# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

**En mécanismes des interactions parasitaires pathogènes et symbiotiques**

**École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau**

**Unité de recherche BGPI - Biologie et Génétique des Interactions Plantes-Parasites**

## Caractérisation des mécanismes de défense contre les intégrations virales de *Banana streak virus* et les infections qui en dérivent chez les bananiers hybrides natifs interspécifiques


**Présentée par Emeline RICCIUTI**


**Le 16 décembre 2019**

**Sous la direction de Marie-Line Iskra-Caruana**

**Devant le jury composé de**

| | |
|---|---|
| **Jean-Luc Gallois**, Directeur de recherche, INRA, UR GAFL, Avignon | **Rapporteur** |
| **Corinne Schmitt-Keichinger,** Maître de conférences, UMR SVQV, Université de Strasbourg | **Rapporteure** |
| **Christophe Brugidou,** Directeur de recherche, IRD, UMR IPME, Montpellier | **Examinateur** |
| **Claire Neema,** Professeure, Montpellier SupAgro, UMR BGPI, Montpellier | **Examinatrice** |
| **Katja Richert-Pöggeler,** Senior scientist, Julius Kühn-Institut, Braunschweig (Germany) | **Examinatrice** |
| **Marie-Line Iskra-Caruana,** Directrice de Recherche, CIRAD, UMR BGPI, Montpellier | **Directrice de thèse** |
| **Bruno Hostachy,** Directeur de l'unité RAPT, ANSES-LSV, Unité RAPT, Saint-Pierre | **Co-encadrant (invité)** |
| **Pascal Gentit,** Responsable de l'équipe virologie, ANSES-LSV, Unité BVO, Angers | **Invité** |

# Résumé / Abstract

Les bananiers cultivés sont constitués de deux espèces majeures : *Musa acuminata* (génome A) et *Musa balbisiana* (génome B). Le bananier plantain est un hybride triploïde naturel de ces deux espèces, AAB. Le génome B contient naturellement des intégrations du Banana streak virus (BSV), responsable de la mosaïque en tiret du bananier qui affecte habituellement la croissance et la production fruitière. Suite à des stress, ces séquences endogènes appelées « eBSV » peuvent déclencher une infection. Le plant spontanément infecté devient alors un réservoir d'inoculum viral disponible pour les cochenilles, vectrices de la maladie. A ce jour, aucune épidémie n'a été décrite dans les parcelles de plantain où des pieds de bananiers sont pourtant infectés. L'hypothèse testée durant cette thèse propose la mise en place par le bananier plantain d'un contrôle de l'infection virale hérité au cours de la coévolution avec ces séquences virales endogènes, et basé sur un mécanisme de type ARN interférent. Mes travaux de thèse visent à comprendre le fonctionnement du pathosystème en **1)** suivant la distribution du virus dans la plante et la dynamique de la charge virale lors d'une infection d'origine endogène grâce à des outils moléculaires (IC-PCR, qPCR), puis en **2)** caractérisant les ARN antiviraux impliqués dans la régulation de ces infections (TGS, PTGS) *via* leur séquençage profond. Par ailleurs, l'intensification des cultures de plantains dans un contexte de changement climatique multipliant les stress abiotiques, pose la question du risque épidémiologique pour les cultures environnantes de bananiers Cavendish, sans génome B et plus sensibles aux infections BSV. Une partie de mes travaux de thèse visent également à **3)** définir la localisation histologique des particules virales BSV pour estimer leur accessibilité pour les cochenilles vectrices de l'infection, puis à tester leur transmission à partir de plantains infectés vers des bananiers Cavendish sains, afin d'évaluer le risque que représentent ces infections d'origine endogène chez le plantain pour les cultures environnantes.

