

- Procédure.....	22
I.2.1.3- Extraction, clonage et séquençage des marqueurs AFLP.....	23
1.2.2- Résultats et discussion.....	23
I.2.2.1- Ségrégation de la maladie dans la descendance.....	23
I.2.2.2- La séquence EPRV BSV-OI comme gène candidat de l'expression de la maladie.....	24
I.2.2.3- Recherche de marqueurs moléculaires liés à l'expression de la maladie dans la descendance.....	24
I.2.3- Analyse moléculaire des marqueurs AFLP.....	25
I.2.4- Conclusions.....	25
I.3- Analyse génétique de la ségrégation de la maladie sur la population d'hybrides PKW x IDN 110 T.....	26
I.4- Analyse génétique de deux populations d'haploïdes doublés (HD) et Autofécondés (AF) <i>M. balbisiana</i>	44
I.4.1- Matériels et méthodes.....	44
I.4.1.1- Description du matériel végétal.....	44
I.4.1.2- Extraction d'ADN et analyse génétique.....	45
I.4.1.3- Analyse IC-PCR et ISEM.....	45
I.4.2- Résultats	45
I.4.2.1- Détermination du génotype des clones HD et AF par rapport au locus BEL	45
I.4.2.2- Détection du BSV.....	46
I.4.3- Discussion.....	46
I.5- Conclusions.....	47
CHAPITRE II.....	49
II.1- Introduction et objectifs.....	49
II.2- Recherche de la forme "minichromosome"	50
II.2.1- Matériels et méthodes.....	50
II.2.1.1- Détection de l'ADN viral libre par hybridation.....	50
II.2.1.2- Détection par PCR des formes virales circulaires libres.....	51
II.2.2- Résultats et discussion.....	51
II.3- Recherche d'EPRV BSV-OI pathogènes.....	52
II.3.1- Recherche de produits de transcription.....	53

II.3.1.1- Matériels et méthodes.....	53
- Extraction d'ARN.....	53
- Transfert et hybridation.....	53
II.3.1.2- Résultats et discussion.....	54
II.3.2- Recherche du degré d'identité moléculaire entre EPRVs et PRVs BSV-Ol... 54	
II.4- Recherche d'EPRVs BSV correspondant à des souches virales autres que la souche BSV-Ol.....	64
II.5- Conclusions.....	82
CHAPITRE III.....	84
III.1- Introduction et objectifs.....	84
III.2- Matériels et méthodes.....	84
III.2.1- Transmission des souches BSV-Ol, BSV-Gf et BSV-Mys (Mysore) par cochenilles.....	84
III.2.2- Détection des souches BSV-Ol, BSV-GF et BSV-Mys.....	85
III.2.3- Mise en évidence de la présence de séquences EPRVs BSV-Mys.....	85
III.3- Résultats et discussion.....	85
Conclusions générales et perspectives.....	87
1-Origine des séquences EPRVs BSV.....	88
Origine de l'intégration.....	88
Mécanisme d'intégration.....	89
2- Mécanisme d'expression.....	90
Le facteur génétique d'expression : le locus BEL.....	91
Mécanismes moléculaires des interactions BEL / EPRVs BSV pathogènes.....	92
Exploration de la carte génétique.....	92
Exploration du statut sain.....	92
Listes des figures et des tableaux.....	95
Références bibliographiques.....	99

Abréviations

Terminologie et sigles *

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AF :	Autofécondés
AFLP :	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN :	Acide Ribonucléique
BAC :	Bacterial Artificial Chromosom
BEL :	BSV Expressed Locus
bp :	Base Pair
CARBAP :	Centre Africain de Recherche sur Bananes et Plantains
CIRAD :	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CIV :	Culture <i>in vitro</i>
cM :	Centimorgan
EMBRAPA-CNPMF :	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical
ENSAM :	Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier
EPRV :	Endogenous Pararetrovirus
FHIA :	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
FISH :	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FLHOR :	Production Fruitière et Horticole
GRD :	<i>Geminivirus</i> -related DNA
Hc PRO :	Helper Component-Proteinase
HD :	Haploïdes Doubles
IC-PCR :	Immunocapture Polymerase Chain Reaction
IITA :	International Institute of tropical Agriculture
ISEM :	Immunosorbent Electromicroscope
kbp :	Kilo Base Pair
LTR :	Long Terminal repeat
nm :	Nanomètre
NOR :	Nucleolar Organization Region
ORF :	Open Reading Frame
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PK :	Pisang Klutuk
PKW :	Pisang Klutuk Wulung
PRV :	Pararetrovirus
PTGS :	Posttranscriptional Gene Silencing
RMD :	RNA-Mediated Defense
SC :	Supercoiled
SGS :	Specific Gene Silencing
TAG :	Theoretical and Applied Genetics
TGS :	Transcriptional Gene Silencing
V :	Volt
VIGS :	Virus-Induced Gene Silencing

* : Par commodité, la traduction des abréviations est donnée dans la langue dont elles sont issues.

Virus et maladie associée

BSV :	<i>Banana streak virus</i>
BSD :	Banana streak disease
BBrMV :	<i>Banana bract mosaic virus</i>
BBrMD :	Banana bract mosaic disease
BBTV :	<i>Banana bunchy top virus</i>
BBTD :	Banana bunchy top disease
BSV-Cav :	BSV Cavendish
BSV-Gf :	BSV Goldfinger
BSV-Im :	BSV Imové
BSV-Mys :	BSV Mysore
BSV-Ol :	BSV Obino L'Ewai
CMD :	Infectious chlorosis disease
CMV :	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CoYMV :	<i>Commelina yellow mottle virus</i>
CSSV :	<i>Cacao swollen shoot virus</i>
CsVMV :	<i>Cassava vein mosaic virus</i>
CYMV :	<i>Citrus yellow mottle virus</i>
PVCV :	<i>Petunia vein clearing virus</i>
RTBV :	<i>Rice tungro bacilliform virus</i>
ScBV :	<i>Sugarcane bacilliform virus</i>
TPV :	<i>Tobacco pararetrovirus</i>
TVCV :	<i>Tobacco vein clearing virus</i>

Introduction Générale



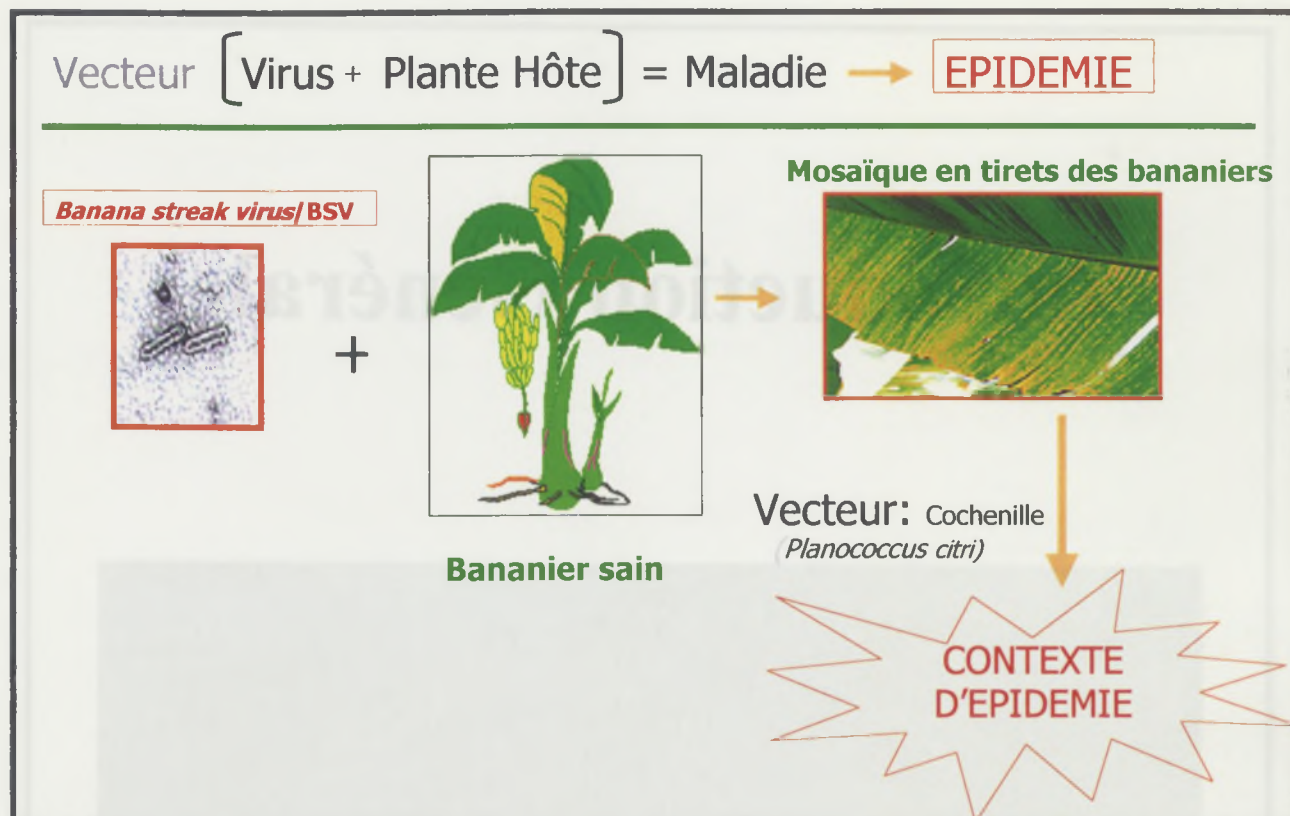


Figure 1a : Equation Virale : mode d'infection habituel du BSV

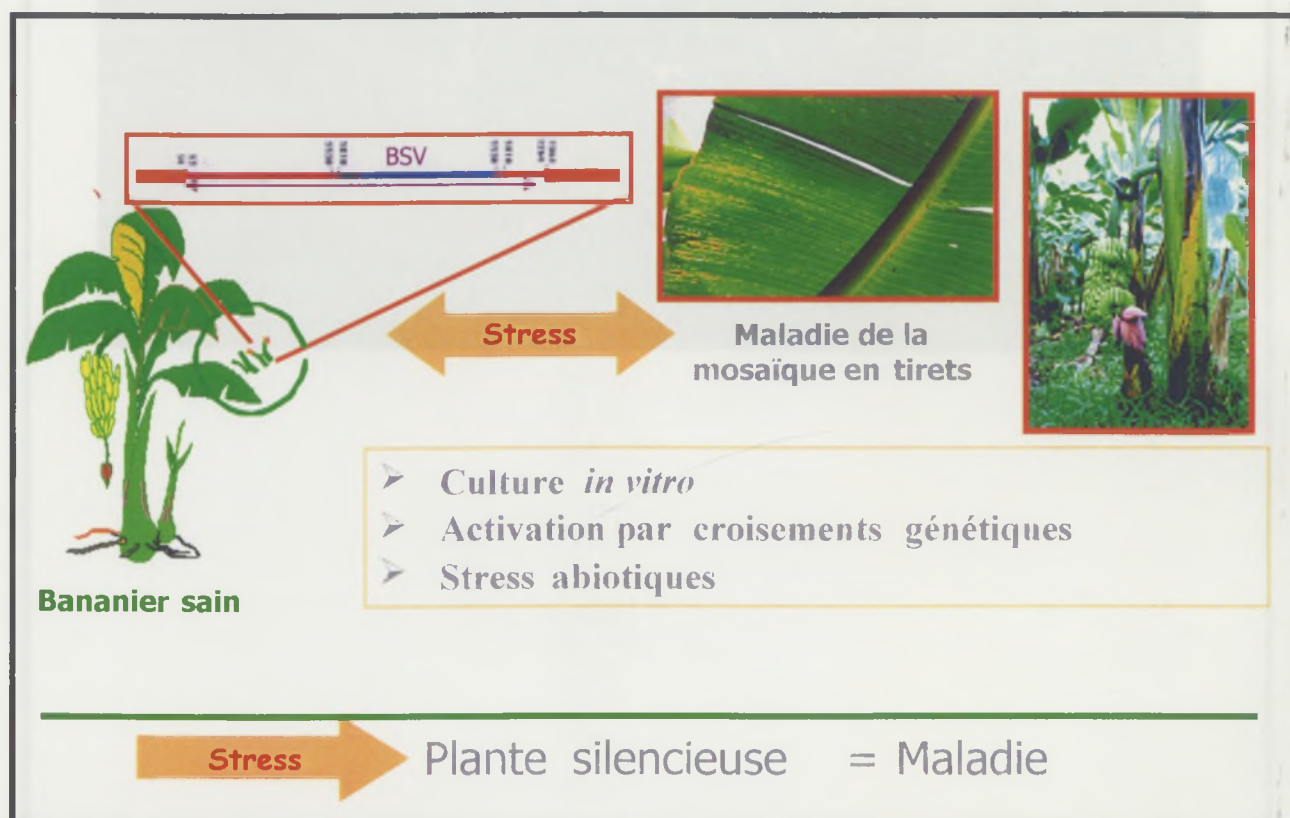


Figure 1b : Equation Virale : virus dormant BSV

Introduction Générale

Toutes les espèces végétales peuvent être considérées comme des hôtes potentiels des virus. Ces derniers étant des parasites intracellulaires obligatoires, sont totalement dépendants de la cellule hôte pour se multiplier. L'infection d'une plante par un virus suit dès lors le schéma habituel lié à une contamination extérieure. Au cours de l'infection, les virus détournent la machinerie cellulaire à leur profit pour produire leurs propres composants. Leur multiplication crée alors un déséquilibre dans la plante qui laisse place à l'installation de la maladie pouvant aller jusqu'à la mort de cette dernière. La colonisation de nouvelles plantes se fait par l'intermédiaire de vecteurs et contribue au développement d'épidémies.

Le *Banana streak virus* (BSV), responsable de la maladie de la mosaïque en tirets des bananiers (*Banana streak disease* - BSD), utilise généralement ce schéma de contamination (Fig. 1a). Ces dernières années cependant, la véritable contrainte liée au BSV a résidé dans l'association étroite de l'apparition de la maladie avec l'obtention et la diffusion de nouvelles variétés de bananiers alors qu'aucune contamination externe n'était possible. Ainsi, il a régulièrement été observé des plantes affectées par la BSD dans des populations d'hybrides issues de croisements interspécifiques de géniteurs sains (Bakry et Kerbellec, 1995). D'autre part, des variétés interspécifiques saines multipliées par culture *in vitro* ont parfois restitué des vitroplants affectés par la maladie. La seule hypothèse pouvant expliquer ces divers phénomènes a été d'admettre que l'apparition de la maladie était génétique ou liée au génotype de la plante (Ndowora et al., 1997). L'analyse du génome *Musa* a par la suite révélé la présence de séquences virales BSV intégrées au génome de bananiers de l'espèce *M. balbisiana* (Ndowora et al., 1999) (Fig. 1b). Ces séquences endogènes possèdent l'information nécessaire à la reconstitution d'un génome viral dans sa totalité. Elles ont été nommées « pathogènes » en regard de leur capacité théorique sous l'effet d'un stress de reconstituer une particule virale, pathogène. Ainsi, l'infection par le BSV est une originalité dans le monde végétal par rapport à la contamination virale habituelle. Ce nouveau mode d'infection a suscité de nombreux travaux visant à élucider les mécanismes qui le sous-tendent. L'apparition non contrôlée de la maladie dans des populations d'hybrides améliorés pose, pour les améliorateurs et les centres de diffusion de bananiers, le problème du statut sain du matériel végétal. Il est actuellement impossible de distinguer un bananier sain qui ne développera jamais la maladie d'un bananier apparemment sain qui, sous l'effet d'un stress,

va exprimer la maladie. Ce dernier est dès lors dénommé « silencieux » quant à l'expression de la maladie. Le phénomène est d'un grand attrait pour les scientifiques par son originalité dans le monde végétal et par ses similitudes avec les rétrovirus animaux. Il n'en reste pas moins que l'intégration du virus dans le génome de la plante n'est pas un événement obligatoire dans le cycle de multiplication du BSV lors d'une infection. Toutefois, l'étude des intégrations pourra alimenter la connaissance des relations plante-virus en terme de co-évolution et pourra apporter des éléments de réponse quant à l'origine de ces virus.

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont eu pour objectif d'étudier les mécanismes génétiques régulant l'expression de la maladie de la mosaïque en tirets du bananier au cours de l'hybridation interspécifique conventionnelle. Cette étude, réalisée sur différentes populations d'hybrides de bananier connues comme exprimant la maladie, s'est aussi fixée pour objectif de comprendre la « résistance » à l'expression de la maladie du parent appartenant à l'espèce *M. balbisiana*, en abordant la question de la non-expression apparente des séquences intégrées dans son génome.

Nous aborderons dans un premier chapitre l'étude qui vise à statuer sur le déterminisme génétique de l'expression de la maladie et à identifier les marqueurs génétiques *Musa* liés à l'expression du BSV au cours de l'hybridation génétique des bananiers. Dans un deuxième chapitre, nous avons tenté de préciser la nature du facteur génétique de l'expression au travers de l'identification de l'origine des particules virales exprimées. Enfin, dans un troisième et dernier chapitre nous avons recherché des éléments utiles à la compréhension du mécanisme de régulation en abordant le comportement des géniteurs vis-à-vis d'une contamination extérieure.

infections entraînent parfois la mort de l'hôte. Pour contrebalancer ce risque, la plante a alors développé des mécanismes de défense tels que les réactions d'hypersensibilité, de résistance systémique acquise (Dangl et Jones, 2001; Heath, 2000; Sticher et al., 1997) et celles décrites dernièrement faisant appel au « silencing » (Vaucheret et Fagard, 2001).

1.1- Réaction de défense de la plante par « silencing »

Cette réaction de défense est basée sur des mécanismes de type Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) comparables à ceux qui sont décrits chez les plantes transgéniques (Ratcliff et al., 1999). Le principe de cette réaction consiste en la reconnaissance d'aberrations au niveau des ARNs dans la cellule, conduisant à leur dégradation spécifique immédiatement après leur transcription. Ces aberrations peuvent être d'ordre quantitatif (surproduction d'un messenger au-delà des seuils physiologiques) ou qualitatif (présence de structures aberrantes de type ARN double brin).

Au cours de l'infection et par l'intermédiaire de leurs ARNs messagers, les virus à ARN comme à ADN sont à la fois initiateurs et cibles de ce mécanisme. C'est ce qui a été observé lors de l'infection de plants de tabac non transgéniques par le *Tomato black ring virus* (TbRV: *Nepovirus*), le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV : *Caulimovirus*) et le *Tobacco rattle virus* (TRV: *Tobravirus*) (Ratcliff et al., 1997 ; Covey et al., 1997 ; Ratcliff et al., 1999). Les plantes infectées ont tout d'abord développé des symptômes sévères de la maladie sur les premières feuilles inoculées. Puis les feuilles nouvellement émises après l'infection systémique sont restées indemnes de symptôme et contenaient une très faible concentration de particules virales. Ce phénomène a été appelé « rétablissement induit par le virus ». La réaction de défense par silencing induite par les virus est aussi nommée VIGS (virus induced gene silencing) ou RMD (RNA-mediated defense) (Ruiz et al., 1998 ; Ratcliff et al., 1999 ; Covey et Al-kaff, 2000).

Jusqu'à présent, il est naturellement admis que le mécanisme de dégradation spécifique des ARNs observé dans les plantes résistantes résultait d'un phénomène de PTGS identique à celui observé dans les plantes transgéniques (Baulcombe, 1996). Dernièrement, une étude a montré l'origine génomique d'un tel mécanisme en montrant que la mutation des gènes SGS2 et SGS3 chez *Arabidopsis thaliana* neutralisait le PTGS existant chez cette plante vis-à-vis du CMV (Mourrain et al., 2000). Le silencing fournit à la plante tant au niveau de la cellule que de la plante entière (Voinnet et Baulcombe, 1997 ; Voinnet et al., 1998), un mécanisme général de défense adaptable à n'importe quel autre virus (Ratcliff et al., 1999).

Rapport-gratuit.com



1.2- Stratégie contre-défensive virale : suppression du silencing

La capacité des virus à infecter les plantes possédant le mécanisme de silencing post-transcriptionnel indique que les phytovirus ont développé des mécanismes de suppression du silencing. Cette idée a pour la première fois été suggérée par l'analyse de l'effet synergique de potyvirus sur la multiplication d'autres virus dans le cas de coinfection (Vance, 1991). Il a été montré récemment que cet effet synergique était le résultat d'une suppression du PTGS par la Protease Hc (HcPro) codée par le génome du potyvirus (Pruss et al., 1997 ; Anandalakshmi et al., 1998 ; Kasschau et Carrington, 1998). Aujourd'hui, cette capacité à supprimer ou contourner la défense de type VIGS a été observée pour plusieurs virus appartenant à différents groupes (Brigneti et al., 1998 ; Voinnet et al., 1999). Un certain nombre de supprimeurs du silencing ont été caractérisés (Anandalakshmi et al., 1998 ; Kasschau et Carrington, 1998 ; Voinnet et al., 1999). Il s'agit de protéines dont l'analyse montre qu'elles sont des déterminants de la pathogénie mais qui ne révèle aucune structure commune (Voinnet et al., 1999). Ceci tend à montrer que la fonction de supprimeur a évolué au cas par cas pour contourner ou supprimer les effets du silencing. En effet, il a été montré que chaque étape du mécanisme du silencing (l'initiation, le transport à distance du signal de silencing et son maintien) peut être la cible des supprimeurs (Voinnet et al., 1999). A cet égard, les virus infectant les plantes pourraient être divisés en deux groupes, ceux capables de contourner ou supprimer le silencing et qui auront un haut pouvoir pathogène et ceux qui en sont incapables dits « faibles », voire non pathogènes.

Ces dernières années de nombreux exemples tendent à montrer que le mécanisme de défense par « silencing » joue un rôle prépondérant dans les interactions plantes - virus. Celui-ci impose une forte pression de sélection sur les virus et les incite à le contourner ou le supprimer pour pouvoir se développer dans la plante. Parallèlement, une pression de même nature est imposée côté plante laquelle adapte sa résistance aux modifications d'agressivité induites du virus.

Au cours de ces dix dernières années, l'accès aux génomes et les nouvelles technologies ont permis aux chercheurs de mettre en évidence des séquences virales intégrées dans le génome de plantes appartenant à différentes espèces (Hull et al., 2000). Cette association moléculaire entre le génome de la plante et celui du virus soulève actuellement un grand nombre d'interrogations afin de comprendre à qui profite cette situation. En d'autres termes, quels sont l'origine et le rôle exact de ces intrants dans la cohabitation plante - virus ?

Si l'on se base sur une étude récente, certaines de ces séquences virales confèreraient une immunité vis-à-vis de nouvelles infections virales à la plante *via* des mécanismes de méthylation par interaction ADN-ADN comme l'a montré Mette et al. (2002) pour le *Tabacco endogenous pararetrovirus* (TEPRV) chez *Nicotiana tabacum*. C'est le seul cas jusqu'à présent pour lequel une étude a été réalisée. Ce phénomène n'a pas été observé pour les autres intrants viraux décrits. Inversement, on observe dans trois autres cas une corrélation étroite entre l'apparition de particules épisomales et la présence d'intrants viraux (décrits au paragraphe 2.2). Seule l'étude de ces motifs viraux intégrés permettra de comprendre toutes les composantes de cette relation.

2- Séquences virales intégrées dans le génome des plantes

Les séquences caractérisées intégrées dans le génome des plantes proviennent des deux familles de virus à ADN, les *Geminiviridae* à ADN simple brin (Kenton et al., 1995 ; Bejarano et al., 1996 ; Ashby et al., 1997) et les *Caulimoviridae* à ADN double brin (Richert-Pöggeler et al., 1996 ; Harper et al., 1999 ; Ndowora et al., 1999 ; Jakowitsch et al., 1999 ; Lockhart et al., 2000 ; Budiman et al., 2000 ; Mao et al., 2000). Jusqu'à présent aucun virus végétal n'a été identifié intégré dans sa totalité au génome des plantes en référence à ce qui est connu pour les rétrovirus animaux. L'intégration au génome de l'hôte reste pour ces derniers une étape obligatoire dans leur cycle de réplication. Seules des parties de séquences virales ont jusqu'alors été décrites comme intégrées dans le génome des plantes. Il semblerait que cette intégration soit le résultat d'une recombinaison illégitime puisque aucun de ces virus ne possède les éléments majeurs nécessaires à l'intégration ou à l'excision (séquence LTR, gène de l'excisase ou de l'intégrase) tels qu'ils existent pour les rétrotransposons et les rétrovirus animaux et humains (Hohn et Fütterer, 1991 ; Hindmarsh et Leis 1999). Une exception est à noter cependant, pour le *Petunia vein clearing virus* (PVCV) pour lequel les éléments de séquences d'une intégrase ont été décrits dans son génome (Richert-Pöggeler et Schepherd, 1997).

2.1- Séquences intégrées de *Géminivirus* : GRD (geminivirus-related DNA).

Les séquences GRDs ont été caractérisées dans le génome de *Nicotiana tabacum*. Trois autres espèces (*N. tomentosiformis*, *N. tomentosa*, *N. kawakamii*), membres de la section *Tomentosae*, contiennent également des GRDs. Ces séquences sont intégrées en copies multiples directes sur un seul et même locus et spécifiques du génome T (Bejarano et al., 1996; Ashby et al., 1997). L'analyse de ces séquences montre qu'elles sont partielles et recombinées et qu'elles ne peuvent par conséquent pas reconstituer un génome viral dans sa totalité et donner lieu à la production de particule épisomale. Cependant, toutes possèdent l'origine de répllication et la protéine de répllication adjacente du virus, ce qui suggérerait que l'intégration par recombinaison illégitime serait survenue à partir d'une forme répllicative subgénomique défective (Bejarano et al., 1996). Par ailleurs, l'étude des séquences flanquantes révèle la présence, pour certaines GRDs, de répétitions directes et inverses semblables aux LTR des éléments transposables, suggérant ainsi l'intervention d'un élément transposable comme catalyseur de l'intégration (Bejarano et al., 1996).

2.2- Séquences intégrées de Pararétrovirus : EPRV (Endogenous Pararetrovirus).

Les séquences intégrées caractérisées jusqu'à ce jour sont issues principalement de la famille des *Caulimoviridae*. Parmi ces intrants, on peut distinguer deux catégories.

- La première catégorie est celle des EPRVs dont la structure ne permet pas la reconstitution de particules épisomales car elles sont soit partielles, soit fortement recombinées. Parmi ces dernières, le premier groupe de séquences caractérisées l'a été pour le génome de tabac. Elles y sont intégrées en copies multiples et dérivent d'un virus encore non identifié, le *Tobacco pararetrovirus* (TPV), proche du genre *Cassava vein mosaic virus*- like (CsVMV-like). L'analyse de ces intrants *Tobacco pararetrovirus* like (TPVL) réalisée par Jakowitsch et al. (1999), révèle une intégration au niveau de deux sites du génome du TPV se trouvant de part et d'autre du site d'initiation de la répllication. Cela suggère que l'événement d'intégration soit survenu à partir d'une forme circulaire défective au niveau de la première discontinuité. Par ailleurs, de façon tout aussi similaire que les GRDs, l'analyse des séquences d'ADN génomiques flanquantes au TPVL révèle la présence de séquences répétées en tandem de type NTS9 et de séquences similaires à la transcriptase inverse d'un rétrotransposon de type *gypsy*.

Le second groupe d'EPRVs partielles a été mis en évidence par PCR et *Southern blot* dans le génome du bananier. Ces séquences appartiennent au genre *Badnavirus* (Lafleur et al., 1996). L'analyse de la séquence caractérisée d'un de ces inserts à partir d'une banque génomique *Musa* a montré une homologie de séquences avec le *Cacao swollen shoot virus* (CSSV). L'intégration s'est produite à proximité du site d'initiation de la réplication et la séquence *Musa* adjacente correspond à un rétrotransposon incomplet (Ndowora et al., 1999). Ces événements d'intégration d'EPRVs partielles ne sont probablement pas isolés. En effet, les programmes de séquençage commencent à faire apparaître l'étendue du phénomène, comme l'illustrent ceux consacrés au riz et à la tomate : le séquençage des extrémités de clones BAC de riz et de tomate a révélé respectivement la présence de séquences similaires à la protéine de capsid du *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) et de séquences similaires au TPV (Mao et al., 2000 ; Budiman et al., 2000).

- La deuxième catégorie d'intrants est celle des EPRVs dont la structure permet la reconstitution de particules épisomales développant ultérieurement une infection : les EPRVs pathogènes. Jusqu'alors, trois cas ont été recensés pour trois pathosystèmes.

Le premier concerne le PVCV pour lequel l'origine de la présence de virions dans des pétunias hybrides a été reliée à l'existence de probables EPRVs dans le génome de la plante. Cette hypothèse a été construite sur la base de l'existence d'un motif d'intégrase directement dans le génome viral, d'une hybridation positive avec une sonde virale sur l'ADN génomique de pétunia sain et d'une transmission de ce caractère exclusivement verticale lors de croisements génétiques (Richert-Pöggler et al., 1996). Cependant, l'intégration du génome entier du PVCV dans le génome du pétunia n'a toujours pas été démontrée et aucun élément additionnel ne permet de corréler la présence de séquences intégrées PVCV à celle de particules épisomales.

Le second cas concerne l'apparition de *Tobacco vein-clearing virus* (TVCV) dans 100 % d'hybrides de tabac (*N. edwardsonii*) alors que les géniteurs (*N. glutinosa* et *N. clevelandii*) sont sains. Des tests d'hybridations montrent que ce virus est probablement intégré dans le génome des hybrides ainsi que dans celui du parent *N. glutinosa*. Les premiers résultats de criblage d'une banque génomique de *N. edwardsonii* semblent confirmer les résultats d'hybridation (Lockhart et al., 2000).

Le dernier cas concerne le BSV apparu dans des descendance issues de croisements interspécifiques de géniteurs sains et dans des vitroplants provenant de variétés « saines »

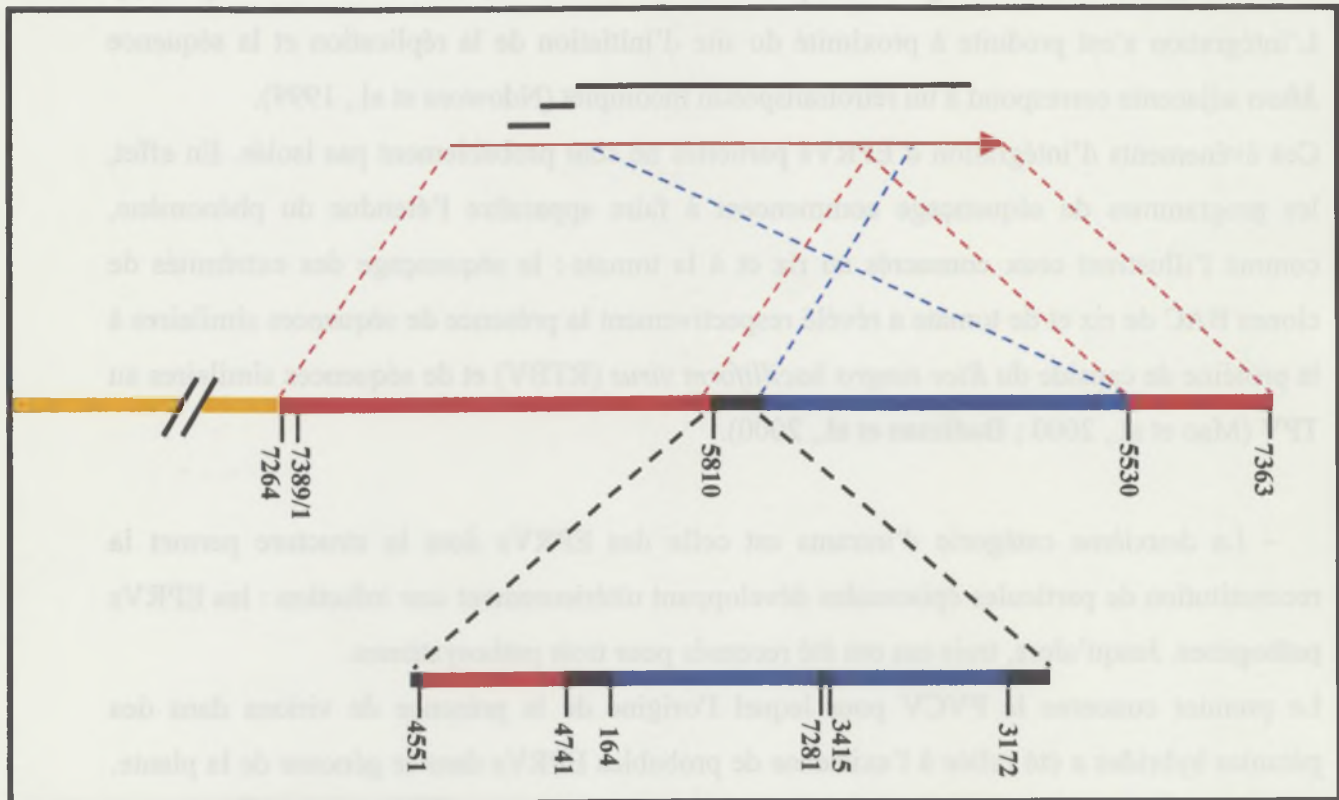


Figure 2 : Représentation schématique de la séquence BSV-OI intégrée dans le génome *Musa balbisiana* (Ndowora et al., 1999).

La flèche rouge et les lignes noires au-dessus indiquent le transcrit et les ORFs. Les régions indiquées en rouge et bleue correspondent à la séquence BSV-OI orientée respectivement dans le même sens ou en sens inverse par rapport au transcrit. La région jaune correspond à la séquence *Musa* adjacente. Les régions en noir contiennent des séquences BSV et *Musa*.

multipliées par culture *in vitro*. L'apparition de la maladie dans ces hybrides a été fortement corrélée avec la présence d'un motif viral BSV souche Obino l'Ewai (BSV-OI) intégrée dans le génome bananier (Ndowora et al., 1997). Ce motif viral dit « pathogène », contient toutes les informations génétiques nécessaires à la synthèse de virus épisomal. Il a été montré que ces séquences endogènes pathogènes seraient spécifiques au génome de l'espèce *Musa. balbisiana* (noté BB) (Ndowora et al., 1999, Harper et al., 1999 ; Geering et al., 2001). Ce motif viral présente plus de 98% d'homologie avec le génome de la souche BSV-OI épisomale présente dans les hybrides infectés. L'analyse de ces séquences montre qu'elles sont issues de recombinaisons. En effet, elles sont constituées de deux fragments d'ADN viral de même sens, représentant à eux deux la totalité du génome viral. Ils sont séparés par un segment constitué d'une alternance de séquences virales et de séquences *Musa*, suivis d'un fragment d'ADN viral (50 % du génome) inséré en sens inverse des deux autres (Fig. 2). Le début de la séquence intégrée correspond à l'extrémité 5' du mRNA viral. Le mécanisme d'intégration semble survenu par recombinaison illégitime à partir d'une forme répllicative aberrante, et similaire à celui décrit pour le virus de l'hépatite B (*Pararétrovirus* animal) (Yang et Summer, 1999 ; Ndowora et al., 1999). C'est ce même mécanisme qui est suggéré pour expliquer l'origine des GRDs et du TEPRV (Bejarano et al., 1996; Jakowitsch et al., 1999)

L'étude de la séquence *Musa* adjacente ne présente aucune homologie avec la structure connue des rétrotransposons concernant les éléments majeurs nécessaires à leur intégration ou à leur excision, ni même avec celle de séquences promotrices. Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré sur le génome d'un bananier triploïde Obino l'Ewai (AAB) que ce motif est présent sur deux chromosomes du génome B uniquement et est répété en tandem de 2 à 8 copies constituant un complexe de séquences virales non contiguës, interrompu par des séquences *Musa* (Harper et al., 1999). Ces séquences seraient activées au cours de l'hybridation génétique classique ou de la culture *in vitro* (CIV) (Ndowora et al., 1999). Pour cette dernière, une étude récente a pu montrer que l'étape de prolifération de la CIV était déterminante pour l'expression de la maladie chez un hybride tétraploïde porteur d'EPRVs BSV-OI (Dallot et al., 2001).

Concernant l'amélioration génétique des bananiers, une corrélation a été établie entre l'apparition de la maladie (BSD) et la présence d'EPRVs BSV pathogènes sur les hybrides nouvellement créés. En conséquence les EPRVs BSV sont apparues comme une menace pour la diffusion et la culture de nouvelles variétés de bananier. Elles constituent actuellement un

PHYLUM	Magnoliophyta
SOUS-CLASSE	Liliopsida
SUPER-ORDRE	Zinberidae
ORDRE	Scitaminae
FAMILLE	Musaceae
GENRE	<i>Musa</i> <i>Ensete</i>
SECTION	<i>Eumusa</i> <i>Rhodoclamis</i> <i>Australimusa</i> <i>Callimusa</i>
ESPECES	<i>Musa acuminata</i> <i>Musa balbisiana</i> <i>Musa schizocarpa</i> <i>Musa basioo</i>

Figure 3a : Taxinomie du Bananier

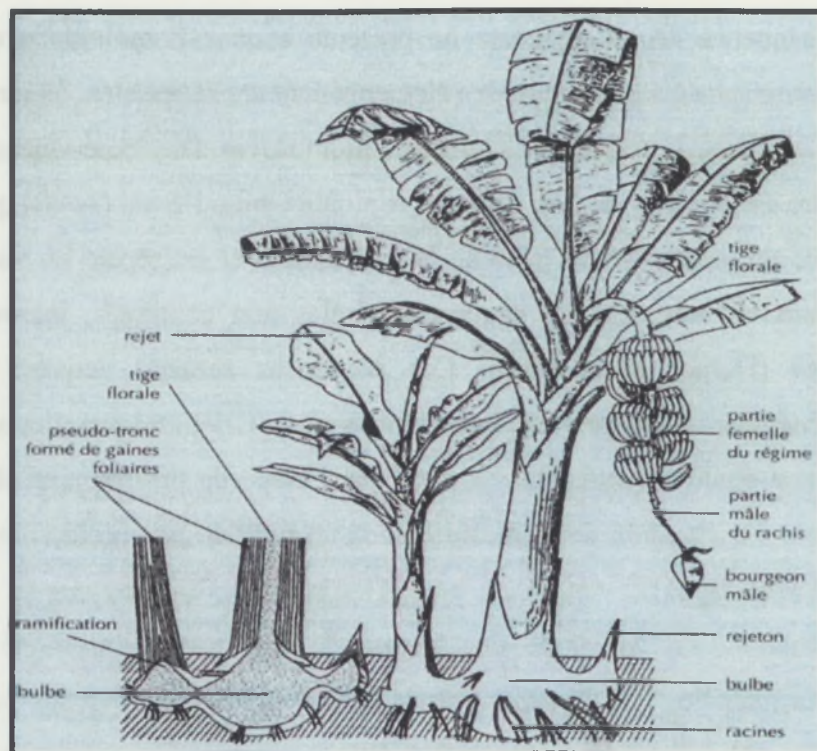


Figure 3b : Représentation d'un bananier avec ses rejets au moment de la fructification, et coupe longitudinale de la tige, d'après Champions (1967).

des freins majeurs des programmes d'amélioration génétique du bananier, le mécanisme à l'origine de cette nouvelle voie d'expression du virus n'étant pas connu.

