'étape c), au moins une sonde spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757 (correspondant à D/E<sub>419</sub>), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAA avec le polymorphisme A<sub>2271</sub>.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la sonde ii) comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 5 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2271, notamment avec la séquence **5'- cgatcacgaaacgcagaca - 3'** (SEQ ID No 9) ou **5'- atcacgaaacgcagaca - 3'** (SEQ ID No 20).
12. Procédé selon la revendication 10 ou 11, caractérisé en ce qu'on utilise en outre une **sonde ii) contrôle** à l'étape c), en particulier une sonde s'hybridant spécifiquement à la séquence cible lorsque le codon 757 est GAC avec le polymorphisme C<sub>2271</sub>.
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la sonde ii) contrôle comporte de 14 à 40, de 15 à 25 ou de 18 à 22 ou encore 20 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 6 (Figure 1) et comprenant le nucléotide en position 2213, notamment avec la SEQ ID No 10 : **5'- accatgacactcaaa - 3'** ou avec la SEQ ID No 21 : **5'- tgaccatgacactcaa - 3'**
14. Procédé selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la sonde ii) et la sonde ii) contrôle sont marquées différemment.
15. Procédé selon l'une des revendications précédentes dans les sondes comporte un marqueur fluorescent (reporter) et une molécule captant le signal lorsqu'elle se trouve à proximité du marqueur fluorescent (quencher).
16. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que lors de l'étape b), la transcription inverse est effectuée avec au moins 2 paires d'amorces sens et antisens.
17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que la transcription inverse est effectuée au moins avec une première paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY<sup>N</sup>, et

au moins une deuxième paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY<sup>O</sup>.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la première paire  
5 d'amorces (FpN et RpN) comprend une amorce sens FpN et une amorce antisens RpN pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 1 ou 5.
19. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'amorce sens FpN se situe  
10 en amont du codon 738 polymorphique et l'amorce RpN se situe en aval du codon 757 polymorphique.
20. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on met en œuvre deux premières paires :
- 15 - FpN1 en amont du codon 738  
- RpN1 en aval du codon 738  
- FpN2 en amont du codon 757  
- RpN2 en aval du codon 757
- 20 21. Procédé selon l'une des revendications 16 à 20, caractérisé en ce que la deuxième paire d'amorces (FpO et RpO) comprend de préférence une amorce sens FpO et une amorce antisens RpO pouvant comporter une séquence de 20 à 40 nucléotides consécutifs d'une séquence s'hybridant avec la séquence SEQ ID No 3 ou 6.
- 25 22. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que l'amorce sens FpO se situe en amont du codon 738 polymorphique et l'amorce RpO se situe en aval du codon 757 polymorphique.
23. Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce qu'on met en œuvre deux  
30 deuxièmes paires :
- FpO1 en amont du codon 738



- RpO1 en aval du codon 738
- FpO2 en amont du codon 757
- RpO2 en aval du codon 757

- 5    24. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce les amorces des deux paires sont choisies parmi :
- Amorces sens pour YN
- SEQ ID No 22 F1 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGT-3'
- SEQ ID No 23 F2 : 5'-ATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTAGTC-3'
- 10    SEQ ID No 24 F3 : 5'-CATGATGCAGAACTGCCTAGAATACTA-3'
- Amorces anti-sens pour YN :
- SEQ ID No 28 R1 : 5'-GTGAGCCAAACGAGTCAACTACAT-3'
- SEQ ID No 29 R2 : 5'-TTTGTGAGCCAAACGAGTCAACTA-3'
- SEQ ID No 30 R3 : 5'-TTGTGAGCCAAACGAGTCAACT-3'
- 15    Amorces sens pour YO
- SEQ ID No 25 F1 : 5'-GCAGAGCTGCCTAGTTTATTGGTT-3'
- SEQ ID No 26 F2 : 5'-ATGATGCAGAGCTGCCTAGTTTATT-3'
- SEQ ID No 27 F3 : 5'-TGCAGAGCTGCCTAGTTTATTGG-3'
- Amorces anti-sens pour YO :
- 20    SEQ ID No 31 R1 : 5'-GCCAAATGAGTCAACCACATGA-3'
- SEQ ID No 32 R2 : 5'-AGCCAAATGAGTCAACCACATG-3'
- SEQ ID No 33 R3 : 5'-CCAAATGAGTCAACCACATGACA-3'
- 25    25. Procédé de sélection sanitaire de plants de la famille des Solanacées susceptibles d'être infectées par une ou plusieurs souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires, notamment de nécroses tuberculaires chez la pomme de terre, comprenant la mise en œuvre systématique du procédé de détection selon l'une des revendications 1 à 24 sur les semences, plants et/ou plantes susceptibles
- 30    d'être mis en culture et procéder à la destruction ou mise sous quarantaine desdites semences, plants ou plantes contaminés avec une souche présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :

- [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
- [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose)

- 5    26. Kit de détection de la présence ou de l'absence d'isolats du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il comprend :
- au moins une première paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY<sup>N</sup>, au moins
  - 10    une deuxième paire d'amorces permettant l'amplification de séquences nucléotidiques incluant les codons 738 et 757 des souches du type PVY<sup>O</sup>.
  - au moins une sonde marquée i) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 738 et au moins une sonde marquée ii) spécifique d'un polymorphisme sur le codon 757, lesdites sondes i) et ii) étant définies selon l'une des revendications 5 à 6 et 10 à 11
  - 15    respectivement, et présentant des marqueurs émettant un signal de fluorescence différent.
27. Kit de détection selon la revendication 25 comprenant en outre les sondes i) et ii) de contrôle telles que définies selon l'une des revendications 7 à 8 et 12 à 13
- 20    respectivement, les sondes i) et contrôle i) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents, les sondes ii) et contrôle ii) étant marquées avec des marqueurs de fluorescence différents.
28. Kit de détection selon la revendication 26 ou 27 comprenant une solution
- 25    comprenant les amorces à une concentration optimale se situant entre 400 nM et 1200 nM, notamment 800 nM et une solution comprenant les sondes à une concentration se situant entre 100 nM et 300 nM, notamment 200 nM.
29. Sonde ou collection de sondes définie(s) selon l'une des revendications 5 à 15.
- 30    30. Amorce ou collection d'amorces définie(s) selon l'une des revendications 17 à 24.

31. Utilisation d'une sonde et d'une amorce ou des collections selon la revendication 29 et 30 respectivement pour la détection de la présence ou de l'absence de souches du virus PVY responsables de nécroses nervaires, foliaires ou tuberculaires chez les plantes de la famille des *Solanacées*, notamment chez la pomme de terre, l'aubergine, la tomate, les piments et le tabac.
32. Lot de semences, plants et/ou plantes de la famille des *Solanacées*, caractérisé en ce qu'il est dépourvu de semences, plants ou plantes contaminés avec une souche de PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :
- [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
  - [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
  - [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose).
33. Lot de plants ou tubercules de pomme de terre, caractérisé en ce que qu'il est dépourvu de plants ou tubercules contaminés avec une souche de PVY présentant au moins un des polymorphismes correspondant à :
- [R<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
  - [K<sub>400</sub>, D<sub>419</sub>] (souche capable d'induire la nécrose)
  - [K<sub>400</sub>, E<sub>419</sub>] (souche induisant la nécrose).
34. Lot selon la revendication 32 ou 33 susceptible d'être obtenu par la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 24 et 25 ou du kit selon l'une des revendications 26 à 28.

## LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)  
 GROUPEMENT NATIONAL INTERPROFESSIONNEL DES SEMENCES ET  
 PLANTES (GNIS)  
 FEDERATION NATIONALE DES PRODUCTEURS DE PLANTS DE POMMES DE  
 TERRE (FNPPPT)

<120> DETECTION DU VIRUS DE LA POMME DE TERRE

<130> D21019

<160> 33

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 9701

<212> ADN

<213> Virus de la pomme de terre

<220>

<223> Séquence PVYN-605

<400> 1

aaattaaaac	aactcaatac	aacataagaa	aatcaacgca	aaaacactca	caaaagcttt	60
caactcta	tcaaacaatt	tgtaagttt	caatttcgat	cttcatcaaa	caaactcttt	120
caatttcagt	gtaagctatc	gtaattcagt	aagttatttc	aaactctcgt	aaattgcaga	180
agatcatcca	tggcaattta	cacatcaaca	atccagtttg	gttccattga	atgcaaactt	240
ccatactcac	ccgctccttt	tgggctagtt	gcggggaaac	gagaagtttc	aaccaccact	300
gacccttcg	caagtttgga	gatgcagctc	agtgcgcgat	tacgaaggca	ggagtttgca	360
actattcgaa	catccaagaa	tggtagttgc	atgtatcgat	acaagactga	tgtccagatt	420
gcgcgcattc	aaaagaagcg	cgaggaaaga	gaaagagagg	aataataatt	ccaaatggct	480
gcgtcaagtg	ttgtgtcgaa	gatcactatt	gctggtggag	agccaccttc	aaaacttgaa	540
tcacaagtgc	ggaggggtgt	catccacaca	actccaagga	tgcgcacagc	aaaaacatat	600
cacacgccaa	agttgacaga	gggacaaatg	aaccacctta	tcaagcaggt	gaagcaaatt	660
atgtcaacca	aaggagggtc	tgtccaactg	attagcaaga	aaagtaccca	tgttcactat	720
aaagaagttt	tgggatcaca	tcgcgcagtt	gtttgcactg	cacatatgag	aggtttacga	780
aagagagtgg	actttcgggt	tgataaatgg	accgttgtgc	gtctacagca	tctcgccagg	840
acggacaagt	ggactaacca	agttcgtgct	actgatctac	gcaagggcga	tagtggagtt	900
atattgata	atactaattc	caaaggaaac	tttgggagaa	gctcggaggg	cctattcata	960
gtgcgtgggt	cgcacgaagg	aaaaatctat	gatgcacggt	ccaagggttac	tcaaggggtt	1020
atggattcaa	tggttcagtt	ctcaagcgct	gaaagctttt	ggaagggtt	ggacggcaat	1080
tgggcacaaa	tgagatatcc	tacagatcat	acatgtgtgg	caggcttacc	agttgaagac	1140
tgtggcagag	ttgcagcgat	aatgacacac	agtattttac	cgtgctataa	gattacctgc	1200
cctacctgtg	cccaacaata	tgccaaactg	ccagccagtg	acttacttaa	gatattacac	1260
aagcacgcaa	gtgatggtct	aaatcgattg	ggggcagaca	aagatcgctt	tgtgcatgtc	1320
aaaaagtctt	tgacaatctt	agagcactta	actgaaccgg	ttgatctgag	tctagaaatt	1380
ttcaatgaag	tattcaagtc	tataggggag	aagcaacaat	cacctttcaa	aaacctgaat	1440
attctgaata	atttcttttt	gaaaggaaag	gaaaatacag	ctcgtgaatg	gcaggtggct	1500
caattaagct	tacttgaatt	ggcaagattc	caaaagaaca	gaacggataa	tatcaagaaa	1560
ggagacatct	cgttcttttag	gaataaacta	tctgccaaag	caaattggaa	cttgtatctg	1620
tcatgtgata	accagctgga	taagaatgca	agcttcctgt	ggggacagag	ggaatatcat	1680
gctaagcgat	ttttctcgaa	ctatttctgag	gaaattgatc	cagcgaaggg	ctatttcagca	1740
tacgaaaatc	gtttgcatcc	gaatgggaca	agaaaacttg	caattggaaa	cctaattgta	1800
ccacttgatc	tggctgagtt	taggcggaag	atgaaaggtg	attataaaaag	acagccaggg	1860
gtgagtaaga	agtgcacgag	ctcgaaggat	ggaaactacg	tgtatccctg	ttgttgact	1920
acacttgatg	atggctcagc	tgttgaaatca	acattttacc	cgccaactaa	gaagcacctc	1980
gtaataggta	atagtggcga	ccaaaagtat	gttgacttac	caaaagggaa	ttctgagatg	2040
ttatatattg	ccaggcaagg	cttctgtttac	attaacattt	tcctcgcgat	gttgattaac	2100
attagtgagg	aagatgcaaa	ggatttcact	aagaaggttc	gtgacatgtg	tgtgccaag	2160