---

Cultivated bananas include two major species: *Musa acuminata* (A genome) and *Musa balbisiana* (B genome). Plantain is a natural hybrid of these two species, with a triploid AAB genome. B genome naturally contains integrations of Banana streak virus (BSV), responsible for Banana streak disease, usually affecting plant growth and fruit yield. Following stresses, endogenous viral sequences, reported as "eBSV", can trigger an infection. The infected plant then become a reservoir of viral inoculum available for mealybugs, vectors of the disease. So far, no epidemic was reported on plantain fields, though infected plants were detected. The tested hypothesis proposes that an infection control mechanism was developed in plantain during the coevolution with endogenous viral sequences, and that this defence mechanism rely on RNA silencing. This PhD project aims to understand this mechanism by **1)** following the virus distribution and viral titre dynamic following eBSV-derived infections, using molecular tools (IC-PCR, qPCR), and by **2)** characterizing antiviral sRNA involved in the regulation of these infections (TGS, PTGS) *via* sRNA deep sequencing. Beside this, the intensification of plantain culture, along with global warming and a growing frequency of abiotic stresses, raises the question of the epidemic risk for surrounding Cavendish banana cultures, without B genome and more susceptible to BSV infections. A part of my PhD results aim to **3)** define the histological localization of BSV particles to estimate their accessibility for mealybugs, and further to test their transmission from infected plantains to virus-free Cavendish banana, in order to evaluate the risk emerging from eBSV-derived infections in plantain for surrounding banana cultures.

# Laboratoire d'accueil

Cette thèse a été réalisée dans l'unité mixte de recherche **BGPI** :

**Biologie et Génétique des Interactions Plantes-Parasites**

INRA – CIRAD – SupAgro

Campus International de Baillarguet,

34398 Montpellier Cedex 5, France

Dans l'équipe **2B2E** :

**Biodiversité des Badnavirus Exogènes et Endogènes**

Sous la direction de :

**Marie-Line Iskra-Caruana**,

Directrice de Recherche CIRAD, UMR BGPI, Montpellier

Et avec le co-encadrement de :

**Bruno Hostachy**, Ingénieur de Recherche et Directeur de l'unité **RAPT :**

Ravageurs et Agents Pathogènes Tropicaux

au Laboratoire de Santé des Végétaux (LSV) de l'ANSES, Saint-Pierre

Ces travaux ont été cofinancés par le **CIRAD** et **l'ANSES**

# Remerciements :

Je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Jean-Luc Gallois, Corinne Schmitt-Keichinger, Katja Richert-Pöggeler, Christophe Brugidou, Claire Neema et Pascal Gentit; pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et mes travaux de thèse, et de partager avec moi vos compétences respectives.

> *De nombreuses personnes ont pavé le chemin parcouru ces trois années, et dont le résultat est présenté dans ce manuscrit. Tous ont façonné à leur manière ces années de thèse et la docteure que j'espère devenir. Dans ces quelques pages, je tiens à les remercier…*

Merci à **Marie-Line Iskra-Caruana**, ma directrice de thèse, pour m'avoir confié ce projet avec ta confiance et ta bienveillance. Merci pour ton accompagnement et l'autonomie que tu m'as laissée. Je te souhaite une belle retraite à venir, douce et familiale… Tu la mérites.

*Thank you*, **Mikhail Pooggin**. You gradually came into my PhD project, with keys sometimes such helpful. I admire your passion for science, and I wish you to keep enjoying it for the rest of your career.

*Thank you*, Rajendran Rajeswaran, « **Rajesh** ». You helped me practically and mentally when I needed it. I saw in you a perfect mix of kindness and high skills, and I wish this could be as useful to you as it has been for me, to go through these hard times.