3- Le bananier

Classée au quatrième rang mondial des cultures avec une production annuelle de 80 millions de tonnes, cette herbe géante monocotylédone de la famille des *Musaceae* (Cronquist, 1988) (Fig. 3a et 3b), originaire du Sud-est asiatique, constitue l'aliment de base de plus de 500 millions de personnes. En effet, dans la plupart des zones intertropicales, la banane consommée est produite sur de petites plantations paysannes permettant d'assurer une autosuffisance alimentaire ; dans certains cas, elle procure un revenu substantiel. Ce type de production représente 87% de la production globale. Elle couvre une importante gamme de variétés, chacune adaptée à une région et sélectionnée selon des coutumes alimentaires. Elles peuvent être alors consommées crues, frites, bouillies, cuites au four ou fermentées et transformées en bière, vin ou vinaigre (Arguelles, 1919; Howes, 1929). En revanche la banane exportée (banane dessert) que l'on trouve sur les marchés des pays industrialisés est constituée de quelques variétés et ne représente que 13 % de la production mondiale de banane et banane plantain (Frison et Sharrock, 1998).

3.1- Les bananiers : description

La domestication du bananier par l'homme a conduit à la création de variétés produisant des fruits sans graine. Les ovaires des fleurs femelles se remplissent de pulpe pour former le fruit, sans pollinisation ni formation de graines. Ces bananiers sont dit stériles et parthénocarpiques (Simmonds, 1962). Les bananes sont issues principalement de deux espèces sauvages diploïdes : *Musa acuminata*, dont le génome est noté « A » et *Musa balbisiana*, dont le génome est noté « B » (Fig. 3a). Les variétés actuelles sont pour la plupart des clones triploïdes issus soit de la seule espèce *Musa acuminata* et constituent alors le groupe des autotriploïdes AAA, soit de croisements interspécifiques entre les espèces *M. acuminata* et *M. balbisiana* qui constituent les groupes des allotriploïdes AAB et ABB (Simmond et Shepherd, 1955). Des variétés diploïdes AA et AB existent et sont encore cultivées en Asie du Sud-Est.

Actuellement, la production de bananes pour l'exportation provient de la culture de bananiers du sous-groupe des Cavendish (AAA) comme la Grande Naine, la Petite Naine ou la variété Williams. En revanche, l'exploitation des cultivars issus des sous-groupes Plantains (AAB),

Figue Pomme (AAB), Lujugira (AAA) ou encore Gros Michel (AAA) est davantage destinée à la consommation locale.

3.2- Mode de multiplication du bananier

Alors que les deux espèces originelles *M. acuminata* et *M. balbisiana* peuvent se reproduire par voie sexuée, les cultivars actuels en raison de leur stérilité ne peuvent se multiplier que par voie végétative à partir de rejets provenant de bourgeons axillaires portés par la tige vraie improprement appelée « bulbe » (Fig. 3b). Ce mode de multiplication a été et demeure encore aujourd'hui pour les exploitations familiales la source principale de matériel pour les plantations. Cependant, ces vingt dernières années ont vu l'avènement des techniques de micro propagation par bourgeonnement *in vitro*. Ces techniques permettent d'obtenir très rapidement des milliers de *in vitro* plants alors que la première méthode ne permet l'obtention que d'une dizaine de rejets dans un laps de temps équivalent. Ces techniques contribuent au développement plus rapide et plus homogène du matériel végétal sain.

3.3- Amélioration génétique du bananier

Les bananiers, comme toutes les autres cultures vivrières, sont menacés par des maladies et des ravageurs. Pour la plupart, des traitements chimiques existent et sont actuellement employés, mais le coût de ce procédé associé au souci actuel de protection de l'environnement rend son utilisation problématique. L'approche génétique a alors été largement privilégiée dans le but de créer des variétés de bananiers résistants aux maladies et ravageurs. Cet objectif fut le principal moteur de recherche depuis les années 1920 jusqu'à aujourd'hui pour les principaux centres de recherche que sont la FHIA au Honduras, L'EMBRAPA-CNPMF au Brésil, le CARBAP au Cameroun, l'IITA au Nigéria et le CIRAD aux Antilles.

3.4- Bio-agresseurs du bananier

La recherche d'hybrides résistants aux maladies foliaires dues à des champignons a mobilisé de façon prioritaire l'énergie de la plupart des centres de recherches. Ces maladies répandues dans la majorité des zones de production sont à l'origine d'importantes chutes de rendement. Deux principaux groupes se distinguent : les cercosporioses formant un premier groupe avec la maladie de sigatoga provoquée par *Mycosphaerella musicola* et la maladie des raies noires due à *M. fijiensis* (Vuylsteke et al., 1993 ; Carlier, 1994). Le deuxième groupe est

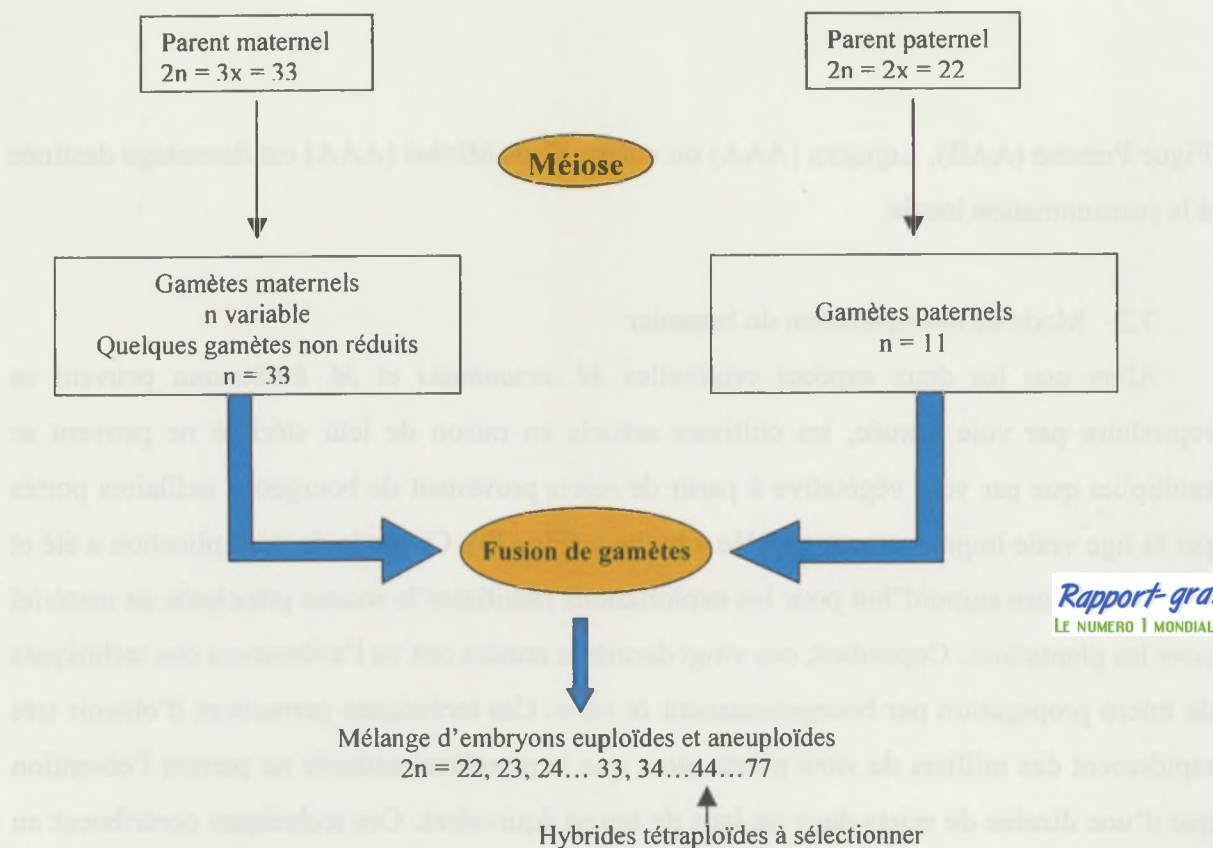


Figure 4a : Création de variétés tétraploïdes par restitution des gamètes maternels de variétés triploïdes (Bakry et al., 1997)

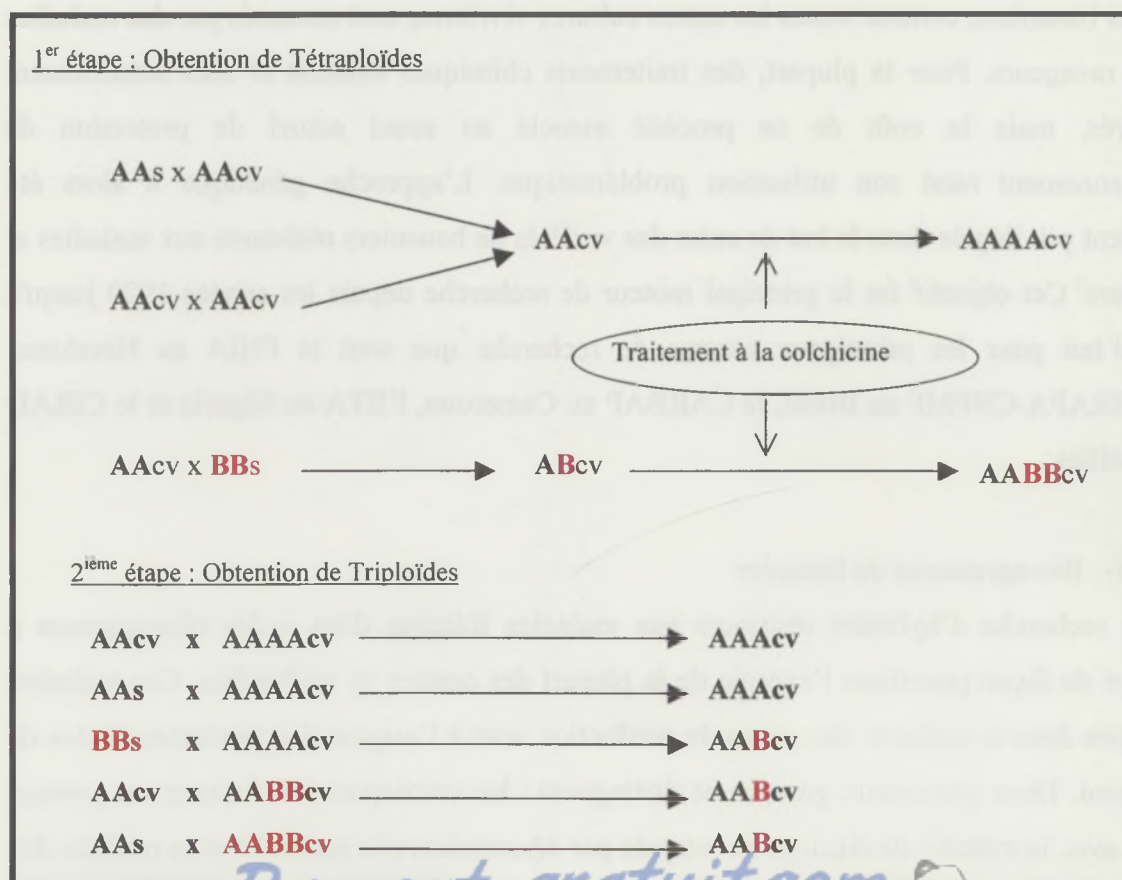


Figure 4b : Schéma de synthèse des variétés triploïdes à partir de clones diploïdes. s : sauvage ou bananier séminifère, cv : cultivar ou bananier parthénocarpique (Bakry et al., 1997)

représenté par la fusariose causée par différentes races de *Fusarium oxysporum* f. sp *Cubense* responsable de la maladie de Panama. Dans une moindre mesure, la recherche de cultivars tolérants et résistants aux deux principaux ravageurs que sont les nématodes dont *Radopholus similis* (Sarah, 1989) et les charançons, dont *Cosmopolites sordidus* font aussi l'objet d'investigations. Il en est de même pour les bactérioses dûes à *Ralstonia solanacearum* (maladie de Moko) (Oliveira e Silva et al., 2000 ; Gnanamanickam et Anuratha, 1992).

Les viroses du bananier échappent à ce schéma dans la mesure où aucune résistance naturelle n'a été observée chez les bananiers. Quatre principales maladies virales, affectant les bananiers, ont été décrites : (i) la maladie du bunchy top - BBTD due au *Banana bunchy top virus* (BBTV - virus appartenant à la famille des *Nanoviridae*) (Thomas et Iskra-Caruana, 2000), (ii) la maladie de la mosaïque en plage causée par le *Cucumber mosaic virus* (CMV - virus appartenant à la famille des *Bromoviridae*) (Lockhart et Jones, 2000a), (iii) la maladie de la mosaïque des bractées - BBrMD due au *Banana bract mosaic virus* (BBrMV - virus appartenant à la famille des *Potyviridae*) (Thomas et al., 2000), (iv) pour finir, la maladie de la mosaïque en tirets - BSD due au virus du même nom (BSV - virus appartenant à la famille des *Caulimoviridae*) (Lockhart et Jones, 2000b).

3.5- Stratégies d'amélioration

Même si les objectifs que se sont fixés les équipes de recherche sont quasiment les mêmes, les techniques pour atteindre ces objectifs sont différentes et deux stratégies se distinguent. La première, effectuée par la FHIA, l'EMBRAPA-CNPMF, le CARBAP et l'IITA, vise à créer des variétés tétraploïdes par croisement entre les variétés triploïdes et des variétés diploïdes naturelles ou améliorées porteuses de gènes de résistances (Fig. 4a). Cette orientation vise essentiellement l'amélioration des bananiers d'autoconsommation ou destinés aux marchés locaux. Cette méthode a la capacité d'offrir très peu de variabilité génétique (Menendez et Shepherd, 1975 ; Bakry et Horry 1992). La seconde, développée par le CIRAD et également utilisée par le CARBAP, vise à créer des variétés triploïdes directement à partir de matériel végétal diploïde naturel ou amélioré (Fig. 4b) (Bakry et al., 1990 ; Bakry 2002). Les diploïdes sélectionnés sont traités à la colchicine pour former des autos ou des allotétraploïdes puis croisés avec d'autres diploïdes pour donner des bananiers triploïdes. Ce schéma permet d'exploiter une grande diversité de matériel végétal diploïde et la création d'hybrides triploïdes confère la stérilité attendue.



Figure 5 : Symptômes de la maladie de mosaïque en tirets de bananier.

- A : Tirets jaunes sur le limbe des feuilles.
- B : Nécroses sur le limbe des feuilles.
- C : Eclatement du pseudo tronc à sa base.
- D : Tâches brunes et nécrose sur l'arête des fruits.
- E : Mort de la feuille naissante appelée aussi « cigare ».

4- La maladie de la mosaïque en tirets du bananier

La maladie de la mosaïque en tirets du bananier a été décrite pour la première fois en 1966 en Côte d'Ivoire (Yot-Dauthy et Bové, 1966) et observée par la suite au Sénégal et au Mali. Des publications plus anciennes (Magee, 1930, 1940) décrivent la plupart du temps une mosaïque du bananier, sans distinction aucune avec la maladie causée par le CMV laissant penser que ces deux virus ont largement été associés et confondus dans le temps. Cependant, la BSD ne s'était en aucun cas révélée comme une contrainte forte de la culture des bananiers jusqu'à ces dernières années où une quantité importante de plants se sont trouvés contaminés au même moment. La maladie jusqu'alors limitée à certaines régions d'Afrique, est devenue le virus des *Musaceae* le plus répandu (Daniells et al., 2001; Geering et al., 2000; Pasberg-Gauhl et al., 1996; Vuylsteke et al., 1996; Reichel et al., 1996; Tushmereirwe et al., 1996; Jones et Lockhart, 1993).

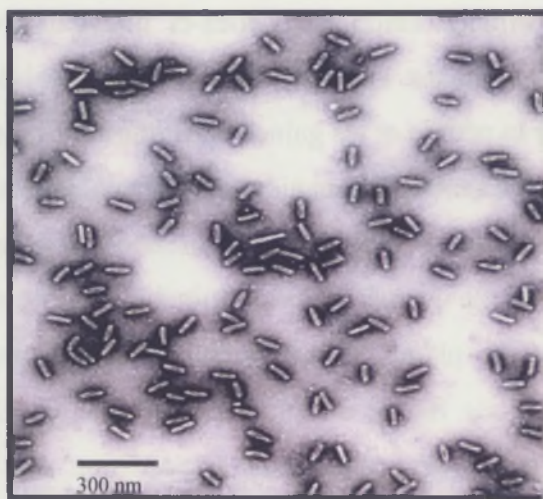
4.1- Symptomatologie

Les effets de la maladie sur une plantation peuvent être suffisamment sévères pour réduire de façon importante la production de bananes même si aucune épidémie répandue n'a été décrite (Lassoudière, 1979). Le symptôme caractéristique de la maladie est la présence de tirets jaunes, plus ou moins nombreux, évoluant en nécrose sur le limbe des feuilles. L'observation des feuilles par transparence vis-à-vis d'une source de lumière (soleil) facilite leur observation sur les feuilles les plus hautes des bananiers adultes. La maladie peut apparaître également sous des formes beaucoup plus diffuses. Il n'est pas rare d'observer sur des bananiers malades de simples chloroses, celles-ci pouvant évoluer par la suite en chloroses plus sévères puis en nécroses. Lorsque la maladie est plus intense, des taches ovales brunes peuvent apparaître sur le pétiole et les gaines ainsi que sur l'arête des fruits. Enfin, des souches virales virulentes en présence de bananiers plus sensibles, conduisent à une nécrose du cigare (feuille naissante) induisant l'éclatement du pseudo tronc à sa base et conduisant à la mort des plants par avortement du méristème terminal (Lassoudière, 1974) (Fig. 5). Au cours du développement de la plante, il est aussi courant d'observer une alternance d'apparition des symptômes d'une feuille à l'autre sur le bananier. Dahal et al. (1998) ont montré l'influence des écarts de température sur l'expression des symptômes selon les cultivars. Daniells et al., (2001), ont observé le même phénomène en Australie où les

Tableau 1 : Comparaison de quelques propriétés des *Badnavirus*.

Virus	Taille de la particule (nm)	Vecteur	Taille du génome (bp) (Nbr ORF)	Ref.
<i>Banana streak virus</i>	30 x 130-150	Cochenille	7389 (3)	1
<i>Commelina yellow mottle virus</i>	24 x 133	Cochenille	7489 (3)	2
<i>Cacao swollen shoot virus</i>	28 x 121-130	Cochenille	7161(5)	3
<i>Sugarcane bacilliform virus</i>	30 x 130-150	Cochenille	7568 (3)	4
<i>Dioscorea alata bacilliform virus</i>	29 x 130	Cochenille	~7413 (3)	5
<i>Citrus yellow mosaic virus</i>	30 x 120-150	Cochenille	7559 (6)	6
<i>Pineapple bacilliform virus</i>	33 x 133	Cochenille	-	7
<i>Goosberry vein banding virus</i>	30 x 120	Puceron	-	8
<i>Kalanchoë top spotting virus</i>	20-25 x 50-100	-	-	9
<i>Spiraea yellow leafspot virus</i>	-	Puceron	~7500	10
<i>Schefflera ringspot virus</i>	30 x 150	Cochenille	-	11
<i>Canna yellow mottle virus</i>	31 x 130	-	-	12
<i>Taro bacilliform virus</i>	30 x 130	Cochenille	7489	13
<i>Piper yellow mottle virus</i>	30 x 125	Cochenille	-	14

1 : Lockhart, 1986 ; 2 : Medberry et al., 1990 ; 3 : Hagen et al., 1993 ; 4 : Bouhida et al., 1993 ; 5 : Briddon et al., 1999 ; 6 : Huang et Hartung, 2001 ; 7 : Thomson et al., 1996 ; 8 : Jones et al., 2001 ; 9 : Hearon et Locke, 1984 ; 10 : Lockhart et Lachner, 1999 ; 11 : Lockhart et Olszewski, 1996 ; 12 : Lockhart, 1988 ; 13 : Harding et al., 2002 ; 14 : Lockhart et al., 1997



x 200 000

Figure 6 : Particules de BSV capturées sérologiquement avec l'anticorps polyclonal anti-BSV IgG PMX2RC et observées en microscopie électronique.

symptômes sont faibles voire absents en saison sèche et froide (23°C le jour et 16°C la nuit) et plus violents en période chaude et humide (30°C le jour et 23°C la nuit).

4.2- Biologie des *Badnavirus* : référence au BSV.

L'agent pathogène responsable de la maladie de la mosaïque en tirets du bananier est le *Banana streak virus* (BSV). Ce virus appartient au genre *Badnavirus*, de la famille des *Caulimoviridae* et du groupe des *Pararétrovirus* (Hull, 1999). A ce jour, douze virus ont été caractérisés comme appartenant au genre *Badnavirus* dont le membre type est le *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV) (Tableau 1). Le BSV se caractérise par des particules bacilliformes non enveloppées mesurant 30 x 120-150 nm (Fig. 6) contenant un ADN circulaire double brin de 7,4 kbp comportant une discontinuité sur chacun des deux brins (Lockhart, 1986; Harper et Hull, 1998). On observe chez les *Badnavirus* ainsi que pour les différentes souches de BSV entre elles une importante variabilité sérologique et moléculaire à la limite d'une classification en espèces différentes (Tableau 2) (Lockhart et Olszewski, 1993, Geering et al., 2000).

L'organisation génomique du BSV-OI comprend 3 ORFs situées sur le brin (+). Les deux premières ORFs codent pour deux petites protéines putatives (ORF1 \approx 22 kDa., ORF2 \approx 14 kDa.) dont les fonctions restent encore inconnues (Harper et Hull, 1998) (Fig. 7). L'étude réalisée sur les deux premières ORFs du CoYMV (Cheng et al., 1996) ont montré que la protéine de l'ORF I participerait à la maturation du virion et que la protéine de l'ORF II s'associait aussi bien avec le virion mature que le virion immature. Enfin, la troisième ORF code pour une polyprotéine (210 kDa.) qui clivée, libère au moins quatre produits différents : la protéine de capsid (CP), une aspartique protéase, une reverse transcriptase, une Rnase H et aussi une probable protéine de mouvement. Cette organisation se retrouve chez la plupart des *Badnavirus* séquencés, comme le *Sugarcane bacilliform virus* (ScBV) (Bouhida et al., 1993) ou le CoYMV (Medberry et al., 1990). Toutefois le CSSV (Hagen et al., 1993) et le *Citrus yellow mottle virus* (CYMV) (Huang et Hartung, 2001) se distinguent en comptant respectivement deux et trois ORFs supplémentaires dont les fonctions demeurent inconnues.

De par leur similarité génomique, le cycle de multiplication des *Badnavirus* et par conséquent du BSV fait souvent référence à celui du CaMV car à ce jour aucune étude n'a été réalisée directement sur le cycle de multiplication des *Badnavirus* (Jacquot et al., 1997). L'étape caractéristique de multiplication des pararétrovirus réside dans le fait que l'ARN

Tableau 2 : Pourcentages des similarités nucléotidiques basés sur la méthode de Lipman-Pearson pour les trois ORFs du *Banana streak virus* (BSV), *Cacao swollen shoot virus* (CSSV), *Citrus yellow mottle virus* (CYMV), *Sugarcane bacilliform virus* (ScBV) et *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV).

ScBV	41,2			
CoYMV	44,4	40,9		
CSSV	23	24,8	29,3	
CYMV	33,7	27,5	35,4	55,3
	BSV	ScBV	CoYMV	CSSV

ORF I

ScBV	21,5			
CoYMV	24,1	17,1		
CSSV	19,8	25,2	36,8	
CYMV	8,8	29,7	13,4	23,3
	BSV	ScBV	CoYMV	CSSV

ORF II

ScBV	42,1			
CoYMV	41,2	36,2		
CSSV	42,8	31,8	36,4	
CYMV	42,8	47,1	32,7	57,1
	BSV	ScBV	CoYMV	CSSV

ORF III

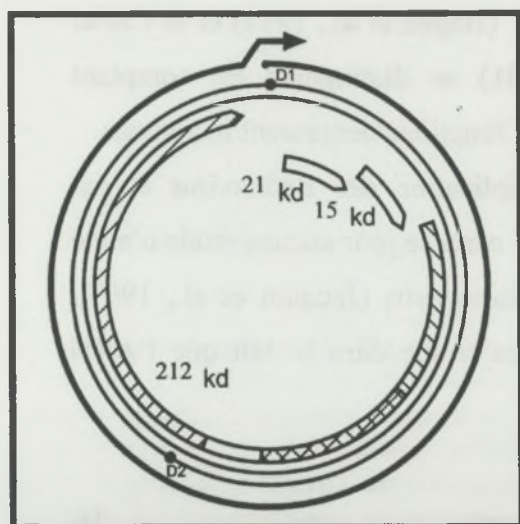


Figure 7 : Organisation du génome du BSV.

Le double cercle représente l'ADN génomique double brin, la position des discontinuités (D1 et D2) étant représentée par « • ». A l'intérieur du double cercle les boîtes décrivant des arcs représentent les ORF I à III (sont indiqués les poids moléculaires des protéines produites). A l'extérieur du double cercle est indiqué par une flèche circulaire la position du transcrit, la tête de la flèche indiquant l'extrémité 3'. Les boîtes hachurées représentent la fonction des produits de l'ORF III (protéine de fusion) qui sont respectivement : la protéine de mouvement, la protéine de capsid, l'aspartique protéase et la réplicase (transcriptase inverse et Rnase H).

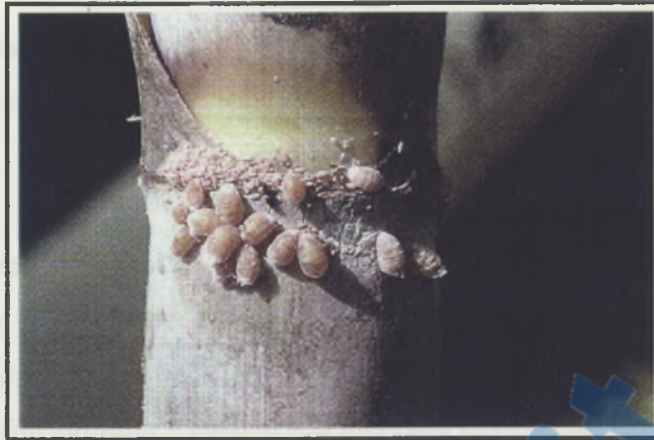
transcrit joue à la fois un rôle de messenger pour la production des protéines virales mais aussi de matrice pour la transcriptase inverse par laquelle l'ADN génomique viral sera synthétisé.

4.3- Transmission de la maladie

La maladie se propage principalement au travers de l'utilisation de rejets successeurs d'une plante ou d'un vitroplant malade (propagation courte distance) et par voie de conséquence de leur transfert par l'homme (longue distance). Ce type de transmission est également observé pour les autres badnavirus infectant des plantes à multiplication végétative tels que l'ananas, la canne à sucre ou encore l'igname. La maladie n'est pas par ailleurs transmise mécaniquement. Les travaux réalisés par Daniells et al. (1995) suggèrent que la transmission du BSV puisse se faire par la graine.

Les cochenilles constituent le vecteur préférentiel des badnavirus hormis pour le badnavirus du *Spiraea* spp transmis par puceron (Lockhart et Lachner, 1999). Trois cochenilles ont été caractérisées comme pouvant transmettre de façon semi-persistante le BSV : la cochenille des agrumes (*Planococcus citri*), la cochenille rose de la canne à sucre (*Saccharicoccus sacchari*) et de la cochenille de l'ananas (*Dysmicoccus brevipes*) (Kubiriba et al., 2001a) (Fig. 8). Bien que la cochenille soit sédentaire, le stade précoce de la nymphe appelé aussi « crawler » est plus mobile et peut se déplacer d'une plante à une autre de façon active, ou peut être déplacée par le vent ou par des fourmis (Lockhart, 1995). Des observations en champs suggèrent cependant que la propagation du virus par les cochenilles reste lente (Kubiriba et al., 2001b). L'utilisation de matériel contaminé par voie végétative présente un risque plus important de dissémination du BSV que sa propagation via les cochenilles. Il est compréhensible au regard de ces résultats que, jusqu'à récemment, cette maladie ne constituait pas une véritable contrainte pour les producteurs de banane du fait du contrôle efficace du vecteur, limitant dès lors l'expansion des foyers d'infection.

L'infection d'un bananier peut se faire aujourd'hui de façon externe *via* le vecteur et de façon interne par l'activation d'EPRVs BSV pathogènes. Quelle que soit son origine, le BSV suit toujours le même cycle de multiplication (Fig. 9). Dans un même bananier, l'infection peut de fait être multiple selon l'origine des particules épisomales. La présence de plusieurs souches BSV dans un même bananier peut favoriser des mécanismes de recombinaisons entre les virus qui peuvent être à l'origine de l'émergence de nouvelles souches virales.



A



B



C

Figure 8 : Vecteurs du BSV

A : Cochenille rose de la canne à sucre- *Saccharicoccus sacchari*

B : Cochenille de l'ananas sur racine- *Dysmicoccus brevipes*

C : Cochenille des agrumes- *Planococcus citri*

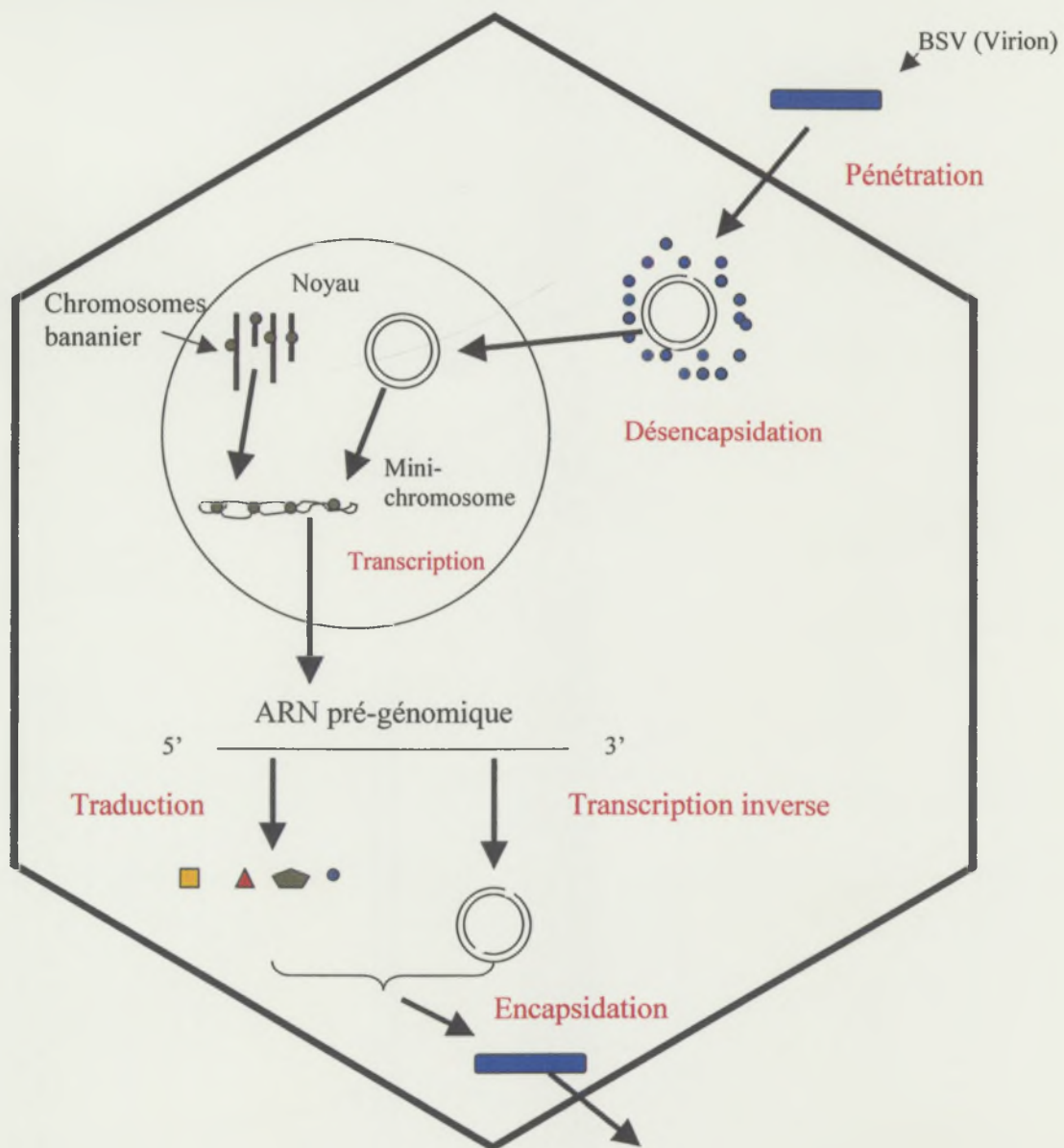


Figure 9 : Cycle supposé de multiplication du BSV

Chapitre I



Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MEMOIRE



CHAPITRE I : Déterminisme génétique de la maladie de la mosaïque en tirets des bananiers.



I.1-Introduction et objectifs

Au début des années 90 en Guadeloupe, le CIRAD FLHOR a mis en œuvre un programme d'amélioration visant à créer des hybrides interspécifiques triploïdes résistants aux cercosporioses des bananiers (Fig. 4b). L'équipe de généticien a pour cela évalué et sélectionné des clones diploïdes des espèces *Musa acuminata* (IDN110, Pisang lilin, Pisang pipit, SF247 et Galeo) comme parent mâle et *Musa balbisiana* (Pisang batu, Tani, Pisang Klutuk Wulung et Pisang Klutuk) comme parent femelle. L'objectif étant d'obtenir une grande quantité de graines au cours du croisement, les améliorateurs ont exploité l'importante fertilité femelle des géniteurs *M. balbisiana* qui est largement supérieure à la fertilité femelle des clones *M. acuminata*.

Les évaluations réalisées sur les premières descendance ont montré une bonne aptitude à la combinaison interspécifique et de réels gains d'un point de vue agronomique. Cependant, un nombre important de ces hybrides triploïdes (AAB) ont développé les symptômes de la maladie de la mosaïque en tiret (> 38%) (Bakry et Kerbellec, 1995) sans possibilité aucune de contamination externe. Les géniteurs utilisés dans les croisements ont été tout au long du processus d'amélioration régulièrement contrôlés vis-à-vis des différents virus affectant le bananier dont le BSV, et sont toujours apparus sains. Les améliorateurs en ont conclu que ces attaques de BSV sur les hybrides étaient gouvernées par des « effets familles très prononcés » et les parents *M. balbisiana* ont très rapidement été désignés comme coupables. En effet, seuls les hybrides AAB développaient la maladie dans des proportions importantes alors que des hybrides triploïdes purement *M. acuminata* (AAA) provenant des mêmes géniteurs *M. acuminata* étaient indemnes. La transmission maternelle a été logiquement suspectée par les améliorateurs faisant également référence à une étude réalisée par une équipe australienne (Daniells et al., 1995) suspectant la transmission du BSV par la graine. Très rapidement cette hypothèse a été supplantée par la découverte de séquences BSV intégrées dans le génome

Musa (Lafleur et al., 1996; Ndowora et al., 1997) relançant l'intérêt de l'origine génétique des observations réalisées.

L'objectif de notre étude s'est attaché à rechercher un déterminant génétique de l'expression de la maladie au cours de l'hybridation génétique conventionnelle. Pour cela deux croisements interspécifiques faisant appel aux géniteurs pour lesquels les améliorateurs avaient régulièrement observé l'apparition de BSV ont été renouvelés. Une première population, issue du croisement Pisang batu (BB) x Pisang pipit T (AAAA), a d'abord été consacrée à la validation des outils d'analyse de la ségrégation recherchée ainsi qu'à la définition des approches méthodologiques. Les résultats précédemment obtenus ont été confirmés et complétés sur la deuxième population de taille plus importante - PKW (BB) x IDN 110 T (AAAA) – une fois celle-ci en champ.

I.2- Étude génétique de la ségrégation de la maladie sur la population d'hybrides P. batu x P. pipit 4x.

Nous avons tout d'abord utilisé comme support d'étude génétique la première population de 62 hybrides en place à la station du CIRAD FLHOR de Neufchâteau, en Guadeloupe. Cette population est issue d'un croisement interspécifique entre un cultivar *Musa acuminata* comme parent mâle : Pisang pipit 4x AAAA (issus du cultivar P. pipit AA doublé artificiellement à la colchicine) et une espèce sauvage *M. balbisiana* : Pisang batu (BB) dans le rôle du parent femelle.

La méthodologie développée visait à identifier un marqueur de la maladie permettant d'observer la ségrégation génétique parmi les outils déjà disponibles, puis de rechercher l'élément génétique à l'origine de l'expression du BSV selon deux voies. En premier, la corrélation faite par B.E.L. LOCKHART entre la présence de la séquence EPRV BSV-OI ayant la potentialité de restituer un génome viral dans son intégrité et l'expression de la maladie nous a conduit tout naturellement à considérer cette séquence EPRV comme gène candidat à l'origine de l'expression du virus. Par la suite, nous avons recherché par Bulk Segregant Analysis (BSA) des marqueurs AFLP liés à la présence ou à l'absence de particules virales épisomales afin de tenter de caractériser le facteur génétique responsable de l'expression de la maladie dans la descendance d'hybrides.

Adsorption des anticorps PMx2RC sur la paroi du tube. Incubation à 4 °C une nuit.