cttggaaacct	ggccaacccat	gatggatctg	gctacaactt	gtgctcaaat	gaaaatattc	2220
tacctgatg	ttcatgatgc	agaactgcct	agaatactag	tcgatcacga	aacgcagaca	2280
tgccatgtag	ttgactcggt	tggtcacaa	acaactgggt	atcatatttt	gaaagcatct	2340
agcgtgtccc	aacttatttt	gtttgcta	gatgagttgg	agtctgacat	taagcactat	2400
agagttgggt	gtattcctgg	agcatgccct	gagcttgggt	ccacaatatc	acctttttaga	2460
gaaggaggaa	tcataatgtc	tgagtcagca	gcgctaaaac	tgctcctaaa	gggaattttt	2520
aggcccaaag	tgatgaagca	attgctactg	gatgaaccat	atgttgcctat	tttatcgata	2580
ttatctcctg	gtatacttat	ggctatgtac	aacaatggga	tatttgagtt	agcgggtgaag	2640
ttgtggatca	atgagaaaca	atctatagcc	atgatagcat	cgttattgtc	cgcttgggt	2700
ttacgagtg	cagcagcaga	aacactcggt	gcacagagga	ttataattga	cacggcagca	2760
acagatcttc	tcgatgctac	gtgtgatgga	ttcaatttaa	atctgacata	tcccactgca	2820
ctcatggtgt	tgcaagttgt	taagaacaga	aatgaatgtg	atgatacggt	gtttaaagca	2880
ggtttttcac	attacaacat	gagtgctgtg	cagattatgg	aaaaaaatta	tctaagcctc	2940
ttgggcgatg	cctggaaaga	tttaacctgg	cgagaaaaat	tatccgcaac	atggcactca	3000
tacaaagcaa	agcgctctat	cactcagttc	ataaaaccca	taggcaaagc	agatttaaaa	3060
gggttgtaga	acatatacc	gcaagcattc	ttgggtcagg	gcgtacagag	agtcaaaggc	3120
accgcctcag	ggttgaatga	gcgactcaat	aattatatca	ataactaagt	tgtaaattatt	3180
tcactctttt	tcattcgtag	aattttccgg	cgcttgccaa	cttttgtaac	tttcattaat	3240
tcattattag	ttattagtat	gctaactagt	gtagtagcag	tgtgtcaagc	aataattcta	3300
gatcaaagga	agtatagaaa	agaaattgag	ttgatgcaga	ttgagaagaa	tgaaattggt	3360
tgtatggagt	tgtatgcgag	tctgcagcgc	aaacttgagc	gtgaattcac	atgggatgaa	3420
tatatggaat	atgtgaaatc	tgtgaatccc	cagatagttc	aattcgcgca	agctcaaagt	3480
gaagaatata	atgtgcgaca	tcagcgctcc	acaccaggtg	ttaagaattt	agagcaggtg	3540
gtagcattta	taactcta	tatcatgatg	tttgatgctg	aaaggagcga	ctgtgtattc	3600
aagactctca	acaaattcaa	aggcatcggt	tcttcaatgg	atcatgaagt	taaacaccag	3660
tccttggtatg	atgtaatcaa	gaatttcgat	gaaaggaacg	aagttattga	ttttgagcta	3720
aatgaggata	caattaaaac	atcatcagtg	ttggacacga	agtttagcga	ctggtgggat	3780
cggcaaacc	aaatgggaca	cacacttccc	cattatagaa	ctgagggaca	cttcatggaa	3840
ttcacaaggg	caactgctgt	acaagtggcc	aacgacatcg	cgcatagtga	gcacctagac	3900
tttctagtga	ggggagctgt	tggtctgga	aaatctactg	gactgcctgt	ccatctcagt	3960
gcagctggat	ccgtgctttt	gatagaacca	actcgaccac	ttgcagaaaa	cgtgttcaag	4020
caattatcca	gtgaaccgtt	tttcaagaag	ccaacactgc	gcatgcgagg	aaatagtgtg	4080
tttggttcc	ctccaatctc	catcatgact	agcggctttg	cgttgcacta	ctatgcta	4140
aatcgctctc	agctaactca	gtttaatttc	ataatttttg	atgaatgtca	tgttttagat	4200
ccttctgcaa	tggcatttcg	tagcttgta	agtgtgtatc	accaa	caaagtgtta	4260
aaggtgtcag	ccactccagt	gggaaggag	gtcgagttca	caacacaaca	accagttaaa	4320
ttggtggttg	aggatacact	ttcattccaa	tcttttggtg	atgcgcaagg	ctcaaaaacc	4380
aatgccgacg	ttgttcagca	tggttcgaac	atactcgtgt	atgtgtcgag	ttacaatgaa	4440
gtggatacat	tagccaagct	tctaacagat	aggaatatgg	tagtctcaaa	agttgatggc	4500
agaacaatga	agcacggatg	cttagaaatt	gtaacgaaag	ggactagtgc	aaagccacat	4560
tttgtcgtag	caaccaacat	tattgaaaat	ggagtaactt	tagatataga	tgtagtgtga	4620
gattttggac	ttaaagtctc	accgttttta	gatattgaca	ataggagcat	tgcatacaat	4680
aagattagt	ttagctattg	agaaagaatt	cgagagttgg	gccgtgttgg	gcgctttaag	4740
aaggagtg	cattgcgtat	tggaacacacc	gaaaagggaa	ttattgagat	tccaagtatg	4800
attgctagt	aagctgcgct	tgctgtcttt	gcatacaatt	tgccagta	gacagggggt	4860
gtttcaacta	gcctcattgg	caattgtact	gttcgtcaag	ttaaaactat	gcaacaattt	4920
gagctgagtc	cattctttat	acaaaatttt	gttgcccatg	atggatcaat	gcactcgtc	4980
atacatgaca	ttcttaagaa	gtataaactg	cgagattgta	tgacgacctt	gtgtgatcaa	5040
tcatacctt	acagagcctc	aagcacttgg	ttgtctgtta	gtgagta	acgactcgga	5100
gtggttttgg	acattccaaa	acagatcaag	attgcattcc	acatcaagga	catccctcct	5160
aagttgcatg	aaatgctttg	ggaaacagtt	atcaaatata	aggatgtttg	tttgtttcca	5220
agtattcggg	cttcatccat	tagcaaaatt	gcatacacac	tgcgactga	tctttttgca	5280
attcccagaa	ccctaattct	agttgaaaga	ttgatcgagg	aggaacgagt	gaaacagagt	5340
caattcagaa	gtctcattga	tgaaggatgc	tcaagcatgt	tttcaattgt	taatttaaca	5400
aacactctta	gagctagata	tgcaaaggat	tacactgcag	aaaacataca	gaagctcgag	5460
aaagtgagaa	gtcagttaaa	ggagttctca	aatttaaatg	gctctgcatg	tgaggagaac	5520
ttaatgaaga	ggtatgaatc	tctacagttt	gtgcatactc	aagcaacaac	ttcactcgca	5580
aaggatttga	agttgaaagg	agtttgaag	aagtcattag	ttgtgcagga	cttactcata	5640
gcgggtgccg	ttgtctattg	tggaataggg	ctcatctata	gttggtttac	tcaatcagtt	5700
gaaactgtgt	ctcaccaggg	caagaacaaa	tccaaaagaa	ttcaagcatt	gaagtttcga	5760
cacgcccgcg	ataagagggc	tggttttgaa	attgataaca	atgatgatac	aatagaggaa	5820

ttcttttgat	ctgcatacag	gaagaaggga	aaaggtaaag	gcaccactgt	tggtatgggc	5880
aagtcaagca	ggaggtttgt	taatatgtat	ggatttgacc	caacagaata	ttcattcatc	5940
cagttcgttg	atccgctcac	tggagctcaa	attgaagaga	acgtctatgc	tgatattaga	6000
gacatccaag	agcgcttttag	tgatgtccgc	aagaaaatgg	tagaggatga	tgaaatcgaa	6060
ttgcaagcat	tgggcagcaa	cacaaccatt	catgcttact	tcaggaaaga	ttggtctgac	6120
aaggctctaa	aaattgattt	gatgccacac	aaccactca	aaatctgtga	taaatcgaat	6180
ggcattgcta	agtttcctga	aagagaactt	gagttgaggc	aaactgggcc	agcaatagag	6240
gttgatgtga	aagacattcc	aaaacaggaa	gtggagcatg	aagccaaatc	actcatgaga	6300
ggtttaaggg	atttcaatcc	aattgtctaa	acagtttgca	gagtaaaagt	gtctgttgaa	6360
tatggaacgt	ctgaaatgta	tgggttcggg	tttgggtcgt	atattatagt	aaaccaccat	6420
ctattcaaga	gcttcaatgg	atccatggaa	gtgcgatcaa	tgcatggaac	attcagagtg	6480
aagaatttgc	atagcttgag	cgttttaccg	atcaaaggca	gagacattat	catcataaag	6540
atgccaaagg	atttccctgt	tttcccacaa	aaactgcact	tccgagctcc	agtgcagaat	6600
gagaggattt	gtttggtttg	aactaatttt	caagaaaaac	atgcatcatc	aatcatcaca	6660
gaaacgagta	ctacatacaa	tgtaccgggc	agcacttttt	ggaagcattg	gattgaaaca	6720
aatgatgggc	attgtggatt	accagtagtg	agtacagctg	atggatgtct	agttggaata	6780
cacagcttgg	cgaataatgt	gcaaaccacg	aattattatt	cagcctttga	tgaggatttt	6840
gaaagtaagt	atctccgaac	taatgagcat	aatgagtgga	ccaaatcgtg	ggtatataac	6900
ccagatactg	tgttgtgggg	tccattgaag	ctcaaggaga	gtaccocctaa	aggcctgttt	6960
aagacaacaa	aacttgtaca	ggatttaatt	gatcatgatg	ttgttgtaga	gcaagctaaa	7020
cattctgcgt	ggatgtatga	ggctctaaca	gggaatttgc	aagctgtggc	gacaatgaag	7080
agtcagctag	tgacaaagca	cgtggtcaaa	ggggagtgtc	ggcacttcaa	agagttctta	7140
actgtggatt	cggaagcaga	agctttcttc	aggcctttga	tggtatgctta	tgggaagagc	7200
ttgttaaata	gagaagcata	tataaaggac	ataatgaaat	actcaaagcc	tattgatggt	7260
ggaatagtag	actgtgatgc	ttttgaagag	gctatcaata	gggttatcat	ttatctgcaa	7320
gtgcattggc	tcagaaatgt	caattacatc	accgatgagc	aggaaaatttt	caaagctctc	7380
aatatgaaa	agctgttcgg	agctatgtat	ggaggcaaga	agaaagacta	cttcgagcat	7440
tttactgagg	cggataaaga	ggaaattgtt	atgcaaaagt	gctttcgatt	gtacaagggc	7500
tcgcttgcca	tatggaatgg	atcattgaaa	gcagaacttc	ggtgcaaaga	gaagatactt	7560
gcaaataaga	caaggacatt	cactgctgca	cctttagata	ctctactggg	tggaaagggtg	7620
tgcgttgatg	attttaataa	tcaattctac	tcaaagaaca	ttgaatgctg	ctggactggt	7680
ggaatgacta	agttttatgg	aggttgggac	aaattgcttc	ggcgtctacc	tgaaaattgg	7740
gtgtactgcg	atgccgatgg	ttcacaattc	gatagttcac	tcaccccata	cctaattaat	7800
gctgttctca	tcatcagaag	cacatacatg	gaagattggg	acttgggggt	gcaaattgtg	7860
cgcaatttgt	acacagaaat	aatttacaca	ccaatctcaa	ctccagatgg	aacaattgtc	7920
aagaagttta	gaggtaataa	tagcgttcaa	ccttctaccg	ttgtggataa	ttctctcatg	7980
gttgtccttg	ctatgcatta	cgctctcatt	aaggagtgcg	ttgagtttga	agaaatcgac	8040
agcacgtgtg	tattctttgt	taatggtgat	gacttattga	ttgctgtgaa	tccggagaaa	8100
gagagcattc	tcagatagaat	gtcacaacat	ttctcagatc	ttggtttgaa	ctatgatttt	8160
tcgtcgagaa	caagaaggaa	ggaggaattg	tggttcatgt	cccatagagg	cctgctaatac	8220
gaggatatgt	acgtgccaaa	gcttgaagaa	gagagaattg	tatccattct	gcaatgggat	8280
agagctgata	tgccagagca	cagattagaa	gcgatttgtg	cagcaatgat	agaatcctgg	8340
ggttattttg	agttaacgca	ccaaatcagg	agattctact	catggttgtt	gcaacagcaa	8400
cctttttcaa	cgatagcaca	ggaaggaaaa	gctccataca	tagcgagcat	ggcattgaag	8460
aagctgtaca	tgaataggac	agtagatgag	gaggaactga	aggctttcac	tgaaatgatg	8520
gttgcccttg	atgatgaatt	tgagtgcgat	acttatgaag	tgcaccatca	aggaaatgac	8580
acaatcgatg	caggaggaag	cactaaaaag	gatgcaaaac	aagagcaagg	tagcattcaa	8640
ccaaatctca	acaaggaaaa	ggaaaaggac	gtgaatgttg	gaacatctgg	aactcatact	8700
gtgccacgaa	ttaaagctat	cacgtccaaa	atgaaaatgc	ccaagagtaa	aggtgcaact	8760
gtactaaatt	tggaacactt	actcgagtat	gctccacagc	aaattgacat	ctcaaatact	8820
cgagcaactc	aatcacagtt	tgatacgtgg	tatgaagcag	tacaacttgc	atacgacata	8880
ggagaaactg	aatgccaac	tgtgatgaat	gggcttatgg	tttgggtgcat	tgaaaatgga	8940
acctcgccaa	acatcaacgg	agtttgggtt	atgatggatg	gaaatgaaca	agtcgaatac	9000
ccactgaaac	caatcgttga	gaatgcaaaa	ccaacactta	ggcaaatcat	ggcacatttc	9060
tcagatgttg	cagaagcgta	tatagaaatg	cgcaacaaaa	aggaaccata	tatgccacga	9120
tatggtttag	ttcgtaattc	gcgcgatgga	agtttggctc	gctatgcttt	tgacttttat	9180
gaagttacat	cacggacacc	agtgagggct	agagaggcac	acattcaaat	gaaggccgca	9240
gctttaaaat	cagctcaatc	tcgacttttc	ggattggatg	gtggcattag	tacacaagag	9300
gaaaacacag	agaggcacac	caccgaggat	gtttctccaa	gtatgcatac	tctacttgga	9360
gtgaagaaca	tgtgattgta	gtgtctttcc	ggacgatata	tagatattta	tgtttgcagt	9420
aagtattttg	gcttttcctg	tactactttt	atcgcaatta	ataatcgttt	gaatattact	9480

```

ggcagatagg ggtggtatag cgattccgtc gttgtagtga ccttagctgt cgtttctgta 9540
ttattatggt tgtataaaag tgccgggttg ttgttggtgt ggctgatcta tcgattaggt 9600
gatgttgcca tttgtcgtag cagtgactat gtctggattt agttacttgg gtgatgctgt 9660
gattctgtca tagcagtgac tgtaaacttc aatcaggaga c 9701

```

<210> 2  
 <211> 3061  
 <212> PRT  
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>  
 <223> Polyprotéine contenant HC-PRO de PVYN-605