Merci à **Delphine Massé** et **Bruno Hostachy**, collègue et co-encadrant ANSES depuis La Réunion. Merci pour tout le travail que vous avez réalisé, à coups de clip-cages et de PCR… Je sais que cette collaboration n'a pas tenu toutes ses promesses, et merci de m'avoir néanmoins accompagnée jusqu'au bout. Delphine, je te souhaite une belle thèse, bienvenue de l'autre côté du miroir…

Merci à **Nathalie Laboureau**, pour ta gestion du laboratoire, ton accompagnement aux débuts, et surtout pour ton soutien et ton sourire durant ces trois ans. Prend soin des suivants…

Merci à toute **l'équipe 2B2E**. J'ai très vite trouvé ma place dans notre équipe, et c'est sûrement grâce à chacun d'entre vous. **Serge**, merci de m'avoir aidé à prendre soin de mes bananiers. **Marie-Carmen**, merci pour ton aide administrative, toujours bienveillante. **Matthieu**, merci pour nos discussions scientifiques, et **Emmanuelle**, merci pour ton soutien. Merci à **Antonin**, mon premier stagiaire, qui a avancé un peu de mon travail en échange de pas mal de fous-rires. **Audrey**, on se croise à peine mais je fais confiance aux occasions qui arrivent pour se rattraper ! **Karthik**, *for your sincere empathy and kindness, and for handling our compagny with such patience in the office n° 124*… Et puis merci à **Valentin**, tout particulièrement. Toi qui a restauré le bureau de poèmes, de blagues nulles et d'une bonne dose de scotch. Tu m'as apporté dans cette dernière année un soutien inespéré, en forme de punch-line mais sur fond de sincère bienveillance. Je te souhaite une belle thèse, et si je peux te rendre la pareille, je le ferais sans hésiter.

Merci aux membres de mes comités de suivi de thèse : **Sébastien Massart, Jean-Luc Verdeil, Emmanuel Jacquot**. Merci pour nos discussions riches et bienveillantes lors de ces deux grandes réunions qui m'ont aidé à redéfinir le cap. Jean-Luc, merci pour ton soutien en tant que référent ED, et aussi pour ton œil expert en microscopie. Merci à la plateforme **PHIV**, qui m'a initié au merveilleux monde de l'imagerie. Le bananier est si beau vu de l'intérieur…

Merci à **Daniel Gargani**, pour ton œil expert en microscopie lui aussi, et pour cette passion que tu transmets si facilement. Merci à **Marie-Stéphanie Vernerey**, pour ton aide et tous les immuno-marquage que tu as réalisé pour mes travaux.

Merci à **Sébastien Ravel**, pour ton support en bio-informatique, pour ta patience et pour les centaines de jobs que tu as fait tourner pour moi. Sois sûr que si c'était à refaire, j'apprendrais à coder…

Merci à toute l'unité **BGPI**. Vous avez offert un bel accueil à ces vagues de doctorants ! Merci au **comité des fêtes** de nous offrir ces moments de partage qui forgent les souvenirs. Merci aux « **Bogoss** » pour l'organisation des séminaires et pour faire vivre la culture scientifique. Claire, pour ta bienveillance envers les doctorants. Merci à Katia et son affection débordante, à Henri pour nos discussions et pour ton sens du partage, à Sandrine pour son soutien régulier, à Isabelle P. pour avoir géré mes 1001 commandes de radioactivité, à Babeth et Claire pour avoir initié BGPI à la fête de la Science ; à Stella, pour ton soutien au détour de cafés ; à Michel A. pour les fossiles et ta bonne humeur, et à Michel P. pour nous avoir embarqué dans les joies du brassage de la bière (une joie qui ne me quitte plus depuis).

Je souhaite également remercier **Delphine Luquet** et **David Pot**, de l'UMR AGAP, pour m'avoir ouvert les portes du Cirad il y a 4 ans en encadrant mon stage de fin d'étude, marquant pour moi le début d'un attrait sincère pour l'agronomie.