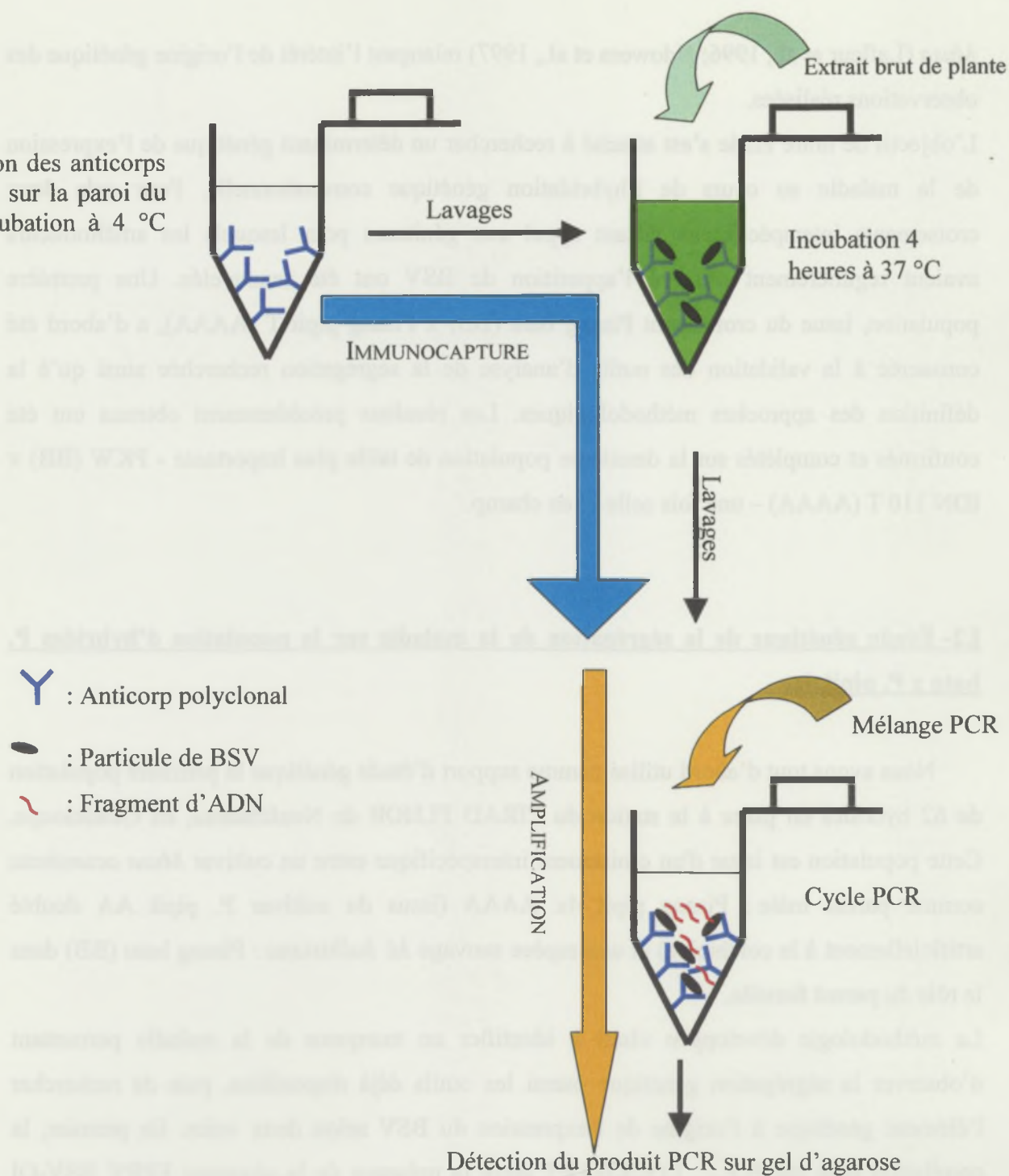


Figure 10 : Procédure de la technique d'Immunocapture PCR (IC-PCR).

I.2.1- Matériels et méthodes

Nous n'avons développé ci-dessous que le protocole d'extraction et de séquençage des marqueurs AFLP, la section « matériels et méthodes » étant décrite dans l'article N°1.

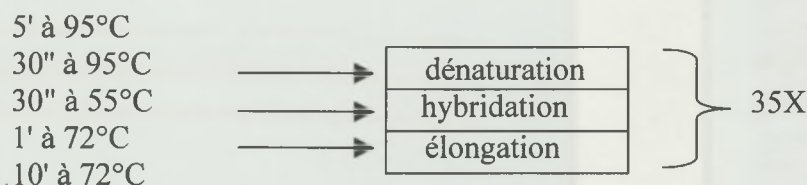
I.2.1.1 L'Immunocapture PCR ou IC-PCR

Principe

Cette méthode permet sans extraction ou purification du virus au préalable, d'amplifier la partie du génome viral ciblée, directement à partir de broyat de plante. Elle combine une capture des particules virales à l'aide d'anticorps spécifiques (IC) et une amplification du génome viral par une réaction PCR (fig.10). L'ensemble de ces deux étapes est réalisé simultanément dans un seul tube. Outre le fait de concentrer les particules virales dans l'échantillon analysé, l'étape d'immunocapture permet de réduire la présence d'inhibiteurs de PCR libérés par la plante au cours des diverses étapes d'extraction d'acide nucléiques classiques.

Procédure

25µl d'une solution de 10µg / ml dans du tampon carbonate d'anticorps polyclonaux PMX2RC (Lockhart) anti BSV sont déposés dans un tube PCR 0.2 ml placé à 4 °C durant une nuit. Cette étape va permettre l'adsorption des anticorps au niveau de la paroi du tube. Trois lavages sont ensuite réalisés avec du PBS.T 1X pH 7.4 (8.0g NaCl, 1.15g Na₂HPO₄, 0.2g KH₂PO₄, 0.2g KCl, 0.5mL de Tween-20. L'échantillon de feuille (0.5g) est broyé avec 5 ml de tampon de broyage (PBS.T +2% PVP+0,2% de Na₂SO₃+ 0,2% d'albumine bovine) et centrifugé 5' à 8000rpm. 30µl sont déposés dans le tube et incubés 4H à 37°C. Le tube est rincé 5 fois avec 50µl de TPS.T 1X (50ml de Tris 40mM pH 7,5 + 8g NaCl + 0.2g KCl + 0.2g NaN₃, 5ml/l de Tween 20 à 10%) et rincé 1 fois avec de l'eau mQ stérile pour éliminer les sels résiduels. Les amorces Cl1 : (5')ATG GCC TTA ATA GTC TTT CGT GTA(3') - Cl2 : (5')GGT GGC GCT GAG GAT GTG(3') spécifiques de la souche BSV-OI, sont ajoutées (2.5µl à 1pM/µl) avec le MIX réactionnel (2,5µl tampon 10X, 1,5 µl de MgCl₂ 50mM, 2,5µl dNTP 2.5mM, 1U Taq 5U/µl et H₂O qsp 25µl). Le cycle PCR d'amplification suivant est appliqué :



15°C jusqu'à la récupération des tubes (l'ADN est stable à température ambiante).

Le produit d'amplification obtenu est alors détecté sur gel d'agarose 1% TBE 1X.

A

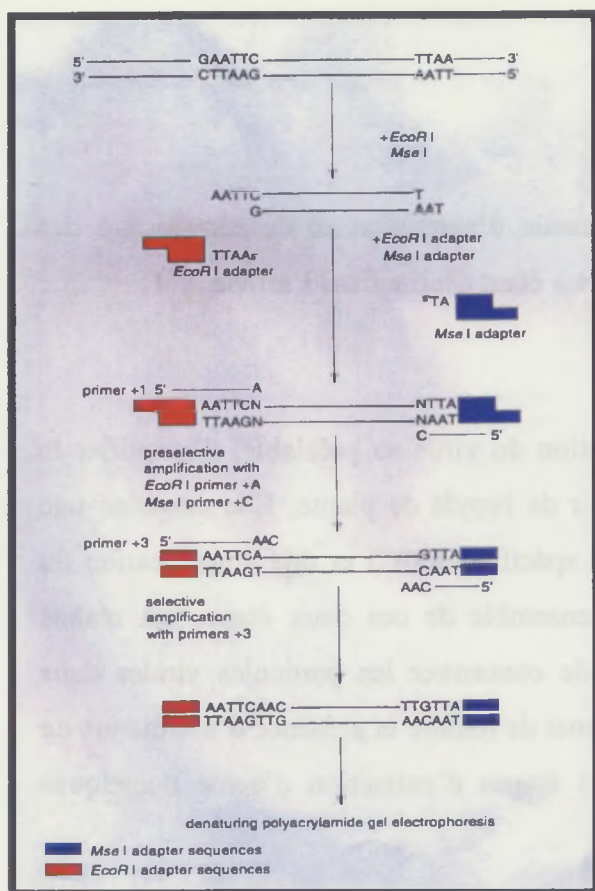


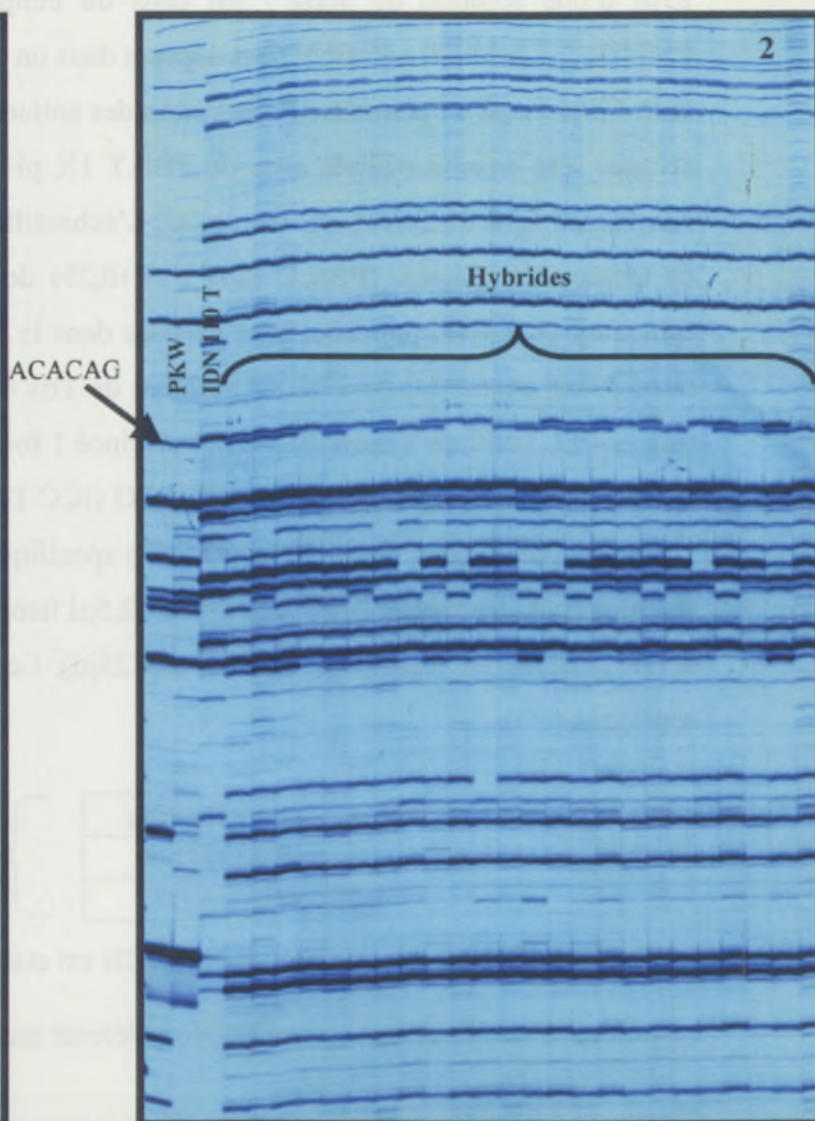
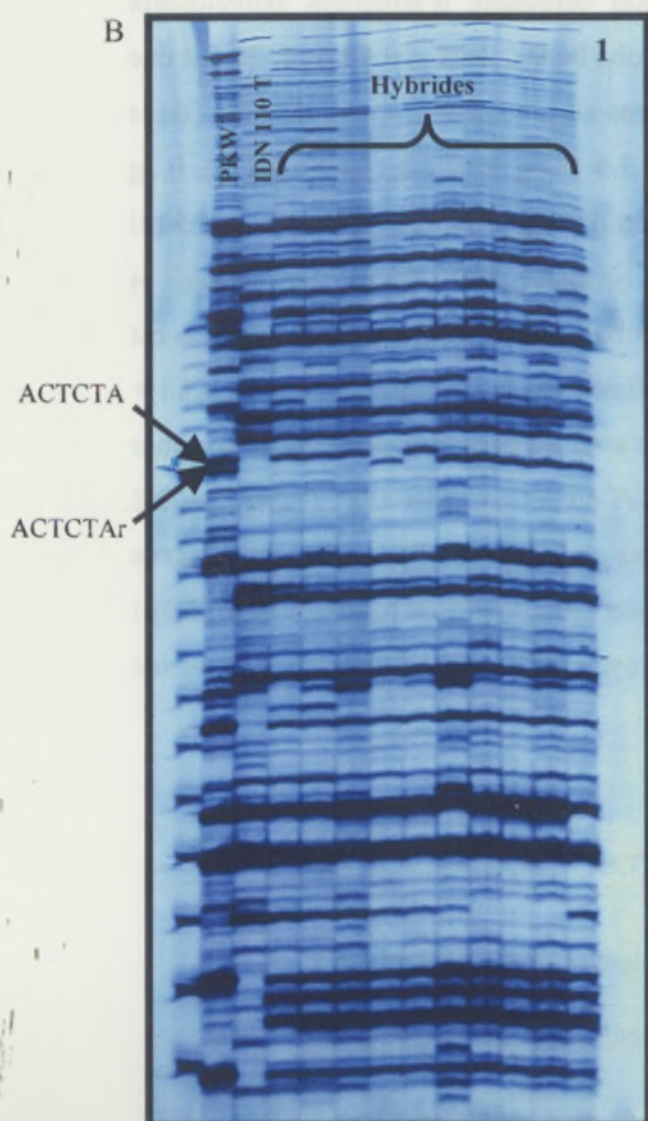
Figure 11 : AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

(A) Procédure de la technique AFLP

(B) Exemple d'autoradiogrammes AFLP obtenus

- 1- Marqueurs issus du couple d'amorces E-ACT/M-CTA
- 2- Marqueur issu du couple d'amorces E-ACA/M-CAG

B



1.2.1.2 AFLP (Amplified fragment length polymorphism)(Vos et al., 1995)

Principe

La technique des AFLP permet de mettre en évidence du polymorphisme de restriction et de séquence. Elle est basée sur une amplification sélective par PCR de sous-groupe de fragments de restriction à l'aide d'oligonucléotides spécifiques ou arbitraires.

Procédure

La technique AFLP se décompose en 4 étapes principales :

- Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (Fig. 11)

L'ADN génomique est isolé et digéré simultanément avec deux enzymes de restriction : EcoRI et MseI. Ces endonucléases reconnaissent respectivement un site de 6 bp et 4 bp générant des fragments d'ADN aux extrémités cohésives 5' sortantes. Utilisées ensemble, ces enzymes génèrent de petits fragments d'ADN d'une taille inférieure à 1kbp s'amplifiant très facilement et ayant une taille optimum pour une séparation sur gel dénaturant de polyacrylamide.

- Ligation des adaptateurs (Fig. 11)

Les enzymes de restrictions sont inactivées par la chaleur (10 min à 70 °C) et les fragments d'ADN génomique sont ligués avec une ligase aux adaptateurs EcoR I et Mse I. Ces adaptateurs flanquant les séquences d'ADN génomiques variables vont servir de site de fixation pour les oligonucléotides.

- Réactions d'amplification (Fig. 11)

La PCR est ensuite réalisée en deux réactions consécutives. La première appelée pré-amplification va permettre une amplification des fragments d'ADN génomique avec des oligonucléotides spécifiques des adaptateurs ayant un nucléotide supplémentaire de sélection (A et C). Les produits PCR de la pré-amplification sont dilués et puis amplifiés à l'aide de nouveaux oligonucléotides spécifiques des adaptateurs mais auxquels ont été ajoutés trois nucléotides supplémentaires de sélection. L'oligonucléotide EcoR I a été au préalable marqué radioactivement à l'extrémité 5' par du P³³. Le kit AFLP fourni par GIBCO BRL offre une sélection de 8 oligonucléotides EcoR I et Mse I permettant 64 combinaisons pour la deuxième amplification.

► Séparation des fragments amplifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant (Fig. 11)

Les produits de l'amplification sélective sont séparés sur un gel de polyacrylamide 5 % dénaturant. Le gel est ensuite apposé sur du papier wathman préalablement découpé (32 x 42 cm) et comportant le nom des amorces ainsi que le sens des dépôts. Le gel est recouvert de papier SARAN (cellophane) et séché à 80 °C sous vide pendant 20 à 30 min. Il est ensuite exposé à un film X-OMAT AR (Kodak) trois jours minimum à température ambiante, puis révélé.

Le protocole exact utilisé est celui donné par le fabricant –Life Technology GIBCO-BRL AFLP started primer kit.

I.2.1.3-Extraction, clonage et séquençage des marqueurs AFLP

A partir de l'autoradiographie, l'amplifiat correspondant au marqueur peut être localisé sur le gel. Le morceau du gel correspondant est découpé minutieusement et déposé dans un tube contenant quelques microlitres d'eau pendant une nuit. L'ADN libéré est amplifié par PCR en utilisant les amorces correspondant au marqueur. Afin de vérifier la présence d'un amplifiat, 10µl du produit d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 0.8% dans du TAE 1X. Le produit d'amplification est ensuite cloné à l'aide du kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega) selon les recommandations du fabricant. Les bactéries transformées (Colonies blanches) sont sélectionnées par PCR avec les amorces correspondant aux marqueurs (Schillberg et al., 1997). Pour vérifier que le fragment cloné correspond bien au marqueur sélectionné, 1µl d'ADN amplifié du fragment cloné est mélangé à 5µl d'ADN d'un individu ne possédant pas le marqueur amplifié avec les mêmes amorces. Le mélange est déposé sur un gel de polyacrylamide dénaturant suivant le protocole décrit pour les AFLPs. Les fragments clonés correspondant à chaque marqueur sont séquencés. Les séquences obtenues sont comparées aux séquences de la banque de données du NCBI par le programme BLAST (Altschul et al., 1990 ; Parenty, 1995).

I.2.2-Résultats et discussion

I.2.2.1-Ségrégation de la maladie dans la descendance.

L'apparition de la BSD a été analysée par notation de symptômes, recherche de la présence de particules virales en ISEM après semi-purification et IC-PCR afin d'estimer sa performance par rapport à l'ISEM. En effet, au début de ce travail, l'ISEM après semi-purification était la seule technique de référence pour un diagnostic fiable du BSV. Comme

Tableau 3: Analyse de la répartition de la maladie dans la descendance P. batu x P. pipit T

	Symptômes	IC-PCR	ISEM	Total
Hybrides malades	35/62= 56,4%	42/62=67,7%	42/62= 67,7%	42/62=67,7%
Hybrides sains				20/62=32,3%



Figure 12 : Position des amorces « Mixtes » *Musa T3.2* et *BSV 510* sur la séquence EPRV BSV-OI (Ndowora et al., 1999).

Les régions indiquées en rouge et bleu correspondent à la même séquence BSV-OI orientée respectivement dans le sens (+) de transcription ou en sens inverse. La région jaune correspond à la séquence *Musa* adjacente. Les régions en noir contiennent des alternances de courtes séquences BSV et *Musa*.

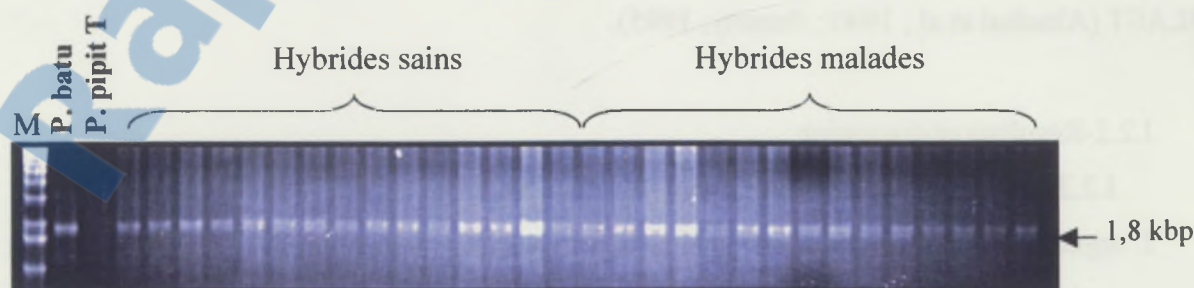


Figure 13: Résultat représentatif des analyses PCR obtenues en utilisant les amorces « mixtes » (*Musa T3.2* et *BSV 510*) sur la descendance du croisement P. batu x P. pipit T et de ces deux même parents.

l'illustre le tableau 3, le pourcentage de plantes infectées est différent selon l'approche utilisée et proche de 50%. La notation des symptômes donne un pourcentage en dessous de celui obtenu pour l'ISEM et l'IC-PCR qui quant à eux sont identiques. Tous les plants développant la maladie ont montré la présence de particules virales de type BSV. En revanche, les analyses ISEM et IC-PCR ont révélées la présence de particules virales sur des bananiers indemnes de symptômes. A la vue du caractère aléatoire de l'apparition des symptômes, la présence de virions a été retenue comme seul marqueur de la maladie. Les résultats obtenus pour l'ISEM et L'IC-PCR étant identiques, nous avons privilégié la dernière technique plus facile à mettre en œuvre pour identifier la présence des virions. La globalité de ces résultats tend à mettre en évidence une ségrégation de l'expression de la maladie au cours du croisement génétique, cependant le nombre restreint de la population analysée ne permet pas de préciser la nature exacte de cette ségrégation.

I.2.2.2-La séquence EPRV BSV-OI comme gène candidat de l'expression de la maladie.

Des tests PCR ont été effectués à l'aide d'un couple d'amorces constitué d'une première amorce située sur le génome du bananier « *Musa T3.2* » et d'une amorce située sur la séquence virale intégrée « BSV 510 » (Fig. 12). Ces amorces sont dénommées amorces « mixtes » et permettent d'amplifier la première zone de jonction du génome viral avec le génome bananier et donc implicitement d'identifier la présence de la séquence intégrée pour un bananier donné. Elles ont été utilisées sur les parents et l'ensemble de la population étudiée, afin de suivre la répartition de la séquence virale intégrée. Les résultats montrent que cette séquence est présente strictement chez le parent *M. balbisiana* et indifféremment pour tous les hybrides de la population (Fig. 13). Cette observation indique que la séquence virale intégrée semble à l'état homozygote chez le parent P. batu. Toutefois, les amorces mixtes utilisées ne sont pas discriminantes et ne nous permettent pas de tester si ce motif viral est à l'origine des particules épisomales observées.



I.2.2.3-Recherche de marqueurs moléculaires liés à l'expression de la maladie dans la descendance.

11 marqueurs polymorphes ont été identifiés spécifiquement chez le parent P. batu. Sept marqueurs ségrègent avec la présence de particules virales et 4 ségrègent avec l'absence de particule virale. L'analyse de ces 11 marqueurs à l'aide du logiciel Mapmaker sur les 62

hybrides a permis d'établir une carte génétique du locus responsable de l'expression de la maladie ou « BSV Expressed Locus – BEL » pour le parent *Musa balbisiana*, P. batu (Fig. 14). Les marqueurs génétiques s'échelonnent sur une région totale de 25 cM. Le marqueur le plus proche du locus d'expression du BSV, ACTCTA, se situe à 1,7 cM. Néanmoins, l'agencement des marqueurs tel qu'il est représenté sur la carte génétique du locus BEL (Fig. 14) est selon le logiciel MapMaker le plus probable (Tableau 4). La position des marqueurs reste aléatoire et comme l'illustre le tableau 4, plusieurs arrangements sont envisagés avec des probabilités proches. Les incertitudes touchent principalement les marqueurs encadrant étroitement le locus BEL lui-même. Ce problème s'explique par le faible nombre d'individus qui est donc peu représentatif.

I.2.3-Analyse moléculaire des marqueurs AFLPs

Le séquençage des marqueurs moléculaires n'a révélé aucune homologie de séquence significative hormis pour le marqueur ACGCTC. L'analyse de la séquence a révélé une homologie de 87% avec le LTR 3' du rétrotransposon « Skippy » qui a été caractérisé en présence d'un rétrotransposon non autonome « Monkey » de type *gypsy*-like dans le génome *Musa* (Balint-Kurti et al., 2000) (Fig. 15). Ces mêmes auteurs ont mis en évidence la présence de ce rétrotransposon dans les génomes *M. acuminata* et *M. balbisiana* jusqu'à 0.5 % du génome *Musa*. L'analyse FISH des rétrotransposons *Monkey* révèle qu'il est principalement concentré à proximité des régions NOR (Nucleolar organization region).

La présence de cet élément peut être fortuite ou révélatrice de la nature du facteur génétique. La distance de ce marqueur avec le locus BEL est de 7,5 cM. Sa position reste à préciser.

I.2.4-Conclusions

La méthodologie basée sur le suivi de la ségrégation de la maladie par identification de la présence de particules virales et les outils (ISEM, IC-PCR et AFLP) ont été retenus pour analyser la ségrégation génétique de la maladie la population PKW x IDN110 T comportant un plus grand nombre d'individus compatible pour une étude génétique de la ségrégation de la maladie.

I.3- Analyse génétique de la segregation de la maladie sur la population d'hybrides PKW x IDN110 T.

Les résultats sont présentés dans la publication : **“Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific *Musa* Hybrids”** : Article N°1 accepté par la revue *Theoretical and Applied Genetics* (TAG).

Identification of genetic markers linked to *Banana streak disease* expression in inter-specific *Musa* hybrids

F. Lheureux^{1,2}, F. Carreel², C. Jenny², B.E.L. Lockhart³ and M.L. Iskra-Caruana¹

¹ CIRAD-AMIS, UMR BGPI TA 40/02 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier cedex 5, FRANCE.

² CIRAD-FLHOR, Station de Neufchâteau, 97130 Sainte-Marie, Guadeloupe, FRANCE.

³ Department of Plant Pathology, University of Minnesota, St. Paul MN 55108, USA.

Abstract

Recently-introduced inter-specific *Musa* hybrids, bred for improved yield and resistance to diseases, have been found to be widely infected with *banana streak virus* (BSV), the causal agent of banana streak disease (BSD). One hypothesis suggests: (1) that BSD occurrence in these inter-specific hybrids results from activation of BSV-OI endogenous pararetrovirus sequences (EPRV) integrated into the *Musa* genome rather than from external sources of infection, and (2) that the process of genetic hybridisation may be one factor involved in triggering episomal expression of the BSV integrants. In order to test this hypothesis we carried out a genetic analysis of BSD incidence in a F1 triploid (*Musa* AAB) population produced by inter-specific hybridisation between virus and disease-free diploid *Musa balbisiana* (BB) and tetraploid *Musa acuminata* (AAAA) parents. Half of the F1 progeny of this cross expressed BSV particles. Using PCR amplification to determine the presence or absence of BSV-OI EPRVs, it was determined that this endogenous sequence was specific to the *M. balbisiana* genome and occurred in a homozygous state. Using bulk segregant analysis, ten AFLP markers co-segregating with the absence and/or presence of BSV infection were identified in the *M. balbisiana* genome, but were absent from the *M. acuminata* genome. Seven of these markers segregated with the presence of a BSV particle and three with the absence of BSV particles. Analysis of the segregation of these markers using a test-cross configuration allowed the construction of a genetic map of the linkage group containing the locus associated with BSV infection in the F1 hybrid population. These data indicate that a genetic mechanism is involved in BSV appearance, and suggest that a monogenic allelic system confers the role of carrier to the *M. balbisiana* parent.

Keywords: Badnavirus, Banana streak disease, endogenous pararetrovirus sequences (EPRV), Inter-specific hybridisation, Allelic system

INTRODUCTION

Banana and plantains (*Musa* spp.) are important local food sources in many countries of the humid tropics. Several diseases and pests cause significant losses in the production of these crops. Therefore, several breeding programs have been initiated in order to produce high yielding disease-resistant cultivars. These improved banana and plantain genotypes are inter-specific hybrids derived from crosses between *Musa acuminata* (A genome) and *Musa balbisiana* (B genome) parents. While many of these inter-specific *Musa* hybrids show impressive gains in yield and disease tolerance (Bakry 2002); most of them have been found to be infected with the *banana streak virus*, BSV Obino l'Ewai strain (BSV-OL) (Ortiz 1996; Pasberg-Gauhl et al. 1996), and to develop symptoms of the banana streak disease. Epidemiological studies showed that BSV infection in these improved *Musa* hybrids could not originate from external sources (Ndowora et al. 1997), and it was then hypothesised that infections arose instead through a complex recombination pattern from viral sequences integrated into the *Musa* genome, called BSV-OL EPRVS endogenous pararetrovirus sequences EPRVs (Ndowora et al. 1999). *Banana streak virus* is a member of the plant pararetrovirus, genus *badnavirus*, in the *Caulimoviridae* family (Hull 1999). Like other pararetroviruses, BSV has a circular dsDNA genome (Lockhart 1990) which is replicated by reverse transcription involving an RNA intermediate (Medberry et al. 1990). In the case of human and animal retroviruses, integration of the entire viral dsDNA genome into the host genome is compulsory for its replication (Hindmarsh and Leis 1999). In contrast, integration of viral sequences into a plant host genome is considered to be an accidental event and this is not a normal feature of the viral life cycle (Bejarano et al. 1996). Nevertheless, truncated viral sequences have been recently reported for several members of the *Caulimoviridae* family such as *Tobacco vein clearing virus*, TVCV, *Petunia vein clearing virus*, PVCV, and *Tobacco pararetrovirus-like* (NtEPRV) (Richert-Pöggler et al. 1996; Jakowitsch et al. 1999; Lockhart et al. 2000) as well as *Banana streak virus* (Ndowora et al. 1999). Then, two kinds of loci containing endogenous *Badnavirus* sequences have been identified in the *Musa* genome. The first one (*Musa* 1) carries a truncated *Badnavirus* genome unable of producing a functional viral transcript (Lafleur et al. 1996). The second locus contains two sequences whose junction can reconstitute a full-length BSV-OL genome. A model by which these two elements could recombine and produce a complete viral genome has been proposed by Ndowora et al. (1999).

In Guadeloupe (French West Indies), BSD was observed in several F1 hybrid populations resulting from inter-specific crosses between virus-free *M. acuminata* and *M. balbisiana* parents. There was no evidence of a natural field spread of BSV. The study reported here was undertaken in order to provide a genetic basis for BSD expression in inter-specific hybrids, and to test the hypothesis that *de novo* BSV infection and BSD expression in inter-specific *Musa* hybrids can arise from viral sequences integrated in the parental genome as pathogenic EPRVs.

MATERIALS AND METHODS

Plant population

A population consisting of 249 F1 allotriploid hybrids (AAB) was used in this study. This population was derived from inter-specific hybridisation between a virus-free autotetraploid *M. acuminata* male parent (IDN 110 4x, AAAA) and a virus-free diploid *M. balbisiana* female parent [Pisang Klutuk Wulung (PKW), BB].

Disease and virus detection

Visual observation

BSD incidence was scored visually. Incidence of BSV was determined by immunosorbent electron microscopy (ISEM) and by immunocapture PCR (IC-PCR) using partially purified extracts. Extracts were prepared from 10 g leaf samples as described by Ahlawat et al. (1996).

Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM)

Carbon-coated Formvar grids were floated for 30 min at room temperature on 10 µl of 10 µg/ml anti-BSV IgG (antiserum PMX2RC (Ndowora 1998) diluted in 60 mM carbonate buffer, pH 9.5. The coated grids were rinsed with distilled water and incubated over night at 4°C on 10 µl of partially purified leaf tissue extract, and stained with 2% sodium phosphotungstate, pH 7.0, for electron microscopy examination.

Immunocapture PCR

IC-PCR assays using the primers pairs BSVC11: 5'ATGGCCTTAATAGTCTTTCGTGAT3' and BSVC12: 5'GGTGGCGCTGAGGATGTG3' were performed according to Dallot et al. (2001).

PCR detection of integrated viral sequences

Total *Musa* DNA was extracted from young leaf tissue, according to Lanaud et al. (1995). The presence of the BSV-OI EPRVs (Ndowora et al. 1999) was checked by PCR using the mixed primers (*Musa* T3-2 5'GGCTTATGATGCTGACCACAT3' and BSV510 5'TTCTCGACCATAAATTGTAT3') located on the *Musa* and BSV-OI genome respectively,

as described by Ndowora (1998). The specificity of the amplification was confirmed by Southern-blot hybridisation according to Sambrook et al. (1989) using a probe specific to BSV-OI and the *Musa* flanking fragment.

AFLP and linkage analysis

Bulked segregant analysis (BSA) was performed according to the procedure described by Michelmore et al. (1991). AFLP analysis was performed according to Vos et al. (1995), using the enzyme combination *EcoRI/MseI*. Selective amplification was carried out using *EcoRI* and *MseI* primers having three selective nucleotides. AFLP fingerprinting was performed on pools and on individuals. Two pools (each containing DNA from five individuals) were used, one representing a disease phenotype, the other a healthy phenotype. Candidate markers were identified visually from the fingerprint data obtained from the pooled DNA and were tested on the individual progeny of each pool. Markers showing a good correlation were tested on all individual progeny of the PKW IDN 110 4x cross. Linkage analysis was performed with MAPMAKER version 3.0 (Lander et al. 1987). The linkage group was computed using a minimum LOD of 3.0.

Results

Identification of markers linked to the disease

The F1 allotriploid progeny from the PKW IDN 110 4x cross was scored for BSD expression. Because symptoms of BSD may appear only periodically in some plants due to their temperature dependence (Dahal et al. 1997, 1998) and the variable range of expression symptoms, the presence of virions was also required by ISEM and IC-PCR (Table 1). The expression of the disease was scored during 2 years for the presence of viral particles; 130/249 plants of the F1 population showed severe and mild symptoms of BSD and were confirmed as infected by ISEM and IC-PCR. Two symptomless plants were identified both by ISEM and IC-PCR as infected plants and contained BSV particles. The data recorded confirmed: (1) the presence of the viral particles as the best reliable disease marker, and (2) the repartition of the disease in half of the progeny. These observations indicate that the expression of the disease could result from a Mendelian segregation phenomenon.

The BSV-OI EPRV as a genetic marker candidate of the disease segregation

The presence of BSV-OI EPRVs among parental and progeny genotypes was investigated by PCR amplification, using the mixed primer pair (Musa T3-2 and BSV510). A product of the predicted size (1,800 bp) was obtained from total genomic DNA of both the *M. balbisiana* parent PKW and the entire F1 population (Fig. 1A). No product was obtained from genomic DNA of IDN 110 4x, the *M. acuminata* parent, confirming the results already obtained by Ndowora et al. (1999) and Geering et al. (2001) in the Calcutta-4 cultivar and other *M. acuminata* genotypes. These results were confirmed by Southern-blot hybridisation (Fig. 1B). PKW appears homozygous for the BSV-OI EPRVs tested. Hence, the set of primers used are not reliable to test whether these BSV-OI EPRVs co-segregate with the disease.

Mapping of the BSV infection locus linked to the disease

Bulked segregant analysis (BSA) was used to identify AFLP markers co-segregating with the presence or absence of BSV infection. For BSA analysis, we identified two pools of AFLP templates composed of five individuals selected from healthy and diseased F1 progeny respectively. Both templates pools were fingerprinted by AFLP using 64 combinations of *EcoRI* + 3/*MseI* + 3 primer extensions. BSA yielded seven fragments specific for the diseased

pool and three fragments specific for the healthy pool. All ten markers were tested on each individual of the bulks, and on the rest of the progeny individually. The ten markers were present in PKW only, the *M. balbisiana* parent, in a heterozygous condition and absent in IDN 110 4x, the *M. acuminata* parent. All ten markers segregated in a 1:1 ratio in the F1 progeny following a test-cross configuration. This result was validated by a χ^2 test to check the null hypothesis of a 1:1 segregation (Table 2). The data obtained from the progeny using these markers permitted the construction of a maternal genetic map of the BSV expressed locus (BEL) as shown on Fig. 2. Markers followed by "r" are linked in the repulsion phase. The repulsion phase was found by inverting the markers scored and comparing them to non-inverted scores using Mapmaker. All markers were linked to the BEL. The direct distance between BEL and the nearest marker (ACACAC) was 1.2 cM. The marker covered 69.8 cM and the genetic distances between markers varied in size from 0.6 to 39.2 cM. The 1:1 disease segregation ratio, and the joint occurrence of markers segregating with disease and markers segregating with the absence of viral particles, suggest a monogenic allelic system, which confers the role of the carrier to PKW.



Discussion

The results of our study to test the BSV-OL EPRVS as a candidate gene for BSD expression were inconsistent because it occurs in a homozygous state for the PKW parent. However, the identification of the origin of viral particles remains essential for the understanding of the BSV appearance mechanism. In this study, we also revealed the existence of a unique locus for the PKW genome and in an heterozygous state, which is responsible for BSD expression in 50% of the F1 progeny. Genetic data suggest that the release mechanism depends on a monogenic system. This could be inhibited by the allele situated on the homologous chromosome. Such a system confers the role of a free carrier on the *M. balbisiana* parent. The inhibition of this mechanism would be triggered during breeding hybridisation allowing disease expression in part of the F1 progeny. At least two hypotheses can be considered for the origin of viral particles. In the first one, the viral particles originate from the BSV-OL EPRVS identified by mixed primers and occurs as a homozygous state in the *M. balbisiana* parent. In order to explain the observed segregation, the PKW genome contains a genetic factor (revealed by AFLP markers) as a heterozygous state because the homologous recombination model proposed by Ndowora et al. (1999) cannot account for BSD appearance in 50% of the F1 hybrids. This hypothesis also implies that the BSV-OL EPRVS and the BSV Expressed locus are not genetically linked. In our second hypothesis the viral particles would originate from a BSV-OL EPRV occurring in a heterozygous state linked to the releasing factor. These two hypotheses are totally compatible with the silent expression observed in the PKW parent. Our results show that an allelic interaction occurring in-trans can prevent the action of the releasing factor involved in homology dependent gene silencing. This phenomenon appears an attractive hypothesis with regard to the regulation of the transposable-elements activity (Hirochika et al. 2000; Matzke et al. 2001); and the epigenetic inhibition of the releasing factor will be irreversible in PKW. In fact, PKW, but also IDN 110 4x, show no sign of infection and have never developed disease in the past. The most appropriate explanation could be that BSV infection in our cross results from the allopolyploidisation phenomenon which leads to the formation of triploid hybrids AAB in which one *M. balbisiana* (B) genome is associated with two *M. acuminata* (A) genomes. Therefore, during breeding hybridisation, 50% of the F1 progeny would contain the releasing factor and become active by the absence of the inhibitor mechanism. This type of mechanism has been hypothesised for transposable-element (TE) activity in which integrated TE sequences could both change the expression pattern and the methylation level (Matzke et al.

2000). Finally, a recent study has shown that allopolyploidy can also induce the elimination of a specific sequence in noncoding regions of the plant genome (Eckardt 2001). The integrated BSV sequences could be the target of such a phenomenon, causing their excision and making possible the regeneration of the viral genome. These evoked mechanisms are complex but seem to occur related to the emergence of a new disease and new hybrids resulting from the co-adaptation/co-evolution of the plant and viral genomes. During the last 2 years, other cases of EPRVs have been reported. Multiple integrations of truncated sequences from uncharacterised tobacco pararetrovirus-like (Nt EPRV) have been identified into the *Nicotiana tabacum* genome (Jacowisch et al. 1999). A recent report has shown that an episomal form of *tobacco vein clearing virus* may arise from viral integrants in the *Nicotiana edwardsonii* genome (Lockhart et al. 2000). Understanding the BSV expression mechanism from BSV-OL EPRVs could lead to a useful model system for evaluating the risk of disease expression from EPRVs for other pararetroviruses. Indeed, to day the BSD is the unique described pathosystem with economic consequences. Our study confirm that BSD is currently the major constraint for improvement programs and appears today as an important genetic disease for the new banana hybrids involving the *M. balbisiana* progenitor. Therefore, the co-dominant marker identified in this study might prove extremely useful for the marker-assisted selection of new hybrids devoid of pathogenic BSV EPRVs.