<400> 2

```

Met Ala Ile Tyr Thr Ser Thr Ile Gln Phe Gly Ser Ile Glu Cys Lys
1           5           10           15

Leu Pro Tyr Ser Pro Ala Pro Phe Gly Leu Val Ala Gly Lys Arg Glu
20          25          30

Val Ser Thr Thr Thr Asp Pro Phe Ala Ser Leu Glu Met Gln Leu Ser
35          40          45

Ala Arg Leu Arg Arg Gln Glu Phe Ala Thr Ile Arg Thr Ser Lys Asn
50          55          60

Gly Thr Cys Met Tyr Arg Tyr Lys Thr Asp Val Gln Ile Ala Arg Ile
65          70          75          80

Gln Lys Lys Arg Glu Glu Arg Glu Arg Glu Glu Tyr Asn Phe Gln Met
85          90          95

Ala Ala Ser Ser Val Val Ser Lys Ile Thr Ile Ala Gly Gly Glu Pro
100         105         110

Pro Ser Lys Leu Glu Ser Gln Val Arg Arg Gly Val Ile His Thr Thr
115        120        125

Pro Arg Met Arg Thr Ala Lys Thr Tyr His Thr Pro Lys Leu Thr Glu
130        135        140

Gly Gln Met Asn His Leu Ile Lys Gln Val Lys Gln Ile Met Ser Thr
145        150        155        160

Lys Gly Gly Ser Val Gln Leu Ile Ser Lys Lys Ser Thr His Val His
165        170        175

Tyr Lys Glu Val Leu Gly Ser His Arg Ala Val Val Cys Thr Ala His
180        185        190

Met Arg Gly Leu Arg Lys Arg Val Asp Phe Arg Cys Asp Lys Trp Thr
195        200        205

Val Val Arg Leu Gln His Leu Ala Arg Thr Asp Lys Trp Thr Asn Gln
210        215        220

Val Arg Ala Thr Asp Leu Arg Lys Gly Asp Ser Gly Val Ile Leu Ser
225        230        235        240

```

Asn Thr Asn Leu Lys Gly Asn Phe Gly Arg Ser Ser Glu Gly Leu Phe  
 245 250 255  
 Ile Val Arg Gly Ser His Glu Gly Lys Ile Tyr Asp Ala Arg Ser Lys  
 260 265 270  
 Val Thr Gln Gly Val Met Asp Ser Met Val Gln Phe Ser Ser Ala Glu  
 275 280 285  
 Ser Phe Trp Lys Gly Leu Asp Gly Asn Trp Ala Gln Met Arg Tyr Pro  
 290 295 300  
 Thr Asp His Thr Cys Val Ala Gly Leu Pro Val Glu Asp Cys Gly Arg  
 305 310 315 320  
 Val Ala Ala Ile Met Thr His Ser Ile Leu Pro Cys Tyr Lys Ile Thr  
 325 330 335  
 Cys Pro Thr Cys Ala Gln Gln Tyr Ala Asn Leu Pro Ala Ser Asp Leu  
 340 345 350  
 Leu Lys Ile Leu His Lys His Ala Ser Asp Gly Leu Asn Arg Leu Gly  
 355 360 365  
 Ala Asp Lys Asp Arg Phe Val His Val Lys Lys Phe Leu Thr Ile Leu  
 370 375 380  
 Glu His Leu Thr Glu Pro Val Asp Leu Ser Leu Glu Ile Phe Asn Glu  
 385 390 395 400  
 Val Phe Lys Ser Ile Gly Glu Lys Gln Gln Ser Pro Phe Lys Asn Leu  
 405 410 415  
 Asn Ile Leu Asn Asn Phe Phe Leu Lys Gly Lys Glu Asn Thr Ala Arg  
 420 425 430  
 Glu Trp Gln Val Ala Gln Leu Ser Leu Leu Glu Leu Ala Arg Phe Gln  
 435 440 445  
 Lys Asn Arg Thr Asp Asn Ile Lys Lys Gly Asp Ile Ser Phe Phe Arg  
 450 455 460  
 Asn Lys Leu Ser Ala Lys Ala Asn Trp Asn Leu Tyr Leu Ser Cys Asp  
 465 470 475 480  
 Asn Gln Leu Asp Lys Asn Ala Ser Phe Leu Trp Gly Gln Arg Glu Tyr  
 485 490 495  
 His Ala Lys Arg Phe Phe Ser Asn Tyr Phe Glu Glu Ile Asp Pro Ala  
 500 505 510  
 Lys Gly Tyr Ser Ala Tyr Glu Asn Arg Leu His Pro Asn Gly Thr Arg  
 515 520 525  
 Lys Leu Ala Ile Gly Asn Leu Ile Val Pro Leu Asp Leu Ala Glu Phe  
 530 535 540  
 Arg Arg Lys Met Lys Gly Asp Tyr Lys Arg Gln Pro Gly Val Ser Lys  
 545 550 555 560  
 Lys Cys Thr Ser Ser Lys Asp Gly Asn Tyr Val Tyr Pro Cys Cys Cys



565										570					575				
Thr	Thr	Leu	Asp	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Glu	Ser	Thr	Phe	Tyr	Pro	Pro				
			580					585					590						
Thr	Lys	Lys	His	Leu	Val	Ile	Gly	Asn	Ser	Gly	Asp	Gln	Lys	Tyr	Val				
		595					600					605							
Asp	Leu	Pro	Lys	Gly	Asn	Ser	Glu	Met	Leu	Tyr	Ile	Ala	Arg	Gln	Gly				
	610					615					620								
Phe	Cys	Tyr	Ile	Asn	Ile	Phe	Leu	Ala	Met	Leu	Ile	Asn	Ile	Ser	Glu				
625					630					635					640				
Glu	Asp	Ala	Lys	Asp	Phe	Thr	Lys	Lys	Val	Arg	Asp	Met	Cys	Val	Pro				
				645					650					655					
Lys	Leu	Gly	Thr	Trp	Pro	Thr	Met	Met	Asp	Leu	Ala	Thr	Thr	Cys	Ala				
			660					665					670						
Gln	Met	Lys	Ile	Phe	Tyr	Pro	Asp	Val	His	Asp	Ala	Glu	Leu	Pro	Arg				
		675					680					685							
Ile	Leu	Val	Asp	His	Glu	Thr	Gln	Thr	Cys	His	Val	Val	Asp	Ser	Phe				
	690					695					700								
Gly	Ser	Gln	Thr	Thr	Gly	Tyr	His	Ile	Leu	Lys	Ala	Ser	Ser	Val	Ser				
705					710					715					720				
Gln	Leu	Ile	Leu	Phe	Ala	Asn	Asp	Glu	Leu	Glu	Ser	Asp	Ile	Lys	His				
				725				730						735					
Tyr	Arg	Val	Gly	Gly	Ile	Pro	Gly	Ala	Cys	Pro	Glu	Leu	Gly	Ser	Thr				
			740					745					750						
Ile	Ser	Pro	Phe	Arg	Glu	Gly	Gly	Ile	Ile	Met	Ser	Glu	Ser	Ala	Ala				
		755					760					765							
Leu	Lys	Leu	Leu	Leu	Lys	Gly	Ile	Phe	Arg	Pro	Lys	Val	Met	Lys	Gln				
	770					775					780								
Leu	Leu	Leu	Asp	Glu	Pro	Tyr	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	Ile	Leu	Ser	Pro				
785					790					795					800				
Gly	Ile	Leu	Met	Ala	Met	Tyr	Asn	Asn	Gly	Ile	Phe	Glu	Leu	Ala	Val				
				805					810					815					
Lys	Leu	Trp	Ile	Asn	Glu	Lys	Gln	Ser	Ile	Ala	Met	Ile	Ala	Ser	Leu				
			820					825					830						
Leu	Ser	Ala	Leu	Ala	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Ala	Glu	Thr	Leu	Val	Ala				
		835					840					845							
Gln	Arg	Ile	Ile	Ile	Asp	Thr	Ala	Ala	Thr	Asp	Leu	Leu	Asp	Ala	Thr				
	850					855					860								
Cys	Asp	Gly	Phe	Asn	Leu	Asn	Leu	Thr	Tyr	Pro	Thr	Ala	Leu	Met	Val				
865					870					875					880				
Leu	Gln	Val	Val	Lys	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys	Asp	Asp	Thr	Leu	Phe	Lys				
				885					890					895					

Ala Gly Phe Ser His Tyr Asn Met Ser Val Val Gln Ile Met Glu Lys  
 900 905 910  
 Asn Tyr Leu Ser Leu Leu Gly Asp Ala Trp Lys Asp Leu Thr Trp Arg  
 915 920 925  
 Glu Lys Leu Ser Ala Thr Trp His Ser Tyr Lys Ala Lys Arg Ser Ile  
 930 935 940  
 Thr Gln Phe Ile Lys Pro Ile Gly Lys Ala Asp Leu Lys Gly Leu Tyr  
 945 950 955 960  
 Asn Ile Ser Pro Gln Ala Phe Leu Gly Gln Gly Val Gln Arg Val Lys  
 965 970 975  
 Gly Thr Ala Ser Gly Leu Asn Glu Arg Leu Asn Asn Tyr Ile Asn Thr  
 980 985 990  
 Lys Cys Val Asn Ile Ser Ser Phe Phe Ile Arg Arg Ile Phe Arg Arg  
 995 1000 1005  
 Leu Pro Thr Phe Val Thr Phe Ile Asn Ser Leu Leu Val Ile Ser  
 1010 1015 1020  
 Met Leu Thr Ser Val Val Ala Val Cys Gln Ala Ile Ile Leu Asp  
 1025 1030 1035  
 Gln Arg Lys Tyr Arg Lys Glu Ile Glu Leu Met Gln Ile Glu Lys  
 1040 1045 1050  
 Asn Glu Ile Val Cys Met Glu Leu Tyr Ala Ser Leu Gln Arg Lys  
 1055 1060 1065  
 Leu Glu Arg Glu Phe Thr Trp Asp Glu Tyr Met Glu Tyr Leu Lys  
 1070 1075 1080  
 Ser Val Asn Pro Gln Ile Val Gln Phe Ala Gln Ala Gln Met Glu  
 1085 1090 1095  
 Glu Tyr Asn Val Arg His Gln Arg Ser Thr Pro Gly Val Lys Asn  
 1100 1105 1110  
 Leu Glu Gln Val Val Ala Phe Ile Thr Leu Ile Ile Met Met Phe  
 1115 1120 1125  
 Asp Ala Glu Arg Ser Asp Cys Val Phe Lys Thr Leu Asn Lys Phe  
 1130 1135 1140  
 Lys Gly Ile Val Ser Ser Met Asp His Glu Val Lys His Gln Ser  
 1145 1150 1155  
 Leu Asp Asp Val Ile Lys Asn Phe Asp Glu Arg Asn Glu Val Ile  
 1160 1165 1170  
 Asp Phe Glu Leu Asn Glu Asp Thr Ile Lys Thr Ser Ser Val Leu  
 1175 1180 1185  
 Asp Thr Lys Phe Ser Asp Trp Trp Asp Arg Gln Ile Gln Met Gly  
 1190 1195 1200

His	Thr	Leu	Pro	His	Tyr	Arg	Thr	Glu	Gly	His	Phe	Met	Glu	Phe
1205						1210					1215			
Thr	Arg	Ala	Thr	Ala	Val	Gln	Val	Ala	Asn	Asp	Ile	Ala	His	Ser
1220						1225					1230			
Glu	His	Leu	Asp	Phe	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Val	Gly	Ser	Gly	Lys
1235						1240					1245			
Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Val	His	Leu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Val	Leu
1250						1255					1260			
Leu	Ile	Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	Leu	Ala	Glu	Asn	Val	Phe	Lys	Gln
1265						1270					1275			
Leu	Ser	Ser	Glu	Pro	Phe	Phe	Lys	Lys	Pro	Thr	Leu	Arg	Met	Arg
1280						1285					1290			
Gly	Asn	Ser	Val	Phe	Gly	Ser	Ser	Pro	Ile	Ser	Ile	Met	Thr	Ser
1295						1300					1305			
Gly	Phe	Ala	Leu	His	Tyr	Tyr	Ala	Asn	Asn	Arg	Ser	Gln	Leu	Thr
1310						1315					1320			
Gln	Phe	Asn	Phe	Ile	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	His	Val	Leu	Asp	Pro
1325						1330					1335			
Ser	Ala	Met	Ala	Phe	Arg	Ser	Leu	Leu	Ser	Val	Tyr	His	Gln	Thr
1340						1345					1350			
Cys	Lys	Val	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Gly	Arg	Glu	Val
1355						1360					1365			
Glu	Phe	Thr	Thr	Gln	Gln	Pro	Val	Lys	Leu	Val	Val	Glu	Asp	Thr
1370						1375					1380			
Leu	Ser	Phe	Gln	Ser	Phe	Val	Asp	Ala	Gln	Gly	Ser	Lys	Thr	Asn
1385						1390					1395			
Ala	Asp	Val	Val	Gln	His	Gly	Ser	Asn	Ile	Leu	Val	Tyr	Val	Ser
1400						1405					1410			
Ser	Tyr	Asn	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Ala	Lys	Leu	Leu	Thr	Asp	Arg
1415						1420					1425			
Asn	Met	Val	Val	Ser	Lys	Val	Asp	Gly	Arg	Thr	Met	Lys	His	Gly
1430						1435					1440			
Cys	Leu	Glu	Ile	Val	Thr	Lys	Gly	Thr	Ser	Ala	Lys	Pro	His	Phe
1445						1450					1455			
Val	Val	Ala	Thr	Asn	Ile	Ile	Glu	Asn	Gly	Val	Thr	Leu	Asp	Ile
1460						1465					1470			
Asp	Val	Val	Val	Asp	Phe	Gly	Leu	Lys	Val	Ser	Pro	Phe	Leu	Asp
1475						1480					1485			
Ile	Asp	Asn	Arg	Ser	Ile	Ala	Tyr	Asn	Lys	Ile	Ser	Val	Ser	Tyr
1490						1495					1500			
Gly	Glu	Arg	Ile	Gln	Arg	Leu	Gly	Arg	Val	Gly	Arg	Phe	Lys	Lys