> *Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans mes camarades de thèse, très vite devenus des amis plus que des collègues, une belle brochette …*

Merci à **Edwige** et **Coralie**, qui nous ont accueillis les bras ouverts. Edwige, merci pour avoir organisé ces moments entre doctorants, pour tes douces attentions et tes inégalables cookies. Coralie, merci pour ton recul sur la thèse et ta façon de trouver le positif, partout. J'ai hâte de voir grandir vos filles.
Merci à la promotion 2016-2019 : **Pascal** et tes partages d'expérience, toujours zen ; **Kévin** et tes histoires à foisons… bravo pour ce que tu as traversé, et vivement la suite dans ton bonheur à deux. **Albin**, merci pour nos fous-rires et ton affection pour l'humour nul. Je te souhaite de t'éclater dans ta vie de père et de scientifique, c'est plutôt bien parti. **Faustine**, merci pour ton empathie et ta bienveillance, et pour tes avis souvent si originaux. Je te souhaite de devenir chercheuse, ça t'irait franchement bien. **Maëlle**, merci pour ton énergie (tu as quand même réussi à me convertir à la course), nos discussions multiples, sans filtre, et pour être devenue une fidèle amie. **Maud**, ma très chère coloc' de bureau, merci pour ces trois années complices, des fous-rires aux larmes. Merci aussi pour nous avoir montré ton île (et tes rhums), tu sais que j'ai hâte d'y retourner un jour…
Merci aussi aux +1, parties intégrantes de cette troupe ! **Jérémy** et nos « check » de compet', **Raphaël** et ta patience à l'assurance (merci de m'avoir initié à l'escalade !), et **Yohann**, pour avoir pris soin de ma copine les week-end (ou était-ce plutôt l'inverse ?)
Et puis il y a eu les promotions suivantes, avec leurs lots de nouveaux copains : **Jérémy**, et ton positivisme à toute épreuve ; **Rémi,** dans la même trempe avec un yoyo en plus ; **Guillaume**, et nos (quelques) soirées d'escalade ; **Mathias**, avec ton talent d'improvisateur et ton goût pour provoquer les débats ; et **Thomas**, toujours là pour embrayer, prendre un café ou simplement refaire le monde… (tes 12 000 passages et massages par jour vont me manquer). Merci aussi aux autres copains de BGPI, **Florian**, pour être aussi bon public ; **Marie** et **Adeline**, pour la facilité déconcertante de nos discussions et de nos blagues ; **Anne**, pour tes attentions chocolatées (ça m'a marqué) et ta bienveillance. Enfin, aux dernières recrues, **Marie**, **Mélia**, **Alexandre**, je vous souhaite de très belles thèses.
Vivement nos prochains débats sur le monde, entrecoupés de bières et de pots de thèse (ça nous changera du Triskell). Avec une telle brochette, il y a de quoi croquer la vie à pleines dents, ou presque…

Comme les doctorants sont une grande famille, je tiens aussi à remercier quelques autres copains, du même bateau… **Sandy**, c'était toujours un plaisir de te croiser par surprise, et j'espère bientôt découvrir ta maison et tous tes projets. Les **doctorants d'AGAP**, Marion, Aurélien, Clara, Laurianne ; que j'ai croisé à mainte reprise sans jamais le prévoir… C'est sûrement plus que du hasard. Merci également à l'association « **Femmes et Sciences** » et les doctorantes rencontrées au gré des formations. Merci à ma mentor Danièle Noel, pour nos discussions autour d'un bagel. Je remercie également mes compagnons de l'aventure « **Ma thèse en 180s** » de Montpellier. Ce concours a médié plus de rencontres et d'échanges que de compétition, et c'était fort. Enfin je souhaite remercier mes copains de Strasbourg,

**Perrine, Chloé**, **Farah**, **Olivier**, **Magdalène**, **Duygu**, **Ophélia ;** qui m'ont embelli mes années d'études. J'ai hâte de vous retrouver, 3 ans après, on a quelques soirées à rattraper…

*Mes années de thèse ont été accompagnées de changements personnels, à commencer par mon déménagement à Montpellier. Des remerciements s'imposent pour ceux qui ont rendu cette ville et ces années fantastiques…*

Merci aux premiers coloc', la *casa bonita* du Père Soulas : **Margot**, **Béa**, **Rémi**, **Sabine**, **Davide** ; merci pour nos soirées au coin du feu, nos repas colocs fournis (« ramène ça, on sait jamais… ») et nos souvenirs mémorables de « Vegetal Party » ou au Cirque de Navacelles, *bien sûr*…