Acknowledgements.

We thank Ange-Marie Risterucci and Dr. Laurent Grivet for their generous help with molecular genetic analysis and Dr. Frederic Bakry for *Musa* genetic information. This Work partially funded by INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain).

References

- Ahlawat YS, Pant RP, Lockhart BEL, Srivastava M, Chakraborty NK, Varma A (1996) Association of a *Badnavirus* with Citrus mosaic disease in India. *Plant Dis* 80: 590-592.
- Bakry F (2002) Banana genetic diversity and perspectives for breeding. New varieties: why and how? *Comptes Rendues de l'Académie d'Agriculture de France. In press.*
- Bejarano ER, Khashoggi A, Witty M, Lichtenstein C (1996) Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc Natl Acad Sci* 93:759-764.
- Dahal G, Gauhl F, d'A Hugues J, Pasberg-Gauhl C, Nokoe KS (1997) Symptomatology and development of banana streak, a disease causes by *Banana streak badnavirus*, under natural conditions in Ibadan, Nigeria. *Acta Horticulturae* 126:25-31.
- Dahal G, Pasberg-Gauhl C, Gauhl F, Thottapilly G, d'A Hugues J (1998) Effect of temperature on symptom expression and reliability of *Banana streak badnavirus* detection in naturally infected plantain and banana (*Musa* sp.) *Plant Disease* 82:16-21.
- Dallot S, Acuña P, Rivera C, Ramirez P, Côte F, Lockhart BEL, Caruana ML (2001) Evidence that the proliferation stage of micropopagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). *Arch Virol* 146:2179-2190
- Eckardt NA (2001) A sense of self: The role of DNA elimination in allopolyploidization. *Plant Cell* 13: 1699-1704.
- Geering ADW, Olszewski NE, Dahal G, Thomas JE, Lockhart BEL (2001) Analysis of the distribution and structure of integrated *Banana streak virus* DNA in a range of *Musa* cultivars. *Mol Pl Path* 2: 207-213.
- Hindmarsh P, Leis J (1999) Retroviral DNA integration. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 836-43.

Hirochika H, Okamoto H, Kakutani T (2000) Silencing of retrotransposons in *Arabidopsis* and reactivation by ddm1 mutation. *Plant Cell* 12: 357-368.

Hull R (1999) Classification of reverse transcribing elements: a discussion document. *Arch Virol* 144:209-214.

Jakowitsch J, Mette MF, Van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJM (1999) Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13241-13246.

Lafleur DA, Lockhart BEL, Olszewski NE (1996) Portions of the *Banana streak badnavirus* genome are integrated in the genome of its host *Musa* sp. *Phytopathology* 86:100 (supplement).

Lanaud C, Risterucci AM, N'Goran JAK, Clement D, Flament M, Laurent V, Falque M (1995). A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor Appl Genet* 91: 987-993.

Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M, Lincoln SE, Newburg L (1987) MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.

Lockhart BEL (1990) Evidence for double-stranded circular DNA genome in a second group of plant viruses. *Phytopathology* 80: 127-131.

Lockhart BEL, Menke J, Dahal G, Olszewski NE (2000) Characterization and genomic analysis of *Tobacco vein clearing virus*, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J Gen Virol* 81:1579-1585.

Matzke M, Mette MF, Jakowitsch J, Kanno T, Moscone EA, Van der Winden J, Matzke AJM (2001) A test for transvection in plants: DNA pairing may lead to trans-activation or silencing of complex heteroalleles in tobacco. *Genetics* 158: 451-461.

Matzke MA, Mette MF, Matzke AJM (2000) Transgene silencing by the host genome defense: implication for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* 43: 401-415.

Medberry S, Lockhart BEL, Olszewski NE (1990) Properties of commelina yellow mottle virus complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a pararetrovirus. *Nucleic Acids Res.* 18:5505-5513.

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828-9832.

Ndowora TC, Lockhart BEL, Olszewski NE (1997) relationship between integrated and episomal *badnavirus* genomic sequences in *Musa*. *Phytopathology* 86: 69 (Supplement).

Ndowora TC (1998) Development of an enzyme immunoassay to detect serologically diverse isolates of *Banana streak virus* and characterization of viral sequences integrated into the *Musa* genome *Musa* sp. PhD Thesis, University of Minnesota, USA, p 90.

Ndowora T, Dahal G, Lafleur D, Harper G, Hull R, Olszewski NE, Lockhart BEL (1999) Evidence that *Badnavirus* infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequence. *Virology* 255: 214-220.

Ortiz R (1996) The potential of AMMI analysis for field assessment of *Musa* genotypes to virus infection. *Hortscience* 31: 829-832.

Pasberg-Gaahl C, Gaahl F, Schill P, Lockhart BEL, Afreh-Nuamah K, Osei JK, Zofa K (1996) First report of *Banana streak virus* in farmer's fields in Benin, Ghana, and Nigeria, West Africa. *Plant Disease* 80: 224.

Richert-Pöggeler KR, Shepherd RJ, Casper R (1996) Petunia vein-clearing virus, a pararetrovirus that also exists as a retroelement in the chromosome of its host. In Abstract of the International Congress of Virology; Jerusalem Israel p 16.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, NY.

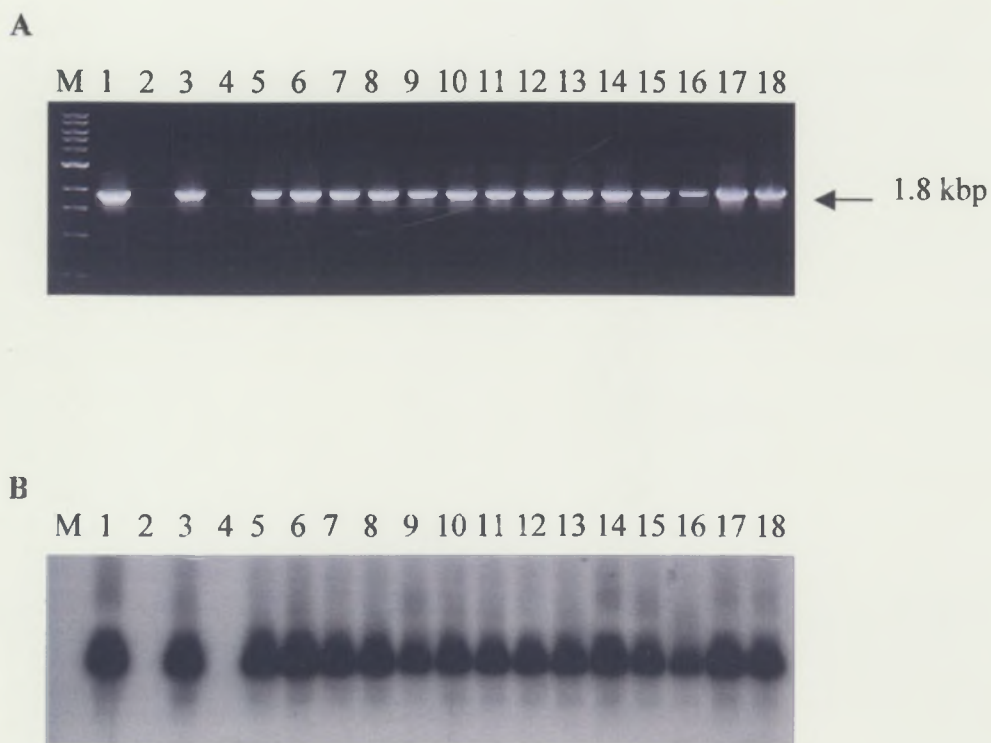
Vos P, Hoger R, Bleeker M, Reijan M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Pelemenan J, Kuiper M, Zabeau M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res. 23: 4407-4414.

Table 1 : Disease analysis in the progeny of PKW x IDN110 4x

	% of BSV positive hybrids ¹	% of BSV negative hybrids	Total
Symptom	130/249 = 52.2%	0	130
No symptom	2/249 = 0.8%	117/249 = 47%	119
Total	132/249 = 53%	117/249 = 47%	249

¹ Measured by ISEM and IC-PCR

Fig 1:



PCR analysis of the F1 progeny from the PKW x IDN 110 4x cross, using mixed primer pair [Musa T3.2 and BSV 510].

(A) EtBr-stained agarose gel analysis of PCR product.

(B) Southern blot hybridization of the gel using a BSV-OI specific probe.

Lane 5 to 11: F1 hybrids showing no sign of BSD.

Lane 12 to 18: F1 hybrids showing symptoms and BSV particles.

Lane M: 1 kbp ladder, lane 1: Obino l'Ewai (positive control), lane 2: Cavendish (AAA, negative control), lane 3: PKW, lane 4: IDN 110 4x.

Table 2: Segregation of markers in the progeny of PKW x IDN 110 4x

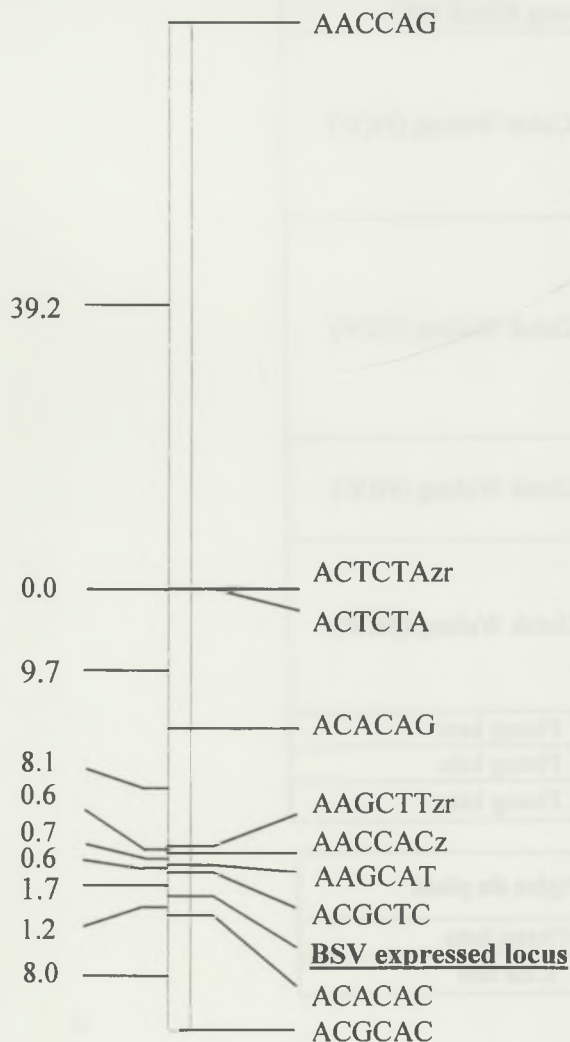
Markers	Parents		Progeny		$P\chi^2$ ^a
	PKW	IDN 110 4x	Observed +/-	Expected +/-	
Virion	-	-	120/109	1:1	0.47
ACTCTA1*	+	-	99/127	1:1	0.06
ACTCTA2	+	-	127/99	1:1	0.06
AACCAG	+	-	134/94	1:1	0.01
ACACAC	+	-	113/116	1:1	0.84
ACGCTC	+	-	114/115	1:1	0.95
AAGCAT	+	-	104/124	1:1	0.19
ACGCAC	+	-	130/98	1:1	0.03
ACACAG	+	-	115/109	1:1	0.69
AAGCTT*	+	-	118/111	1:1	0.64
AACCAC*	+	-	123/105	1:1	0.23

+, presence of fragment; -, absence of fragment

*, markers segregating with absence of viral particles

^a, $P\chi^2$ were calculated to test that the data fit an expected ratio of 1:1

Fig 2: Genetic map of area containing BSV expressed locus area



Markers (abbreviation of the selective nucleotide extension in 3'-end of each primer) are indicated on the right. Map distances (in centimorgans) are given to the left.

z, markers segregating with absence of viral particle.

r, markers linked in repulsion phase

Tableau 5 : Description des populations d'Haploïdes doublés et Autofécondés *M. balbisiana* utilisées:
(A) Haploïdes doublés (HD). (B) Auto fécondés (AF).

A

N° de Cal	N° de plant	Origine du plant
2	2	Pisang Klutuk (PK)
3	- 3.1 - 3.2 - 3.3 - 3.4 - 3.5 - 3.6	Pisang Klutuk Wulung (PKW)
4	- 4.1 - 4.2 - 4.3 - 4.4 - 4.5 - 4.6 - 4.7	Pisang Klutuk Wulung (PKW)
6	- 6.1 - 6.2 - 6.3	Pisang Klutuk Wulung (PKW)
8	- 8.1 - 8.2 - 8.3 - 8.4 - 8.5	Pisang Klutuk Wulung (PKW)
15	15	Pisang batu
21	21	Pisang batu
24	24	Pisang batu

B

N° de plant	Origine du plant
De 1 à 19	Pisang batu
De 20 à 45	Klue tani

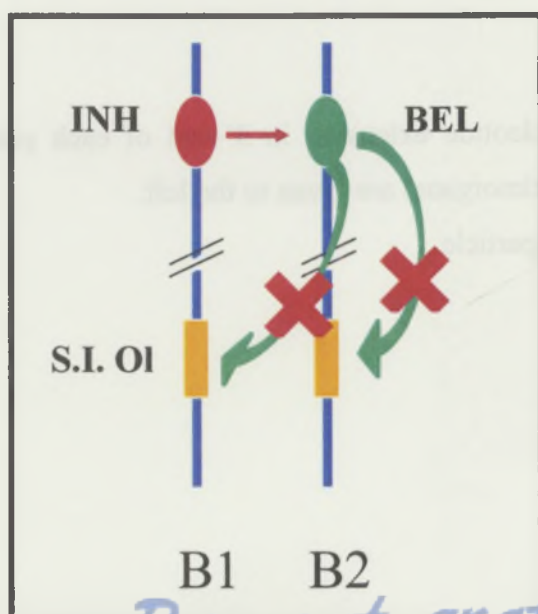


Figure 16 : Représentation schématique du système allélique qui confère le rôle de porteur sain au parent PKW et P. batu.

Inh : Inhibiteur

BEL : BSV Expressed Locus ; B1 et B2 : Chromosomes homologues ; S.I. OI : EPRVs BSV-OI

I.4- Analyse génétique de deux populations d'Haploïdes doublés (HD) et Autofécondés (AF) *M. balbisiana*.

L'analyse des deux populations d'hybrides triploïdes interspécifiques précédentes nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un système allélique dans le génome des parents *M. balbisiana* à l'origine de l'expression du BSV dans les populations hybrides. Ainsi chez les hybrides infectés, le BEL agirait sur les séquences EPRV BSV-OI, restituant des particules virales épisomales. Les parents *M. balbisiana* apparaissent dès lors comme porteurs sains puisque nous n'avons jamais pu observer de particules virales BSV dans ces bananiers. L'hypothèse émise atteste que le facteur génétique d'expression du BSV y est présent à l'état hétérozygote et inactivé par un inhibiteur situé sur l'allèle correspondant (Fig. 16). Cet inhibiteur empêche par conséquent toute action du BEL sur les séquences EPRVs BSV-OI et donc l'obtention de particules virales.

Afin de vérifier cette hypothèse et éprouver ce système allélique, nous avons étudié le statut de deux populations de clones *Musa balbisiana* haploïdes doublés (HD) et auto fécondée (AF) quant à l'expression ou non du BSV. Le génotype de ces populations a été déterminé en utilisant les marqueurs AFLP du locus BEL. Un phénotype « Sain » et « Malade » a alors été proposé pour chaque bananier et confronté à celui réellement observé et déterminé par la présence ou l'absence de particules virales par les techniques d'IC-PCR et ISEM. Les bananiers *M. balbisiana* à l'origine des populations HD et AF étudiés sont P. batu, PKW, P. klutuk et Klue tani.

I.4.1-Matériels et méthodes

La section « matériels et méthodes » est décrite dans l'article N°1 (Chapitre I.3), ces sections sont reprises et détaillées pour les données supplémentaires introduites.

I.4.1.1-Description du matériel végétal

La population de bananiers « Haploïdes doublés » - HD comporte 26 bananiers issus de 8 calcs de prolifération des clones PKW, Pisang batu et Pisang Klutuk (PK). La population de bananiers « Auto fécondée » - AF est composée de 45 clones : 19 clones de Pisang batu et 26 de Klue tani (BB) (Tableau 5).

Tableau 6 : Comparaison des phénotypes observés et attendus, après analyse génétique AFLP des clones de la population HD.

N° de Cal	N° de plant	IC-PCR	Génotype	Phénotype attendu
2	2	+	recombiné	?
3	- 3.1	-	recombiné	?
	- 3.2	-		
	- 3.3	-		
	- 3.4	+		
	- 3.5	+		
	- 3.6	-		
4	- 4.1	+	recombiné	?
	- 4.2	-		
	- 4.3	+		
	- 4.4	-		
	- 4.5	+		
	- 4.6	-		
	- 4.7	+		
6	- 6.1	+	Sain	Sain
	- 6.2	-		
	- 6.3	-		
8	- 8.1	-	Malade	Malade
	- 8.2	-		
	- 8.3	+		
	- 8.4	-		
	- 8.5	+		
15	15	-	Sain	Sain
21	21	-	recombiné	?
24	24	+	Malade	Malade

Génotype « Sain » : Présence uniquement des marqueurs ségrégeant avec l'absence de particule virale (ACTCTAz, AACCACz).

Génotype « Malade » : Présence uniquement des marqueurs ségrégeant avec la présence de particules virales (AACCAG, ACTCTA, ACACAC).

Génotype recombiné : Apparition d'une recombinaison (Crossing over durant la méiose).

I.4.1.2-Extraction d'ADN et analyse génétique

L'ADN de chaque clone a été extrait selon le protocole décrit par Lanaud et al. (1995). L'analyse AFLP a été réalisée suivant les recommandations de Vos et al. (1995). Les deux populations ont été analysées avec 4 couples d'amorces (E-AAC/ M-CAG, E-ACT/ M-CTA, E-AAC/ M-CAC et E-ACA/ M-CAC) symbolisant 5 marqueurs représentatifs de la carte génétique du locus BEL établie avec l'analyse de la population P. batu x P. pipit (Fig. 14).

I.4.1.3-Analyses IC-PCR et ISEM

Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM). Les grilles de microscopie électronique en cuivre 300 mesh recouvertes d'un film de collodium, sont déposées 30 min à température ambiante sur 10 µl d'anti-BSV IgG antiserum PMX2RC (Ndowora, 1998) 10 µg/ml dilué dans 60 mM de tampon carbonate, pH 9.5. Les grilles sont ensuite rincées à l'eau distillée et incubées toute la nuit à 4°C avec 10 µl d'extrait de feuille partiellement purifié selon le protocole décrit par Ahlawat et al. (1996). Elles sont colorées avec 2% de phosphotungstène de sodium, pH 7.0 séchées et observées en microscopie électronique à transmission (type JEOL-I00CXII).

Immunocapture PCR. Les tests IC-PCR utilisant les couples d'amorces spécifiques de la souche BSV-OI, BSVC11: 5'-ATG GCC TTA ATA GTC TTT CGT GAT-3', BSVC12: 5'-GGT GGC GCT GAG GAT GG-3', ont été réalisés selon le protocole décrit par Dallot et al. (2001) (Fig. 10). Les résultats IC-PCR concernant la population d'AF ont été confirmés par Southern blot en utilisant comme sonde le fragment Pst I de 2.6 Kbp issu du génome de la souche BSV-OI.

I.4.2-Résultats

I.4.2.1-Détermination du génotype des clones HD et AF par rapport au locus BEL.

Cinq marqueurs AFLP répartis sur la carte génétique du croisement P. batu x P. pipit sont utilisés pour établir le génotype des populations HD et AF par rapport au locus BEL. Deux des marqueurs sont représentatifs du phénotype « Sain » et les trois autres du phénotype « Malade ». Dans le cas d'individu homozygote strict pour le locus, les phénotypes « Sain » ou « Malade » correspondent au génotype.

Les HD se répartissent en cinq génotypes (Tableau 6): homozygote « Sain » (cals N°15 et 6), homozygote « Malade » (cals N°8 et 24) et trois pour lesquels sont apparus une

Tableau 7 : Comparaison des phénotypes observés et attendus, après analyse génétique AFLP des clones de la population AF.

N° plante	IC-PCR	Génotype	Phénotype attendu
1	+	Recombiné	?
2	-	Recombiné	?
3	-	Recombiné	?
4	+	Recombiné	?
5	+	Recombiné	?
6	+	Recombiné	?
7	+	Parental	Sain
8	+	Recombiné	?
9	+	Recombiné	?
10	+	Malade	Malade
11	+	Malade	Malade
12	+	Parental	Sain
13	+	Recombiné	?
14	+	Recombiné	?
15	+	Recombiné	?
16	+	Recombiné	?
18	+	Recombiné	?
19	+	Malade	Malade
20	-	Recombiné	?
22	+	Recombiné	?
24	-	Recombiné	?
25	+	Parental	Sain
27	-	Parental	Sain
28	+	Malade	Malade
29	+	Malade	Malade
30	+	Parental	Sain
31	+	Parental	Sain
32	+	Malade	Malade
33	+	Parental	Sain
34	+	Parental	Sain
35	-	Recombiné	?
36	+	Parental	Sain
37	+	Malade	Malade
38	+	Malade	Malade
39	+	Recombiné	?
40	+	Parental	Sain
41	+	Recombiné	?
42	+	Recombiné	?
43	+	Malade	Malade
44	+	Malade	Malade

Génotype « Sain » : Présence uniquement des marqueurs ségrégeant avec l'absence de particule virale (ACTCTAz, AACCACz).

Génotype « Malade » : Présence uniquement des marqueurs ségrégeant avec la présence de particules virales (AACCAG, ACTCTA, ACACAC).

Génotype recombiné : Apparition d'une recombinaison (Crossing over durant la méiose).

recombinaison (Cal N°2, 3, 4 et 21) rendant impossible l'attribution du phénotype « Sain » ou « Malade ».

Les génotypes observés pour les AF ont été regroupés en 3 catégories : (i) les clones possédant un génotype de type « Parental » PKW et P. batu (ii) les clones ayant un génotype homozygote « Malade » et (iii) les clones où est apparue une recombinaison et pour lesquels il est impossible d'établir un phénotype. Aucun bananier de génotype homozygote « Sain » n'a été observé dans notre population (Tableau 7).

I.4.2.2-Détection du BSV

Les clones de populations HD constituées à partir des bananiers PKW, P.batu, PK, et les clones de la population AF constitués à partir des bananiers P. batu et Klue tani ne développent aucun symptôme de la maladie. Cependant les résultats IC-PCR révèlent la présence de particules épisomales pour 44 % des HD répartis sur les cals N°3, 4, 6, 8, 2 et 24 (Fig. 17A et 17B) et dans 81 % des AF. Pour un même cal d'HD, tous les clones ne réagissent pas de la même manière au test IC-PCR (Tableau 6) témoignant d'une répartition des particules virales hétérogène. L'analyse ISEM n'a pas permis l'observation de particules virales de type BSV. Ce résultat peut être le fait d'une quantité trop faible de particules épisomales non détectables par ISEM.

I.4.3-Discussion

Les résultats obtenus ne nous ont pas permis de confirmer notre hypothèse concernant le locus BEL et son fonctionnement chez les parents *M. balbisiana*. En effet le nombre d'individus constituant les populations HD et AF n'est pas suffisant pour valider les rapports attendus. Cette étude montre également l'existence probable du même locus BEL, chez d'autres bananiers *M. balbisiana* que sont P. klutuk et Klue Tani du fait de la présence des marqueurs AFLP.

Un clone pour lequel un phénotype « sain » a été établi contient des particules virales épisomales. Les résultats IC-PCR pour ces deux populations apparaissent cependant en contradiction avec l'absence de particules virales observées en ISEM. Ce résultat ne peut s'expliquer par des différences liées aux seuils de détection de ces deux techniques car cette observation n'est pas isolée, tous les HD et AF réagissent de la même façon. Ce phénomène peut être la manifestation de la mise en place d'un mécanisme de défense de la plante de type « silencing » tel qu'il a été montré par Mette et al. (2002) pour l'EPRV PVL sur tabac.

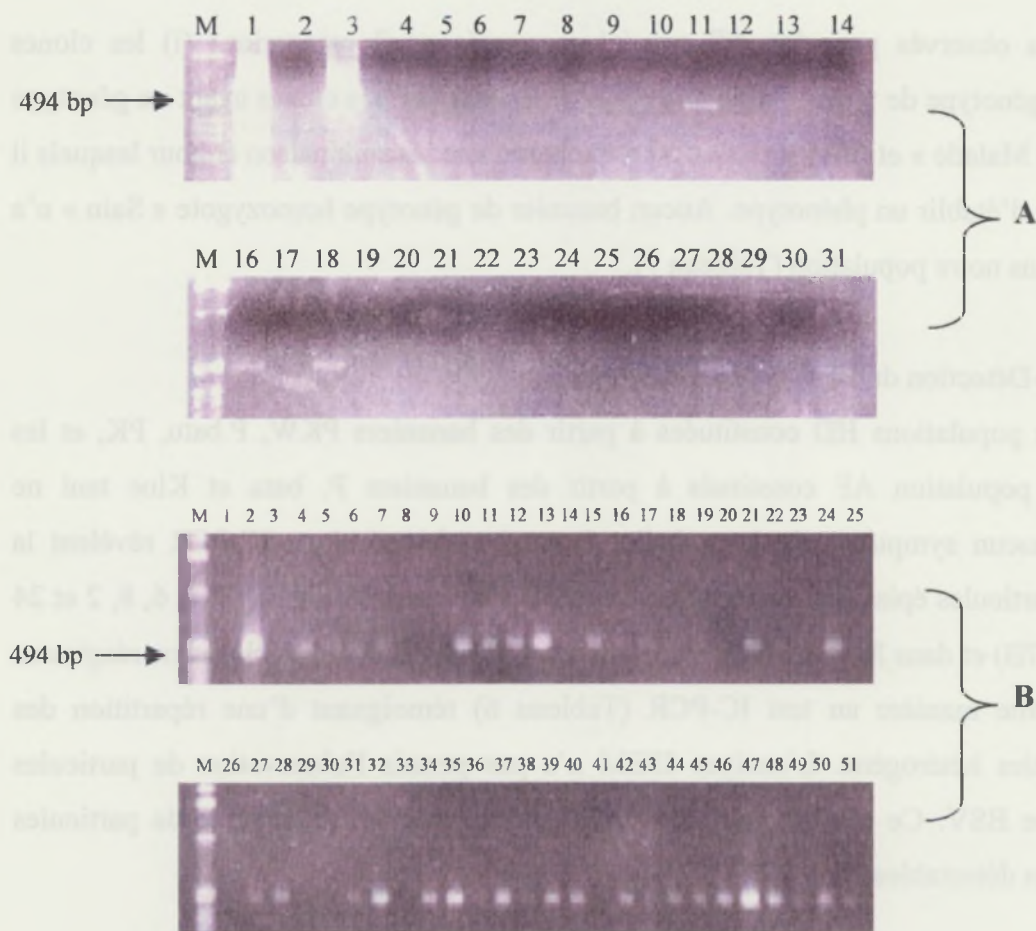


Figure 17 : Résultats des tests d'IC-PCR avec les amorces C11-C12 (Dallot et al., 2001) sur les populations d'Haploïdes doublés (A) et Autofécondés (B) *M. balbisiana*.

A) M : marqueur 1kbp (Gibco BRL). Pistes 1 à 31 correspondent respectivement à : T+ ADN (PKW), Teau, T+ (hybride malade PKW x IDNT), T- (*M. acuminata* sain), T-ADN (IDNT), 2, 3.1, 3.2, 3.4, 3.5, 3.6, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 6.1, 6.2, 6.3, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 15, 21, 24 (Cf. tableau 5).

B) M : marqueur 1kbp (Gibco BRL). Piste 1 à 49 correspondent respectivement à : T-(IDN), T+ (Hybride malade), Teau, T+ ADN (PKW), T+ADN (P. batu), T+ADN (Klue tani), Clone AF de 7 à

Celui-ci maintiendrait la quantité de particules épisomales à un seuil non détectable par ISEM.

La présence de virions dans un clone du cal 6 d'origine HD de phénotype « Sain » serait alors le résultat d'une activation accidentelle résultant strictement de l'étape de culture *in vitro* au cours de la formation du cal. Cette étape ne serait pas liée au locus BEL. Cette activation serait de même nature que celle observée lors de l'expression du BSV au cours de la culture *in vitro* d'hybrides sains possédant des séquences EPRV BSV pathogènes (Dallot et al., 2001).

La présence de particules épisomales dans les clones AF possédant le profil « Parental » est en contradiction avec le fait qu'ils possèdent le système allélique leur conférant le rôle de porteur sain. Dans ce cas, ce résultat peut résulter de l'expression des EPRV BSV-OI pathogènes avant l'étape d'autofécondation. En effet, la seule étape où le facteur génétique BEL n'est plus sous l'influence de l'inhibiteur est lorsqu'il est à l'état « n » dans les cellules germinales. Cette étape se situe juste après l'étape de la mitose réductionnelle. Les gamètes portant le facteur génétique d'activation seul renfermeraient également la forme virale ADN super enroulé transcriptionnellement active et issue de l'expression des séquences EPRV BSV-OI. Le croisement, avec des gamètes porteurs de l'inhibiteur seul, inhibera à nouveau l'expression des séquences endogènes, laissant le virus déjà présent. C'est ce dernier qui serait détecté.

L'analyse de cette population a été réalisée à la suite des résultats obtenus avec la population P. batu x P. pipit, la deuxième population n'était qu'en cours de réalisation. Nous nous sommes basés par conséquent sur la première carte génétique du locus BEL qui comme nous l'avons signalé n'était pas totalement fiable en ce qui concerne la position des marqueurs. De plus, n'ayant sélectionné seulement que quatre marqueurs l'interprétation phénotypique est relative. L'analyse de ces deux populations avec la totalité des marqueurs est en cours de réalisation.

1.5- Conclusions

Un locus identique responsable de l'expression de la maladie dans la descendance a été identifié chez les deux parents *M. balbisiana* utilisés dans nos croisements et semble conservé au sein de l'espèce *M. balbisiana*. En effet l'analyse des données AFLPs groupées des deux

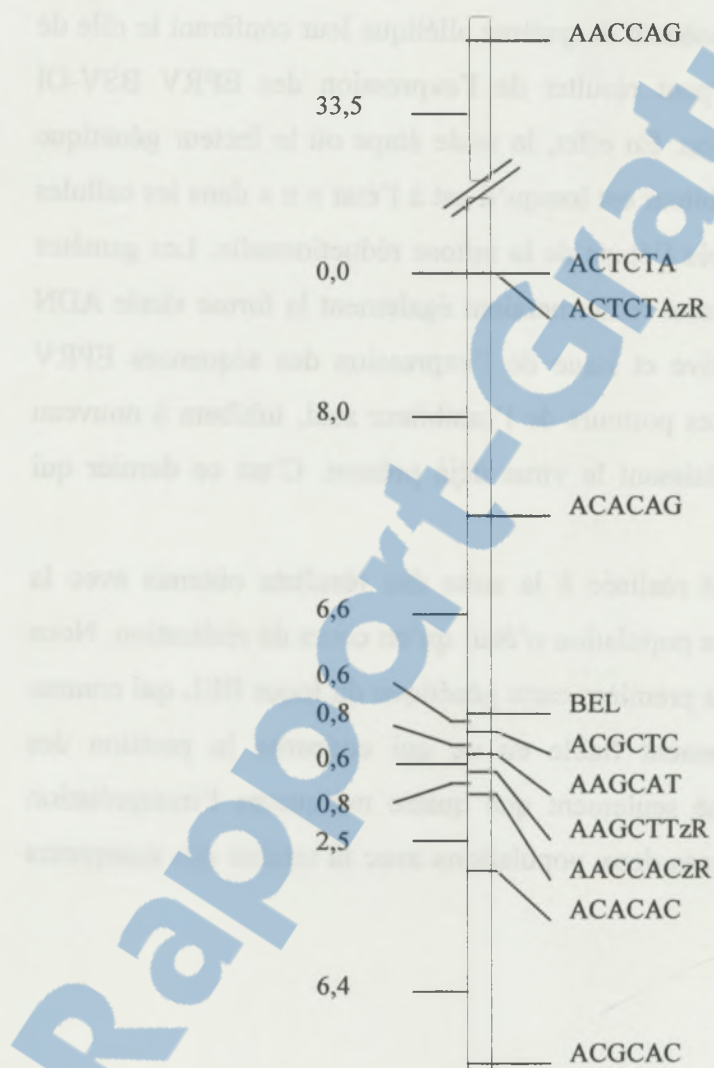


Figure 18: Carte génétique du locus BEL construite à partir des données AFLP des populations PKW x IDN 110 T et P. batu x P. pipit T

populations d'hybrides étudiées à l'aide du logiciel Mapmaker restitue une carte génétique semblable à celle obtenue pour la seule population PKW x IDN110T (Fig. 18). Ce résultat renforce l'existence du locus BEL. Ce locus confère aux parents *Musa balbisiana* le rôle de porteur sain. Cette similitude observée pour les deux parents femelles est cohérente dans la mesure où les deux bananiers sont génétiquement proches. Il est par conséquent très probable de retrouver le même locus chez d'autre *M. balbisiana* tel Kluetani ou Pisang Klutuk qui sont aussi génétiquement proches des deux précédents comme nous avons commencé à le démontrer avec l'étude des populations HD et AF. Le taux d'hétérozygocie de ces clones est très faible d'un point de vue génétique (12 à 14%, Carreel, 1994). Il serait alors intéressant d'analyser l'ensemble des clones *M. balbisiana* de la collection en Guadeloupe pour confirmer cette hypothèse.

L'analyse des populations HD et AF indiquerait que l'activation des séquences se fait dans les cellules germinales avant la fécondation. Par ailleurs, il semblerait que ces clones *Musa balbisiana* soient capables de se défendre vis-à-vis de cette infection intérieure par des mécanismes qu'il reste à déterminer en maintenant un taux de particules épisomales bas. Ce mécanisme semble bien distinct de celui qui agit sur les séquences endogènes car l'analyse des géniteurs *M. balbisiana* par IC-PCR n'a jamais révélé la présence de particules virales.



Chapitre II



Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



CHAPITRE II : Etude de l'origine des particules épisomales.

II.1- Introduction et objectifs

Dans toutes les hypothèses formulées pour tenter de proposer un mécanisme moléculaire d'activation, l'identification de l'origine des virions apparaît comme un élément clé pour appréhender la nature du facteur génétique et de son mode d'action. Cependant, les résultats de l'étude sur la séquence EPRV BSV-OI dans les deux populations d'hybrides triploïdes n'a pas permis de désigner le motif décrit comme étant à l'origine de l'apparition des particules épisomales. Par conséquent, au cours de cette étude nous avons tenté de rechercher et d'étudier toutes les origines possibles du BSV-OI qui nous permettrait alors de remonter au mécanisme moléculaire d'expression de la maladie dans nos descendances.

Comme ont pu le décrire ou le suggérer différents auteurs (Covey et al., 2000; Saunders et al., 1990; Covey et Turner, 1991; Covey et al., 1997; Ratcliff et al., 1997; Tang et Leisner, 1998) le cycle de multiplication du virus fait l'objet au cours de l'infection de différentes régulations de la part de la plante hôte. Ces mécanismes de régulation affectent plus particulièrement les formes génomiques super-enroulées à l'origine de la transcription et situées dans le noyau des cellules de la plante. Ces formes sont rendues inactives par les mécanismes de régulation de l'hôte ce qui entraîne la non-expression de la maladie pour la plante qui les renferme. Elles peuvent être décrites alors comme des formes latentes du virus dans le noyau et transmises verticalement à la descendance. Elles pourraient donner lieu par la suite à une multiplication virale ou non selon les capacités de l'hybride à réguler l'expression du virus. Nous avons par conséquent recherché en premier ces structures chez les géniteurs ainsi que chez les hybrides sains et malades. Ensuite nous avons tenté d'identifier dans le génome du parent PKW le motif EPRV BSV-OI pathogène, indirectement par la recherche de transcrits et plus directement par l'analyse moléculaire et la comparaison des séquences PRV et EPRV BSV-OI disponibles. Enfin nous avons recherché la possibilité d'EPRV BSV différentes de celle décrite pour la souche OI en étudiant la diversité des souches virales exprimées dans les hybrides malades tenant compte de ce qui avait déjà été décrit (Geering et al., 2000).

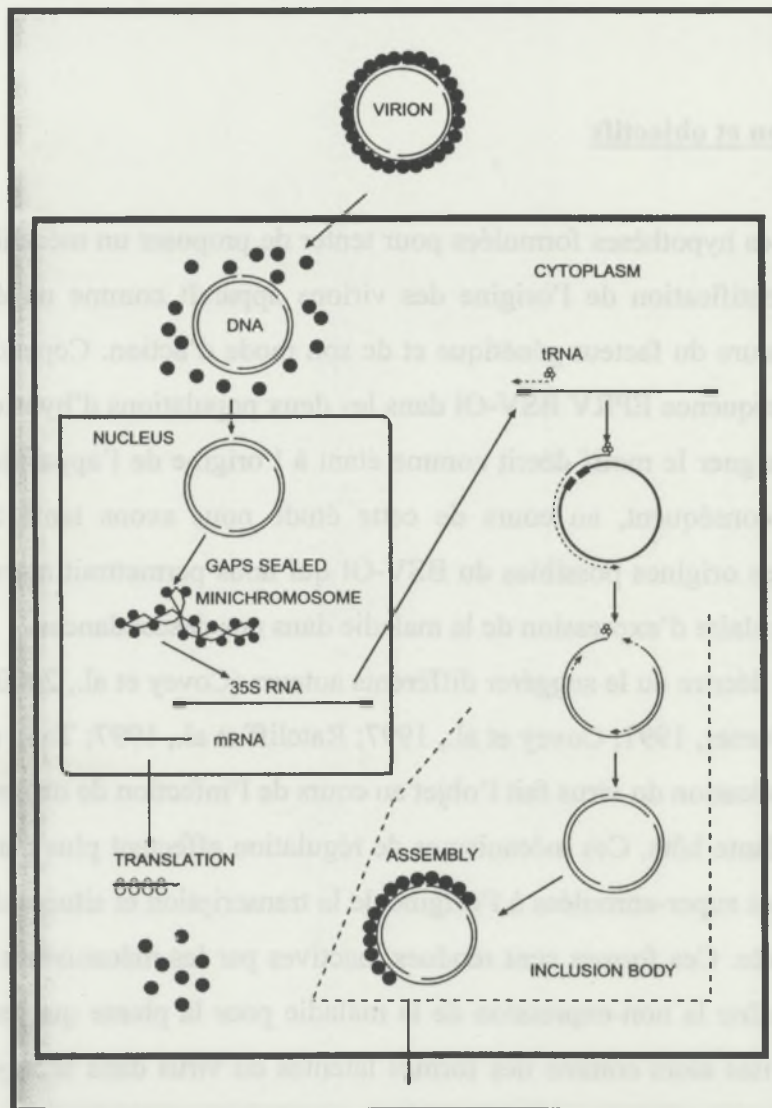


Figure 19: Diagramme du cycle de multiplication du CaMV (Hull, 2002)

II.2- Recherche de la forme « minichromosome »

Classiquement au cours de l'infection virale de *Caulimoviridae*, l'ADN du virus est désencapsidé dans la cellule et pénètre ensuite dans le noyau. Les discontinuités au nombre de trois pour le CaMV et de deux pour le BSV-OI, qui sont des « reliquats » de la reverse transcription, sont réparées par des enzymes de la cellule hôte pour former un ADN double brin circulaire super-enroulée (sc DNA). Ce dernier s'entourant d'histone va former un minichromosome dans le noyau de la cellule (Menissier et al., 1982 ; Olszewski et al., 1982). C'est à partir de ce minichromosome que les transcrits vont être synthétisés par la RNA polymérase de la cellule l'hôte. Les ARN messagers vont alors être traduits ou servir de modèle à la reverse transcription pour synthétiser de nouveaux ADN génomiques (avec leurs discontinuités) qui seront à leur tour encapsidés donnant une particule virale épisomale (Jacquot et al., 1997) (Fig. 19).