1505	1510	1515
Gly Val Ala Leu Arg Ile	Gly His Thr Glu Lys	Gly Ile Ile Glu
1520	1525	1530
Ile Pro Ser Met Ile Ala	Ser Glu Ala Ala Leu	Ala Cys Phe Ala
1535	1540	1545
Tyr Asn Leu Pro Val Met	Thr Gly Gly Val Ser	Thr Ser Leu Ile
1550	1555	1560
Gly Asn Cys Thr Val Arg	Gln Val Lys Thr Met	Gln Gln Phe Glu
1565	1570	1575
Leu Ser Pro Phe Phe Ile	Gln Asn Phe Val Ala	His Asp Gly Ser
1580	1585	1590
Met His Pro Val Ile His	Asp Ile Leu Lys Lys	Tyr Lys Leu Arg
1595	1600	1605
Asp Cys Met Thr Pro Leu	Cys Asp Gln Ser Ile	Pro Tyr Arg Ala
1610	1615	1620
Ser Ser Thr Trp Leu Ser	Val Ser Glu Tyr Glu	Arg Leu Gly Val
1625	1630	1635
Val Leu Asp Ile Pro Lys	Gln Ile Lys Ile Ala	Phe His Ile Lys
1640	1645	1650
Asp Ile Pro Pro Lys Leu	His Glu Met Leu Trp	Glu Thr Val Ile
1655	1660	1665
Lys Tyr Lys Asp Val Cys	Leu Phe Pro Ser Ile	Arg Ala Ser Ser
1670	1675	1680
Ile Ser Lys Ile Ala Tyr	Thr Leu Arg Thr Asp	Leu Phe Ala Ile
1685	1690	1695
Pro Arg Thr Leu Ile Leu	Val Glu Arg Leu Ile	Glu Glu Glu Arg
1700	1705	1710
Val Lys Gln Ser Gln Phe	Arg Ser Leu Ile Asp	Glu Gly Cys Ser
1715	1720	1725
Ser Met Phe Ser Ile Val	Asn Leu Thr Asn Thr	Leu Arg Ala Arg
1730	1735	1740
Tyr Ala Lys Asp Tyr Thr	Ala Glu Asn Ile Gln	Lys Leu Glu Lys
1745	1750	1755
Val Arg Ser Gln Leu Lys	Glu Phe Ser Asn Leu	Asn Gly Ser Ala
1760	1765	1770
Cys Glu Glu Asn Leu Met	Lys Arg Tyr Glu Ser	Leu Gln Phe Val
1775	1780	1785
His His Gln Ala Thr Thr	Ser Leu Ala Lys Asp	Leu Lys Leu Lys
1790	1795	1800
Gly Val Trp Lys Lys Ser	Leu Val Val Gln Asp	Leu Leu Ile Ala
1805	1810	1815

Gly Ala	Val Ala	Ile Gly	Gly Gly	Ile Gly	Leu Ile	Tyr	Ser Trp	Phe	
1820			1825			1830			
Thr Gln	Ser Val	Glu Thr	Val	Ser His	Gln Gly	Lys	Asn Lys	Ser	
1835			1840			1845			
Lys Arg	Ile Gln	Ala Leu	Lys	Phe Arg	His Ala	Arg	Asp Lys	Arg	
1850			1855			1860			
Ala Gly	Phe Glu	Ile Asp	Asn	Asn Asp	Asp Thr	Ile	Glu Glu	Phe	
1865			1870			1875			
Phe Gly	Ser Ala	Tyr Arg	Lys	Lys Gly	Lys Gly	Lys	Gly Thr	Thr	
1880			1885			1890			
Val Gly	Met Gly	Lys Ser	Ser	Arg Arg	Phe Val	Asn	Met Tyr	Gly	
1895			1900			1905			
Phe Asp	Pro Thr	Glu Tyr	Ser	Phe Ile	Gln Phe	Val	Asp Pro	Leu	
1910			1915			1920			
Thr Gly	Ala Gln	Ile Glu	Glu	Asn Val	Tyr Ala	Asp	Ile Arg	Asp	
1925			1930			1935			
Ile Gln	Glu Arg	Phe Ser	Asp	Val Arg	Lys Lys	Met	Val Glu	Asp	
1940			1945			1950			
Asp Glu	Ile Glu	Leu Gln	Ala	Leu Gly	Ser Asn	Thr	Thr Ile	His	
1955			1960			1965			
Ala Tyr	Phe Arg	Lys Asp	Trp	Ser Asp	Lys Ala	Leu	Lys Ile	Asp	
1970			1975			1980			
Leu Met	Pro His	Asn Pro	Leu	Lys Ile	Cys Asp	Lys	Ser Asn	Gly	
1985			1990			1995			
Ile Ala	Lys Phe	Pro Glu	Arg	Glu Leu	Glu Leu	Arg	Gln Thr	Gly	
2000			2005			2010			
Pro Ala	Ile Glu	Val Asp	Val	Lys Asp	Ile Pro	Lys	Gln Glu	Val	
2015			2020			2025			
Glu His	Glu Ala	Lys Ser	Leu	Met Arg	Gly Leu	Arg	Asp Phe	Asn	
2030			2035			2040			
Pro Ile	Ala Gln	Thr Val	Cys	Arg Val	Lys Val	Ser	Val Glu	Tyr	
2045			2050			2055			
Gly Thr	Ser Glu	Met Tyr	Gly	Phe Gly	Phe Gly	Ala	Tyr Ile	Ile	
2060			2065			2070			
Val Asn	His His	Leu Phe	Lys	Ser Phe	Asn Gly	Ser	Met Glu	Val	
2075			2080			2085			
Arg Ser	Met His	Gly Thr	Phe	Arg Val	Lys Asn	Leu	His Ser	Leu	
2090			2095			2100			
Ser Val	Leu Pro	Ile Lys	Gly	Arg Asp	Ile Ile	Ile	Ile Lys	Met	
2105			2110			2115			

Pro Lys Asp Phe Pro Val Phe	Pro Gln Lys Leu His	Phe Arg Ala
2120	2125	2130
Pro Val Gln Asn Glu Arg Ile	Cys Leu Val Gly Thr	Asn Phe Gln
2135	2140	2145
Glu Lys His Ala Ser Ser Ile	Ile Thr Glu Thr Ser	Thr Thr Tyr
2150	2155	2160
Asn Val Pro Gly Ser Thr Phe	Trp Lys His Trp Ile	Glu Thr Asn
2165	2170	2175
Asp Gly His Cys Gly Leu Pro	Val Val Ser Thr Ala	Asp Gly Cys
2180	2185	2190
Leu Val Gly Ile His Ser Leu	Ala Asn Asn Val Gln	Thr Thr Asn
2195	2200	2205
Tyr Tyr Ser Ala Phe Asp Glu	Asp Phe Glu Ser Lys	Tyr Leu Arg
2210	2215	2220
Thr Asn Glu His Asn Glu Trp	Thr Lys Ser Trp Val	Tyr Asn Pro
2225	2230	2235
Asp Thr Val Leu Trp Gly Pro	Leu Lys Leu Lys Glu	Ser Thr Pro
2240	2245	2250
Lys Gly Leu Phe Lys Thr Thr	Lys Leu Val Gln Asp	Leu Ile Asp
2255	2260	2265
His Asp Val Val Val Glu Gln	Ala Lys His Ser Ala	Trp Met Tyr
2270	2275	2280
Glu Ala Leu Thr Gly Asn Leu	Gln Ala Val Ala Thr	Met Lys Ser
2285	2290	2295
Gln Leu Val Thr Lys His Val	Val Lys Gly Glu Cys	Arg His Phe
2300	2305	2310
Lys Glu Phe Leu Thr Val Asp	Ser Glu Ala Glu Ala	Phe Phe Arg
2315	2320	2325
Pro Leu Met Asp Ala Tyr Gly	Lys Ser Leu Leu Asn	Arg Glu Ala
2330	2335	2340
Tyr Ile Lys Asp Ile Met Lys	Tyr Ser Lys Pro Ile	Asp Val Gly
2345	2350	2355
Ile Val Asp Cys Asp Ala Phe	Glu Glu Ala Ile Asn	Arg Val Ile
2360	2365	2370
Ile Tyr Leu Gln Val His Gly	Phe Gln Lys Cys Asn	Tyr Ile Thr
2375	2380	2385
Asp Glu Gln Glu Ile Phe Lys	Ala Leu Asn Met Lys	Ala Ala Val
2390	2395	2400
Gly Ala Met Tyr Gly Gly Lys	Lys Lys Asp Tyr Phe	Glu His Phe
2405	2410	2415
Thr Glu Ala Asp Lys Glu Glu	Ile Val Met Gln Ser	Cys Phe Arg

2420	2425	2430
Leu Tyr Lys Gly Ser	Leu Gly Ile Trp Asn Gly Ser	Leu Lys Ala
2435	2440	2445
Glu Leu Arg Cys Lys	Glu Lys Ile Leu Ala Asn Lys	Thr Arg Thr
2450	2455	2460
Phe Thr Ala Ala Pro	Leu Asp Thr Leu Leu Gly Gly	Lys Val Cys
2465	2470	2475
Val Asp Asp Phe Asn Asn	Gln Phe Tyr Ser Lys Asn	Ile Glu Cys
2480	2485	2490
Cys Trp Thr Val Gly Met	Thr Lys Phe Tyr Gly Gly	Trp Asp Lys
2495	2500	2505
Leu Leu Arg Arg Leu Pro	Glu Asn Trp Val Tyr Cys	Asp Ala Asp
2510	2515	2520
Gly Ser Gln Phe Asp Ser	Ser Leu Thr Pro Tyr Leu	Ile Asn Ala
2525	2530	2535
Val Leu Ile Ile Arg Ser	Thr Tyr Met Glu Asp Trp	Asp Leu Gly
2540	2545	2550
Leu Gln Met Leu Arg Asn	Leu Tyr Thr Glu Ile Ile	Tyr Thr Pro
2555	2560	2565
Ile Ser Thr Pro Asp Gly	Thr Ile Val Lys Lys Phe	Arg Gly Asn
2570	2575	2580
Asn Ser Gly Gln Pro Ser	Thr Val Val Asp Asn Ser	Leu Met Val
2585	2590	2595
Val Leu Ala Met His Tyr	Ala Leu Ile Lys Glu Cys	Val Glu Phe
2600	2605	2610
Glu Glu Ile Asp Ser Thr	Cys Val Phe Phe Val Asn	Gly Asp Asp
2615	2620	2625
Leu Leu Ile Ala Val Asn	Pro Glu Lys Glu Ser Ile	Leu Asp Arg
2630	2635	2640
Met Ser Gln His Phe Ser	Asp Leu Gly Leu Asn Tyr	Asp Phe Ser
2645	2650	2655
Ser Arg Thr Arg Arg Lys	Glu Glu Leu Trp Phe Met	Ser His Arg
2660	2665	2670
Gly Leu Leu Ile Glu Asp	Met Tyr Val Pro Lys Leu	Glu Glu Glu
2675	2680	2685
Arg Ile Val Ser Ile Leu	Gln Trp Asp Arg Ala Asp	Leu Pro Glu
2690	2695	2700
His Arg Leu Glu Ala Ile	Cys Ala Ala Met Ile Glu	Ser Trp Gly
2705	2710	2715
Tyr Phe Glu Leu Thr His	Gln Ile Arg Arg Phe Tyr	Ser Trp Leu
2720	2725	2730

Leu	Gln	Gln	Gln	Pro	Phe	Ser	Thr	Ile	Ala	Gln	Glu	Gly	Lys	Ala
2735						2740					2745			
Pro	Tyr	Ile	Ala	Ser	Met	Ala	Leu	Lys	Lys	Leu	Tyr	Met	Asn	Arg
2750						2755					2760			
Thr	Val	Asp	Glu	Glu	Glu	Leu	Lys	Ala	Phe	Thr	Glu	Met	Met	Val
2765						2770					2775			
Ala	Leu	Asp	Asp	Glu	Phe	Glu	Cys	Asp	Thr	Tyr	Glu	Val	His	His
2780						2785					2790			
Gln	Gly	Asn	Asp	Thr	Ile	Asp	Ala	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Lys	Asp
2795						2800					2805			
Ala	Lys	Gln	Glu	Gln	Gly	Ser	Ile	Gln	Pro	Asn	Leu	Asn	Lys	Glu
2810						2815					2820			
Lys	Glu	Lys	Asp	Val	Asn	Val	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	His	Thr	Val
2825						2830					2835			
Pro	Arg	Ile	Lys	Ala	Ile	Thr	Ser	Lys	Met	Lys	Met	Pro	Lys	Ser
2840						2845					2850			
Lys	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Asn	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala
2855						2860					2865			
Pro	Gln	Gln	Ile	Asp	Ile	Ser	Asn	Thr	Arg	Ala	Thr	Gln	Ser	Gln
2870						2875					2880			
Phe	Asp	Thr	Trp	Tyr	Glu	Ala	Val	Gln	Leu	Ala	Tyr	Asp	Ile	Gly
2885						2890					2895			
Glu	Thr	Glu	Met	Pro	Thr	Val	Met	Asn	Gly	Leu	Met	Val	Trp	Cys
2900						2905					2910			
Ile	Glu	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Asn	Gly	Val	Trp	Val	Met
2915						2920					2925			
Met	Asp	Gly	Asn	Glu	Gln	Val	Glu	Tyr	Pro	Leu	Lys	Pro	Ile	Val
2930						2935					2940			
Glu	Asn	Ala	Lys	Pro	Thr	Leu	Arg	Gln	Ile	Met	Ala	His	Phe	Ser
2945						2950					2955			
Asp	Val	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ile	Glu	Met	Arg	Asn	Lys	Lys	Glu	Pro
2960						2965					2970			
Tyr	Met	Pro	Arg	Tyr	Gly	Leu	Val	Arg	Asn	Leu	Arg	Asp	Gly	Ser
2975						2980					2985			
Leu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Phe	Asp	Phe	Tyr	Glu	Val	Thr	Ser	Arg	Thr
2990						2995					3000			
Pro	Val	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	His	Ile	Gln	Met	Lys	Ala	Ala	Ala
3005						3010					3015			
Leu	Lys	Ser	Ala	Gln	Ser	Arg	Leu	Phe	Gly	Leu	Asp	Gly	Gly	Ile
3020						3025					3030			