Saunders et al. (1990) ont mis en évidence pour le CaMV (*Caulimovirus*) que le cycle de multiplication du virus pouvait être soumis à des mécanismes de régulation de l'hôte. Ainsi, les variétés de *Brassicaceae* infectées par le CaMV et développant de manière constante les symptômes de l'infection contiennent une quantité importante de transcrits viraux et d'ADN circulaire relâché destiné à l'encapsidation. En revanche les variétés présentant un rétablissement naturel quelque temps après l'installation de l'infection contiennent quant à eux exclusivement la forme sc ADN. Covey et al. (1997) ont démontré quelques années plus tard pour ces mêmes plantes l'absence d'accumulation de transcrits bien que la transcription soit effective. Par conséquent et pour le modèle étudié, la maladie pourrait être latente sous la forme de sc ADN situé dans le noyau des cellules hôtes. L'inhibition de la transcription à partir de cet ADN viral ou sa traduction serait levée lors de stress tel que ceux induits par la culture *in vitro* ou lors de modifications de la ploïdie au cours de croisements interspécifiques. Nous avons testé cette hypothèse en recherchant la présence de forme sc ADN dans les géniteurs utilisés lors des croisements étudiés.

II.2.1-Matériels et méthodes

II.2.1.1- Détection de l'ADN viral libre par hybridation

L'ADN des parents PKW, IDN 110 T, P. batu et P. pipit T ainsi que celui de 5 hybrides sains et 5 hybrides malades de la population PKW x IDN110 T a été extrait selon le protocole décrit par Lanaud et al. (1995). Approximativement 10 µg d'ADN génomique total non digéré de chaque clone a été mis à migrer sur un gel d'agarose 0,8 % dans du TAE 1X toute la nuit

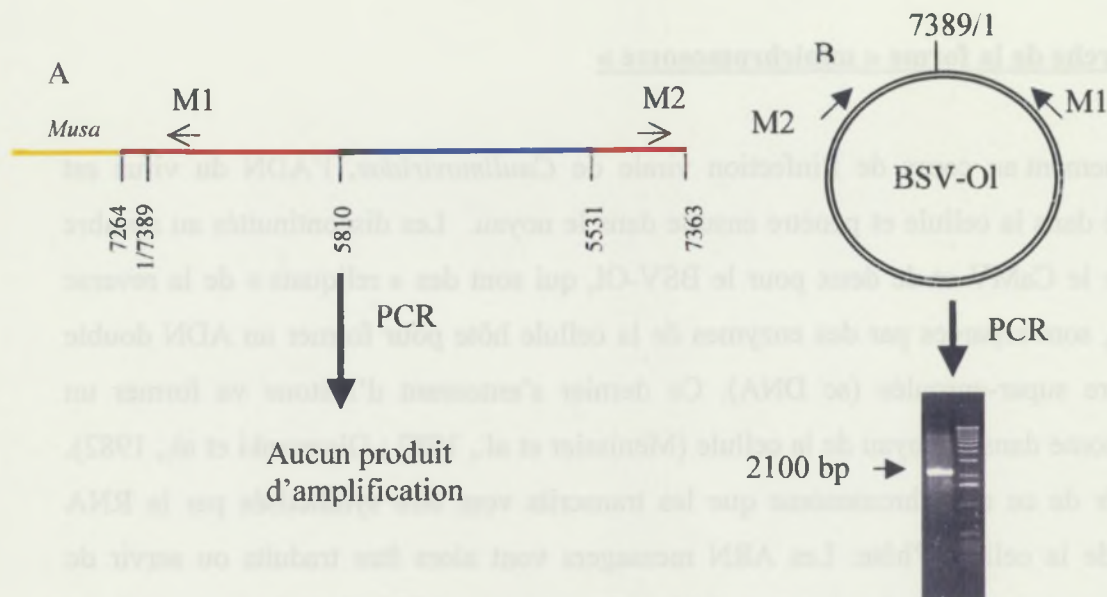


Figure 20: Schéma de la stratégie PCR développée sur ADN total et permettant de mettre en évidence la forme circulaire libre du virus en utilisant les amorces M1 et M2.

A: Séquence EPRV BSV-OI (Ndowora et al., 1999), B: génome viral de la souche BSV-OI (Harper et al., 1998)

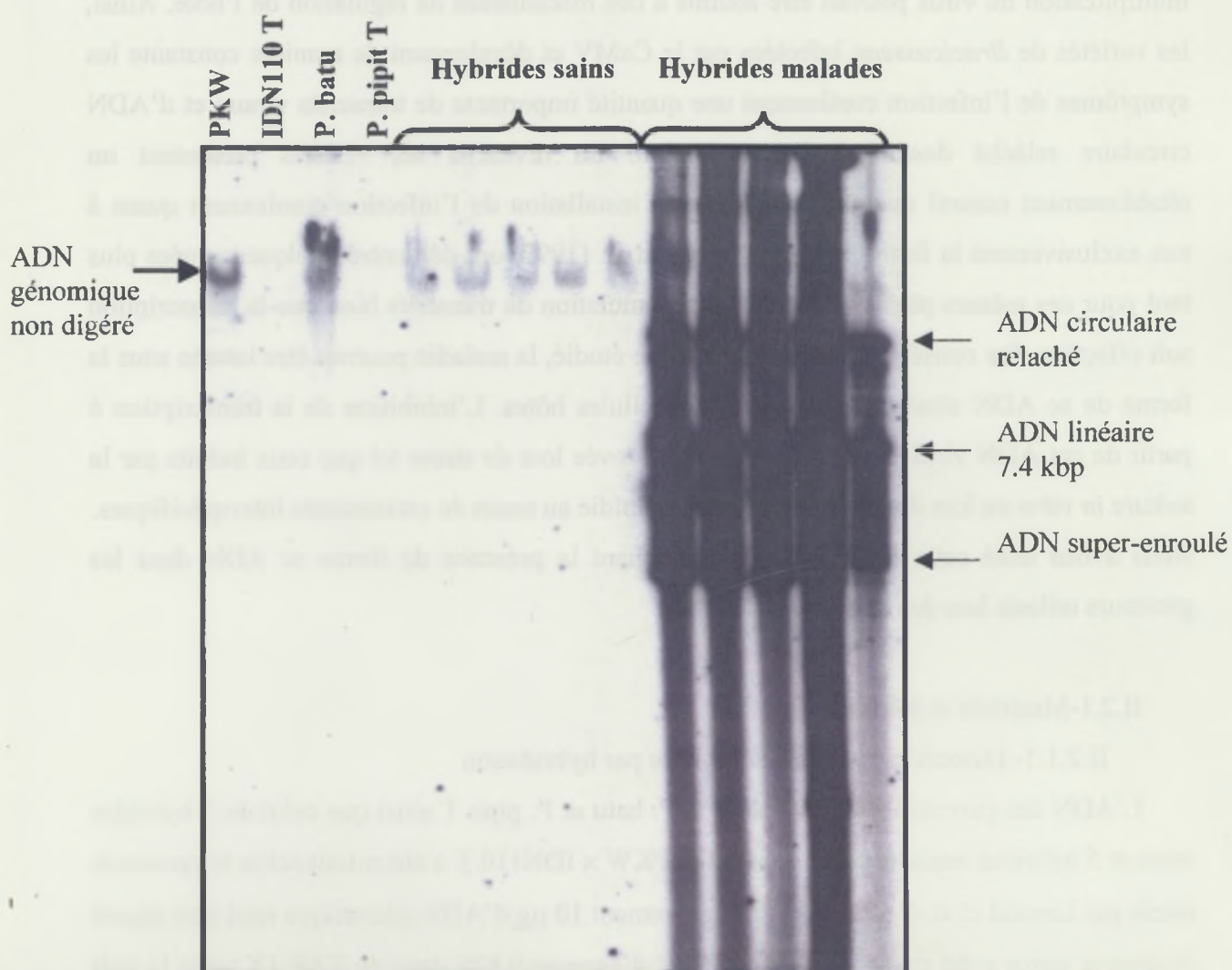


Figure 21 : Mise en évidence de la forme virale sc ADN par Southern blot sur ADN total non digéré.

(110mA ; 0,1V/Cm²). Le transfert de l'ADN sur une membrane de Nylon hybond N+ (Amersham) et le traitement de celles-ci sont ceux préconisés par Sambrook et al. (1989). L'hybridation a été effectuée avec l'ADN génomique viral de la souche BSV-OI comme sonde, marquée radioactivement par amorçage aléatoire et incorporation d' α^{32} dCTP. La préparation de la sonde est réalisée à l'aide du kit « MegaprimeTM DNA labelling systems » (Amersham) suivant les recommandations du fournisseur.

II.2.1.2-Détection par PCR des formes virales circulaires libres

Pour mettre en évidence la forme sc ADN, nous avons dessiné des amorces spécifiques de la séquence EPRV BSV-OI (N° d'accèsion AF106946) M1 5'-GGA TGC AAT AAA CCA GCA-3' et M2 5'-TGG GTC TTT GAG CCA TTA-3'. Ces amorces, orientées en sens inverses sur la séquence virale intégrée, empêchent en théorie toute amplification à partir de cette matrice et permettent seulement l'amplification à partir de la forme virale circulaire (Fig. 20). Un produit d'amplification de 2.1 kbp est alors obtenu. Le mélange PCR contient : 50 ng d'ADN total, tampon Taq 1X , MgCl₂ 1.5 mM, 0.1mM de chaque dNTPs, 0,1 μ M de chaque amorce et 1U de Taq DNA polymérase. Le protocole d'amplification utilisé est le suivant : dénaturation de l'ADN 5 min. à 94°C suivi de 30 cycles d'amplification (30 sec. à 94°C, 30 sec. à 52°C, 2 min 50 sec. à 72°C) et d'une étape d'extension finale de 10 min. à 72°C.

II.2.2-Résultats et discussion

Une hybridation sur ADN total des parents et d'un échantillon représentatif de la population d'hybrides sains et infectés a été réalisée avec la sonde virale pour identifier les formes libres du virus. Les résultats de l'hybridation ont tout d'abord révélé un signal positif correspondant d'après la taille (> à 20 kb) à une hybridation avec l'ADN génomique total des parents femelles PKW et P. batu ainsi que celui des 10 hybrides testés (Fig. 21). Aucune hybridation n'apparaît pour les parents mâles *M. acuminata* IDN110 T et P. pipit T. Ce résultat confirme celui obtenu par PCR avec les amorces mixtes (Lheureux et al., 2002). Cependant, une série de signaux d'une taille allant de 15kbp à 5kbp apparaît uniquement chez les hybrides malades. Cette approche et notre interprétation se sont basées sur une étude réalisée par Newbold et al. (1995) sur l'ADN viral libre d'Hépadnavirus (groupe des pararétrovirus animaux). Les bandes observées correspondraient à des topoisomères de l'ADN viral libre. Les premières bandes seraient des structures circulaires relâchées, les plus basses représenteraient des formes circulaires plus compactes de type superenroulé. L'absence de ces signaux observés chez le parent femelle PKW montre que cette dernière ne contient pas

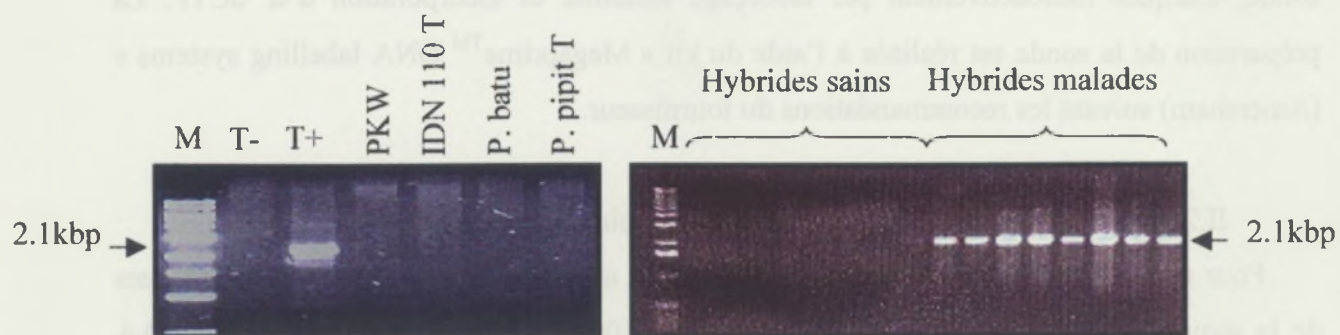


Figure 22: Résultat des analyses PCR sur un échantillonnage de la descendance PKW x IDN 110 T et des géniteurs avec les amorces M1 et M2.

M: marqueur de taille 1kbp (GibcoBRL).

T- : IC-PCR sur bananier sain (Cavendish)

T+ : IC-PCR sur bananier malade (Obino l'Ewai, AAB)

de formes ADN virales libres correspondant soit à de l'ADN issu des formes épisomales soit à des minichromosomes.

Nous avons par la suite conforté ce résultat par une approche PCR en utilisant des amorces inverses M1 et M2. Ces amorces, orientées en sens inverse sur la séquence virale intégrée, ne permettent en théorie une amplification qu'à partir de la forme virale circulaire (Fig. 20). Un produit d'amplification de taille attendue est obtenu pour l'ensemble des hybrides malades des deux populations PKW x IDN110T et P. batu x P. pipit. Aucun produit d'amplification n'est obtenu ni pour les géniteurs ni pour les hybrides sains (Fig. 22). Ceci témoigne de l'absence de la forme ADN virale libre circulaire chez les géniteurs mâles comme chez les géniteurs femelles et pour les plants de phénotype « sain ».

Les résultats de cette étude confirment que l'apparition des particules virales épisomales dans la descendance ne proviennent pas d'ADN viral latent transmis verticalement. Ils statuent indirectement que leur origine est endogène et en relation étroite avec les EPRVs décrites dans le génome *M. balbisiana*. Ce résultat n'est en rien surprenant dans la mesure où avant la mise en place d'un mécanisme de silencing tel que décrit par Covey et al. (1997) ou même Al-Kaff et al. (1998), les plantes ont connu la maladie et ont développé les symptômes de l'infection. Dans notre cas, les géniteurs *M. acuminata* et *M. balbisiana* utilisés dans les croisements n'ont jamais connu la maladie, du moins jusqu'à récemment, et ont avant et durant le processus de croisement génétique été régulièrement contrôlés comme indemnes de virus.

II.3- Recherche d'EPRV BSV-OI pathogènes

La séquence EPRV BSV-OI décrite demeure une des origines la plus probable des particules virales épisomales observées. Le modèle de recombinaison décrit par Ndowora et al. (1999) à partir de ce motif viral intégré est basé sur deux événements de recombinaison rendus possible par la présence de séquences répétées directes. Cependant, cet événement semble trop aléatoire pour expliquer à lui seul la ségrégation d'apparition de la maladie dans nos populations d'hybrides. Cela n'exclut pas pour autant que ce mécanisme soit à l'origine du phénomène ou d'une partie du phénomène finalisé par l'observation de la maladie dans nos populations.

Par ailleurs, l'analyse FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) réalisée par Harper et al. (1999) montre que l'ensemble de la séquence EPRV BSV-OI et *Musa* adjacente est répété

dans le génome OBLE (Obino l'Ewai) en tandem de plusieurs copies et sur deux chromosomes différents. Cette observation suggère que des EPRV identiques ou proches de l'EPRV BSV décrite existent et que celle référencée n'est peut être pas celle à l'origine des particules virales. Les recherches engagées jusqu'à présent sur ce sujet n'ayant tenu compte que de la séquence virale BSV publiée concernant la souche Ol et de la séquence EPRV BSV-Ol correspondante décrite n'ont pas permis de conclure sur l'origine endogène du BSV. Notre hypothèse (Lheureux et al., 2002- Chapitre I) propose le locus BEL - renfermant le facteur génétique d'expression - comme catalyseur de la réaction restituant un génome viral opérationnel. Pour étayer cette proposition nous avons voulu aborder plus généralement dans cette étude la recherche d'EPRVs BSV actives en s'intéressant au mécanisme d'expression à partir des EPRVs et à l'identité moléculaire entre les EPRVs et les PRVs restituées.

II.3.1- Recherche de produits de transcription

L'analyse moléculaire de la séquence EPRV BSV-Ol ainsi que la séquence *Musa* adjacente n'a pas révélé d'éléments majeurs autres que ceux déjà décrit pour tenter d'expliquer l'expression de particules épisomales tel qu'un promoteur par exemple, permettant la transcription d'un motif viral intégré et assimilé dès lors à un gène de plante. Sur l'EPRV décrite, l'unique promoteur présent est celui du génome viral lui-même. Cependant il se situe à l'extrémité droite de la séquence intégrée, et son orientation ne permet pas de transcrire la séquence virale située en amont. Les EPRVs ayant été décrites en tandem de 2 à 8 copies dans le génome *Musa*, la transcription de l'EPRV active peut être sous la dépendance d'un promoteur d'un gène cellulaire ou viral situé en amont. L'objectif de cette étude est de rechercher la présence de produits de transcription chez les géniteurs et la descendance.



II.3.1.1- Matériels et méthodes

- **Extraction d'ARN**

L'ARN total des géniteurs PKW et IDN T ainsi que celui d'un hybride sain N°15 et malade N° 52 sont extraits à partir de 125 mg de matériel frais selon le protocole préconisé par Verwoerd et al. (1989).

- **Transfert et hybridation**

Approximativement 10µg d'ARN sont séparés sur un gel d'agarose 0.6% contenant 5% de formaldéhyde dans du MOPS 1x. L'ARN est alors transféré sur une membrane de nylon

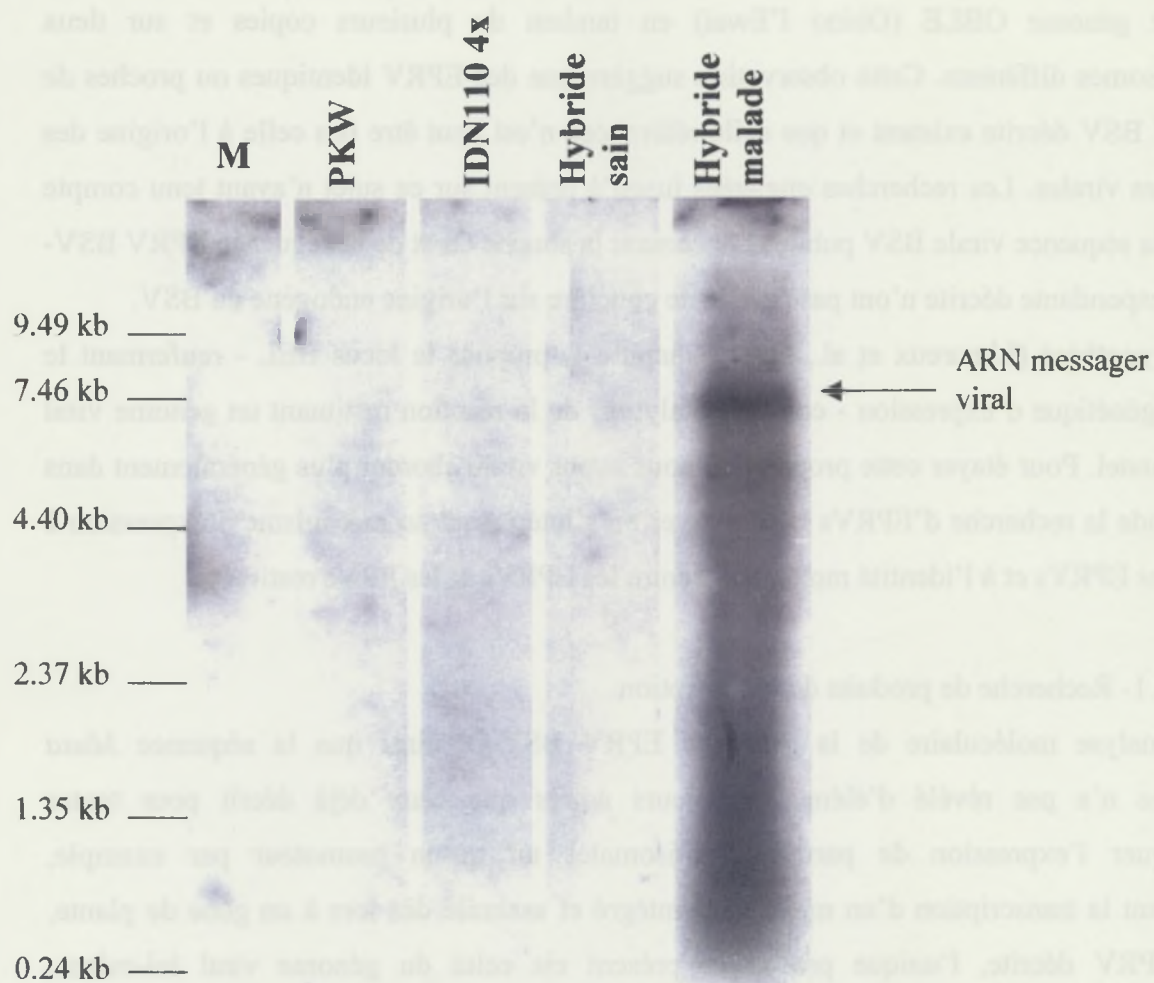


Figure 23: Mise en évidence de produits de transcription viraux par Northern Blot sur de l'ARN total. Le génome de la souche BSV-OI a été utilisé comme sonde.
M : 0.24-905 kb RNA Ladder (Invitrogen)

Hybond N+ (Amersham) par capillarité dans du tampon 10x SSC (1.5M NaCl, 0.6M Citrate trisodique 2.H₂O) (Sambrook et al., 1989).

L'ADN génomique viral de la souche BSV-OI est utilisé comme sonde. Elle est marquée radioactivement avec α^{32} dCTP en utilisant le kit « Megaprime™ DNA labelling systems » (Amersham) suivant les recommandations du fournisseur.

La préhybridation de la membrane est réalisée à 65°C durant 1 heure dans une solution contenant 7% SDS, 0.25M Na₂HPO₄ et 2mM EDTA pH 7.4. L'hybridation avec la sonde dénaturée est réalisée toute la nuit à 65°C dans la même solution que la préhybridation.

Après l'hybridation, la membrane est lavée 15 min avec une solution de 2X SSC, 0.1% SDS à 65°C, puis 2 x 15min avec une solution 1X SSC, 0.1% SDS à 65°C et enfin 2 x 15min dans une solution de 0.1X SSC, 0.1% SDS. La membrane est exposée à un film X-OMAT AR (Kodak) 5 jours à -80°C.

II.3.1.2- Résultats et discussion

L'analyse des ARNs totaux montre que seul l'ARN de l'hybride infecté n°52 présente un résultat d'hybridation avec la sonde virale pour un produit d'une taille d'environ 8kbp (fig. 23). Ce signal correspond vraisemblablement à l'ARN messager issu de la multiplication du virus dans la plante. Il est à cette étape impossible de le distinguer d'une éventuelle transcription à partir de séquence EPRV BSV-OI. Aucun signal de transcription virale n'est enregistré pour le parent PKW. Si l'on considère que l'apparition des particules épisomales provient d'EPRVs BSV-OI transcrites, deux voies sont alors envisageables pour expliquer la non-expression chez le parent femelle PKW : (i) un ARN messager est transcrit, mais il est très rapidement détruit et nos conditions d'expérimentations ne nous permettent pas de le mettre en évidence à ce stade-là de notre étude. Il s'agirait alors d'un mécanisme d'inhibition post-transcriptionnel (PTGS) (Fagard et Vaucheret, 2000a) acquis depuis l'insertion de la séquence virale dans le bananier. (ii) la transcription est inhibée, il s'agirait alors d'un mécanisme d'inhibition transcriptionnel (TGS) (Fagard et Vaucheret, 2000a) résultant d'une forte méthylation du promoteur à l'origine de la transcription de l'EPRV BSV-OI active.

II.3.2- Recherche du degré d'identité moléculaire entre EPRVs et PRVs BSV-OI.

La souche BSV-OI référencée ne présente pas 100% d'identité avec la séquence EPRVs BSV-OI décrite. Les différences résident dans deux délétions de 9 et 12 nucléotides dans le genome viral par rapport à la séquence intégrée. Nous avons alors recherché une corrélation stricte entre les séquences EPRVs BSV-OI et les particules virales exprimées. Les



résultats de cette étude sont présentés dans la publication : **“Towards the identification of the endogenous origin of the BSV-OI PRV expression in banana plants”** : Article N°2 soumis à la revue *Virology* pour une « short communication ».

Towards the identification of the endogenous origin of the BSV-OI PRV expression in banana plants

F. Lheureux¹, N. Laboureau and M.L. Iskra-Caruana

¹CIRAD, UMR BGPI, TA 40/02 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier cedex 5, France.

Summary

The occurrence of *Banana streak badnavirus* strain Obino l'Ewai (BSV-OI PRV) in particular inter-specific *Musa* hybrids is correlated with the presence of BSV-OI endogenous pararetrovirus sequences (EPRV) in the *Musa balbisiana* genome. The episomal BSV-OI expressed should be totally identical to the BSV-OI EPRV sequence if it has arisen from it. However, sequence analysis of BSV-OI PRV shows two dissimilar regions due to the presence of two deletions (9 and 12 pb) with regards to EPRV sequence (6). Our research proposed to analyse the sequences of expressed viral particles in order to identify their exact origin. Primers surrounding the 9 and 12 bp deletions were designed and used in IC-PCR and PCR studies. Our results suggested that the BSV-OI EPRV sequence is unique in the *Musa balbisiana* genome and revealed that there exists a heterogeneous BSV-OI population according to the two deletions noted. We hypothesise that a deletion event would happen following the restitution of viral genome from BSV-OI EPRV and that this heterogeneity is in favor of the existence of recombining phenomena between BSV-OI genome expressed in order to constitute at least an effective viral genome.

Recently introduced inter-specific *Musa* hybrids, bred for improved yield and resistance to diseases, have been found to be infected widely with banana streak virus strain Obino l'Ewai (BSV-OI), a pararetrovirus (PRV) (1)(7)(8). The BSV-OI occurrence is correlated with the presence of BSV-OI endogenous pararetrovirus sequences (EPRV) integrated in the *Musa balbisiana* genome (4)(6). Ndowora (6) proposed two recombination events in order to explain the production of virus particles from active BSV-OI EPRV. Dallot (2) showed that the proliferation stage of in vitro culture was a determinant for the activation of BSV-OI EPRV. Subsequently, Lheureux (5) demonstrated the existence of genetic factor *into M. balbisiana* genome responsible of BSV-OI appearance during genetic crosses. Unfortunately, neither studies confirmed the BSV-OI EPRV as the origin of virus appearance. However this hypothesis seems the most probable to explain the de novo virus expression in virus- and disease-free plants.

The characterized BSV-OI EPRV sequence showed 99,7 % identity with those of the corresponding virus BSV-OI (3), with the dissimilarity being due to single base changes and two deletions of 9 and 12 bp each. These deletions are located at 90 and 434 bp respectively from initiation site of the reverse transcription in the BSV-OI EPRV sequence. The recombining events are compatible with the conservation of these two genome fragments (9 and 12 bp) in the restored viral genome. Hence, the episomal BSV-OI expressed should be totally identical to the BSV-OI EPRV sequence. Our research was to check the presence of the above two typical viral genome sequences in BSV-OI particles expressed in triploid inter-specific *Musa* hybrids resulting from crossing between BSV-free parents *M. balbisiana* PKW and *M. acuminata* IDN110T. Primers surrounding the 9 and 12 bp deletions in BSV-OI were designed and used in IC-PCR in one infected banana plant and direct PCR in PKW - *M. balbisiana* parent -, IDN110T - *M. acuminata* parent -, diseased and healthy hybrids. The PCR products were analyzed, cloned and sequenced. No PCR product was observed from the *M. acuminata* parent, IDNT (Fig. 1). IC-PCR and PCR generated similar size product (523 bp) from BSV-OI expressed in diseased hybrids. An identical PCR product (544 bp) was obtained from DNA of *M. balbisiana* parent PKW and healthy hybrids. The latter product, however, differed in size from the product of diseased hybrids, which should directly, corresponds to the BSV-OI EPRV. However PCR from diseased hybrids preferentially generated one of these two expected products (523 bp). We hypothesized that free viral DNA was preferentially amplified instead of integrated DNA sequence, according to the presence in all hybrids of the BSV-OI EPRV (5). Moreover, PCR generated one product from PKW and healthy hybrids suggesting that the BSV-OI EPRV sequence is unique regarding the two

deletions (Fig. 2). We concluded that BSV-OI EPRV sequence identical to the BSV-OI expressed doesn't exist due to the absence of the corresponding PCR product.

Sequence analysis related to five IC-PCR clones revealed that exists a heterogeneous population with respect to the two deletions (Fig. 3). None of them are totally identical to the corresponding genome portion of the BSV-OL EPRV or BSV-OI. Even when the first deletion of 9 nucleotides is conserved, we observed two different patterns among the clones concerning the second one. The first pattern observed for two clones is constituted by one deletion of eight nucleotides at the beginning of the BSV-OI EPRV fragment. The second pattern observed for the three last clones shows a conservation of the overall BSV-OI EPRV fragment except the 3 last nucleotides, which are deleted, as are the following 10 nucleotides. The sequence analysis related to three PCR clones from one diseased hybrid is identical to the BSV-OI described (3). In contrast, the sequence analyses related to PCR products from PKW and healthy hybrids genome systematically show a total identity to BSV-OI EPRV genome confirming the PCR interpretations. The BSV-OI EPRV sequence analysis doesn't permit to establish any relationship to key elements involved for example, in the mechanism of "Ribosome shunting" (9)(10).

These results raise some exciting questions regarding to the mechanism(s) responsible of the expressed BSV-OI particles with deletions in the diseased hybrids. According to these results, the event of deletion should happen following the restitution of viral genome from BSV-OI EPRV. We hypothesize that the serial viral sequence patterns obtained is in favor of the existence of recombining phenomena between BSV-OI genome expressed in order to constitute at least an effective viral genome.

The following primers were based on the episomal BSV-OI sequence (3; EMBL Accession No. AJ002234), with the number being the position of the 5' nucleotide of the primer on the viral sequence: BSV2, 5'GTA TCA GAG CAA GGT TCG TTT TT and BSV525, 5'ATC CCA AGT TTT CTC GAC CAT AA. Immunocapture PCR (IC-PCR) procedure using the above primers pairs were performed on one diseased hybrid from cross between PKW (BB) x IDN110 T (AAAA) according to (2). The PCR amplification following the immunocapture and PCR on total DNA extraction (DNAeasy, QIAGEN) from parents and 5 healthy hybrids and 5 diseased hybrids, scheme was used: denaturation stage at 94C during 5min followed by 30 cycles (denaturation for 30 s at 94C, primer annealing for 30 s at 60C and primer extension for 1 min at 72C) and a final extension at 72C for 10 min. PCR and IC-PCR products were probe by labeling the 5' extremity of the primer BSV2. We remove the 5' phosphate group from DNA and exchange it to the ADP and replace it using

$\gamma^{32}\text{P}[\text{ATP}]$ as donor. Then we separated the PCR products on a 5% acrylamide gel in 0.5x TBE. The dried gel was exposed to X-ray film for 1 day at room temperature. On the other hand PCR and IC-PCR amplified DNA fragment were cloned with the pGMT "easy vector kit" (Promega) according to the manufacturer's instructions. The recombinant plasmids transformed into *E. coli* strain DH5 α . 5 Positive clones from IC-PCR product from one diseased hybrid and PCR product from PKW, one diseased hybrid and one healthy hybrids were selected and sequenced with fluorescent dye terminators on an automatic sequencer (Genome express, Grenoble).

Acknowledgements

This Work partially funded by INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain).

References

1. BAKRY, F. I. P. (2002). Banana genetic diversity and perspectives for breeding. New varieties: why and how? *Comptes Rendues de l'Académie d'Agriculture de France* **In press**.
2. DALLOT, S., ACUNA, P., C., R., RAMIREZ, P., CÔTE, F., LOCKHART, B. E. L., and CARUANA, M. L. (2001). Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant on the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). *Arch. virol.*
3. HARPER, G., and HULL, R. (1998). Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. *Virus Genes* **17**(3), 271-8.
4. HARPER, G., OSUJI, J. O., HESLOP-HARRISON, J. S., and HULL, R. (1999). Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* **255**(2), 207-13.
5. LHEUREUX, F., CARREEL, F., JENNY, C., and ISKRA-CARUANA, M. L. (2002). Identification of genetic markers linked to *Banana streak disease* expression in inter-specific *Musa* hybrids. *Theor. Appl. Genet.* **In press**.
6. NDOWORA, T. C., DAHAL, G., LAFLEUR, D., HARPER, G., HULL, R., OLSZEWSKI, N. E., and LOCKHART, B. (1999). Evidence that *Badnavirus* infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* **255**(2), 214-20.
7. ORTIZ, R. (1996). The potential of AMMI analysis for field assessment of *Musa* genotypes to virus infection. *Hortscience* **31**, 829-832.
8. PASBERG-GAUHL, C., GAUHL, F., SCHILL, P., and LOCKHART, B. E. L. (1996). First report of *Banana streak virus* in farmers' fields in Benin, Ghana, and Nigeria, West Africa. *Plant dis.* **80**, 224.
9. POOGGIN, M. M., FUTTERER, J., SKRYABIN, K. G., and HOHN, T. (1999). A short open reading frame terminating in front of a stable hairpin is the conserved feature in pregenomic RNA leaders of plant Pararetroviruses. *J. Gen. Virol.* **80**(Pt 8), 2217-28.
10. SCHMIDT-PUCHTA, W., DOMINGUEZ, D., LEWETAG, D., and HOHN, T. (1997). Plant ribosome shunting in vitro. *Nucleic Acids Res.* **25**(14), 2854-60.

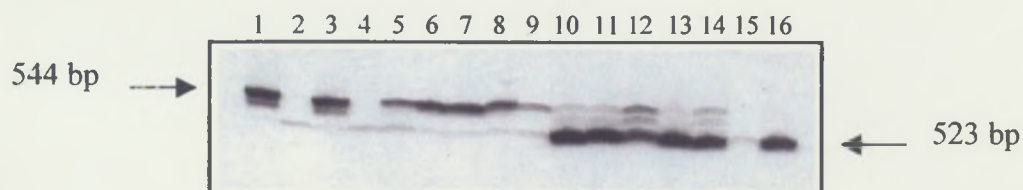


Figure 1: Autoradiogram of PCR and IC-PCR analysis using primer pair (BSV2 and BSV525)

Lane 1 : PKW (BB), Lane 2 : IDN 110 T(AAAA), lane 3 : Pisang batu (BB), lane 4 : Pisang pipit T (AAAA).

Lane 5 to 9 : F1 plant from PKW xIDN 110 T cross showing no sign of BSD

Lane 10 to 14 : F1 plant from PKW xIDN 110 T cross showing symptom and BSV particle

Lane 15 : Negative control of IC-PCR (Cavendish AAA)

Lane 16 : IC-PCR product of one disease hybrid from PKW xIDN 110 T cross

		← A →
EPRV BSV-Ol*	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTAATAGCTGTACAAGTTTATGATTAAATTGTT	
PRV BSV-Ol°	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGATTAAATTGTT	
PKW	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTAATAGCTGTACAAGTTTATGATTAAATTGTT	
15	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTAATAGCTGTACAAGTTTATGATTAAATTGTT	
52	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGATTAAATTGTT	

		← B →
EPRV BSV-Ol*	CAAAAAGATCATAGACCTCTGTGACTGGCTAGGTACGTCAATACGGGTTAAGCATCCTGG	
PRV BSV-Ol°	CAAAAGGATCATAGACCTCTGT~~~~~ACGTCAATACGGGTTAAGCATCCTGG	
PKW	CAAAAAGATCATAGACCTCTGTGACTGGCTAGGTACGTCAATACGGGTTAAGCATCCTGG	
15	CAAAAAGATCATAGACCTCTGTGACTGGCTAGGTACGTCAATACGGGTTAAGCATCCTGG	
52	CAAAAAGATCATAGACCTCTGT~~~~~ACGTCAATACGGGTTAAGCATCCTGG	

Figure 2: Comparison of BSV-Ol PRV and EPRV sequences with those of PCR product of PKW, healthy hybrid (15) and diseased hybrid (52) regarding the 9 (A) and 12 (B) nucleotides deletion area.

*: sequence EPRV BSV-Ol characterized (6)

°: sequence of episomal BSV-Ol characterized (3)

A

EPRV BSV-O1 *	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTAATAGCTGTACAAGTTTATGATTTAAATTGTT
PRV BSV-O1 °	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGATTTAAATTGTT
Clone 1	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGACTTAAATTGTT
Clone 2	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGATTTAAATTGTT
Clone 3	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGATTTAAATTGTT
Clone 4	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGATTTAAATTGTT
Clone 5	AAGGGCTCTGCTTTTCTCTAATTGAGTTA~~~~~CAAGTTTATGATTTAAATTGTT

B

EPRV BSV-O1 *	AACAAAAAGATCATAGACCTCTGTGACTGGCTAGGTACGTCAATACGGGTTAAGCATCCT
PRV BSV-O1 °	AACAAAAGGATCATAGACCTCTGT~~~~~ACGTCAATACGGGTTAAGCATCCT
Clone 1	AACAAAAAGATCATAGACCTCTGTGATTGGCTA~~~~~GGGTTAAGCATCCT
Clone 2	AACAAAAAGATCATAGACCTCTGTGACTGGCTA~~~~~GGGTTAAGCATCCT
Clone 3	AACAAAAAGATCATAGACCTCTGTGACTGGCTA~~~~~GGGTTAAGCATCCT
Clone 4	AACAAAAAGATCATAGACCTCTGT~~~~~AGGTACGTCAATACGGGTTAAGCATCCT
Clone 5	AACAAAAAGATCATAGACCTCTGT~~~~~AGGTACGTCAATACGGGTTAAGCATCCT

Figure 3: Comparison of BSV-O1 PRV and EPRV sequences with those of five IC-PCR clones from one diseased hybrid regarding the 9(A) and 12 (B) nucleotide deletion area.

*: sequence EPRV BSV-O1 characterized (6)

°: sequence of episomal BSV-O1 characterized (3)

II.4-Recherche d'EPRVs BSV correspondant à des souches virales autres que la souche BSV-OI.

Andrews Geering et al., 2000 ont montré pour des hybrides de même nature l'existence d'un complexe de souches virales BSV à l'origine de l'expression de la maladie. Nous avons alors recherché la présence de ces souches dans nos propres hybrides. Toute contamination extérieure de ces hybrides par des souches indigènes étant exclue, nous avons analysé la possibilité d'EPRVs différentes dans le génome *M. balbisiana* de l'EPRV BSV-OI à l'origine de leur expression et testé leur relation avec le facteur génétique BEL. Les résultats sont présentés dans la publication : “ **Identification of new pathogenic BSV EPRVs into inter-specific *Musa* hybrids activated during cross hybridisation**”_: Article N°3 soumis à la revue *Journal of General Virology*.



Evidence of genetic regulation of two new pathogenic *Banana streak virus* endogenous pararetrovirus sequences (BSV EPRVs) in inter-specific *Musa* hybrids

F. Lheureux¹, A.D.W. Geering², N. Laboureau¹ and M.L. Iskra-Caruana¹

¹CIRAD, TA UMR BGPI 40/02 Avenue Agropolis, 34398 Montpellier cedex 5, France.

² Queensland Horticulture Institute, department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, Queensland 4068, Australia.

SUMMARY

Two previously unidentified BSV strains in addition to BSV-OL, have been detected in diseased hybrids produced by inter-specific hybridisation between the virus - and disease- free parents *M. balbisiana* (BB diploid) and *M. acuminata* (AAAA tetraploid). PCR analysis confirmed the presence of the BSV-OL strain and revealed at least the presence of the BSV-Imové (BSV-Im) and BSV-Goldfinger (BSV-Gf) strains. The BSV-OL and BSV-Im strains appeared in almost all diseased hybrids while the BSV-Gf strain appeared only in about half of these hybrids. The close relationships between the presence of these two new BSV strains and the presence of corresponding endogenous sequences integrated in the *M. balbisiana* parent genome shows that the *M. balbisiana* genome contains at least two other pathogenic BSV EPRVs: BSV-Im and BSV-Gf EPRVs. Genetic analysis resulting from AFLP results (Lheureux *et al.*, 2002) showed that BSV-OL and BSV-Im EPRVs' expression depends on the same genetic factor, the BEL locus (BSV Expressed Locus). Although the BSV-Gf is not genetically linked to the BEL locus, the BSV-Gf strain appearance and the activation of corresponding EPRV(s) seem to be subordinated to the BEL locus. The expressed endogenous BSV-Gf sequence would occur in heterozygous state in *M. balbisiana* parent. So, the discovery of new BSV EPRVs linked to BEL locus suggests that BEL differs in nature from BSV EPRVs.

Keywords: *Badnavirus*, Pathogenic EPRV, BSV Expressed Locus (BEL), inter-specific *Musa* hybrids

INTRODUCTION

During the past decade, several researchers have discovered the presence of viral sequences integrated in the genomes of many plant species (Hull *et al.*, 2000). These integrated sequences derive from both families of plant DNA viruses, the single stranded DNA Geminiviridae called GRD (Geminiviral related DNA) (Kenton *et al.*, 1995; Bejarano *et al.*, 1996; Ashby *et al.*, 1997) and the double stranded DNA Caulimoviridae called EPRVs (Endogenous pararetroviruses) (Harper *et al.*, 1999; Ndowora *et al.*, 1999; Lockhart *et al.*, 2000; Budiman *et al.*, 2000; Mao *et al.*, 2000). This molecular association between plant and virus genome raises questions about the function or role of these integrated viral sequences in plant-virus interactions. In the absence of more accurate data, according to Mette *et al.* (2002) these sequences can be classified in to three categories: (i) benign sequences as GRD contributing only to plant genome evolution by insertion mutation, (ii) sequences which can provide viral immunity (Mette *et al.*, 2002) and (iii) sequences which can be potentially pathogenic since they can give rise pathogenic viral particle (Bejarano *et al.*, 1996; Lockhart *et al.*, 2000; Ndowora *et al.*, 1999). For the last category, the main described system concerns *Banana streak badnavirus* (BSV), which infects *Musa* spp. One BSV-OI EPRV (BSV Obino l'Ewai strain EPRV) sequence has been described in the *Musa balbisiana* genome and has been postulated to give rise to an infectious episomal genome through a complex recombination pattern (Ndowora *et al.*, 1999). This particular phenomenon affects hybrids derived from interspecies crosses between virus- and disease-free *M. balbisiana* (B genome) et *M. acuminata* (A genome) parents. This phenomenon seems to be common for pathogenic EPRVs because a similar appearance of virus has been observed for tobacco and *Petunia* hybrids expressing *Tobacco vein clearing virus* TVYV and *Petunia vein clearing virus* PVCV respectively (Lockhart *et al.*, 2000; Richert-Pöggler & Shepherd, 1997). The BSV-OI EPRV sequence is widespread in *M. balbisiana* species and hybrids that contain the B genome but absent in *M. acuminata* species (Geering *et al.*, 2000). This observation is coherent with a recent result which showed that the BSV-OI EPRV occurs in homozygous state in two wild *M. balbisiana* species (Pisang batu and Pisang Klutuk Wulung: PKW) (Lheureux *et al.*, 2002). Switching on of the BSV-OI EPRV has also been observed during tissue culture propagation (Ndowora *et al.*, 1999) and a recent article reported the proliferation stage of the micropropagation procedure as the determinant for expression of the virus (Dallot *et al.*, 2001). The process of genetic hybridisation may be another factor involved in triggering

episomal expression of BSV-OI integrants (Bakry, 2002). Our team has recently shown that activation of BSV-OI EPRV depends on a monogenic factor called BEL (BSV Expressed Locus) located in the *M. balbisiana* genome only. This factor appears to be inhibited in the *M. balbisiana* parent conferring a role of free carrier upon such parents. (Lheureux *et al.*, 2002). To date, only two types of integrated Badnavirus sequences have been characterised in the *Musa* genome: BSV-OI and partial sequence related to CSSV (*Cacao swollen shoot virus*) (Ndowora *et al.*, 1999). Recently, Geering *et al.* (2001) demonstrated the high degree of molecular heterogeneity from five distinct BSV strains according to the serological diversity observed by Lockhart & Olszewsky (1993). They also obtained some elements indicating the integration of these distinct BSV strains in the *Musa balbisiana* genome (Geering *et al.*, 2000). The results presented below describe pathogenic BSV EPRVs other than BSV-OI EPRV, and their possible relationship with the BEL factor. Our work is based on the characterization of BSV strains expressed in the F1 progeny from a cross between BSV-free PKW and IDN 110 T parents.

MATERIALS AND METHODS

Plant population

The population studied is derived from inter-specific hybridisation between a virus-free autotetraploid *M. acuminata* male parent (IDN 110 4x, AAAA) and a virus-free diploid *M. balbisiana* female parent (Pisang Klutuk Wulung (PKW), BB). It consisted of 249 F1 triploid hybrids (AAB).

BSV strain detection

IC-PCR assays using the primers BSV-OL F1 5'-ATC TGA AGG TGT GTT GAT CAA TGC-3', R1 5'-GCT CAC TCC GCA TCT TAT CAG TC-3', BSV-Gf F1 5'-ACG AAC TAT CAC GAC TTG TTC AAG C-3', BSV-Gf R1 5'-TCG GTG GAA TAG TCC TGA GTC TTC-3' and BSV-Im F1 5'-TGC CAA CGA ATA CTA CAT CAA C-3', R1 5'-CAC CCA GAC TTT TCT TTC TAG C-3' were performed according to Geering *et al.* (2000 and 2001 a, b).

PCR detection of integrated viral sequences

Total *Musa* DNA was extracted from young leaf tissue, according to Lanaud *et al.* (1995). The presence of the BSV-Goldfinger (BSV-Gf) and BSV-Imové (BSV-Im) EPRVs was checked by PCR on total plant DNAs from genitors (PKW, IDN 110 4x, P. batu, P. pipit 4x) and four diseased and healthy hybrids from cross PKW x IDN 110 4x, using the specific primers described below. The specificity of the amplification was confirmed by Southern blot hybridisation according to Sambrook *et al.* (1989) using complete genome probes of BSV-OL and BSV-Gf (kindly provided by Dr Lockhart) and the PCR fragment for BSV-Im previously sequenced and compared with Dr Geering's sequence (Pers. Com.)

Linkage analysis

Linkage analysis of AFLP data obtained from previous work (Lheureux *et al.*, 2002) and IC-PCR results was performed with MAPMAKER version 3.0 (Lander *et al.*, 1987). Linkage group was computed using a minimum LOD of 3.0.

RESULTS

Identification of new BSV strains in the infected inter-specific hybrids.

Our study analysed the same F1 progeny of 249 triploid hybrids in which we have demonstrated the genetic segregation of expression of BSV: half of the hybrid population expressed BSV particles analyzed by ISEM and IC-PCR with degenerated *Badnavirus* primers while parents were virus - and disease - free, and where no external contamination was possible (Lheureux *et al.*, 2002). The IC-PCR tests with specific primers were only performed on 97 (Table 1) diseased hybrids out of the 130 produced because 36 died before this work started. This analysis confirmed the presence of the BSV-Ol strain and revealed the presence of at least two other BSV strains: BSV-Im and BSV-Gf (Fig. 1). The BSV-Ol and BSV-Im strains appeared in almost all diseased hybrids, which represented just over half of the progeny. In contrast, the BSV-Gf strain was detected in only 49 percent of the diseased hybrids tested, thus representing about a quarter of the overall progeny (Table 1).

Evidence of presence of new BSV-EPRVs.

The presence of BSV-Gf and BSV-Im EPRVs among parental and progeny genotypes was investigated by PCR amplification and confirmed by Southern blots using specific primers and probes for each strain. The specific products of predicted size 372bp and 476bp for BSV-Im and BSV-Gf respectively were obtained from total genomic DNAs of the PKW parent and also of all the progeny (Fig 2). No PCR product was observed from total genomic DNA of the *M. acuminata* parent. These results showed the existence of two new BSV EPRVs corresponding to the BSV-Im and BSV-Gf strains. These endogenous sequences are specific to the *M. balbisiana* genome. The correlation established between these new BSV endogenous sequences and the corresponding BSV strains expressed in the progeny would provide the identification of two new sets of pathogenic BSV EPRVs. However, these sets of specific primers are not reliable to test whether BSV-Im and BSV-Gf are originated from these highlighted EPRVs.

BSV-EPRVs and BEL locus relationships.

The characterisation of BEL locus was based on identification of AFLP molecular markers co-segregating with presence or absence of BSV infection (Lheureux *et al.*, 2002). Ten markers were identified and which allowed the construction of a map of the BEL locus. The AFLP data previously collected were re-analysed in the same way as before integrating data concerning only the BSV-Gf strain. The BSV-Im strain behaves the same as the BSV-Ol strain regarding repartition in the progeny. Since they are expressed in the same proportion they are under the influence of BEL locus and the genetic mechanism that encompasses. The complete AFLP data with BSV-Gf phenotype marker were tested in order to analyse the relationship between BSV-Gf appearance and the BEL locus. The AFLP data with the Gf marker were tested on the sub-group of diseased hybrids to validate the result obtained with the overall progeny. Genetic maps of BEL locus markers were obtained for each group with Mapmaker (Fig. 3B & 3C). Their organisation on two new maps was modified because we added the marker BSV-Gf that segregates in a ratio 1/4: 3/4 while the other markers segregated in a ratio of 1:1, and the sampling was different for map 3C. Nevertheless in each case, AFLP markers and the BEL locus are linked showing the reliability of the BEL locus. However the BSV-Gf marker appears not to be linked genetically with this locus because it is distant (33 cM) to BEL. But, in comparison with the reference map (Fig. 3A) the BSV-Gf attracts the BEL locus. These results, confirmed by the analysis of the sub-group, suggest that the presence of BSV-Gf is linked to the BEL locus, even the BSV-Gf locus appeared not to be genetically linked to it. A similar phenomenon was observed on a similar, but smaller, triploid progeny (62 hybrids): AAB derived from BSV-free diploid *M. balbisiana* female parent (Pisang batu) and autotetraploid *M. acuminata* male parent (Pisang pipit). The BEL locus identified was the same, in female parent genome only. The nature and the ratio of the BSV strains expressed were also the same (data not shown).

DISCUSSION

The results of this study allowed to confirm the presence of at least two new BSV-EPRVs in the *M. balbisiana* genome. These observations confirm the results obtained by Geering *et al.* (2001b) of evidence of BSV-Im and BSV-Gf integration in the *Musa* genome shown by Southern blot hybridisation on digested total DNA of several plants. Moreover, close relationships between the two new pathogenic BSV strains (Goldfinger and Imové) and the corresponding endogenous sequences exists in diseased hybrids, implicating that these new identified BSV EPRVs must be pathogenic. Nevertheless, because no segregation between healthy and infected hybrids PCR analysis was observed with either set of primers used, we do not postulate that these EPRV sequences are the origin of the pathogenic BSV strains expressed.

The genetic analysis tends to show that the BSV-OL and BSV-Im EPRVs depend on the same genetic factor implicated to be the BEL locus due to the same ratio having been observed in the diseased plants. The hypothesis to explain the expression of BSV-OL and BSV-Im strains from EPRVs is identical to those we have already formulated to explain BSV appearance in triploid progeny (Lheureux *et al.*, 2002). Indeed, two hypotheses can be considered for the origin of these BSV strains. In the first one, the viral particles originate from the BSV-OL and BSV-Im EPRVS occurs as a homozygous state in the *M. balbisiana* parent. This hypothesis implies that the BSV-OL, BSV-Im EPRVS and the genetic factor, BEL, are not genetically linked or localized on another locus from BEL locus. In our second hypothesis the viral particles would originate from a BSV-OL and BSV-Im EPRV occurring in a heterozygous state linked genetically and physically to the genetic factor.

Although the BSV-Gf is not genetically linked to the BEL locus, the appearance of the BSV-Gf strain and the activation of corresponding EPRV seem to be also subordinated to the BEL locus. In fact, the BSV-Gf strain is present in diseased hybrids at the ratio of 49% suggesting that the ratio of total infected hybrids would be higher if the activation was subordinated to another independent mechanism to BEL. The expressed endogenous Gf sequence would occur in a heterozygous state on an independent locus from BEL in the *M. balbisiana* parent. Because these two loci would behave as two independent genes that segregate via the meiosis step as 1/4: 3/4 in to the progeny. Only the hybrids having both the endogenous BSV-Gf sequence and genetic factor BEL will express the BSV-Gf strain. They represent 1/4 of the progeny. This scheme and the previous hypothesis are totally compatible with the fact that *M. balbisiana* does not express *Banana streak disease*. Our previous study has shown that allelic

interaction acted in trans to inactivate the genetic releasing factor (Lheureux *et al.*, 2002). So, the discovery of new EPRVs linked to BEL locus suggested that the nature of genetic factor is different from BSV endogenous sequences. Moreover, the recombination model proposed by Ndowora *et al.* (1999) is too rare to explain alone the regular expression of different BSV strains in half the progeny. So, it is legitimate to imagine the existence of a co-factor which catalyses BSV expression from pathogenic EPRVs by transcription or excision. This type of collaboration has been observed with transposable elements, notably with the system Ac/Ds where the transposase activity of transposon Ac is able to act in trans on Ds element to allow its transposition (Nakagawa *et al.*, 2000). To date, the recombination model prevails over others because the analysis of *Musa* sequences adjacent to BSV-OI EPRV sequences has shown no motif that can allow the transcription (Ndowora *et al.*, 1999). Nevertheless, it is not impossible that the sequence expressed is different from the one described, integrated in a different niche near a plant gene or other retroelement promoter. This is consistent with the fact that many other endogenous viral sequences characterised, either GRD (Geminiviral related DNA) (Bejarano *et al.*, 1996) or EPRVs (Ndowora *et al.*, 1999; Jakowitch *et al.*, 1999) have been found integrated near sequences of retrotransposons. These non-autonomous retroelements can be activated in trans via expression of a functional copy of the same retroelement. Finally, all these transposable elements can be epigenetically inactivated by a change in methylation level (van Houwelingen *et al.*, 1999; Wang & Kunze, 1998; Hirochika *et al.*, 2000; Matzke *et al.*, 2001). The modification of DNA as occurs during polyploidisation (Eckart, 2001) can reactivate these types of element. This can explain what we observed regarding the *M. balbisiana* female parent in which there is never BSV expression. The most appropriate explanation could be that BSV infection in our cross results from allopolyploidisation phenomenon, which leads to the formation of triploid hybrids AAB, in which one *M. balbisiana* (B) genome is associated with two *M. acuminata* (A) genomes. The absence of homologous B genome in hybrids leads to structural and functional modifications of the B chromosome that probably allows gene expression previously inactivated (Wolters & Visser, 2000). We note that among pathogenic EPRVs described in tobacco and petunia, the hybrids expressing viruses and disease are issued from inter-specific cross (Lockhart *et al.*, 2000; Richert-Pöggler *et al.*, 1997) while the parents that contain EPRVs sequences never develop disease. During evolution this genitors has acquired capacity to silence these endogenous sequences or even to be immune against new infections of homologous virus (Mette *et al.*, 2002). This problematic raises many queries about co-evolution of plant and virus. We will understand the dynamic equilibrium that exists between the partner of

cohabitation and why in some time this equilibrium is modified leading the plant and a fortiori the virus to death.

Acknowledgements

This Work partially funded by INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain).



References

Ashby, M. K., Warry, A., Bejarano, E. R., Khashoggi, A., Burrell, M. & Lichtenstein, C. P. (1997). Analysis of multiple copies of geminiviral DNA in the genome of four closely related *Nicotiana* species suggest a unique integration event. *Plant Mol Biol* **35**, 313-21.

Bakry, F. (2002). Banana genetic diversity and perspectives for breeding. New varieties: why and how? *Comptes Rendues de l'Académie d'Agriculture de France* **In press**.

Bejarano, E. R., Khashoggi, A., Witty, M. & Lichtenstein, C. (1996). Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of Tobacco during evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 759-64.

Budiman, M. A., Mao, L., Wood, T. C. & Wing, R. A. (2000). A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Res* **10**, 129-36.

Dallot, S., Acuna, P., Rivera, C., Ramirez, P., Cote, F., Lockhart, B. E. & Caruana, M. L. (2001). Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant in the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). *Arch Virol* **146**, 2179-90.

Eckardt, N. A. (2001). A sense of self : The role of DNA elimination in allopolyploidization. *Plant Cell* **13**, 1699-1704.

Geering, A. D. W., McMichael, L. A., Dietzgen, R. G. & Thomas, J. E. (2000). Genetic Diversity Among *Banana streak virus* Isolates from Australia. *Phytopathology* **90**, 921-927.

Geering, A. D. W., Olszewski, N. E., Dahal, G., Thomas, J. E. & Lockhart, B. E. L. (2001a). Analysis of the distribution and structure of integrated *Banana streak virus* DNA in a range of *Musa* cultivars. *Molecular Plant Pathology* **2**, 207-213.

Geering, A. D. W., Parry, J. N., Zhang, L., Olszewski, N. E., Lockhart, B. E. L. & Thomas, J. E. (2001b). Is *Banana streak virus* strain Onne the only activateable virus integrant in the *Musa* genome ? *INFOMUSA* **10**, V.

Harper, G., Osuji, J. O., Heslop-Harrison, J. S. & Hull, R. (1999). Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* **255**, 207-13.

Hirochika, H., Okamoto, H. & Kakutani, T. (2000). Silencing of retrotransposons in Arabidopsis and reactivation by ddm1 mutation. *Plant Cell* **12**, 357-368.

Hull, R., Harper, G. & Lockhart, B. E. L. (2000). Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends Plant Sci* **5**, 362-365.

Jakowitsch, J., Mette, M. F., van Der Winden, J., Matzke, M. A. & Matzke, A. J. (1999). Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13241-6.

Rapport-gratuit.com



- Kenton, A., Khashoggi, A., Parokonny, A., Bennett, M. D. & Lichtenstein, C. (1995). Chromosomal location of endogenous geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana tabacum* L. *Chromosome Res* 3, 346-50.
- Lanaud, C., Risterucci, A. M., N'Goran, J. A. K., Clement, D., Flament, M., Laurent, V. & Falque, M. (1995). A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theor appl Genet* 91, 987-993.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M., Lincoln, S. E. & Newburg, L. (1987). MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1, 174-181.
- Lheureux, F., Carreel, F., Jenny, C., Lockhart, B. E. L. & Iskra-Caruana, M. L. (2002). Identification of genetic markers linked to *Banana streak disease* expression in inter-specific *Musa* hybrids. *Theor Appl Genet*. In Press.
- Lockhart, B. E. L. & Olszewski, N. E. (1993). Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: implication for virus detection in musa germplasm. *Breeding Banana and plantain for resistance to disease and pest*, J. Genry, ed. Montpellier France: INIBAP, 105-113.
- Lockhart, B. E., Menke, J., Dahal, G. & Olszewski, N. E. (2000). Characterization and genomic analysis of *tobacco vein clearing virus*, a plant pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J Gen Virol* 81, 1579-85.
- Mao, L., Wood, T. C., Yu, Y., Budiman, M. A., Tomkins, J., Woo, S., Sasinowski, M., Presting, G., Frisch, D., Goff, S., Dean, R. A. & Wing, R. A. (2000). Rice transposable elements: a survey of 73,000 sequence-tagged- connectors. *Genome Res* 10, 982-90.
- Matzke, M. A., Mette, M. F. & Matzke, A. J. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol Biol* 43, 401-15.
- Mette, M. F., Kanno, T., Aufsatz, W., Jakowitsch, J., van der Winden, J., Matzke, M. A. & Matzke, A. J. (2002). Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. *Embo J* 21, 461-9.
- Nakagawa, Y., Machida, C., Machida, Y. & Toriyama, K. (2000). Frequency and pattern of transposition of the maize transposable element Ds in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 41, 733-42.
- Ndowora, T. C., Dahal, G., LaFleur, D., Harper, G., Hull, R., Olszewski, N. E. & Lockhart, B. (1999). Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255, 214-20.
- Richert-Poggeler, K. R. & Shepherd, R. J. (1997). *Petunia vein-clearing virus*: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* 236, 137-46.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Edited by n. e. C. S. H. L. press. Cold Spring Harbor, NY.

van Houwelingen, A., Souer, E., Mol, J. & Koes, R. (1999). Epigenetic interactions among three dTph1 transposons in two homologous chromosomes activate a new excision-repair mechanism in petunia. *Plant Cell* **11**, 1319-36.

Wang, L. & Kunze, R. (1998). Transposase binding site methylation in the epigenetically inactivated Ac derivative Ds-cy. *Plant J* **13**, 577-82.

Wolters, A. M. & Visser, R. G. (2000). Gene silencing in potato: allelic differences and effect of ploidy. *Plant Mol Biol* **43**, 377-86.

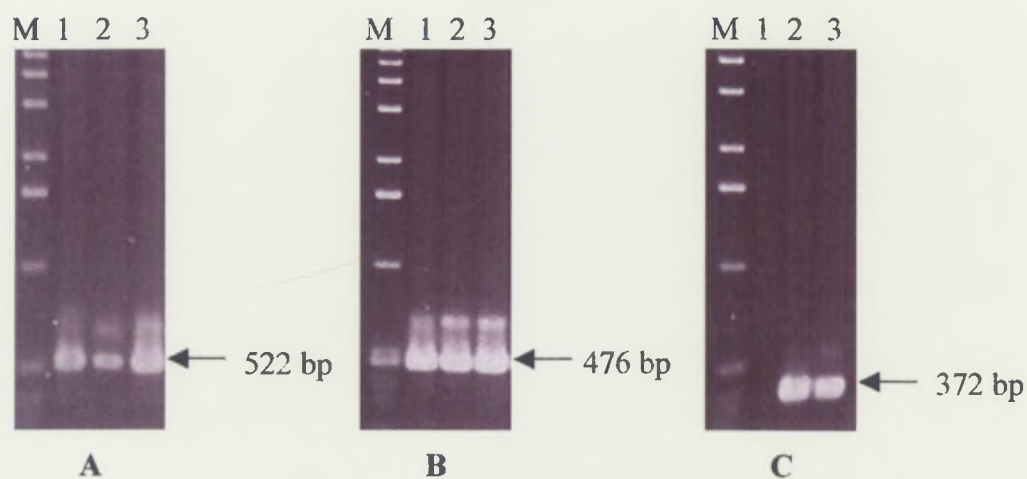


Figure 1 : IC-PCR test on diseased hybrid sample with specific primers of respectively BSV-OI (A), BSV-GF (B) and BSV-Im (C). EtBr-stained agarose gel analysis of IC-PCR product.

M : 1 kbp ladder (GibcoBRL)

Lane 1 to 3 : Diseased hybrids

Table 1: Distribution in diseased hybrids sub population of BSV-OI, BSV-Gf and BSV-Im

	BSV-OI	BSV-Im	BSV-Gf	Total
Diseased hybrids	96/97=99%	88/97=90%	48/97=49%	97

The distribution was measured by IC-PCR with specific primers of each BSV strain

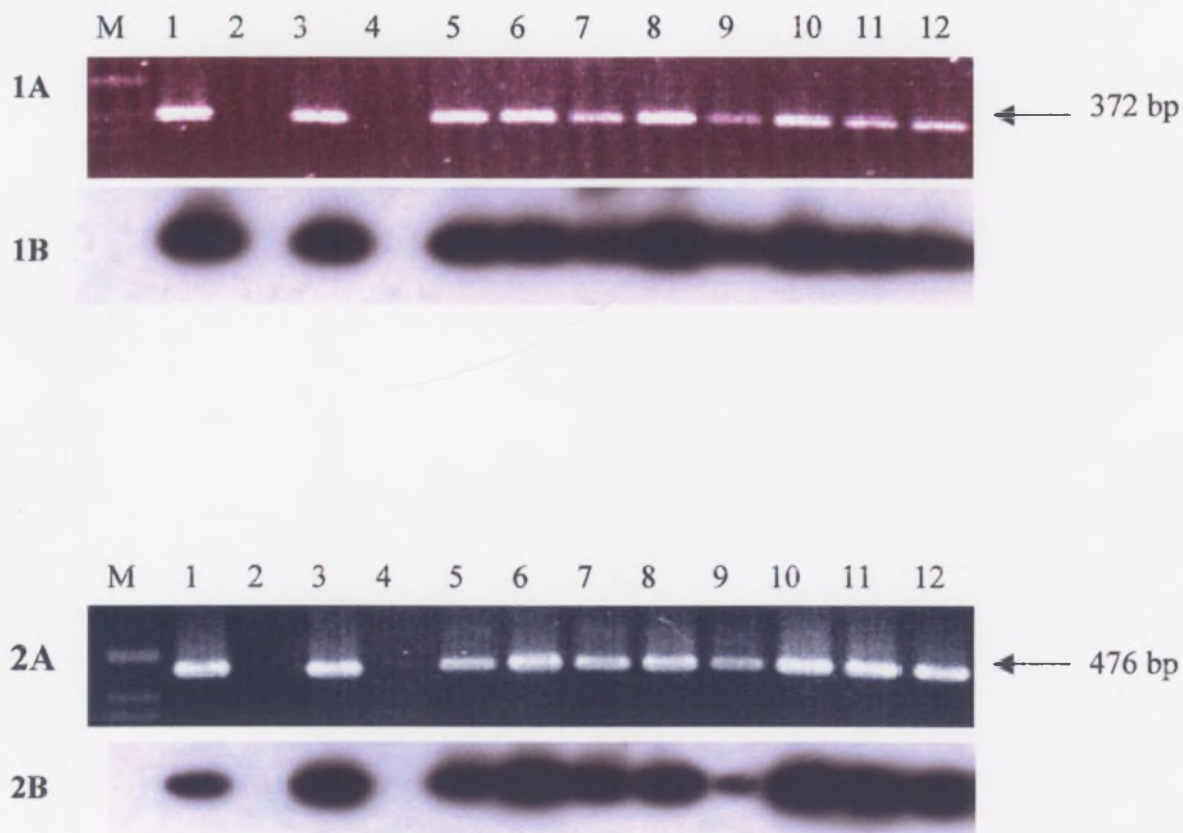


Figure 2 : PCR analysis of genitors and the F1 progeny from PKW x IDN 110 4x cross, using BSV-Im (1) and BSV-Gf (2) specific primers.

(A) EtBr-stained agarose gel analysis of PCR product

(B) Southern blot hybridization of gel using complete genome probes of BSV-Gf (2B) and the PCR fragment for BSV-Im (1B).

Lane 5 to 8 : F1 plants showing no sign of banana streak disease.

Lane 9 to 12 : F1 plants showing symptoms and BSV particles.

Lane M : 1kb ladder, lane 1 : PKW, lane 2 : IDN 110 4x, lane 3 : Pisang batu, lane 4 : Pisang pipit 4x.

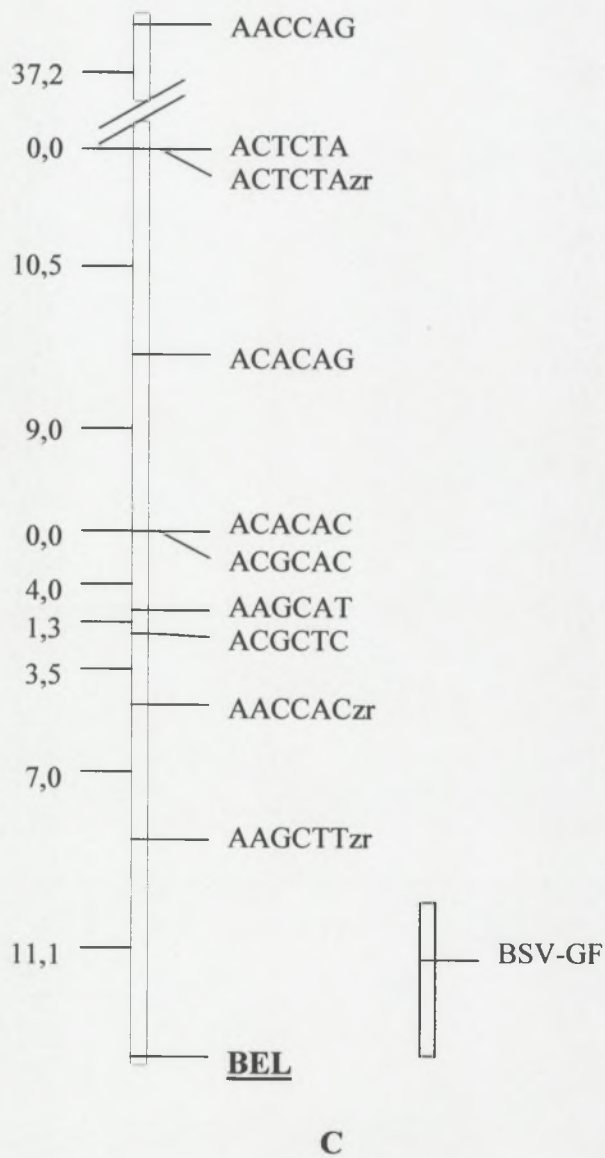
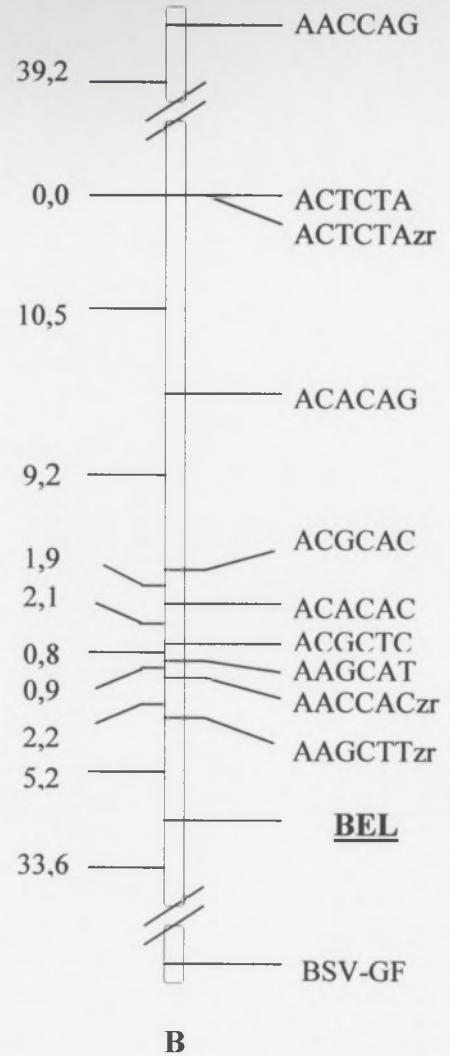
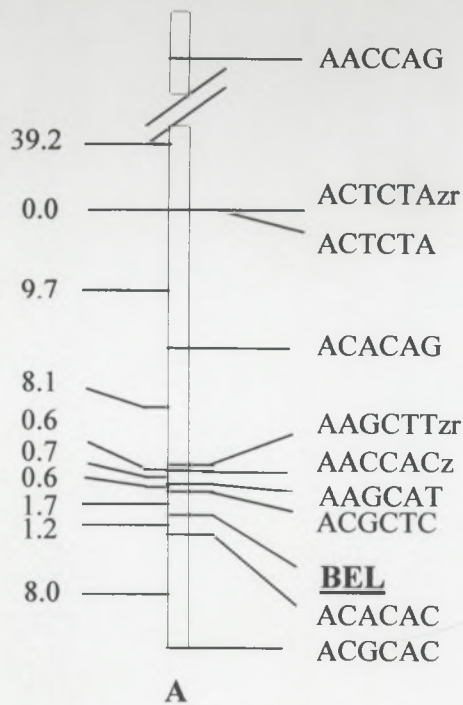


Figure 3: Genetic map of the area containing the BEL Locus

3A: Reference map: Genetic map of the area containing the BEL Locus (Lheureux et al., 2002)

3B: Genetic map of BEL locus including BSV-Gf phenotype marker obtained with the analysis of overall progeny.

3C: genetic map obtained with the analysis of subgroup of diseased hybrids

Markers (abbreviation of the selective nucleotide extension in 3'-end of each primer) are indicated on the right. Map distances (in centimorgans) are given to the left.

Z, markers segregating with absence of viral particle.

r, markers linked in repulsion phase

II.5- Conclusions

Au cours de cette étude nous avons tenté d'identifier la nature du facteur génétique au travers de l'identification de l'origine des particules virales épisomales exprimées dans les hybrides malades de nos croisements. Dans un premier temps, l'absence de forme ADN super enroulée libre chez les géniteurs a permis d'asseoir de façon quasi définitive ce que beaucoup de chercheurs tenaient pour acquis : la ou les séquences EPRVs BSV-Ol sont à l'origine des particules épisomales BSV-Ol exprimées. Cependant, le motif EPRV BSV-Ol décrit peut ne pas être le motif réellement sollicité. En effet, son implication nécessite de faire appel à un mécanisme de recombinaison pour obtenir un génome viral dans sa totalité comme proposé par Ndowora et al., (1999). Cet événement semble aléatoire et non régulé ce qui est peu compatible avec la répartition systématique observée de la maladie dans 50 % de nos descendance. De plus, la séquence EPRV BSV-Ol a été caractérisée pour la variété Obino l'Ewai, triploïde naturel (AAB) et l'ensemble des connaissances reliées à cette séquence a été transposé au génome *M. balbisiana* sur la base de résultats PCR identiques utilisant les amorces mixtes. Néanmoins, le génome « B » peut ne pas être identique aux génomes B du parent PKW et P. batu. Enfin, le modèle de recombinaison proposé fait référence à un contexte d'apparition des particules virales au cours de la culture *in vitro* et non lors de croisements génétiques. En résumé, les composants moléculaires qui participent à l'activation des séquences endogènes ainsi que les séquences elles-mêmes peuvent être différentes.

La recherche d'une corrélation stricte entre les séquences EPRV BSV-Ol et les virions exprimés au travers de l'étude des deux fragments de 9 et 12 bp a seulement montré que les séquences intégrées BSV-Ol sont toutes identiques à la séquence EPRV BSV-Ol décrite pour ces locus. L'analyse des particules virales restituées révèle une hétérogénéité pour ces deux zones liée à des délétions. L'apparition de ces délétions semble postérieure à la reconstitution du génome viral à partir des EPRVs BSV-Ol. Jusqu'à présent, la synthèse de nos résultats ne nous a toujours pas permis de déterminer si le motif décrit est le motif réellement impliqué dans l'expression des particules épisomales pathogènes BSV-Ol.