Ser Thr Gln Glu Glu Asn Thr Glu Arg His Thr Thr Glu Asp Val  
3035 3040 3045

Ser Pro Ser Met His Thr Leu Leu Gly Val Lys Asn Met  
3050 3055 3060

<210> 3

<211> 9698

<212> ADN

<213> Virus de la pomme de terre

<220>

<223> Séquence PVYO-139

<400> 3

aattaaaaca	actcaataca	acataagaaa	aacagcgcaa	aaacactcat	aaacgcttat	60
tctcactcaa	gcattcttgc	aagtttcagt	ttaaatcatt	tccttgcaat	tctcttaaac	120
aattattggaa	accattttcaa	ctcaacaagc	aatttcatca	cttccaacca	attttaaatac	180
ctcgatggca	acttacatgt	caacgatctg	tttcggttcg	tttgaatgca	agctaccata	240
ctcaccggcc	tcttgccggc	ttattgtgaa	ggaacgagaa	gtgctggcct	ccgttaatcc	300
tttcgcagat	ctggaaacac	aacttagtgc	acgattgctc	aagcaagaat	atgctactgt	360
tcgtgtgctc	aagaacggta	cttttacgta	tcgatacaag	actgatgccc	agataaagcg	420
cattcagaag	aaactggaga	ggaaggatag	ggaagaatat	cacttccaaa	tgcccgctcc	480
tagtattgtg	tcaaaaatta	ctatagctgg	tggagatcct	ccatcaaagt	ctgagccaca	540
agcaccaaga	gggatcattc	atacaactcc	aagggtgcgt	aaagtcaaga	cacgccccat	600
aataaagttg	acagaaggcc	agatgaatca	tttcattaa	caggtaaagc	agattatgtc	660
ggagaagaga	gggtctgtcc	acttaattaa	taagaagacc	actcatgttc	aatataagga	720
gatacttggg	gcatactccg	ccacggttcg	aactgcacat	atgatgggtt	tgcgacggag	780
agtggacttc	cgatgtgata	tgtggacagt	tggacttttg	caacgtctcg	ctcgacggga	840
caaatggctc	aatcaagtcc	gcactatcaa	catacgaagg	ggtgatagt	gagtcattct	900
gaacacaaaa	agcctcaaa	gccactttgg	tagaagttca	ggagacttgt	tcatagtgcg	960
cggatcacat	gaagggaat	tgtacgatgc	acgttctaga	gttactcaga	gtgttttgga	1020
ctcaatgata	cagttttcga	atgctgataa	tttttggaag	ggtctggacg	gcaattgggc	1080
acgaatgaga	tatccttcgg	atcacacatg	tgtagctggg	ttacctgtcg	aagattgtgg	1140
taggggttgc	gcattgatgg	cacacagtat	cctcccatgc	tataagataa	cctgccccac	1200
ctgtgtctca	cagtatgcca	gcttgccggg	tagcgatctg	tttaagctgt	tgcataaaca	1260
tgcaagagat	ggtttgaacc	gattgggagc	agataaagac	cggtttatac	atgttaataa	1320
gttcttgata	gcgttagagc	atctaactga	accggtggat	ttgaatctcg	agcttttcaa	1380
tgagatatatt	aaatccatag	gggagaagca	gcaagcaccg	ttcaagaatt	taaatgtcct	1440
gaataatttc	ttcctgaaag	gaaaagaaaa	tacagctcat	gaatggcagg	tggtcaatt	1500
gagtttgctc	gaattagcaa	ggttccagaa	gaatagaact	gataacatca	agaaagggtga	1560
tatatccttc	ttcagaaata	aattatttgc	caaggcaaat	tggaaatctgt	atttgtcggtg	1620
cgacaaccaa	ttggacaaaa	atgcaaat	cctgtgggga	caaaggaggt	atcatgctaa	1680
gcggtttttc	tcaaacttct	ttgaggaaat	tgatccagca	aagggatact	cagcatatga	1740
aatccgcaag	catccaagt	gaacaaggaa	gctctcaatt	ggtaacttag	ttgtccact	1800
tgatttagct	gagtttaggc	agaagatgaa	aggtgactat	aggaaacaac	caggggtcag	1860
cagaaagtgc	acgagttcga	aagatggtaa	ttatgtgtat	ccctgttggt	gcacaacact	1920
tgatgatggg	tcagccattg	aatcaacatt	ctatccacca	actaaaaagc	accttgtaat	1980
aggcaatagt	ggtgacaaa	agtttgttga	tttaccaaaa	ggggattcag	agatgttata	2040
cattgccaag	cagggttatt	gttatattaa	cgtgtttctt	gcaatgctaa	ttacatttgg	2100
cgaggaggat	gcaaaggatt	tcacaaagaa	agtcgcgcac	atgtgtgtgc	cgaagcttgg	2160
aacctggcca	actatgatgg	atttggcgac	cacttgtgct	caaatgagaa	tattctatcc	2220
tgacgtgcat	gatgcagagc	tgccatgttt	attgggttgac	catgacactc	aaacgtgtca	2280
tgtgggtgac	tcatttggct	cgcagacaac	tggatatcat	attctaaaag	catccagcgt	2340
gtctcaactt	atcttgtttg	caaatgatga	attagaatct	gatataaaac	attatagagt	2400
tgggtggcgtt	cctaattgat	gccctgaact	tgggtccacg	atatcacctt	ttagagaagg	2460
aggagttata	atgtctgagt	cggcagcgct	gaaactgctt	ttgaagggaa	tttttagacc	2520
taaggtgatg	agacagttgc	tgttagatga	gccttacctg	ttgattctat	caatattatc	2580
ccctggcata	ctgatggcta	tgtataataa	tgggattttt	gaacttgcgg	taagattgtg	2640
gattaatgag	aaacaatcca	tagctatgat	agcatcgcta	ctatcagctt	tagccctacg	2700

agtgtcagcg	gcagaaacac	tcgtcgcaca	gagaattata	attgatgctg	cagctacaga	2760
cctccttgat	gctacgtgtg	atggattcaa	cctacatcta	acgtacccca	ctgcattaat	2820
ggtgttgcaa	gttgttaaga	atagaaatga	atgtgatgat	accctattca	aggcgggttt	2880
tccaagttac	aacacgagtg	ttgtgcagat	tatggaaaaa	aattatctaa	gtctcttgga	2940
cgatgcttgg	aaagatttaa	cttggcggga	aaaattatcc	gcaacatggg	actcatacag	3000
agcaaaacgc	tctatcactc	ggtacataaa	accacagga	agggcagatt	tgaaaggggt	3060
atacaacata	tcaccacaag	cattcttggg	ccgaagcgcc	caggtgggtca	aaggcactgc	3120
ctcaggattg	agcgagcgat	ttaataatta	tttcaatact	aagtgtgtaa	atatttcatc	3180
ttttttcatt	cgtagaatct	ttaggcgttt	gccaaacttt	gtcacttttg	ttaactcatt	3240
attagttatt	agtatgttaa	ctagcgtagt	ggcagtggtg	cagggaataa	ttttgatca	3300
gaggaagtat	aggagagaaa	tcgagttgat	gcagatagag	agaatgaga	ttgtctgcat	3360
ggagctatat	gcaagtttac	agcgcaaact	tgaacgcgat	ttcacatggg	atgagtacat	3420
tgagtatttg	aagtcagtg	accctcagat	agttcagttt	gctcaagcgc	agatggaaga	3480
atatgatgtg	cgacaccagc	gttccacacc	agggtgttaa	aatttggaac	aagaggtagc	3540
atttatggct	ttagtcatca	tggtgttcga	tgctgaaagg	agtgattgcg	ttttcaaaac	3600
tctcaataaa	tttaaggggtg	tcctttcctc	gctggaccaa	gaagttcgac	atcagtcctt	3660
agacgatgtg	atcaagaatt	ttgatgagag	gaatgagatt	attgattttg	agttgagtga	3720
ggacacaatt	cgaacatcat	cagtgtctaga	tacaaagttt	agtgattggg	gggaccgaca	3780
aatccagatg	ggacatacac	ttccacatta	cagaaccgag	gggcacttca	tggaaatttac	3840
aagagcaact	gctgttcaag	tggtcaatga	cattgcccat	agtgaacacc	tagacttttt	3900
agtaagggga	gctgttgggt	ctggaaagtc	aactgggttg	cctgttcatc	ttagtgtagc	3960
cggatctgtg	cttttaattg	aaccaacgcg	accactagcg	gagaacgttt	tcaaacagct	4020
atctagttaa	ccattcttca	agaagccaac	actgcgtatg	cgcggaataa	gtatatattg	4080
ctcttctcca	atctccgtca	tgactagcgg	attcgcgcta	cactacttgc	ccaataaccg	4140
ctcccaatta	gctcagttca	actttgtaat	atttgatgag	tgccatgttc	tggatccttc	4200
cgcaatggcg	ttccgcagtc	tgctgagtg	ttatcatcaa	gcatgcaaag	tattaaaagt	4260
gtcagctact	ccagtgggaa	gagaggttga	attcacaaca	cagcagccag	tcaagttgat	4320
agtggaggac	acactgtctt	tccaatcatt	tgttgatgca	caaggttcta	aaactaatgc	4380
tgtgtgtgtt	cagtttgggt	caaacgtact	tgtgtatgtg	tcgagctaca	atgaagttga	4440
taccttggct	aagctcctaa	cagacaagaa	tatgatggtc	acaaagggtg	atggcagaac	4500
aatgaagcac	ggttgccctag	aaattgtcac	aaaaggaacc	agtgcgagac	cacattttgt	4560
tgtagcaacc	aacataattg	aaaatggagt	aactttggac	atagacgtgg	ttgtggattt	4620
tgggttga	gtctcaccat	tcttggacat	tgacaatagg	agcattgcct	acaataagga	4680
gagtgttagc	tatgggtgaa	gaattcaaag	gttgggtcgt	gttggacgct	tcaagaaagg	4740
agtagcattg	cgcatgtgac	acactgagaa	gggaattatt	gaaattccaa	gcatggttgc	4800
tactgaggcg	gctcttgctt	gctttgcata	taacttgcca	gtgatgacag	gcggcgctct	4860
aactagtctg	attggcaatt	gtactgtgcg	ccagggttaa	acaatgcagc	aatttgaatt	4920
gagtccttct	tttatccaga	atttcgttgc	tcatgatgga	tcaatgcac	ctgtcataca	4980
tgacattctt	aaaaagtata	aacttcgaga	ttgtatgaca	cctttgtgcg	atcagtctat	5040
accatacagg	gcatcgtgca	cttggttatc	ggttagtgaa	tatgagcgac	ttggagtggc	5100
cttagaaatt	ccaaagcaaa	tcaaaattgc	attccataat	aaagagatcc	ctcctaagct	5160
ccacgaaatg	ctttgggaaa	cggttgtaaa	atacaaaagc	gtttgcttat	ttccaagcat	5220
tcgagcatcg	tccatcagca	aaatcgcata	cacattgcgt	acagacctct	tcgccatccc	5280
aagaactcta	atattgggtg	agagattact	tgaagaggag	cgagtgaagc	agagccaatt	5340
cagaagtctc	atcgatgaag	ggtgctcaag	tatgttttca	attgttaact	tgaccaacac	5400
tctcagagct	agatatgcaa	aagattacac	cgcagagaac	atacaaaaac	ttgagaaagt	5460
gagaagtcaa	ttaaaagaat	tctcaaattc	ggatggttct	gcatgtgagg	agaatttaat	5520
aaagaggtat	gagtctttgc	agttcgttca	tcaccaagct	gcgacgtcac	ttgcaaagga	5580
tctcaagttg	aaggggacct	ggaagaaatc	attagtggct	aaagacttga	tcatagcagg	5640
cgctgttgca	attgggtggt	taggactcat	atatagttgg	ttcacacaat	cagttgagac	5700
tgtgtcccac	caagggaaaa	ataaatccaa	agaatccaa	gccttgaagt	ttcgccatgc	5760
tcgtgacaaa	agggctggct	ttgaaattga	caacaatgat	gacacaatag	aggaattctt	5820
tggatctgca	tataggaaaa	agggaaaagg	taaaggtacc	acagttggta	tgggcaagtc	5880
aagcaggaag	ttcatcaaca	tgtatgggtt	tgatccaaca	gagtactcat	tcattccagt	5940
cgttgatcca	ctcactgggg	cgcaaataga	agagaatgtc	tatgctgaca	ttagagacat	6000
tcaagataga	tttagtgaag	tgcgaaagaa	aatggttgag	aatgatgaca	ttgaaatgca	6060
agccttgggt	agtaacacaa	ccatacatgc	atacttcagg	aaagattggg	ctgacaaaagc	6120
tttgaagatt	gacttaatgc	cacacaaccc	actcaaagtt	tgtgacaaaa	caaattggcat	6180
tgcaaaattt	cctgagagag	agctcgaaact	aaggcagact	gggccagctg	tagaagtcaa	6240
tgtgaaggac	ataccagcac	aggaggtgga	gcatgaagct	aaatcgctca	tgagaggctt	6300
gagagacttc	aatccaattg	cccaaacagt	ttgtaggctg	aaagtatctg	ttgaatatgg	6360

gacatcagag	atgtacgggt	ttggatttgg	agcatacata	atagcgaacc	accatttgtt	6420
taggagttac	aatgggttcca	tggaggtgca	atccatgcac	ggtacattca	gggtgaagaa	6480
tctacacagt	ttgagcgttc	tgccaattaa	aggtagggac	atcatcctca	tcaaaatgcc	6540
gaaagatttc	cctgtctttc	cacagaaatt	gcatttccga	gctcctatac	agaatgaaag	6600
agtttgttta	gttgaggacca	actttcagga	gaagtatgca	tctgcaatca	tcacagaaac	6660
aagcactact	tacaatatac	caggcagcac	attctggaag	cattggattg	aaacagataa	6720
tggacattgt	ggactaccag	tggtaagcac	tgccgatgga	tgtctagtcg	gaattcacag	6780
tttggcacac	aatgcacaca	ccacgaacta	ctactcagcc	ttcgatgagg	attttgaaag	6840
caagtacctc	cgggccaatg	agcacaatga	atgggtcaag	tcttggaaat	ataatccaga	6900
cacagtgttg	tggggcccg	tgaacttaa	agacagcact	cccaaagggt	tattttaaac	6960
aacaaagctt	gtgcaagatc	taatcgagca	tgatgtagtg	gtggagcaag	ctaagcactc	7020
tgcgtggatg	tttgaagcct	tgacaggaaa	tttgcaagct	gtcgcaacaa	tgaagagcca	7080
attagtaacc	aagcatgtag	ttaaaggaga	gtgtcgacac	ttcaaggagt	tcctgactgt	7140
ggatgcagaa	gcagaggcat	tcttcaggcc	tttgatggat	gcgtatggga	aaagcttgct	7200
gaacagagat	gcgtacatca	aggacataat	gaagtattca	aaacctatag	atggttggtat	7260
cgtggattgt	gatgcattcg	aggaagccat	caatagggtt	atcatctacc	tgcaagtgca	7320
cggcttcaag	aagtgtgcac	atgtcactga	cgagcaagaa	attttcaaag	cgcttaacat	7380
gaaagctgca	gtcggagcca	tgtatggtgg	caaaaagaaa	gactactttg	agcatttcac	7440
tgatgcagac	aaggaagaaa	tagtcatgca	aagctgtctg	cgattgtata	aaggcttgct	7500
cggcatttgg	aatggatcat	tgaaggcaga	gctccggtgt	aaggaaaaga	tacttgcaaa	7560
taagacgagg	acattcactg	ctgcacctct	agacactttg	ctgggtggta	aagtgtgtgt	7620
tgacgacttc	aataatcaat	tttattcaaa	gaatattgag	tgctgttgga	cagttgggat	7680
gactaagttt	tatggtggtt	gggataaact	gcttcggcgt	ttacctgaga	attgggtata	7740
ctgtgatgct	gatggctcac	agtttgatag	ttcactaact	ccatacttat	tcaatgctgt	7800
tctcaccatc	agaagcacat	acatggaaga	ctgggatgtg	gggctgcaaa	tgctgcgtaa	7860
tttatacact	gagattgttt	acacacctat	ttcaactcca	gatggaacaa	ttgttaagaa	7920
gttcagagga	aataacagtg	gtcagccttc	tactgtttgt	gacaactctc	ttatggtcgt	7980
ccttgccatg	cactatgctt	tcatcagaga	aggcattgag	tttgaagaaa	ctgacagcac	8040
gtgcgtgttc	tttgtcaatg	gtgatgattt	gctgattgct	gtgaatccgg	ataaagagga	8100
cattcttgac	agattgtcac	aacacttctc	agatcttggc	ttaaattatg	atctctcgct	8160
aagaacaaga	aataaggaag	agttgtggtt	tatgtctcat	aggggcctac	tgattgaggg	8220
catgtacgtg	cogaaacttg	aagaagaaag	gattgtgtcc	attctccaat	gggacagagc	8280
agacttggct	gaacacaggc	ttgaggcgat	ttgcgcacgt	atgatagagt	cctgggggta	8340
ttctgaacta	acacaccaaa	tcaggagatt	ctactcatgg	ttattgcaac	agcaaccttt	8400
tgcaacaata	gcgcaggagg	ggaaggctcc	ttatatagca	agcatggcat	taaggaaact	8460
gtatatggat	agggtgtgtg	atgaggaaga	gcttagagcc	ttcactgaaa	tgatggctgc	8520
attagacgat	gagtttgagt	ttgactctta	tgaagtatac	catcaagcaa	atgacacaa	8580
tgatgcagga	ggaagcaaca	agaaagatac	aaaaccagag	caaagcagca	tccagtcaaa	8640
cccgaacaaa	ggaaaagata	aagatgtgaa	tgccggcaca	tctgggacac	acactgtacc	8700
gagaatcaag	gctatcacgt	ccaaaatgag	aatgcccaaa	agcaaggagg	cagctgtgct	8760
gaatttagaa	cacttgcttg	agtatgctcc	acaacaaatt	gatatttcaa	atactcgggc	8820
aactcaatca	cagtttgata	cgtggtatga	agcagtgcgg	atggcatacg	acataggaga	8880
aactgagatg	ccaactgtga	tgaatgggct	tatggtttgg	tgcatgaaa	atggaacctc	8940
gccaaatgtc	aacggagttt	gggttatgat	ggatgggaat	gaacaagttg	agtaccctgt	9000
gaaaccaatc	gttgagaatg	caaaaaccaac	ccttaggcaa	atcatggcac	atctctcaga	9060
tgttgacaga	gcgtatatag	aaatgcgcaa	caaaaaggaa	ccatatatgc	cacgatatgg	9120
tttaattcga	aatctgcggg	atatgggttt	agcgcgttat	gcttttgact	tttatgaggt	9180
cacatcacga	acaccagtga	gggctagggg	agcgcaaat	caaagaagg	ccgcagcatt	9240
gaaatcagcc	caacctcgac	ttttcgggtt	ggacgggtggc	atcagtacac	aagaggagaa	9300
cacagagagg	cacaccaccg	aggatgtctc	tccaagtatg	catactctac	ttggagtcaa	9360
gaacatgtga	tgtagtgtct	ctccggacga	tatataaata	tttacatatg	cagtaagtat	9420
tttggttttt	cctgtactac	ttttatcata	attaataatc	agtttgaata	ttactaatag	9480
atagaggtgg	cagggtgatt	tctgcattgt	ggtgactcta	tctgttaatt	tgcattattt	9540
aagtcttaga	taaaagtgcc	gggttgtcgt	tggtgtggat	gattcatcga	ttaggtgatg	9600
ttgcgattct	gtcgtagcag	tgactatgtc	tggatctatc	tgcttgggtg	atgttgtgat	9660
tttgtcataa	cagtgactgt	aaacttcaat	caggagac			9698

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 3081

&lt;212&gt; PRT

<213> Virus de la pomme de terre

<220>

<223> Polyprotéine contenant HC-PRO de PVYO-139

<400> 4

Met	Glu	Thr	Ile	Ser	Thr	Gln	Gln	Ala	Ile	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Asn	
1				5					10					15		
Leu	Lys	Ser	Ser	Met	Ala	Thr	Tyr	Met	Ser	Thr	Ile	Cys	Phe	Gly	Ser	
			20					25					30			
Phe	Glu	Cys	Lys	Leu	Pro	Tyr	Ser	Pro	Ala	Ser	Cys	Gly	Leu	Ile	Val	
		35					40					45				
Lys	Glu	Arg	Glu	Val	Leu	Ala	Ser	Val	Asn	Pro	Phe	Ala	Asp	Leu	Glu	
	50					55					60					
Thr	Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Gln	Glu	Tyr	Ala	Thr	Val	Arg	
65					70					75					80	
Val	Leu	Lys	Asn	Gly	Thr	Phe	Thr	Tyr	Arg	Tyr	Lys	Thr	Asp	Ala	Gln	
				85					90					95		
Ile	Lys	Arg	Ile	Gln	Lys	Lys	Leu	Glu	Arg	Lys	Asp	Arg	Glu	Glu	Tyr	
			100					105					110			
His	Phe	Gln	Met	Ala	Ala	Pro	Ser	Ile	Val	Ser	Lys	Ile	Thr	Ile	Ala	
		115					120					125				
Gly	Gly	Asp	Pro	Pro	Ser	Lys	Ser	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Arg	Gly	Ile	
	130					135					140					
Ile	His	Thr	Thr	Pro	Arg	Val	Arg	Lys	Val	Lys	Thr	Arg	Pro	Ile	Ile	
145					150					155					160	
Lys	Leu	Thr	Glu	Gly	Gln	Met	Asn	His	Phe	Ile	Lys	Gln	Val	Lys	Gln	
				165					170					175		
Ile	Met	Ser	Glu	Lys	Arg	Gly	Ser	Val	His	Leu	Ile	Asn	Lys	Lys	Thr	
			180					185					190			
Thr	His	Val	Gln	Tyr	Lys	Glu	Ile	Leu	Gly	Ala	Tyr	Ser	Ala	Thr	Val	
		195					200					205				
Arg	Thr	Ala	His	Met	Met	Gly	Leu	Arg	Arg	Arg	Val	Asp	Phe	Arg	Cys	
		210				215						220				
Asp	Met	Trp	Thr	Val	Gly	Leu	Leu	Gln	Arg	Leu	Ala	Arg	Thr	Asp	Lys	
225					230					235					240	
Trp	Ser	Asn	Gln	Val	Arg	Thr	Ile	Asn	Ile	Arg	Arg	Gly	Asp	Ser	Gly	
				245					250					255		
Val	Ile	Leu	Asn	Thr	Lys	Ser	Leu	Lys	Gly	His	Phe	Gly	Arg	Ser	Ser	
			260					265					270			
Gly	Asp	Leu	Phe	Ile	Val	Arg	Gly	Ser	His	Glu	Gly	Lys	Leu	Tyr	Asp	
		275					280					285				

Ala Arg Ser Arg Val Thr Gln Ser Val Leu Asp Ser Met Ile Gln Phe  
 290 295 300  
 Ser Asn Ala Asp Asn Phe Trp Lys Gly Leu Asp Gly Asn Trp Ala Arg  
 305 310 315 320  
 Met Arg Tyr Pro Ser Asp His Thr Cys Val Ala Gly Leu Pro Val Glu  
 325 330 335  
 Asp Cys Gly Arg Val Ala Ala Leu Met Ala His Ser Ile Leu Pro Cys  
 340 345 350  
 Tyr Lys Ile Thr Cys Pro Thr Cys Ala Gln Gln Tyr Ala Ser Leu Pro  
 355 360 365  
 Val Ser Asp Leu Phe Lys Leu Leu His Lys His Ala Arg Asp Gly Leu  
 370 375 380  
 Asn Arg Leu Gly Ala Asp Lys Asp Arg Phe Ile His Val Asn Lys Phe  
 385 390 395 400  
 Leu Ile Ala Leu Glu His Leu Thr Glu Pro Val Asp Leu Asn Leu Glu  
 405 410 415  
 Leu Phe Asn Glu Ile Phe Lys Ser Ile Gly Glu Lys Gln Gln Ala Pro  
 420 425 430  
 Phe Lys Asn Leu Asn Val Leu Asn Asn Phe Phe Leu Lys Gly Lys Glu  
 435 440 445  
 Asn Thr Ala His Glu Trp Gln Val Ala Gln Leu Ser Leu Leu Glu Leu  
 450 455 460  
 Ala Arg Phe Gln Lys Asn Arg Thr Asp Asn Ile Lys Lys Gly Asp Ile  
 465 470 475 480  
 Ser Phe Phe Arg Asn Lys Leu Phe Ala Lys Ala Asn Trp Asn Leu Tyr  
 485 490 495  
 Leu Ser Cys Asp Asn Gln Leu Asp Lys Asn Ala Asn Phe Leu Trp Gly  
 500 505 510  
 Gln Arg Glu Tyr His Ala Lys Arg Phe Phe Ser Asn Phe Phe Glu Glu  
 515 520 525  
 Ile Asp Pro Ala Lys Gly Tyr Ser Ala Tyr Glu Ile Arg Lys His Pro  
 530 535 540  
 Ser Gly Thr Arg Lys Leu Ser Ile Gly Asn Leu Val Val Pro Leu Asp  
 545 550 555 560  
 Leu Ala Glu Phe Arg Gln Lys Met Lys Gly Asp Tyr Arg Lys Gln Pro  
 565 570 575  
 Gly Val Ser Arg Lys Cys Thr Ser Ser Lys Asp Gly Asn Tyr Val Tyr  
 580 585 590  
 Pro Cys Cys Cys Thr Thr Leu Asp Asp Gly Ser Ala Ile Glu Ser Thr  
 595 600 605  
 Phe Tyr Pro Pro Thr Lys Lys His Leu Val Ile Gly Asn Ser Gly Asp