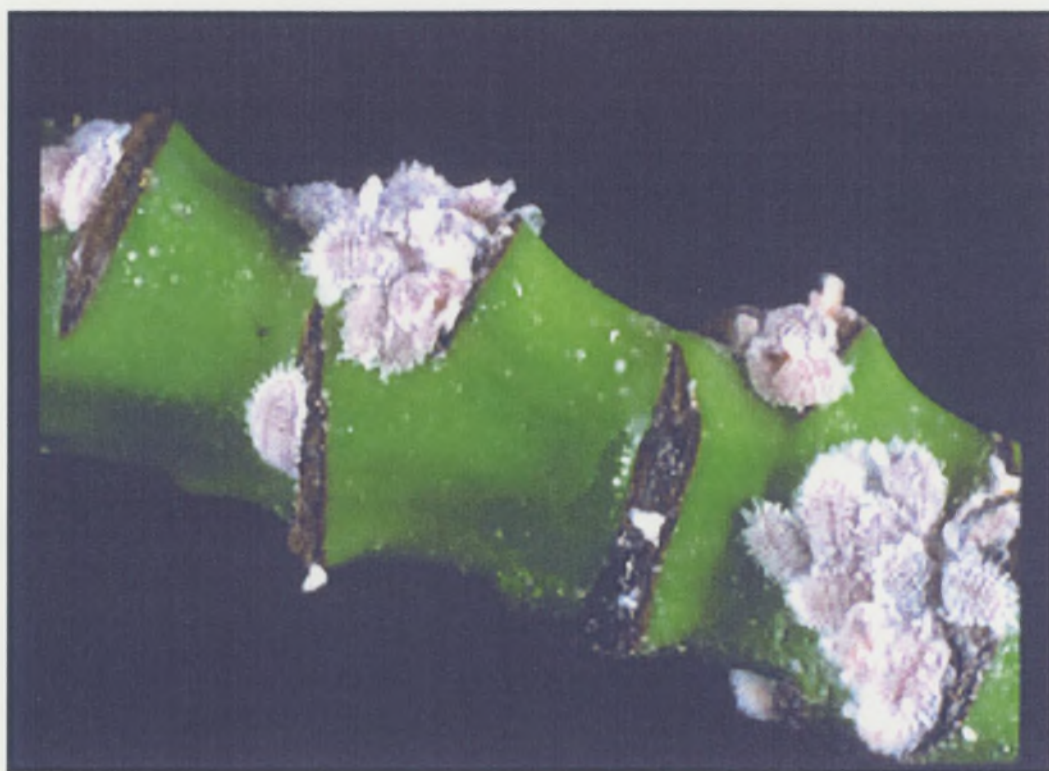
L'analyse de la diversité des souches BSV exprimées dans les hybrides malades a montré la présence d'au moins deux nouvelles souches : BSV-Im et BSV-Gf. La mise en évidence de la présence d'EPRVs correspondants à ces deux nouvelles souches nous a amenés à conclure que nous étions en présence de deux nouvelles séquences pathogènes EPRVs BSV. L'analyse de la répartition des trois souches dans la descendance associée à l'analyse génétique de cette répartition avec les données AFLPs a montré que l'activation des trois EPRVs BSV était sous

la dépendance du même locus BEL et du mécanisme moléculaire qu'il renferme. Ce dernier résultat a permis de conclure que le facteur génétique responsable de l'activation de ces séquences EPRVs pathogène est de nature différente des séquences virales EPRVs.

L'accumulation de ces séquences virales EPRVs pathogènes dans le génome *Musa balbisiana* semble montrer que ce dernier a eu à un moment donné de son évolution une importante plasticité ou une importante réceptivité à l'infection virale qui ont entraîné l'intégration d'au moins trois souches BSV. La compréhension de la biologie du BSV peut apporter des éclairages sur les conséquences des possibilités d'intégration lors d'une infection massive par plusieurs souches comme cela semble avoir été le cas.

Le fait que ces EPRVs BSV soient silencieuses chez les *M. balbisiana* diploïdes met en évidence une régulation commune de l'expression de ces séquences, que nous avons identifiés comme étant le locus BEL. On peut alors faire l'hypothèse que toutes les EPRVs pathogènes seront très similaires.

Chapitre III



Cochenille, *Planococcus citri*

Rapport-gratuit.com



LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

CHAPITRE III : Etude du comportement « sain » *M. balbisiana*

III.1- Introduction et objectifs

Les séquences EPRVs BSV pathogènes caractérisées chez le bananier sont présentes exclusivement dans le génome *Musa Balbisiana* (Geering et al., 2001; Lheureux et al., 2002). Dans le pathosystème TVCV/tabac décrit par Lockhart et al. (2000) les séquences endogènes de TVCV (EPRVs TVCV) sont présentes uniquement chez le parent mâle *Nicotiana glutinosa* et absentes du génome parental femelle *Nicotiana clevelandii*. Ces deux systèmes d'EPRVs sont « silencieux » chez les géniteurs *M. balbisiana* et *N. glutinosa* et actifs et pathogènes chez les hybrides interspécifiques (Lockhart et al., 2000; Lheureux et al., 2002). Il semblerait que chacun des parents ait développé des mécanismes permettant d'inhiber l'expression de ces EPRVs. Les résultats obtenus sur bananier (chapitre I) proposent que le locus BEL à l'état hétérozygote chez PKW soit réprimé expliquant les EPRVs BSV silencieuses.

Mette et al. (2002) dans une étude récente, ont montré que les séquences TEPRVs décrites chez *Nicotiana tabacum* conféraient au plant de tabac une « immunité » vis-à-vis d'une infection classique par le TPV. Un tel phénomène pourrait être à l'origine en partie de ce qui a été observé pour les populations de bananiers *M. balbisiana* Haploïdes doublés (HD) et Autofécondés (AF) (Chapitre II). L'objectif de cette étude est de rechercher les éléments utiles à la compréhension du mécanisme de régulation à partir des EPRVs BSV. Pour cela nous avons choisi de tester le comportement « résistant » à l'expression des EPRVs BSV pour les géniteurs, vis à vis d'une contamination virale extérieure.

III.2- Matériels et méthodes

III.2.1-Transmission des souches BSV-OI, BSV-Gf et BSV-Mys (Mysore) par cochenilles.

Les tests de transmission sont réalisés sur de jeunes plants de bananiers âgés de 4 semaines pour les géniteurs que sont PKW, P. batu, IDN 110 T, IDN D et P. pipit T. Un bananier Cavendish (AAA, *Musa acuminata*) est utilisé comme contrôle de l'efficacité de la transmission et du développement de l'infection. 20 à 30 cochenilles de l'espèce *Planococcus citri* sont déposées pour l'acquisition de chaque souche BSV durant 48 heures sur des



Figure 24: Expression des symptômes dus au BSV sur les bananiers *M. acuminata*.

A: IDN 110 2X

B: IDN 110 4X

C: Pisang pipit 4X

D: Mosaïque en tirets sur le limbe des feuilles du bananier P. pipit 4X

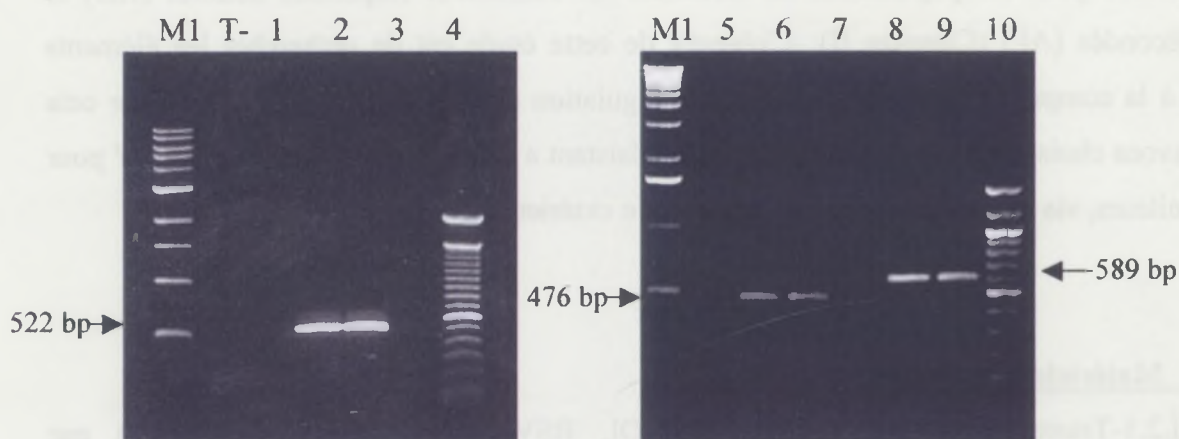


Figure 25 : Résultats des tests IC-PCR utilisant les amorces spécifiques BSV-OI, BSV-GF et BSV-Mys visant à identifier les 3 différentes souches virales sur les géniteurs après transmission de ces mêmes souches.

M1 : Invitrogen 298-12216 bp markers.

M2 : New England Biolabs 100-1500 bp markers

T- : contrôle négatif BSV-OI (Grande Naine)

Pistes 1 à 4 test IC-PCR amorces spécifiques BSV-OI

1: PKW, 2: IDN 110 4x, 3: Pisang pipit 4x, 4: Pisang batu.

Pistes 5 à 7 test IC-PCR amorces spécifiques BSV-GF

5: P. batu, 6: Grande Naine, 7: P. pipit 4x.

Pistes 8 à 10 test IC-PCR amorces spécifiques BSV-Mys

8: P. batu, 9: Grande Naine, 10: P. pipit 4x

bananiers infectés respectivement par les souches BSV-Ol, BSV-Gf et BSV-Mys. Les cochenilles infectées indépendamment par chaque souche virale sont transférées sur les bananiers sains (deux bananiers/clones). Des morceaux de feuilles infectées portant les colonies de cochenilles sont déposées directement sur les feuilles de bananier à inoculer. Un lot de chaque clone est conservé comme témoin. Les bananiers sont traités à l'insecticide 48 heures après le transfert des cochenilles.

Les plantes inoculées par les cochenilles sont maintenues en serre durant plusieurs mois après l'inoculation dans les conditions favorables au développement de la maladie. Les plantes sont régulièrement observées pour la présence des symptômes de la maladie de la Mosaïque en tirets des bananiers.

III.2.2- Détection des souches BSV-Ol, BSV-Gf et BSV-Mys

La présence des particules virales épisomales est recherchée par ISEM avec le sérum Anti BSV PMXR2C à partir d'extrait partiellement purifié de virus suivant le protocole décrit par Ahlawat et al. (1996). L'identification des souches est réalisée par IC-PCR avec les amorces spécifiques des trois souches à partir d'extrait brut de plantes selon le protocole décrit par Geering et al (2000).

III.2.3- Mise en évidence de la présence de séquences EPRVs BSV-Mysore

La présence de séquence BSV-Mys EPRV est recherchée par PCR sur l'ADN total des géniteurs PKW, P. batu, IDN 110 T, P. pipit T avec les amorces spécifiques de la souche BSV-Mys et suivant le protocole décrit par Geering et al. (2000). L'ADN des bananiers est extrait au préalable par le kit Dnasy (QUIAGENE) suivant les recommandations du fabricant.

III.3- Résultats et discussion

Les premiers symptômes caractéristiques de la maladie sont apparus pour les trois souches virales étudiées 3 semaines après inoculation sur le bananier Cavendish utilisé comme témoin positif, 6 semaines après inoculation sur les clones IDN 110 T et D et 13 semaines après inoculation sur le clone Pisang pipit T (Fig. 24). Ces résultats ont été confirmés par l'observation des particules virales en ISEM et par la caractérisation des souches en IC-PCR (Fig. 25). Les symptômes de la maladie pour le bananier IDN 110 T et IND 110 D sont comparables à ceux observés pour le témoin Cavendish. Ils sont extrêmement



A



B

Figure 26: Clones PKW (A) et Pisang batu (B) résistant à une infection externe par la souche BSV-OI.

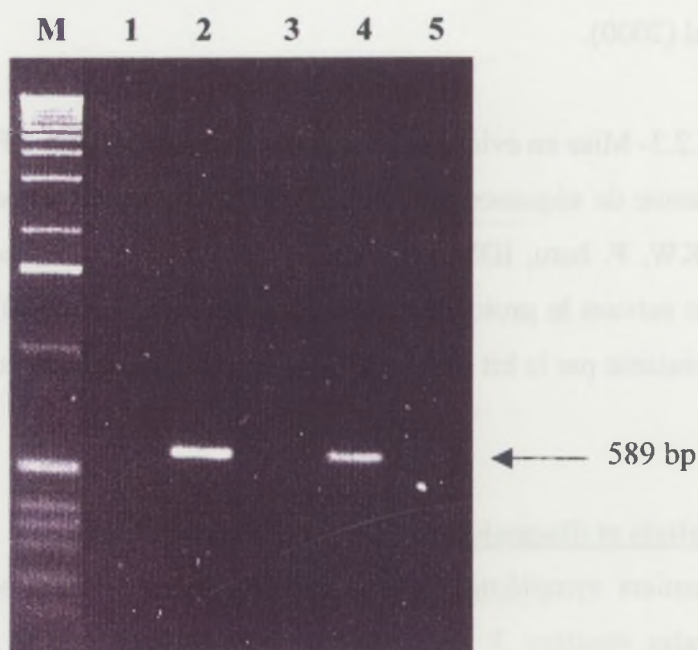


Figure 27 : Résultat d'analyses PCR avec les amorces spécifiques de la souche BSV-Mys (Geering et al., 2000) sur l'ADN total des géniteurs *M. balbisiana* et *M. acuminata*.

M : Marqueur de taille 1kbp (GibcoBRL)

Piste 1: Témoin eau.

Piste 2: Pisang Klutuk Wulung (PKW)

Piste 3: IDN 110 T

Piste 4: Pisang batu

Piste 5: Pisang pipit T

sévères et ont entraîné la mort des bananiers pour les trois souches virales étudiées. Les symptômes de la maladie apparaissent en revanche beaucoup plus diffus pour l'autre parent *M. acuminata* (P. pipit) et ne semble pas affecter la croissance de ce dernier qui est identique aux mêmes bananiers non infectés. Nous avons déjà observé ce phénomène en champ pour nos populations d'hybrides issues des croisements PKW x IDN110 T et P. batu x P. pipit T. En effet la première population développait des symptômes sévères de la maladie entraînant jusqu'à la mort des bananiers alors que la deuxième montrait des symptômes diffus et clairsemés; la maladie ne semblait affecter ni la croissance ni la floraison de ces hybrides. Nous en avons alors conclu que le croisement P. batu x P. pipit T était plus tolérant vis à vis de la maladie. Les résultats des tests d'inoculation montrent que ce caractère de tolérance ou de sensibilité est porté par le parent mâle *M. acuminata*.

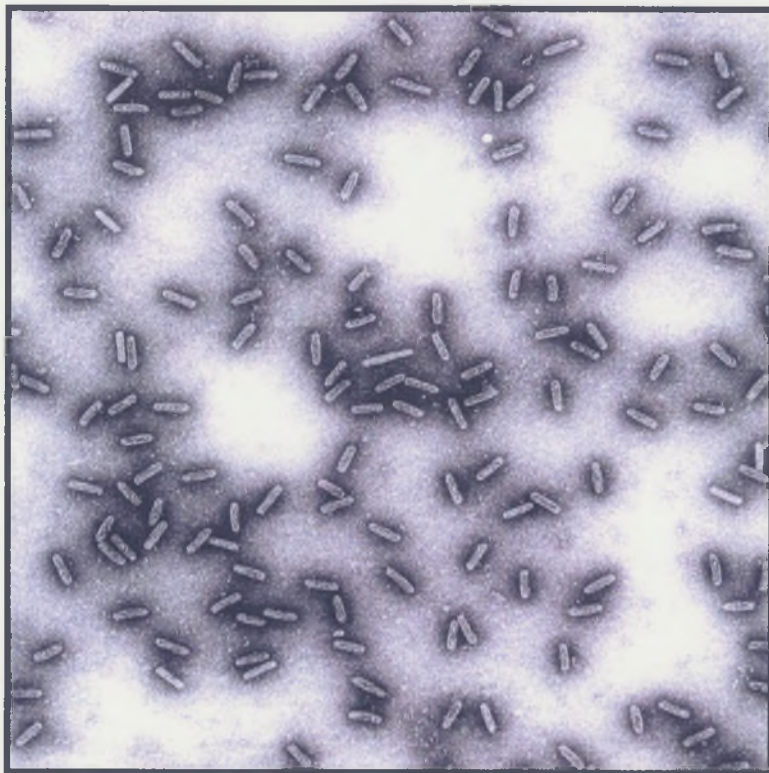
Les deux bananiers de l'espèce *M. balbisiana* ne développent aucun symptôme de la maladie pour chacune des infections liées aux trois souches BSV (Fig. 26). Les analyses ISEM et IC-PCR ne révèlent la présence d'aucune particule virale épisomale. Ces bananiers semblent avoir développé une résistance vis-à-vis d'une infection extérieure pour les trois souches de BSV.

La résistance à l'infection observée semble indépendante des EPRVs BSV pathogènes. En effet, aucune différence de comportement n'est observée pour les bananiers *M. balbisiana* inoculés avec les souches virales homologues aux EPRVs pathogènes (BSV-Ol et Gf) et non pathogène BSV-Mys. En effet pour cette dernière aucun virion correspondant n'a été observé dans nos descendance alors que des EPRVs BSV-Mys ont été mises en évidence par PCR dans le génome des parents *M. balbisiana* (Fig. 27). Par conséquent, le mécanisme de résistance observée chez les parents femelles *M. balbisiana* apparaît commun aux souches BSV ayant des EPRVs correspondantes qu'elles soient pathogènes ou non dans la descendance utilisant le géniteur *M. balbisiana*

Ces analyses démontrent la résistance des parents *M. balbisiana* à une infection par le BSV.

Le mode d'action du mécanisme de résistance sollicité sur les différentes étapes de l'infection n'a pas été abordé dans cette étude. Ce mécanisme de résistance ne semble pas être transmis à la descendance car 50 % des bananiers expriment la maladie. Si toutefois ce mécanisme est transmis à la descendance, il doit être étroitement lié aux hybrides sains qui ne possèdent pas le facteur génétique BEL.

Conclusions générales et Perspectives



Particules virales de BSV (Microscopie électronique)

Conclusions générales et perspectives

Ces dernières années, l'avancée spectaculaire de la connaissance des génomes a été liée principalement à l'accumulation de données générée par les travaux de séquençage. Les plantes ont bénéficié de ces technologies en raison notamment de la petite taille de leur génome. L'analyse des données en référence à des bases de données a révélé la présence de séquences pararétrovirales dénommées EPRVs. Leurs analyses indiquent que le phénomène d'intégration s'est probablement généralisé à l'ensemble du règne végétal. Depuis 1996, date à laquelle les premières EPRVs ont été identifiées par Lafleur et al. (1996) dans le bananier, plusieurs équipes de recherche se sont inscrites dans une dynamique d'identification et/ou de mise en évidence de nouvelles EPRVs (Jakowitsch et al., 1999; Hull et al., 2000). L'étude réalisée par l'équipe du Dr Lockhart (Ndowora et al., 1999) demeure toutefois, l'étude de référence d'EPRV **pathogène**. En effet, elle reste la première non seulement à avoir avancé l'existence de séquences virales endogènes dans le génome des plantes, mais également à les avoir proposées comme seule explication possible à l'émergence de virions dans des plantes saines, leur attribuant de fait un rôle pathogène. Par la suite d'autres études ont identifié de nouvelles EPRVs pathogènes sans pour autant apporter d'éléments nouveaux quant aux mécanismes qui régulaient leur expression (Richert-Pöggeler et al., 1996; Lockhart et al., 2000 ; Budiman et al., 2000 ; Mao et al., 2000) Ce n'est que récemment que les travaux de Dallot et al. (2001) ont pu approcher le mécanisme d'activation de l'EPRV BSV-O1 au cours de la culture *in vitro*. Mette et al. (2002) quant à eux, bien que n'étudiant pas directement d'EPRVs pathogènes, ont abordé leur rôle possible vis-à-vis de la mise en place de mécanismes de défense lors d'infection virale de même nature.

Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette nouvelle dynamique et y a apporté un éclairage nouveau sur les mécanismes d'action des EPRVs pathogènes au travers du pathosystème EPRV BSV / Bananier. Nous avons montré l'existence d'au moins trois EPRVs BSV pathogènes au cours de l'hybridation génétique. L'étude génétique de ce phénomène nous a permis de proposer des hypothèses sur l'origine, la régulation et l'expression de ces EPRVs BSV dans le génome du bananier. Enfin, de par l'avancé des connaissances par rapport aux autres pathosystèmes, le complexe EPRV BSV / Bananier constitue en soi un modèle tant sur les mécanismes d'expression des EPRVs pathogènes que sur l'adaptation et la mise en place d'outils pour comprendre ce phénomène pour d'autres pathosystèmes.

1- Origine des séquences EPRVs BSV

Origine de l'intégration

Les séquences EPRVs BSV, ainsi que l'allèle BEL ne sont pas présents chez les bananiers de l'espèce *Musa acuminata* témoignant d'une association plus étroite avec le génome *M. balbisiana*. En effet, les mouvements à travers le monde de germoplasme bananiers de tout temps liés aux échanges commerciaux, ont soumis les bananiers de l'espèce *M. acuminata* à des contacts réguliers avec le BSV. Pour autant que cette espèce soit sensible aux infections par le BSV, aucun événement d'intégration dans leur génome n'a été rapporté. Il semblerait également qu'aucune autre nouvelle intégration n'ait eu lieu concernant l'espèce *M. balbisiana*. Ces observations font suite aux études de la biologie même des PRVs montrant qu'ils ne possèdent ni les outils d'intégration ou d'excision et que leur cycle de multiplication reste totalement indépendant de l'intégration. Les événements d'intégrations pourraient dater de la période liée à la spéciation des bananiers *M. balbisiana*. L'observation de la présence exclusive des EPRVs BSV dans le génome *M. balbisiana* semble également indiquer que, du moins dans un premier temps, seuls les bananiers appartenant à cette espèce ont été en contact avec le BSV. Ceci reste du domaine du possible puisque d'après Simmonds (1954) l'isolement géographique a été un élément important et moteur de la spéciation des bananiers. De cette association aurait pu naître les événements d'intégration observés aujourd'hui. Cependant l'isolement géographique des bananiers appartenant à l'espèce *Musa balbisiana* ne peut pas expliquer à lui seul l'asymétrie d'intégration observée. Une multiplication de facteurs favorables a dû être nécessaire pour que de telles intégrations aient pu se produire. Le génome de ces bananiers probablement était configuré de sorte à favoriser les interactions entre génomes conduisant aux différents événements d'intégration mis en évidence. Les bananiers appartenant à l'espèce *Musa acuminata* ont dû à l'opposé développer des mécanismes limitant voire interdisant ce type d'interaction car on trouve toutefois des traces de séquences badnavirus intégrées dans quelques génomes *M. acuminata* (Lafleur et al., 1996; Ndowora et al., 1999). Des recherches portant sur une analyse de la biodiversité des EPRVs parmi les autres espèces - toutes sections *Musa* confondues - dont la différenciation s'est réalisée en amont de l'espèce *Musa balbisiana*, permettra d'aborder la question de l'origine du phénomène d'intégration. Cette étude apportera certainement par la suite des éléments d'information quant à l'évolution stricte des bananiers au travers de l'histoire du BSV utilisant ce dernier comme marqueur d'évolution.

En dehors du pathosystème EPRV BSV/bananiier, l'asymétrie de la répartition des EPRVs entre deux espèces a été également observée pour le pathosystème TVCV-EPRV/Tabac où seul le parent *Nicotiana glutinosa* et les hybrides créés à partir de ce géniteur possèdent les séquences virales endogènes correspondant au virus TVCV exprimé (Lockhart et al., 2000). Ces séquences sont silencieuses chez *N. glutinosa* - tout comme chez PKW ou P. batu pour les EPRVs BSV - et exprimées pour les hybrides. A ce jour, le mécanisme d'expression n'a toujours pas été exploré. L'hypothèse retenue expliquant ces observations propose le croisement génétique, comme le révélateur de la mise en place du mécanisme d'expression des TVCV-EPRVs chez le Tabac en référence au pathosystème EPRVs BSV/bananiier. De plus, un parallèle rapide établi entre ces deux pathosystèmes identifie de nombreuses similitudes suggérant que le mécanisme moléculaire de régulation des EPRVs serait similaire et pourrait être conservé chez les plantes. Les données recueillies pour le bananiier seraient exploitables et dès lors transposables immédiatement à une autre plante.

Mécanisme d'intégration

Les éléments connus favorisant l'intégration de séquences exogènes dans les génomes n'ont pas pu être identifiés en relation avec les EPRVs BSV étudiées. L'origine de l'intégration des PRVS nous semble de nature générique, et les mécanismes d'intégration sous jacents doivent certainement suivre une logique commune liée étroitement au comportement des plantes face à une infection. Ainsi ne peut-on pas imaginer un mécanisme générique corrélé à la sensibilité et la tolérance des plantes vis-à-vis d'une infection virale puisque les PRVs ne possèdent pas dans leur génome la capacité d'intégrer activement un autre génome ?

En effet, comme cela a été observé chez des *Brassicaceae*, les plantes sensibles à une infection au CaMV développent les symptômes attendus de l'infection, le virus se multipliant sans limites de façon importante. Ainsi comme l'a montré Covey et al. (1990) les structures « ADN viral super enroulée » ou « minichromosomes » situées dans le noyau des cellules sont, chez ces plantes, en quantité faible due à la multiplication intensive du virus pour une contamination systémique. Cette situation tend à limiter les interactions entre génomes. En revanche, les plantes pour lesquelles les mécanismes de défense sont suffisamment efficaces pour limiter ou arrêter une infection virale, accumulent dans le noyau de leur cellules les structures d'ADN super enroulé ou « minichromosomes » (Covey et al., 1997). Leur présence

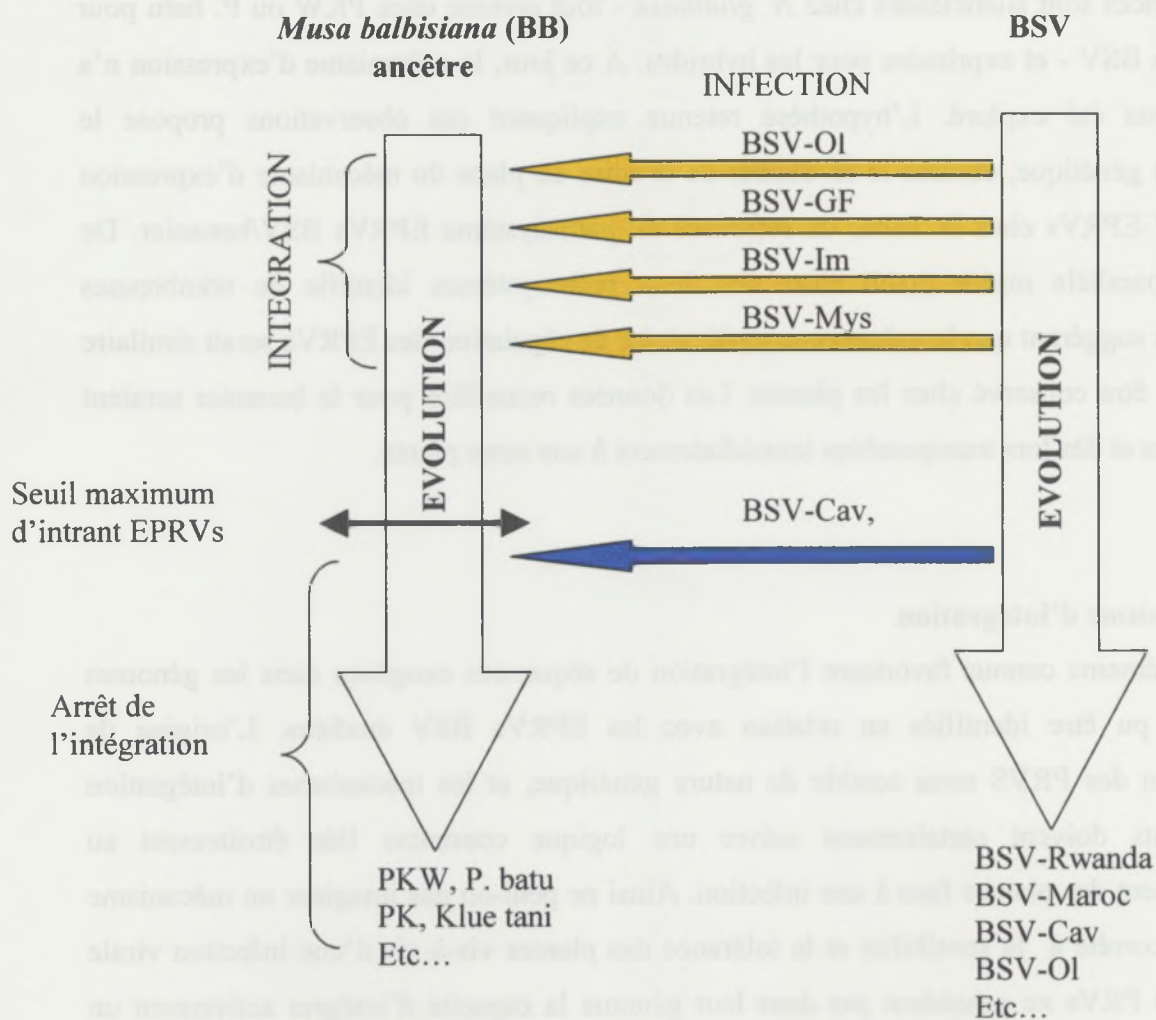


Figure 28: Proposition de co-évolution du BSV et du génome *Musa balbisiana*.



importante dans le noyau peut favoriser des interactions pouvant conduire à des recombinaisons illégitimes avec le génome de l'hôte. Seul un tel phénomène peut expliquer l'intégration des PRVs et a pu être à l'origine de la première intégration du BSV dans un bananier ancestral *M. balbisiana*, ce dernier devant être tolérant à l'infection BSV. Ce comportement associé à une pression continue de la maladie a abouti à l'intégration de différentes souches virales pour un même génome hôte. Le virus en parallèle soumis à diverses pressions évolutives aurait généré une variabilité à l'origine de la diversité des souches virales identifiées encore aujourd'hui. De la comparaison des génomes des différentes variétés actuelles de bananiers *M. balbisiana* basée sur la diversité des EPRVs et PRV BSV disponibles, pourrait ressortir des propositions de « pas de temps » des phénomènes d'intégration en référence à l'échelle de l'évolution de l'espèce des bananiers elle-même. Ce schéma mettra certainement en évidence une étape clé expliquant l'arrêt des intégrations dû par exemple à une saturation du génome bananier devant préserver sa biologie propre. Un élément supplémentaire attestant d'un mécanisme d'intégration arrivé à saturation pourrait être l'existence de souches BSV pour lesquelles aucune correspondance EPRV n'a été identifiée. Ces dernières résulteraient de l'évolution du BSV seul en parallèle à l'évolution du bananier (Fig. 28). Dès lors, un équilibre sous forme de mécanisme de régulation s'est vraisemblablement établi dans le génome de ces bananiers vis-à-vis de nouvelles intégrations donnant naissance au comportement observé pour PKW et P batu tant pour la régulation de l'expression des EPRVs que lors d'infections nouvelles. La mise en évidence de l'existence d'un mécanisme de défense probablement de type VIGS a été abordé au cours de notre travail (chapitre III) sans que nous ayons eu la possibilité de définir l'existence d'une immunité spécifique ou générique EPRVs. Il serait utile de compléter cette analyse en suivant la multiplication virale suite à des inoculations par des souches BSV n'ayant pas d'EPRVs.

2- Mécanisme d'expression

Les données recueillies au travers de notre étude sont les seules existantes et disponibles pour proposer un mécanisme d'expression des EPRVs au travers des hybridations génétiques chez le bananier. Nous avons établi que le mécanisme s'articulait autour de deux points clés qui sont le facteur génétique d'expression BEL et les EPRVs pathogènes. Nous avons également montré la présence de plusieurs EPRVs pathogènes dans un même génome

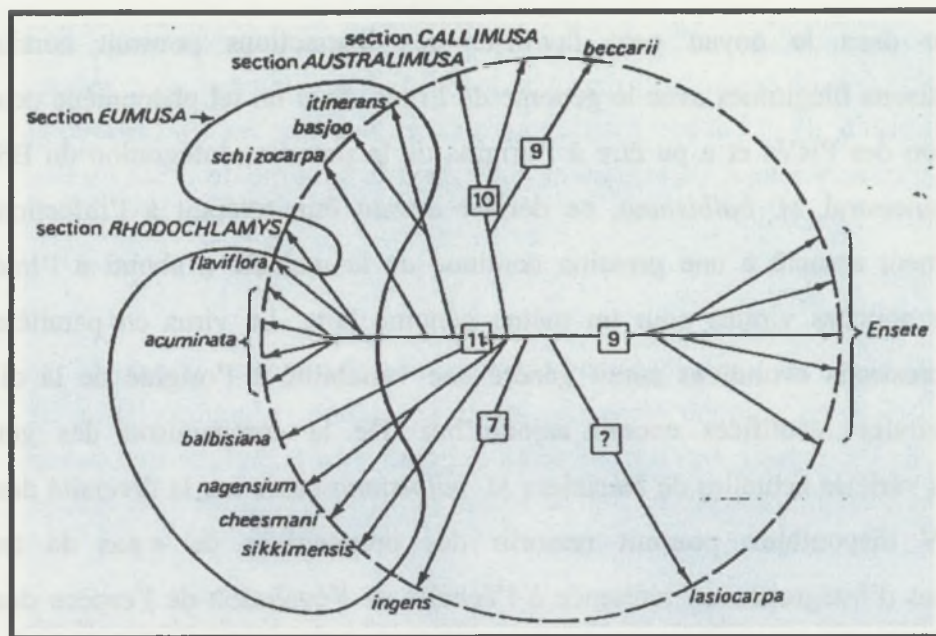


Figure 29: Schéma évolutif des espèces des genres *Musa* et *Ensete* d'après Simmond (1962). Le diagramme représente l'évolution à partir d'une origine commune (centre), le cercle extérieur représentant l'époque actuelle. Le degré de différenciation entre deux taxons est représenté par la distance entre le cercle externe et le point où ils divergent l'un et l'autre.

bananier, sous la dépendance du même locus BEL. En conséquence nous en avons déduit que le facteur génétique n'était pas d'origine virale. Ce mécanisme est effectif pour tous les hybrides développant la maladie et réprimé ou absent pour les parents *M. balbisiana* et les hybrides n'exprimant pas la maladie respectivement. Nous avons montré que l'allèle BEL était à l'état hétérozygote chez le parent *M. balbisiana*. Dès lors nous avons conclu à son inactivation par son propre allèle situé sur le chromosome homologue. L'identification des séquences EPRVs pathogènes et l'analyse de leurs structures permettront d'approcher plus précisément la nature exacte du facteur génétique

Le facteur génétique d'expression : le locus BEL

L'analyse de la ségrégation de la maladie sur les deux populations d'hybrides interspécifiques a pu mettre en évidence l'existence d'un facteur génétique (BEL) chez les deux géniteurs *M. balbisiana*, PKW et P. batu, responsable de l'expression de la maladie dans la descendance. Les résultats de l'analyse des populations de bananiers Haploïdes doublés (HD) et Auto-fécondés (AF) au travers des marqueurs AFLP, témoignent en faveur de l'existence probable de ce même locus BEL pour d'autres bananiers appartenant à l'espèce *M. balbisiana* : Pisang Klutuk et Klue tani. Cette donnée reste toutefois à confirmer par une analyse complète comprenant tous les marqueurs AFLP. Ce résultat était cependant attendu puisque les quatre bananiers de l'espèce *Musa balbisiana* étudiés sont entre eux génétiquement très proches. Plus largement la base génétique des *M. balbisiana* exploités est réduite en raison d'un fort taux d'homozygocie. Simmond (1962) a montré dans une étude sur l'évolution des espèces des genres *Musa* et *Ensete*, que l'espèce *M. balbisiana* s'est très rapidement différenciée dans la section Eumusa bien avant *Musa Schizocarpa* et *Musa acuminata* (Fig. 29). Cette espèce s'est par la suite elle-même très peu diversifiée (Cheesman, 1947; Horry, 1989; Carreel, 1994). Par conséquent le locus BEL, pourrait être présent dans le génome de tous les bananiers ou presque de cette même espèce. Une étude systématique de la présence du locus BEL dans le germoplasme bananier informerait sur le rôle exact du locus BEL dans le pathosystème : action spécifique sur les EPRVs ou mécanisme général de régulation de séquences endogènes.

Mécanismes moléculaires des interactions BEL / EPRVs BSV pathogènes

Nous avons délibérément choisi d'aborder les premières recherches sur le mécanisme moléculaire par une approche génétique utilisant les marqueurs AFLP au détriment d'une approche moléculaire stricte de type « marche chromosomique ».

Exploration de la carte génétique

Au cours de l'analyse des marqueurs AFLP lors de la construction de la carte génétique du locus d'expression, nous avons identifié une homologie de séquence avec un rétroélément pour le marqueur ACGCTC situé à moins de 1 cM du locus BEL. La présence de ce rétroélément de type *gypsy* au travers du marqueur AFLP est extrêmement attractive dans la mesure où ce dernier représentant uniquement 0,5 % du génome bananier (Balint-Kurti et al., 2000) apparaît regroupé à proximité des sites NOR le mettant en relation avec le mécanisme d'expression dont il pourrait être le promoteur (Grandbastien, 1992; White et al., 1994; Hull et Covey, 1996). Cependant, cette information ne pourra prendre toute sa dimension que lorsque la localisation des séquences EPRV BSV aura été clairement établie sur les chromosomes de PKW par des techniques FISH et Fiber FISH. Cette expérience permettra également de localiser le locus BEL par rapport aux différentes séquences BSV EPRVs pathogènes déjà caractérisées. Les résultats permettront de statuer sur les différentes hypothèses formulées jusqu'alors quant au caractère homozygote ou hétérozygote des séquences EPRVs BSV pathogènes. Ils nous renseigneront également sur leur localisation et plus particulièrement celle de l'EPRV BSV-Gf pathogène qui selon nos résultats, serait située sur un locus différent.

Exploration du statut sain

A ce jour, en l'absence de données supplémentaires par rapport à d'autres pathosystèmes EPRVs nous ne pouvons que formuler des hypothèses quant aux mécanismes moléculaires d'expression. Elles se réfèrent cependant aux résultats obtenus lors des études des contrôles épigénétiques de l'activité des transgènes naturels ou artificiels dans le génome des plantes (Matzke et al., 2000; Fagard et Vaucheret, 2000a) et dernièrement ceux de Mette et al. (2002) proposant des mécanismes de méthylation induit par les EPRVs en réponse à une infection virale homologue. Dans ce dernier cas il est utile de signaler que l'étude porte sur un système TPV/tabac pour lequel aucune infection virale n'a jamais été observée conférant à cette plante un statut sain. Nous avons dès lors abordé cette question par le biais d'études conduites sur les

parents *M. balbisiana*, PKW et P. batu, en tentant d'interpréter leur comportement sain en référence aux observations de Mette et al. (2002).

L'hypothèse d'un inhibiteur situé en position allélique par rapport à l'allèle BEL a été explorée en premier en observant la répartition des virions sur les populations HD et AF (chapitre I).

Nous avons alors enregistré la présence de particules virales pour des bananiers de génotype parental et leur maintien à des taux trop faibles pour pouvoir les observer en microscopie électronique. Cette observation différente de celle attendue et obtenue pour les parents *M. balbisiana* nous a laissé penser qu'un mécanisme de défense de type régulation avait été mis en évidence maintenant les virions à des taux extrêmement faibles. Ce mécanisme aurait été révélé par l'étape d'haploïdisation des génomes au moment de la méiose. A cette étape le chromosome portant l'allèle BEL n'étant plus sous le contrôle de son inhibiteur a la possibilité de libérer des virions. Lors de la reconstitution d'un génome diploïde, la présence de ces virions induit une réaction de défense de la plante qui régule leur expression. Cette réaction peut être liée à la présence d'EPRVs dans le génome de la plante et « mémorisée » comme le suggère les travaux de Waterhouse et al. (2001). Afin de tester cette nouvelle hypothèse nous avons envisagé de suivre l'inoculation de différentes souches BSV aux parents *M. balbisiana* par cochenilles et testé l'héritabilité de ce phénomène.

Les résultats préliminaires indiquent que les géniteurs femelles PKW et P. batu sont résistants à l'inoculation des souches BSV-OI, BSV-Gf et BSV-Mys. Ces trois souches virales sont différentes de part le fait que les deux premières ont des EPRVs pathogènes et qu'aucune donnée actuelle ne propose la séquence EPRV BSV-Mys comme telle. Nos analyses doivent être confirmées par des études cinétiques des ARNs viraux transcrits afin de préciser la nature VIGS du mécanisme ou non. Il serait également intéressant d'approfondir la nature exacte de ce phénomène afin de préciser si elle est BSV spécifique ou PRV générique afin d'estimer les possibilités exactes de stabilité des génomes ayant des EPRVs vis-à-vis d'une expression potentielle de la maladie.

Ces résultats ont été rapprochés des observations réalisées sur la population hybride dans le but de tester l'héritabilité de ce caractère. La ségrégation de la maladie semble indiquer une non transmission du mécanisme de défense. Il semblerait en effet, qu'il faille que le génome *M. balbisiana* soit à l'état diploïde pour être effectif ou bien que le mécanisme de défense soit régi par des gènes de nature récessive. Pour cela des tests d'inoculation sur des populations

d'hybrides ABB issu d'un croisement PKW 4x (BBBB) avec l'IDN 110 (AA) permettra de valider ou non cette dernière suggestion

Dans l'hypothèse où ce mécanisme de défense ait pu être transmis à la descendance, seuls les hybrides sains le possèderaient. Ce dernier à l'état hétérozygote dans le génome PKW et P. batu serait alors lié au locus homologue du facteur génétique que l'on retrouve uniquement dans les hybrides sains. Des tests d'inoculation sur ces mêmes hybrides avec différentes souches BSV permettront également de vérifier si le mécanisme de défense peut être transmissible d'une génération à l'autre.

Les résultats de l'étude moléculaire de l'action du mécanisme de défense recoupé avec les données d'inoculation sur les hybrides permettront par la suite de proposer un schéma des mécanismes de défense. Ce schéma pourra alors être utilisé comme support de réflexions pour développer des stratégies de résistance.

Liste des figures et des tableaux

- Figure 1a.** Equation Virale : mode d'infection habituel du BSV (Page 3).
- Figure 1b.** Equation Virale : virus dormant BSV (Page 3).
- Figure 2.** Représentation schématique de la séquence BSV-OI intégrée dans le génome *Musa balbisiana* (Page 11).
- Figure 3a.** Taxinomie du Bananier (Page 12).
- Figure 3b.** Représentation d'un bananier avec ses rejets au moment de la fructification, et coupe longitudinale de la tige, d'après Champions (1967) (Page 12).
- Figure 4a.** Création de variétés tétraploïdes par restitution des gamètes maternels de variétés triploïdes (page 14).
- Figure 4b.** Schéma de synthèse des variétés triploïdes à partir de clones diploïdes (Page 14).
- Figure 5.** Symptômes de la maladie de la mosaïque en tirets de bananier (Page 15).
- Figure 6.** Particules virales de BSV capturées sérologiquement avec l'anticorps polyclonal anti-BSV IgG PMX2RC et observées en microscopie électronique (Page 16).
- Figure 7.** Organisation du génome du BSV (Page 17).
- Figure 8.** Vecteurs du BSV (Page 18).
- Figure 9.** Cycle supposé de multiplication du BSV (Page 18).
- Figure 10.** Procédure de la technique d'Immunocapture PCR (IC-PCR) (Page 21).
- Figure 11.** AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Page 22).
- Figure 12.** Position des amorces « Mixtes » *Musa* T3.2 et BSV 510 sur la séquence EPRV BSV-OI (Page 24).
- Figure 13.** Résultat représentatif des analyses PCR obtenues en utilisant les amorces « mixtes » (*Musa* T3.2 et BSV 510) sur la descendance du croisement P. batu x P. pipit T et de ces deux même parents (Page 24).
- Figure 14.** Carte génétique du locus BEL pour le croisement P. batu x P. pipit 4x (Page 25).
- Figure 15.** Alignement de la séquence nucléotidique du marqueur E-ACG/M-CTC avec celle correspondante du rétrotransposon décrit par Balint-Kurti et al. (2000) (Page 25).

- Figure 16.** Représentation schématique du système allélique qui cofère le rôle de porteur sain aux parents PKW et P. batu (Page 44).
- Figure 17.** Résultats des tests d'IC-PCR avec les amorces C11 et C12 (Dallot et al., 2000) sur les populations d'haploïdes doublés et Autofécondés *M. balbisiana* (Page 47).
- Figure 18.** Carte génétique du locus BEL construite à partir des données AFLP des population PKW x IDN110 T et P. batu x P. pipit T combinées (Page 48).
- Figure 19.** Diagramme du cycle de multiplication du CaMV (Page 50).
- Figure 20.** Schéma de la stratégie PCR sur ADN total développée permettant de mettre en évidence la forme circulaire libre du virus en utilisant les amorces M1/ M2 (Page 51).
- Figure 21.** Mise en évidence de la forme virale sc ADN par Southern blot sur ADN total non digéré (Page 51).
- Figure 22.** Résultats des analyses PCR sur un échantillonnage de la descendance PKW x IDN 110 T et des géniteurs avec les amorces M1 et M2 (Page 52).
- Figure 23.** Mise en évidence de produits de transcription viraux par Northern Blot sur de l'ARN total (Page 54).
- Figure 24.** Expression des symptômes dus au BSV sur les bananiers *M. acuminata*. (Page 85).
- Figure 25.** Résultats des tests IC-PCR avec les amorces spécifiques BSV-Ol, BSV-Gf et BSV-Mys visant à identifier les trois différentes souches virales sur les géniteurs après transmission de ces mêmes souches (Page 85).
- Figure 26.** Clones PKW (A) et Pisang batu (B) résistant à une infection externe par la souche BSV-Ol (Page 86).
- Figure 27.** Résultats des analyses PCR avec les amorces spécifiques de la souche BSV-Mys sur l'ADN total des géniteurs *M. balbisiana* et *M. acuminata*. (page 86).
- Figure 28.** Proposition de co-évolution du BSV et du génome *M. balbisiana* (Page 90).
- Figure 29.** Schéma évolutif des espèces des genres *Musa* et *Ensete* d'après Simmond (1962) (Page 91).
- Tableau 1.** Comparaison de quelques propriétés des *Badnavirus* (Page 16).
- Tableau 2.** Pourcentages des similarités nucléotidiques basés sur la méthode de Lipman-Pearson pour les trois ORFs du *Banana streak virus* (BSV), *Cacao swollen*

shot virus (CSSV), *Citrus yellow mottle virus* (CYMV), *Sugarcane bacilliform virus* (ScBV) et *Commelina yellow mottle virus* (CoYMV) (Page 17).

- Tableau 3.** Analyse de la répartition de la maladie dans la descendance P. batu x P. pipit T (Page 24).
- Tableau 4.** Proposition de différents agencements des marqueurs AFLP retenus par le logiciel Mapmaker pour le croisement P. batu x P. pipit T (Page 25).
- Tableau 5.** Description des populations d'haploïdes doublés et Autofécondés *M. balbisiana* utilisées (Page 44).
- Tableau 6.** Comparaison des phénotypes observés et attendus, après analyse génétique AFLP des clones de la population HD (Page 45).
- Tableau 7.** Comparaison des phénotypes observés et attendus, après analyse génétique AFLP des clones de la population AF (Page 46).

Article N°1 :

- Figure 1.** PCR analysis of the F1 progeny from the PKW x IDN 110 4x cross, using mixed primer pair (*Musa* T3.2 and BSV 510) (Page 41).
- Figure 2.** Genetic map of the area containing BSV expressed locus (Page 43).
- Table 1.** Disease analysis in the progeny of PKW x IDN 110 4x (Page 40).
- Table 2.** Segregation of markers in the progeny of PKW x IDN 110 4x (Page 42).

Article N°2 :

- Figure 1.** Autoradiogram of PCR and IC-PCR analysis using primer pair (BSV2 and BSV525) (Page 61)
- Figure 2.** Comparison of BSV-OI PRV and EPRV sequences with those of PCR product of PKW, healthy hybrid (15), diseased hybrid (52) regarding the 9 (A) and 12 (B) nucleotides deletion area (Page 62).
- Figure 3.** Comparison of BSV-OI PRV and EPRV sequences with those of five IC-PCR clones from one diseased hybrid regarding the 9 (A) and 12 (B) nucleotides deletion area (Page 63).

Article N°3 :

- Figure 1.** IC-PCR test on diseased hybrid sample with specific primers of respectively BSV-Ol (A), BSV-Im (B) and BSV-Gf (C) (**Page 77**).
- Figure 2.** PCR analysis of genitors and the F1 progeny from PKW x IDN 110 4x cross, using BSV-Im (1) and BSV-Gf (2) specific primers (**Page 79**).
- Figure 3.** Genetic map of the area containing the BEL locus (**Page 80**).
- Table 1.** Distribution in diseased hybrids sub-population of BSV-Ol, BSV-Gf and BSV-Im (**Page 78**).



Références bibliographiques

- AHLAWAT, Y. S., PANT, R. P., LOCKHART, B. E. L., SRIVASTAV, M., CHAKRABORTY, N. K., and VARMA, A. (1996). Association of *Badnavirus* with Citrus mosaic disease in India. *Plant Disease* **80**, 590-592.
- AL-KAFF, N. S., COVEY, S. N., KREIKE, M. M., PAGE, A. M., PINDER, R., and DALE, P. J. (1998). Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to pathogen. *Science* **279**, 2113-2115.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, E. R., and LIPMAN, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- ANANDALAKSHMI, R., PRUSS, G. J., GE, X., MARATHE, R., MALLORY, A. C., SMITH, T. H., and VANCE, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(22), 13079-84.
- ARGUELLES. (1919). Studies of Philippine bananas. *The Philippines Agricultural review* **XII**, 1-96.
- ASHBY, M. K., WARRY, A., BEJARANO, E. R., KHASHOGGI, A., BURRELL, M., and LICHTENSTEIN, C. P. (1997). Analysis of multiple copies of geminiviral DNA in the genome of four closely related *Nicotiana* species suggest a unique integration event. *Plant Mol. Biol.* **35**(3), 313-21.
- BAKRY, F. (2002). Banana genetic diversity and perspectives for breeding. New varieties: why and how? *Comptes Rendues de l'Académie d'Agriculture de France* **In press**.
- BAKRY, F., CARREEL, F., CARUANA, M., CÔTE, F., JENNY, C., and TÉZENAS DU MONTCEL, H. (1997). Les bananiers. In "l'amélioration des plantes tropicales" (A. Charrier, M. Jacquot, S. Hamon, and D. Nicolas, Eds.), pp. 124-129. CIRAD/Orstom.
- BAKRY, F., and KERBELLEC, F. (1995). Evaluation et sélection des diploïdes et des produits de l'amélioration. Rapport CEE STD3.
- BAKRY, F., and HORRY, J. P. (1992). Tetraploid hybrids from interploid 3x/2x crosses in cooking bananas. *Fruits* **47**(6), 641-647.
- BAKRY, F., HORRY, J. P., TEISSON, C., TEZENAS DU MONTCEL, H., and GANRY, J. (1990). L'amélioration génétique des bananiers à l'IRFA/CIRAD. *Fruits* **N° spécial**, 25-40.

- BALINT-KURTI, P. J., CLENDENNEN, S. K., DOLEZELOVA, M., VALARIK, M., DOLEZEL, J., BEETHAM, P. R., and MAY, G. D. (2000). Identification and chromosomal localization of the monkey retrotransposon in *Musa* sp. *Mol. Gen. Genet.* **263**(6), 908-15.
- BAULCOMBE, D. C. (1996). Mechanism of pathogen-derived resistance to virus in transgenic plants. *The Plant Cell* **8**, 1833-1844.
- BEJARANO, E. R., KHASHOGGI, A., WITTY, M., and LICHTENSTEIN, C. (1996). Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93**(2), 759-764.
- BOUHIDA, M., LOCKHART, B. E. L., and OLSZEWSKI, N. E. (1993). An analysis of the complete sequence of a *Sugarcane bacilliform virus* genome infectious to banana and rice. *Journal of general Virology* **74**, 15-22.
- BRIDDON, R. W., PHILLIPS, S., BRUNT, A., and HULL, R. (1999). Analysis of the sequence of *Dioscorea alata bacilliform virus*: comparison to others members of the *Badnavirus* group. *Virus Genes* **18**(3), 277-283.
- BRIGNETI, G., VOINNET, O., LI, W. X., JI, L. H., DING, S. W., and BAULCOMBE, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* **17**(22), 6739-6746.
- BUDIMAN, M. A., MAO, L., WOOD, T. C., and WING, R. A. (2000). A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Res.* **10**(1), 129-136.
- CARLIER, J. (1994). Etude de la structure des populations, par RFLP, de *Mycosphaerella fijiensis*, agent responsable de la maladie des raies noires des bananiers. Paris XI. Thèse de doctorat.
- CARREEL, F. (1994). Etude de la diversité génétique des bananiers (genre *Musa*) à l'aide des marqueurs RFLP. Institut National Agronomique Paris-Grignon. Thèse de doctorat.
- CARRINGTON, J. C., and WHITHAM, S. A. (1998). Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **1**(4), 336-41.
- CHAMPION, J. (1967). Les bananiers et leur culture: botanique et génétique (IFAC, Ed.), p. 214, Paris, France.
- CHEESMAN, E. E. (1947). Classification of the Banana. *Kew bulletin* **2**, 97-117.
- CHENG, C. P., LOCKHART, B. E., and OLSZEWSKI, N. E. (1996). The ORF I and II proteins of *Commelina yellow mottle virus* are virion- associated. *Virology* **223**(2), 263-71.

- COVEY, S. N., and AL-KAFF, N. S. (2000). Plant DNA viruses and gene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**(2-3), 307-22.
- COVEY, S. N., AL-KAFF, N. S., LANGARA, A., and TURNER, D. S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781-782.
- COVEY, S. N., and TURNER, D. S. (1991). Comparison of viral nucleic acid intermediates at early and late stages of *Cauliflower mosaic virus* infection suggests a feedback regulatory mechanism. *J Gen Virol* **72**(Pt 10), 2603-6.
- COVEY, S. N., TURNER, D. S., LUCY, A. P., and SAUNDERS, K. (1990). Host regulation of the *Cauliflower mosaic virus* multiplication cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**(5), 1633-7.
- CRONQUIST, A. (1988). "The evolution and classification of flowering plants." The New York Botanical Garden, New York.
- DAHAL, G., PASBERG-GAUHL, C., GAUHL, F., and THOTTAPPILLY, G. (1998). Studies on a Nigeria isolate of *Banana streak badnavirus* II. Effect of intraplant variation on virus accumulation and reliability of diagnosis by ELISA. *Annal of Applied Biology* **132**, 263-275.
- DALLOT, S., ACUNA, P., C., R., RAMIREZ, P., CÔTE, F., LOCKHART, B. E. L., and CARUANA, M. L. (2001). Evidence that the proliferation stage of micropropagation procedure is determinant on the expression of *Banana streak virus* integrated into the genome of the FHIA 21 hybrid (*Musa* AAAB). *Archives of Virology*.
- DANGL, J. L., and JONES, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**(6839), 826-33.
- DANIELLS, J. W., GEERING, A. D. W., BRYDE, N. J., and THOMAS, J. E. (2001). The effect of *Banana streak virus* on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. *Annals of Applied Biology* **139**(1), 51-60.
- DANIELLS, J., THOMAS, J. E., and SMITH, M. (1995). Seed transmission of *Banana streak virus* confirmed. *INFOMUSA* **4**(1), 7.
- FAGARD, M., and VAUCHERET, H. (2000a). Systemic silencing signal(s). *Plant. Mol. Biol.* **43**(2-3), 285-93.
- FAGARD, M., and VAUCHERET, H. (2000b). (Trans)Gene Silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* **51**, 167-94.
- FRISON, E. A., SHARROCK, S. L. (1998). PROMUSA (PROGRAM). VIROLOGY WORKING GROUP., and INTERNATIONAL NETWORK FOR IMPROVEMENT OF BANANA AND

- PLANTAIN.. "Banana streak virus : a unique virus-*Musa* interaction? : Proceedings of a workshop of the PROMUSA Virology working group held in Montpellier, France, 19-21 January 1997 [i.e. 1998]." Inibap, Montpellier, France.
- GEERING, A. D. W., OLSZEWSKI, N. E., DAHAL, G., THOMAS, J. E., and LOCKHART, B. E. L. (2001). Analysis of the distribution and structure of integrated *Banana streak virus* DNA in a range of *Musa* cultivars. *Molecular Plant Pathology* 2(4), 207-213.
- GEERING, A. D. W., MCMICHAEL, L. A., DIETZGEN, R. G., and THOMAS, J. E. (2000). Genetic Diversity among *Banana streak virus* Isolates from Australia. *Phytopathology* 90(8), 921-927.
- GNANAMANICKAM, S. S., and ANURATHA, C. S. (1992). "Diseases of fruit crops.", III.
- GRANDBASTIEN, M. A. (1992). Retroelements in higher plants. *Trends Genet.* 8(3), 103-8.
- HAGEN, L. S., JACQUEMOND, M., LEPINGLE, A., LOT, H., and TEPFER, M. (1993). Nucleotide sequence and genomic organization of *Cacao swollen shoot virus*. *Virology* 196, 619-628.
- HARDING, R., YANG, I., HAFNER, G., LIEW, S., and DALE, J. (2002). Genomic characterization of *Taro bacilliform virus*. XIIth International congress of virology, Paris. Abstract.
- HARPER, G., OSUJI, J. O., HESLOP-HARRISON, J. S., and HULL, R. (1999). Integration of *Banana streak badnavirus* into the *Musa* genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255(2), 207-13.
- HARPER, G., and HULL, R. (1998). Cloning and sequence analysis of *Banana streak virus* DNA. *Virus Genes* 17(3), 271-8.
- HEARON, S. S., and LOCKE, J. C. (1984). Graft, pollen, and seed transmission of an agent associated with top spotting in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Plant Disease* 68, 347-350.
- HEATH, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44(3), 321-34.
- HINDMARSH, P., and LEIS, J. (1999). Retroviral DNA integration. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(4), 836-43.
- HOHN, T., and FÜTTERER, J. (1991). Pararetroviruses and retroviruses: a comparison of expression strategies. *Seminars in Virology* 2, 55-69.
- HORRY, J. P. (1989). Chimiotaxonomie et organisation génétique dans le genre *Musa*. Paris XI. Thèse de doctorat.
- HOWES, F. N. (1929). Observations on banana in Siam. *Journal of the Siam Society, Natural history supplement* VIII, 41-48.

- HUANG, Q., and HARTUNG, J. S. (2001). Cloning and sequence analysis of an infectious clone of *Citrus yellow mosaic virus* that can infect sweet orange via *Agrobacterium*-mediated inoculation. *J. Gen. Virol.* **82**, 2549-58.
- HULL, R. (2002). "Matthews' Plant Virology." Fourth Edition ed. Academic Press, London.
- HULL, R., HARPER, G., and LOCKHART, B. E. L. (2000). Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends in Plant Science* **5**(9), 362-365.
- HULL, R. (1999). Classification of reverse transcribing elements: a discussion document. *Arch. Virol.* **144**(1), 209-13.
- HULL, R., and COVEY, S. N. (1996). Retroelements: propagation and adaptation. *Virus Genes* **11**(2-3), 105-18.
- JACQUOT, E., DAUTEL, S., LEH, V., GELDREICH, A., YOT, P., and KELLER, M. (1997). Les pararétrovirus de plantes. *Virologie* **1**, 111-120.
- JAKOWITSCH, J., METTE, M. F., VAN DER WINDEN, J., MATZKE, M. A., and MATZKE, A. J. (1999). Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **96**(23), 13241-6.
- JONES, A. T., MCGAVIN, W. J., GUEERING, A. D. W., and LOCKHART, B. E. L. (2001). New Badnavirus in Ribes Species, its Detection by PCR, and its Close Association with *Gooseberry vein banding disease*. *Plant Disease* **85**, 417-422.
- JONES, D. R., and LOCKHART, B. E. L. (1993). *Banana streak disease. fact sheet Nat. Montpellier, France*.
- KASSCHAU, K. D., and CARRINGTON, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**(4), 461-70.
- KENTON, A., KHASHOGGI, A., PAROKONNY, A., BENNETT, M. D., and LICHTENSTEIN, C. (1995). Chromosomal location of endogenous geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana tabacum* L. *Chromosome Res* **3**(6), 346-50.
- KUBIRIBA, J., LEGG, J. P., TUSHEMERIRWE, W., and ADIPALA, E. (2001a). Disease spread patterns of *Banana streak virus* in farmers' fields in Uganda. *Annals of Applied Biology* **139**(1), 31-36.
- KUBIRIBA, J., LEGG, J. P., TUSHEMERIRWE, W., and ADIPALA, E. (2001b). Vector transmission of *Banana streak virus* in the screenhouse in Uganda. *Annals of Applied Biology* **139**(1), 37-43.

- LAFLEUR, D. A., LOCKHART, B. E. L., and OLSZEWski, N. E. (1996). Portions of *Banana streak badnavirus* genome are integrated in the genome of its host *Musa* sp. *Phytopathology* **86**, 100.
- LANAUD, C., RISTERUCCI, A. M., N'GORAN, J. A. K., CLEMENT, D., FLAMENT, M., LAURENT, V., and FALQUE, M. (1995). A genetic linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and applied of genetics* **91**, 987-993.
- LASSOUDIERE, A. (1979). Mise en évidence des répercussion économiques de la mosaïque en tirets du bananier en Côte d'Ivoire. Possibilités de lutte par éradication. *Fruits* **34** (1), 3-34.
- LASSOUDIERE, A. (1974). La mosaïque dite "à tirets" du bananier 'Poyo' en Côte d'Ivoire. *Fruits* **29**, 349-357.
- LHEUREUX, F., CARREEL, F., JENNY, C., LOCKHART, B. E. L., and ISKRA-CARUANA, M. L. (2002). Identification of genetic markers linked to *Banana streak disease* expression in inter-specific *Musa* hybrids. *Theoretical and applied of genetics* **in press**.
- LOCKHART, B. E. L., and JONES, D. R. (2000a). Diseases caused by virus: Banana Mosaic. In "Diseases of banana, Abacà and Ensete" (D. R. Jones, Ed.), pp. 256-263. CABI Publishing, New York.
- LOCKHART, B. E. L., and JONES, D. R. (2000b). Diseases caused by virus: Banana Streak. In "Diseases of banana, Abacà and Ensete" (D. R. Jones, Ed.), pp. 256-263. CABI Publishing, New York.
- LOCKHART, B. E. L., MENKE, J., DAHAL, G., and OLSZEWSKI, N. E. (2000). Characterization and genomic analysis of *Tobacco vein clearing virus*, a plant Pararetrovirus that is transmitted vertically and related to sequences integrated in the host genome. *J. Gen. Virol.* **81**(Pt 6), 1579-85.
- LOCKHART, B. E. L., and LACHNER, J. (1999). An aphid-transmitted *Badnavirus* associated with yellow leafspot of *Spiraea*. *Phytopathology* **89**, S46.
- LOCKHART, B. E. L., KIRATIYA-ANGUL, K., JONES, P., ENG, L. S., P. DE, OLSZEWSKI, N. E., LOCKHART, N., DEEMA, N., and SANGALANG, J. (1997). Identification of *Piper yellow mottle virus*, a mealybug-transmitted *Badnavirus* infecting *Piper* spp. in southeast Asia. *European Journal of Plant Pathology* **103**(4), 303-311.
- LOCKHART, B. E. L., and OLSZEWSKI, N. E. (1996). *Schefflera ringspot virus*, a widely distributed mealybug-transmitted *Badnavirus* occurring in *Schefflera* and *Aralia*. *Acta horticulturae* **432**, 196-202.

- LOCKHART, B. E. L. (1995). *Banana streak badnavirus* infection in *Musa*: epidemiology, diagnosis and control. *ASPAC Food and fertilizer technology center (Taiwan) technical bulletin* **143**, 1-11.
- LOCKHART, B. E. L., and OLSZEWSKI, N. E. (1993). Serological and genomic heterogeneity of *Banana streak badnavirus*: implication for virus detection in *Musa* germplasm. *Breeding Banana and plantain for resistance to disease and pest*, J. Genry, ed. Montpellier France: INIBAP, 105-113.
- LOCKHART, B. E. L. (1988). Occurrence of *Canna yellow mottle virus* in north america. *Acta horticulturae* **234**, 69-72.
- LOCKHART, B. E. L. (1986). Purification and serology of bacilliform virus associated with *Banana streak disease*. *Phytopathology* **76**, 995-999.
- MAGEE, C. J. (1940). Transmission of infections chlorosis or heart rot of the banana and its relationship to CMV. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* **VI**, 44-47.
- MAGEE, C. J. (1930). A new virus disease of bananas. *Agric. Gaz. N. S. W.* **XLV**(12), 929.
- MAO, L., WOOD, T. C., YU, Y., BUDIMAN, M. A., TOMKINS, J., WOO, S., SASINOWSKI, M., PRESTING, G., FRISCH, D., GOFF, S., DEAN, R. A., and WING, R. A. (2000). Rice transposable elements: a survey of 73,000 sequence-tagged- connectors. *Genome Res.* **10**(7), 982-90.
- MATZKE, M. A., METTE, M. F., and MATZKE, A. J. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant. Mol. Biol.* **43**(2-3), 401-15.
- MEDBERRY, S. L., LOCKHART, B. E., and OLSZEWSKI, N. E. (1990). Properties of *Commelina yellow mottle virus*'s complete DNA sequence, genomic discontinuities and transcript suggest that it is a Pararetrovirus. *Nucleic Acids Res* **18**(18), 5505-13.
- MENENDEZ, T., and SHEPHERD, K. (1975). Breeding new banana. In "World crop", Vol. 27, pp. 104-112.
- MENISSIER, J., LEBEURIER, G., and HIRTH, L. (1982). Free *Cauliflower mosaic virus* supercoiled DNA in infected plants. *Virologie* **117**, 322-328.
- METTE, M. F., KANNO, T., AUFSATZ, W., JAKOWITSCH, J., VAN DER WINDEN, J., MATZKE, M. A., and MATZKE, A. J. (2002). Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. *EMBO J.* **21**(3), 461-9.
- MOURRAIN, P., BECLIN, C., ELMAYAN, T., FEUERBACH, F., GODON, C., MOREL, J. B., JOUETTE, D., LACOMBE, A. M., NIKIC, S., PICAULT, N., REMOUE, K., SANIAL, M., VO,

- T. A., and VAUCHERET, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**(5), 533-42.
- NDOWORA, T. C., DAHAL, G., LAFLEUR, D., HARPER, G., HULL, R., OLSZEWSKI, N. E., and LOCKHART, B. (1999). Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* **255**(2), 214-20.
- NDOWORA, T. C. (1998). *Banana streak virus*: development of an immunoenzymatic assay for detection and characterization of sequences that are integrated into the genome of the host *Musa* sp. University of Minnesota, Saint Paul. pp 83, Thesis.
- NDOWORA, T. C., LOCKHART, B. E. L., and OLSZEWSKI, N. E. (1997). Relationship between integrated and episomal genomic sequences in *Musa*. *Phytopathology* **87**, S69.
- NEWBOLD, J. E., XIN, H., TENCZA, M., SHERMAN, G., DEAN, J., BOWDEN, S., and LOCARNINI, S. (1995). The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists *in situ* as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J. Virol.* **69**(6), 3350-7.
- OLIVEIRA E SILVA, S. D., MELLO VÉRAS, S. D., GASPAROTTO, L., MATOS, A. P. D., MACIEL CORDEIRO, Z., and BOHER, B. (2000). Evaluation of *Musa* spp. for resistance to Moko disease (*Ralstonia solanacearum*, race 2). *Infomusa* **9**(1), 19-20.
- OLSZEWSKI, N., HAGEN, G., and GUILFOYLE, T. J. (1982). A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of *Cauliflower mosaic virus* DNA isolated from infected turnip leaves. *Cell* **29**(2), 395-402.
- PARENTY, M. (1995). A l'ère de l'automatisation. *Biofutur* **146**, 34-38.
- PASBERG-GAUHL, C., GAUHL, F., SCHILL, P., and LOCKHART, B. E. L. (1996). First report of *Banana streak virus* in farmers' fields in Benin, Ghana, and Nigeria, West Africa. *Plant disease* **80**, 224.
- PRUSS, G., GE, X., SHI, X. M., CARRINGTON, J. C., and BOWMAN VANCE, V. (1997). Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* **9**(6), 859-68.
- RATCLIFF, F. G., MACFARLANE, S. A., and BAULCOMBE, D. C. (1999). Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**(7), 1207-16.
- RATCLIFF, F. G., HARRISON, B. D., and BAULCOMBE, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560.
- REICHEL, H., BELALCAZAR, S., MÜNERA, G., and NARVÀES, J. (1996). First report of *Banana streak virus* infecting Plantains (*Musa* spp) in Colombia. *Plant disease* **80**, 463.

- RICHERT-POGGELER, K. R., and SHEPHERD, R. J. (1997). *Petunia vein-clearing virus*: a plant Pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* **236**(1), 137-46.
- RICHERT-POGGELER, K. R., SHEPHERD, R. J., and CASPER, R. (1996). *Petunia vein-clearing virus* (PVCV), a Pararetrovirus that also exists as a retroelement in the chromosome of its host *The Xth international congress of virology, Jerusalem, Israel*. Abstract.
- RUIZ, M. T., VOINNET, O., and BAULCOMBE, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**(6), 937-46.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., and MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual (n. e. C. S. H. L. p. C. S. Harbor., Ed.), NY.
- SARAH, J. L. (1989). Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* **19**, 199-216.
- SAUNDERS, K., LUCY, A. P., and COVEY, S. N. (1990). Susceptibility of *Brassica* species to *Cauliflower mosaic virus* infection is related to a specific stage in the virus multiplication cycle. *J. Gen. Virol.* **71**(Pt 8), 1641-7.
- SCHILLBERG, S., SCHUMANN, D., and FISCHER, R. (1997). PCR-based multiplex method for rapid screening of recombinant bacteria. *Biotechniques* **23**(2), 212-4, 216.
- SIMMONDS, N. W. (1962). "The evolution of the banana." (L. e. L. ed., Ed.).
- SIMMONDS, N. W., and SHEPHERD, K. (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journ. Linn. Soc. Bot.* **LV**, 302-312.
- SIMMONDS, N. W. (1954). Varietal identification in the Cavendish group of banana. *J. Hort. Sci.* **XXIX**, 81-88.
- STICHER, L., MAUCHE-MANI, B., and MÉTRAUX, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **35**, 232-270.
- TANG, W., and LEISNER, S. (1998). Methylation of nonintegrated multiple copy DNA in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**(2), 403-6.
- THOMAS, J. E., and ISKRA-CARUANA, M. L. (2000). Diseased caused by virus: Bunchy Top. In "Diseases of banana, Abacà and Ensete" (D. R. Jones, Ed.), pp. 241-253. CABI Publishing, New York.
- THOMAS, J. E., ISKRA-CARUANA, M. L., MAGNAYE, L. V., and JONES, D. R. (2000). Diseased caused by virus: Bract Mosaic. In "Diseases of banana, Abacà and Ensete" (D. R. Jones, Ed.), pp. 253-255. CABI Publishing, New York.

- THOMSON, K. G., DIETZGEN, R. G., THOMAS, J. E., and TEAKLE, D. S. (1996). Detection of *Pinapple bacilliform virus* using the polymerase chain reaction. *Ann. Appl. Biol.* **129**, 57-69.
- TUSHMEREIRWE, W. K., KARAMURA, E. B., and KARYEIIJA, R. (1996). *Banana streak virus* (BSV) and an associated filamentous virus (unidentified) disease complex of highland bananas in Uganda. *INFOMUSA* **5**(1), 9-12.
- VANCE, V. B. (1991). Replication of Potato virus X RNA is altered in coinfections with Potato virus Y. *Virology* **182**(2), 486-94.
- VAUCHERET, H., and FAGARD, M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends. Genet.* **17**(1), 29-35.
- VERWOERD, T. C., DEKKER, B. M., and HOEKEMA, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**(6), 2362.
- VOINNET, O., PINTO, Y. M., and BAULCOMBE, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**(24), 14147-52.
- VOINNET, O., VAIN, P., ANGELL, S., and BAULCOMBE, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* **95**(2), 177-87.
- VOINNET, O., and BAULCOMBE, D. C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature* **389**(6651), 553.
- VOS, P., HOGER, R., BLEEKER, M., REIJAN, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMENA, J., KUIPER, M., and ZABEAU, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407-4414.
- VUYLSTEKE, D. R., CHIZALA, C. T., and LOCKHART, B. E. L. (1996). First report of *Banana streak virus* Disease in Malawi. *Plant Disease* **80**, 224.
- VUYLSTEKE, D. R., SWENNEN, R. L., and ORTIZ, R. (1993). Development and performance of black sigatoka-resistance tetraploid hybrids of plantain (*Musa* spp., AAB group). *Euphytica* **65**, 33-42.
- WATERHOUSE, P. M., WANG, M. B., and LOUGH, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**(6839), 834-42.
- WHITE, S. E., HABERA, L. F., and WESSLER, S. R. (1994). Retrotransposons in the flanking regions of normal plant genes: a role for copia-like elements in the evolution of gene structure and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**(25), 11792-6.

- YANG, W., and SUMMERS, J. (1999). Integration of *Hepadnavirus* DNA in infected liver: evidence for a linear precursor. *J. Virol.* 73(12), 9710-7.
- YOT-DAUTHY, D., and BOVÉ, J. M. (1966). Mosaïque du bananier: Identification et purification de diverses souches du virus. *Fruit* 21(9), 449-465.

summary

Inter-specific hybrids have, in the past few years, been shown to express symptom of *Banana streak disease* (BSD) that could not have originated from external sources of *Banana streak virus* (BSV). It was hypothesised that infections arose instead through a complex recombination pattern from viral sequences integrated into the *Musa* genome called BSV-OL Endogenous Pararetrovirus Sequences EPRVs. The aim of our study was to search for the genetic factor that activates EPRV expression during genetic cross hybridisation of two inter-specific crosses - PKW (BB) x IDN 110 4x (AAAA) and P. batu (BB) x P. pipit 4x (AAAA)-.

The study of the two F1 progeny showed Mendelian segregation of the disease with half of the hybrids containing virus. The observation of BSV strain Ol EPRV segregation occurs in a homozygous state at *Musa balbisiana* genome only. Ten AFLP markers were selected in female *M. balbisiana* parents. The segregation analysis allowed a genetic map of the locus responsible of disease expression, BEL *Banana streak virus* expresses locus, to be proposed. These data indicate that a genetic mechanism is involved in BSV appearance, and suggest that a monogenic allelic system confers the role of carrier to the *M. balbisiana* parent.

Two previously unidentified BSV strains in addition to BSV-Ol, have been detected in diseased hybrids: BSV-Imové (BSV-Im) and BSV-Gold Finger (BSV-GF) strains. The BSV-Ol and BSV-Im strains appeared in almost all diseased hybrids. In contrast, the BSV-GF strain was detected in only 49 percent of the diseased hybrids tested. The presence of BSV-GF and BSV-Im EPRVs among parental and progeny genotypes, shows that the *M. balbisiana* genome contains at least two other pathogenic BSV EPRVs. Genetic analysis resulting from AFLP results showed that BSV-OL and BSV-Im EPRVs' expression depends on the same genetic factor, the BEL locus. Although the BSV-GF is not genetically linked to the BEL locus, the BSV-GF strain appearance and the activation of corresponding EPRV(s) seem to be subordinated to the BEL locus. So, the discovery of new BSV EPRVs linked to BEL locus suggests that BEL differs in nature from BSV EPRVs.

Finally, we have investigated the regulation of EPRVs by investigating the "healthy" behaviour of *M. balbisiana* parents. A resistance to EPRVs expression has been demonstrated even when these parents are inoculated with BSV. Propositions as for the origin of integration mechanism of BSV are discussed.

Key words: *Badnavirus*, BSV, EPRV, Banana, inter-specific crosses, BSV expressed locus, allelic system, resistance.

Résumé

Ces dernières années des hybrides interspécifiques ont développé les symptômes de la maladie de la mosaïque en tirets, *Banana streak disease*-BSD, sans possibilité de contamination externe par le *Banana streak virus*-BSV. Il a été proposé comme hypothèse expliquant l'apparition de la maladie, que l'activation de séquences virales endogènes - EPRVs BSV, présentes dans le génome bananier soient à l'origine des virions observés. L'objectif de notre étude a été de rechercher un déterminant génétique de l'expression de la maladie au cours de l'hybridation génétique conventionnelle pour deux croisements interspécifiques - PKW (BB) x IDN 110 4x (AAAA) et P. batu (BB) x P. pipit 4x (AAAA) - sur lesquels la maladie apparaissait régulièrement.

L'étude des deux descendance F1 a montré une ségrégation à caractère mendélien de la maladie puisque la présence du virus a été notée pour 50 % des plants. L'observation de la ségrégation de l'EPRV BSV souche Ol a montré que cette dernière serait présente à l'état homozygote uniquement dans le génome *M. balbisiana*.

10 marqueurs AFLP ont été sélectionnés comme marqueurs moléculaires de l'expression de la maladie. Ils sont localisés uniquement chez les parents femelles *M. balbisiana*. L'analyse de leur ségrégation a permis de proposer une carte génétique du locus responsable de l'expression de la maladie -BEL *Banana streak virus* expressed locus. Les résultats de ces analyses génétiques révèlent chez ce parent, la présence d'un système allélique monogénique lui conférant le rôle de porteur sain.

L'analyse de la nature des souches virales présentes dans les hybrides malades a montré la présence de la souche BSV-Ol dans 98 % et révélé l'existence de deux nouvelles souches : BSV-Im présent dans 88 % des hybrides malades et BSV-GF présent uniquement dans la moitié d'entre eux. Les EPRVs correspondantes à ces souches ont été identifiées dans les génomes *M. balbisiana* et population hybrides suggérant le caractère pathogène de ces séquences. L'analyse génétique des marqueurs AFLP a montré que les souches BSV-Ol et BSV-Im sont génétiquement liées et dépendent du facteur génétique BEL. La souche BSV-GF apparaît non liée génétiquement au locus BEL mais reste cependant sous son contrôle. L'existence d'au moins trois EPRVs pathogènes dépendante du locus BEL renfermant le facteur d'activation implique que la nature de ce dernier est différente de séquences virales.

Nous avons tenté d'aborder le mécanisme de régulation des EPRVs en explorant le comportement « sain » du parent femelle *M. balbisiana*. Ce dernier présente une résistance tant à l'expression des EPRVs qu'à celle des souches BSV lors d'inoculations extérieures.

Des propositions quant à l'origine du mécanisme d'intégration et d'expression du BSV sont discutées.

Mots clés : *Badnavirus*, BSV, EPRV, Bananier, Croisements interspécifiques, BSV expressed locus, Système allélique, résistance.