610	615	620
Gln Lys Phe Val Asp 625	Leu Pro Lys Gly Asp 630	Ser Glu Met Leu Tyr Ile 635 640
Ala Lys Gln Gly Tyr Cys Tyr Ile 645	Asn Val Phe Leu Ala Met 650	Leu Ile 655
Asn Ile Gly Glu Glu Asp 660	Ala Lys Asp Phe Thr Lys Lys 665	Val Arg Asp 670
Met Cys Val Pro Lys Leu Gly 675	Thr Trp Pro Thr Met Met 680 685	Asp Leu Ala
Thr Thr Cys Ala Gln Met Arg Ile Phe Tyr 690	Pro Asp Val His Asp Ala 700	
Glu Leu Pro Ser Leu Leu Val Asp His Asp 705 710	Thr Gln Thr Cys His Val 715 720	
Val Asp Ser Phe Gly Ser Gln Thr Thr Gly Tyr His Ile Leu Lys Ala 725 730 735		
Ser Ser Val Ser Gln Leu Ile Leu Phe Ala Asn Asp Glu Leu Glu Ser 740 745 750		
Asp Ile Lys His Tyr Arg Val Gly Gly Val Pro Asn Ala Cys Pro Glu 755 760 765		
Leu Gly Ser Thr Ile Ser Pro Phe Arg Glu Gly Gly Val Ile Met Ser 770 775 780		
Glu Ser Ala Ala Leu Lys Leu Leu Leu Lys Gly Ile Phe Arg Pro Lys 785 790 795 800		
Val Met Arg Gln Leu Leu Leu Asp Glu Pro Tyr Leu Leu Ile Leu Ser 805 810 815		
Ile Leu Ser Pro Gly Ile Leu Met Ala Met Tyr Asn Asn Gly Ile Phe 820 825 830		
Glu Leu Ala Val Arg Leu Trp Ile Asn Glu Lys Gln Ser Ile Ala Met 835 840 845		
Ile Ala Ser Leu Leu Ser Ala Leu Ala Leu Arg Val Ser Ala Ala Glu 850 855 860		
Thr Leu Val Ala Gln Arg Ile Ile Ile Asp Ala Ala Ala Thr Asp Leu 865 870 875 880		
Leu Asp Ala Thr Cys Asp Gly Phe Asn Leu His Leu Thr Tyr Pro Thr 885 890 895		
Ala Leu Met Val Leu Gln Val Val Lys Asn Arg Asn Glu Cys Asp Asp 900 905 910		
Thr Leu Phe Lys Ala Gly Phe Pro Ser Tyr Asn Thr Ser Val Val Gln 915 920 925		
Ile Met Glu Lys Asn Tyr Leu Ser Leu Leu Asp Asp Ala Trp Lys Asp 930 935 940		

Leu Thr Trp Arg Glu Lys Leu Ser Ala Thr Trp Tyr Ser Tyr Arg Ala  
 945 950 955 960  
 Lys Arg Ser Ile Thr Arg Tyr Ile Lys Pro Thr Gly Arg Ala Asp Leu  
 965 970 975  
 Lys Gly Leu Tyr Asn Ile Ser Pro Gln Ala Phe Leu Gly Arg Ser Ala  
 980 985 990  
 Gln Val Val Lys Gly Thr Ala Ser Gly Leu Ser Glu Arg Phe Asn Asn  
 995 1000 1005  
 Tyr Phe Asn Thr Lys Cys Val Asn Ile Ser Ser Phe Phe Ile Arg  
 1010 1015 1020  
 Arg Ile Phe Arg Arg Leu Pro Thr Phe Val Thr Phe Val Asn Ser  
 1025 1030 1035  
 Leu Leu Val Ile Ser Met Leu Thr Ser Val Val Ala Val Cys Gln  
 1040 1045 1050  
 Ala Ile Ile Leu Asp Gln Arg Lys Tyr Arg Arg Glu Ile Glu Leu  
 1055 1060 1065  
 Met Gln Ile Glu Lys Asn Glu Ile Val Cys Met Glu Leu Tyr Ala  
 1070 1075 1080  
 Ser Leu Gln Arg Lys Leu Glu Arg Asp Phe Thr Trp Asp Glu Tyr  
 1085 1090 1095  
 Ile Glu Tyr Leu Lys Ser Val Asn Pro Gln Ile Val Gln Phe Ala  
 1100 1105 1110  
 Gln Ala Gln Met Glu Glu Tyr Asp Val Arg His Gln Arg Ser Thr  
 1115 1120 1125  
 Pro Gly Val Lys Asn Leu Glu Gln Glu Val Ala Phe Met Ala Leu  
 1130 1135 1140  
 Val Ile Met Val Phe Asp Ala Glu Arg Ser Asp Cys Val Phe Lys  
 1145 1150 1155  
 Thr Leu Asn Lys Phe Lys Gly Val Leu Ser Ser Leu Asp His Glu  
 1160 1165 1170  
 Val Arg His Gln Ser Leu Asp Asp Val Ile Lys Asn Phe Asp Glu  
 1175 1180 1185  
 Arg Asn Glu Ile Ile Asp Phe Glu Leu Ser Glu Asp Thr Ile Arg  
 1190 1195 1200  
 Thr Ser Ser Val Leu Asp Thr Lys Phe Ser Asp Trp Trp Asp Arg  
 1205 1210 1215  
 Gln Ile Gln Met Gly His Thr Leu Pro His Tyr Arg Thr Glu Gly  
 1220 1225 1230  
 His Phe Met Glu Phe Thr Arg Ala Thr Ala Val Gln Val Ala Asn  
 1235 1240 1245

Asp	Ile	Ala	His	Ser	Glu	His	Leu	Asp	Phe	Leu	Val	Arg	Gly	Ala
1250						1255					1260			
Val	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Gly	Leu	Pro	Val	His	Leu	Ser	Val
1265						1270					1275			
Ala	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	Ile	Glu	Pro	Thr	Arg	Pro	Leu	Ala	Glu
1280						1285					1290			
Asn	Val	Phe	Lys	Gln	Leu	Ser	Ser	Glu	Pro	Phe	Phe	Lys	Lys	Pro
1295						1300					1305			
Thr	Leu	Arg	Met	Arg	Gly	Asn	Ser	Ile	Phe	Gly	Ser	Ser	Pro	Ile
1310						1315					1320			
Ser	Val	Met	Thr	Ser	Gly	Phe	Ala	Leu	His	Tyr	Phe	Ala	Asn	Asn
1325						1330					1335			
Arg	Ser	Gln	Leu	Ala	Gln	Phe	Asn	Phe	Val	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys
1340						1345					1350			
His	Val	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Met	Ala	Phe	Arg	Ser	Leu	Leu	Ser
1355						1360					1365			
Val	Tyr	His	Gln	Ala	Cys	Lys	Val	Leu	Lys	Val	Ser	Ala	Thr	Pro
1370						1375					1380			
Val	Gly	Arg	Glu	Val	Glu	Phe	Thr	Thr	Gln	Gln	Pro	Val	Lys	Leu
1385						1390					1395			
Ile	Val	Glu	Asp	Thr	Leu	Ser	Phe	Gln	Ser	Phe	Val	Asp	Ala	Gln
1400						1405					1410			
Gly	Ser	Lys	Thr	Asn	Ala	Asp	Val	Val	Gln	Phe	Gly	Ser	Asn	Val
1415						1420					1425			
Leu	Val	Tyr	Val	Ser	Ser	Tyr	Asn	Glu	Val	Asp	Thr	Leu	Ala	Lys
1430						1435					1440			
Leu	Leu	Thr	Asp	Lys	Asn	Met	Met	Val	Thr	Lys	Val	Asp	Gly	Arg
1445						1450					1455			
Thr	Met	Lys	His	Gly	Cys	Leu	Glu	Ile	Val	Thr	Lys	Gly	Thr	Ser
1460						1465					1470			
Ala	Arg	Pro	His	Phe	Val	Val	Ala	Thr	Asn	Ile	Ile	Glu	Asn	Gly
1475						1480					1485			
Val	Thr	Leu	Asp	Ile	Asp	Val	Val	Val	Asp	Phe	Gly	Leu	Lys	Val
1490						1495					1500			
Ser	Pro	Phe	Leu	Asp	Ile	Asp	Asn	Arg	Ser	Ile	Ala	Tyr	Asn	Lys
1505						1510					1515			
Glu	Ser	Val	Ser	Tyr	Gly	Glu	Arg	Ile	Gln	Arg	Leu	Gly	Arg	Val
1520						1525					1530			
Gly	Arg	Phe	Lys	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	Arg	Ile	Gly	His	Thr	Glu
1535						1540					1545			
Lys	Gly	Ile	Ile	Glu	Ile	Pro	Ser	Met	Val	Ala	Thr	Glu	Ala	Ala



1550	1555	1560
Leu Ala Cys Phe Ala Tyr Asn 1565	Leu Pro Val Met Thr 1570	Gly Gly Val 1575
Ser Thr Ser Leu Ile Gly Asn 1580	Cys Thr Val Arg Gln 1585	Val Lys Thr 1590
Met Gln Gln Phe Glu Leu Ser 1595	Pro Phe Phe Ile Gln 1600	Asn Phe Val 1605
Ala His Asp Gly Ser Met His 1610	Pro Val Ile His Asp 1615	Ile Leu Lys 1620
Lys Tyr Lys Leu Arg Asp Cys 1625	Met Thr Pro Leu Cys 1630	Asp Gln Ser 1635
Ile Pro Tyr Arg Ala Ser Cys 1640	Thr Trp Leu Ser Val 1645	Ser Glu Tyr 1650
Glu Arg Leu Gly Val Ala Leu 1655	Glu Ile Pro Lys Gln 1660	Ile Lys Ile 1665
Ala Phe His Ile Lys Glu Ile 1670	Pro Pro Lys Leu His 1675	Glu Met Leu 1680
Trp Glu Thr Val Val Lys Tyr 1685	Lys Asp Val Cys Leu 1690	Phe Pro Ser 1695
Ile Arg Ala Ser Ser Ile Ser 1700	Lys Ile Ala Tyr Thr 1705	Leu Arg Thr 1710
Asp Leu Phe Ala Ile Pro Arg 1715	Thr Leu Ile Leu Val 1720	Glu Arg Leu 1725
Leu Glu Glu Glu Arg Val Lys 1730	Gln Ser Gln Phe Arg 1735	Ser Leu Ile 1740
Asp Glu Gly Cys Ser Ser Met 1745	Phe Ser Ile Val Asn 1750	Leu Thr Asn 1755
Thr Leu Arg Ala Arg Tyr Ala 1760	Lys Asp Tyr Thr Ala 1765	Glu Asn Ile 1770
Gln Lys Leu Glu Lys Val Arg 1775	Ser Gln Leu Lys Glu 1780	Phe Ser Asn 1785
Leu Asp Gly Ser Ala Cys Glu 1790	Glu Asn Leu Ile Lys 1795	Arg Tyr Glu 1800
Ser Leu Gln Phe Val His His 1805	Gln Ala Ala Thr Ser 1810	Leu Ala Lys 1815
Asp Leu Lys Leu Lys Gly Thr 1820	Trp Lys Lys Ser Leu 1825	Val Ala Lys 1830
Asp Leu Ile Ile Ala Gly Ala 1835	Val Ala Ile Gly Gly 1840	Ile Gly Leu 1845
Ile Tyr Ser Trp Phe Thr Gln 1850	Ser Val Glu Thr Val 1855	Ser His Gln 1860

Gly Lys	Asn Lys	Ser Lys	Arg	Ile	Gln	Ala	Leu	Lys	Phe	Arg	His
1865			1870					1875			
Ala Arg	Asp Lys	Arg Ala	Gly	Phe	Glu	Ile	Asp	Asn	Asn	Asp	Asp
1880			1885					1890			
Thr Ile	Glu Glu	Phe Phe	Gly	Ser	Ala	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys
1895			1900					1905			
Gly Lys	Gly Thr	Thr Val	Gly	Met	Gly	Lys	Ser	Ser	Arg	Lys	Phe
1910			1915					1920			
Ile Asn	Met Tyr	Gly Phe	Asp	Pro	Thr	Glu	Tyr	Ser	Phe	Ile	Gln
1925			1930					1935			
Phe Val	Asp Pro	Leu Thr	Gly	Ala	Gln	Ile	Glu	Glu	Asn	Val	Tyr
1940			1945					1950			
Ala Asp	Ile Arg	Asp Ile	Gln	Asp	Arg	Phe	Ser	Glu	Val	Arg	Lys
1955			1960					1965			
Lys Met	Val Glu	Asn Asp	Asp	Ile	Glu	Met	Gln	Ala	Leu	Gly	Ser
1970			1975					1980			
Asn Thr	Thr Ile	His Ala	Tyr	Phe	Arg	Lys	Asp	Trp	Ser	Asp	Lys
1985			1990					1995			
Ala Leu	Lys Ile	Asp Leu	Met	Pro	His	Asn	Pro	Leu	Lys	Val	Cys
2000			2005					2010			
Asp Lys	Thr Asn	Gly Ile	Ala	Lys	Phe	Pro	Glu	Arg	Glu	Leu	Glu
2015			2020					2025			
Leu Arg	Gln Thr	Gly Pro	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Val	Lys	Asp	Ile
2030			2035					2040			
Pro Ala	Gln Glu	Val Glu	His	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Met	Arg	Gly
2045			2050					2055			
Leu Arg	Asp Phe	Asn Pro	Ile	Ala	Gln	Thr	Val	Cys	Arg	Leu	Lys
2060			2065					2070			
Val Ser	Val Glu	Tyr Gly	Thr	Ser	Glu	Met	Tyr	Gly	Phe	Gly	Phe
2075			2080					2085			
Gly Ala	Tyr Ile	Ile Ala	Asn	His	His	Leu	Phe	Arg	Ser	Tyr	Asn
2090			2095					2100			
Gly Ser	Met Glu	Val Gln	Ser	Met	His	Gly	Thr	Phe	Arg	Val	Lys
2105			2110					2115			
Asn Leu	His Ser	Leu Ser	Val	Leu	Pro	Ile	Lys	Gly	Arg	Asp	Ile
2120			2125					2130			
Ile Leu	Ile Lys	Met Pro	Lys	Asp	Phe	Pro	Val	Phe	Pro	Gln	Lys
2135			2140					2145			
Leu His	Phe Arg	Ala Pro	Ile	Gln	Asn	Glu	Arg	Val	Cys	Leu	Val
2150			2155					2160			

Gly Thr	Asn Phe	Gln Glu	Lys Tyr	Ala Ser	Ser Ser	Ile Ile	Thr Glu
2165			2170			2175	
Thr Ser	Thr Thr	Tyr Asn	Ile Pro	Gly Ser	Thr Phe	Trp Lys	His
2180			2185			2190	
Trp Ile	Glu Thr	Asp Asn	Gly His	Cys Gly	Leu Pro	Val Val	Ser
2195			2200			2205	
Thr Ala	Asp Gly	Cys Leu	Val Gly	Ile His	Ser Leu	Ala Asn	Asn
2210			2215			2220	
Ala His	Thr Thr	Asn Tyr	Tyr Ser	Ala Phe	Asp Glu	Asp Phe	Glu
2225			2230			2235	
Ser Lys	Tyr Leu	Arg Ala	Asn Glu	His Asn	Glu Trp	Val Lys	Ser
2240			2245			2250	
Trp Lys	Tyr Asn	Pro Asp	Thr Val	Leu Trp	Gly Pro	Leu Lys	Leu
2255			2260			2265	
Lys Asp	Ser Thr	Pro Lys	Gly Leu	Phe Lys	Thr Thr	Lys Leu	Val
2270			2275			2280	
Gln Asp	Leu Ile	Glu His	Asp Val	Val Val	Glu Gln	Ala Lys	His
2285			2290			2295	
Ser Ala	Trp Met	Phe Glu	Ala Leu	Thr Gly	Asn Leu	Gln Ala	Val
2300			2305			2310	
Ala Thr	Met Lys	Ser Gln	Leu Val	Thr Lys	His Val	Val Lys	Gly
2315			2320			2325	
Glu Cys	Arg His	Phe Lys	Glu Phe	Leu Thr	Val Asp	Ala Glu	Ala
2330			2335			2340	
Glu Ala	Phe Phe	Arg Pro	Leu Met	Asp Ala	Tyr Gly	Lys Ser	Leu
2345			2350			2355	
Leu Asn	Arg Asp	Ala Tyr	Ile Lys	Asp Ile	Met Lys	Tyr Ser	Lys
2360			2365			2370	
Pro Ile	Asp Val	Gly Ile	Val Asp	Cys Asp	Ala Phe	Glu Glu	Ala
2375			2380			2385	
Ile Asn	Arg Val	Ile Ile	Tyr Leu	Gln Val	His Gly	Phe Lys	Lys
2390			2395			2400	
Cys Ala	Tyr Val	Thr Asp	Glu Gln	Glu Ile	Phe Lys	Ala Leu	Asn
2405			2410			2415	
Met Lys	Ala Ala	Val Gly	Ala Met	Tyr Gly	Gly Lys	Lys Lys	Asp
2420			2425			2430	
Tyr Phe	Glu His	Phe Thr	Asp Ala	Asp Lys	Glu Glu	Ile Val	Met
2435			2440			2445	
Gln Ser	Cys Leu	Arg Leu	Tyr Lys	Gly Leu	Leu Gly	Ile Trp	Asn
2450			2455			2460	
Gly Ser	Leu Lys	Ala Glu	Leu Arg	Cys Lys	Glu Lys	Ile Leu	Ala

2465	2470	2475
Asn Lys Thr Arg Thr Phe Thr Ala Ala Pro Leu Asp Thr Leu Leu		
2480	2485	2490
Gly Gly Lys Val Cys Val Asp Asp Phe Asn Asn Gln Phe Tyr Ser		
2495	2500	2505
Lys Asn Ile Glu Cys Cys Trp Thr Val Gly Met Thr Lys Phe Tyr		
2510	2515	2520
Gly Gly Trp Asp Lys Leu Leu Arg Arg Leu Pro Glu Asn Trp Val		
2525	2530	2535
Tyr Cys Asp Ala Asp Gly Ser Gln Phe Asp Ser Ser Leu Thr Pro		
2540	2545	2550
Tyr Leu Phe Asn Ala Val Leu Thr Ile Arg Ser Thr Tyr Met Glu		
2555	2560	2565
Asp Trp Asp Val Gly Leu Gln Met Leu Arg Asn Leu Tyr Thr Glu		
2570	2575	2580
Ile Val Tyr Thr Pro Ile Ser Thr Pro Asp Gly Thr Ile Val Lys		
2585	2590	2595
Lys Phe Arg Gly Asn Asn Ser Gly Gln Pro Ser Thr Val Val Asp		
2600	2605	2610
Asn Ser Leu Met Val Val Leu Ala Met His Tyr Ala Phe Ile Arg		
2615	2620	2625
Glu Gly Ile Glu Phe Glu Glu Thr Asp Ser Thr Cys Val Phe Phe		
2630	2635	2640
Val Asn Gly Asp Asp Leu Leu Ile Ala Val Asn Pro Asp Lys Glu		
2645	2650	2655
Asp Ile Leu Asp Arg Leu Ser Gln His Phe Ser Asp Leu Gly Leu		
2660	2665	2670
Asn Tyr Asp Phe Ser Ser Arg Thr Arg Asn Lys Glu Glu Leu Trp		
2675	2680	2685
Phe Met Ser His Arg Gly Leu Leu Ile Glu Gly Met Tyr Val Pro		
2690	2695	2700
Lys Leu Glu Glu Glu Arg Ile Val Ser Ile Leu Gln Trp Asp Arg		
2705	2710	2715
Ala Asp Leu Ala Glu His Arg Leu Glu Ala Ile Cys Ala Arg Met		
2720	2725	2730
Ile Glu Ser Trp Gly Tyr Ser Glu Leu Thr His Gln Ile Arg Arg		
2735	2740	2745
Phe Tyr Ser Trp Leu Leu Gln Gln Gln Pro Phe Ala Thr Ile Ala		
2750	2755	2760
Gln Glu Gly Lys Ala Pro Tyr Ile Ala Ser Met Ala Leu Arg Lys		
2765	2770	2775

Leu	Tyr	Met	Asp	Arg	Ala	Val	Asp	Glu	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Phe
2780						2785					2790			
Thr	Glu	Met	Met	Val	Ala	Leu	Asp	Asp	Glu	Phe	Glu	Phe	Asp	Ser
2795						2800					2805			
Tyr	Glu	Val	Tyr	His	Gln	Ala	Asn	Asp	Thr	Ile	Asp	Ala	Gly	Gly
2810						2815					2820			
Ser	Asn	Lys	Lys	Asp	Thr	Lys	Pro	Glu	Gln	Ser	Ser	Ile	Gln	Ser
2825						2830					2835			
Asn	Pro	Asn	Lys	Gly	Lys	Asp	Lys	Asp	Val	Asn	Ala	Gly	Thr	Ser
2840						2845					2850			
Gly	Thr	His	Thr	Val	Pro	Arg	Ile	Lys	Ala	Ile	Thr	Ser	Lys	Met
2855						2860					2865			
Arg	Met	Pro	Lys	Ser	Lys	Gly	Ala	Ala	Val	Leu	Asn	Leu	Glu	His
2870						2875					2880			
Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Pro	Gln	Gln	Ile	Asp	Ile	Ser	Asn	Thr	Arg
2885						2890					2895			
Ala	Thr	Gln	Ser	Gln	Phe	Asp	Thr	Trp	Tyr	Glu	Ala	Val	Arg	Met
2900						2905					2910			
Ala	Tyr	Asp	Ile	Gly	Glu	Thr	Glu	Met	Pro	Thr	Val	Met	Asn	Gly
2915						2920					2925			
Leu	Met	Val	Trp	Cys	Ile	Glu	Asn	Gly	Thr	Ser	Pro	Asn	Val	Asn
2930						2935					2940			
Gly	Val	Trp	Val	Met	Met	Asp	Gly	Asn	Glu	Gln	Val	Glu	Tyr	Pro
2945						2950					2955			
Leu	Lys	Pro	Ile	Val	Glu	Asn	Ala	Lys	Pro	Thr	Leu	Arg	Gln	Ile
2960						2965					2970			
Met	Ala	His	Phe	Ser	Asp	Val	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ile	Glu	Met	Arg
2975						2980					2985			
Asn	Lys	Lys	Glu	Pro	Tyr	Met	Pro	Arg	Tyr	Gly	Leu	Ile	Arg	Asn
2990						2995					3000			
Leu	Arg	Asp	Met	Gly	Leu	Ala	Arg	Tyr	Ala	Phe	Asp	Phe	Tyr	Glu
3005						3010					3015			
Val	Thr	Ser	Arg	Thr	Pro	Val	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	Gln	Ile	Gln
3020						3025					3030			
Met	Lys	Ala	Ala	Ala	Leu	Lys	Ser	Ala	Gln	Pro	Arg	Leu	Phe	Gly
3035						3040					3045			
Leu	Asp	Gly	Gly	Ile	Ser	Thr	Gln	Glu	Glu	Asn	Thr	Glu	Arg	His
3050						3055					3060			
Thr	Thr	Glu	Asp	Val	Ser	Pro	Ser	Met	His	Thr	Leu	Leu	Gly	Val
3065						3070					3075			

Lys Asn Met  
3080

<210> 5  
<211> 161  
<212> ADN  
<213> Virus de la pomme de terre

<220>  
<223> Séquence PVY-N

<400> 5  
cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgaaaata ttctaccctg 60  
atgttcatga tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgaaacgcag acatgccatg 120  
tagttgactc gtttggtctca caaacaactg ggtatcatat t 161

<210> 6  
<211> 161  
<212> ADN  
<213> Virus de la pomme de terre

<220>  
<223> Séquence PVYo

<400> 6  
cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgagaata ttctatcctg 60  
acgtgcatga tgcagagctg cctagtttat tggttgacca tgacactcaa acgtgtcatg 120  
tggttgactc atttggtctg cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 7  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Sonde PVYN (polymorphisme 400)

<400> 7  
ctcaaagtga aatattctac 20

<210> 8  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Sonde PVYo (polymorphisme 400)

<400> 8  
ctcaaagtga aatattcta 19

<210> 9  
<211> 19  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Sonde PVYN (polymorphisme 419)  
 <400> 9  
 cgatcacgaa acgcagaca 19

<210> 10  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Sonde PVYo (polymorphisme 419)  
 <400> 10  
 accatgacac tcaaa 15

<210> 11  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Amorce sens nucléotide 2079 à 2108 de PVYo-139 avec un site NruI  
 <400> 11  
 aacgtgtttc tcgcatgct aattaacatt ggcgaggagg 40

<210> 12  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Amorce antisens nucléotide 2592 à 2561 de PVYo-139 avec  
 un site BstZ17I  
 <400> 12  
 agccatcagt ataccagggg ataatttga tagaatcaac 40

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Amorce pour transcriptase inverse  
 <400> 13  
 gtctcctgat tgaagtttac 20

<210> 14  
 <211> 163  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>  
 <223> PVY-N-K400-E419  
 <400> 14  
 cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgaaaata ttctaccctg 60  
 atgttcacatga tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgaaacgcag acatgccatg 120  
 tagttgactc gtttggtcaca caaacaactg ggtatcatat ttt 163

<210> 15

<211> 161  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>  
 <223> PVYo-R400-D419  
 <400> 15  
 cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgagaata ttctatcctg 60  
 acgtgcatga tgcagagctg cctagtttat tggttgacca tgacactcaa acgtgtcatg 120  
 tggttgactc atttggtcgc cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 16  
 <211> 163  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>  
 <223> PVY-NTPN-K400-D419  
 <400> 16  
 cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgaaaata ttctaccctg 60  
 atgttcatga tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgacacgcag acatgccatg 120  
 tagttgactc gtttggtcgc caaacaactg ggtatcatat ttt 163

<210> 17  
 <211> 163  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>  
 <223> PVY-NTPN-R400-E419  
 <400> 17  
 cctggccaac catgatggat ctggctacaa cttgtgctca aatgagaata ttctaccctg 60  
 atgttcatga tgcagaactg cctagaatac tagtcgatca cgaaacgcag acatgccatg 120  
 tagttgactc gtttggtcgc caaacaactg ggtatcatat ttt 163

<210> 18  
 <211> 161  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>  
 <223> PVY-NTPo-R400-E419  
 <400> 18  
 cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgagaata ttctatcctg 60  
 acgtgcatga tgcagagctg cctagtttat tggttgacca tgaaactcaa acgtgtcatg 120  
 tggttgactc atttggtcgc cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 19  
 <211> 161  
 <212> ADN  
 <213> Virus de la pomme de terre

<220>  
 <223> PVY-NTPo-K400-D429  
 <400> 19  
 cctggccaac tatgatggat ttggcgacca cttgtgctca aatgaaaata ttctatcctg 60  
 acgtgcatga tgcagagctg cctagtttat tggttgacca tgacactcaa acgtgtcatg 120



tggttgactc atttggtcgc cagacaactg gatatcatat t 161

<210> 20  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Sonde PVYN (polymorphisme 419)  
<400> 20 17  
atcacgaaac gcagaca

<210> 21  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Sonde PVYo (polymorphisme 419)  
<400> 21 16  
tgaccatgac actcaa

<210> 22  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce sens pour YN  
<400> 22 28  
atgatgcaga actgcctaga atactagt

<210> 23  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce sens pour YN  
<400> 23 29  
atgatgcaga actgcctaga atactagtc

<210> 24  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce sens pour YN  
<400> 24 27  
catgatgcag aactgcctag aatacta

<210> 25  
<211> 24  
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce sens pour YO

<400> 25

gcagagctgc ctagtttatt gggt

24

<210> 26

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce sens pour YO

<400> 26

atgatgcaga gctgcctagt ttatt

25

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce sens pour YO

<400> 27

tgcagagctg cctagtttat tgg

23

<210> 28

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce anti-sens pour YN

<400> 28

gtgagccaaa cgagtcaact acat

24

<210> 29

<211> 24

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce anti-sens pour YN

<400> 29

tttgtgagcc aaacgagtca acta

24

<210> 30

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Amorce anti-sens pour YN

<400> 30

ttgtgagcca aacgagtcaa ct

22

<210> 31  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce anti-sens pour YO  
<400> 31  
gccaaatgag tcaaccacat ga

22

<210> 32  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce anti-sens pour YO  
<400> 32  
agccaaatga gtcaaccaca tg

22

<210> 33  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Amorce anti-sens pour YO  
<400> 33  
ccaaatgagt caaccacatg aca

23