Merci aux seconds coloc': **Celia, Joachim**, **Mourad**, **Zaza**, **Anto**; merci d'avoir supporté mon état mental douteux en cette fin de thèse, et de rendre la vie facile et parsemée d'apéro. Du meilleur est à venir ! Et merci à ma boule de poils préférée, qui me donne de l'amour en *ronrons*…

Merci à toute la clique de *La Petite Bouffe* (et affiliés): **Nanou**, **Marjo** (vous êtes à l'origine de tout ça !), **Gillou**, **Eric**, **Mathilde**, **Pierre**, **Marc**, **Guillaume**, **Léa**, **Alban**, **Edith**, **Reno**. Merci pour les WE, le jaja, la bonne bouffe, la radio, le théâtre, les samedis midis… et aprem… et soir…, merci surtout pour la place naturelle que vous m'avez faite dans votre bande et pour votre soutien ces derniers mois.

Et merci à mes compagnons de théâtre, qui équilibrent ma vie chaque lundi soir sur scène.

*Enfin, je tiens à remercier ces proches, famille et amis d'avant Montpellier… mes soutiens infaillibles*

A mes amies de lycée, **Hélène**, **Anaïs**, **Claire**, **Florine**, **Julie** ; merci pour ces attentions régulières à distance, qui font qu'on se retrouve toujours avec le même plaisir. Vous êtes fantastiques.

A mes amis de colo', **Lulu**, **Julie**, **Florie**… je suis fin prête pour refaire le monde !

A mes amies d'enfance, **Pauline** et **Julie** ; merci d'avoir fait le trajet jusqu'à Montpellier, deux fois… En espérant que la prochaine, il ne pleuve pas ! Pauline, je me réjouis de voir ta famille s'agrandir…

A mon frère **Gaëtan**, que j'admire autant que j'aime. Merci pour ton soutien et pour imaginer ensemble notre monde idéal, je crois qu'un jour on y arrivera.

A mes parents, **Isabelle** et **Robert**, qui m'ont soutenu dans chacun de mes choix, et qui ont si souvent veillé sur moi, de loin, au cours de ces trois ans. Là aussi, du meilleur est à venir, mais je sais plus que jamais à quel point je peux compter sur vous. Pour ça et pour tout le reste, je vous aime.

A **Romain**, enfin, qui est entré dans ma vie au cours de ces trois années, et qui l'a radicalement changée. Tu charges mon quotidien d'amour et de rires, et ça rend ma vie nettement plus légère…

# Avant-propos

Le banane est un aliment de base dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales, qu'il s'agisse de bananes « dessert » ou de bananes « à cuire ». Les bananiers plantains sont un sous-groupe de bananiers produisant des bananes « à cuire », et sont des hybrides interspécifiques issus d'un croisement naturel entre deux espèces majeures de bananiers : *Musa acuminata* et *Musa balbisiana*. A la fin des années 1990, la mise en culture de bananiers plantains issus de programmes de sélection variétale, et donc hybrides « synthétiques », a entraîné l'apparition de foyers d'infections spontanées causées par un complexe d'espèces virales : les Banana streak virus (BSV). Ces infections résultent de l'activation d'intégrations virales de BSV naturellement présentes chez les bananiers plantains. Bien que ces intégrations virales soient aujourd'hui bien connues, et que leur mécanismes d'activation ait été largement étudié, le risque d'infections spontanées de BSV chez les plantains reste aujourd'hui encore incontrôlable. Par ailleurs, on assiste depuis quelques années à une intensification de la culture de bananiers plantains, pour répondre à une demande alimentaire locale et croissante. Cette intensification s'observe dans des régions également cultivatrices de bananiers dessert. Ces derniers sont sensibles au Banana streak virus, qui peut être transmis par plusieurs espèces de cochenilles. Dès lors, la proximité géographique des cultures de bananes dessert et de bananes plantains amène à questionner le risque épidémique lié aux intégrations de BSV.

L'un des angles d'approche nécessaire pour étudier cette question est de caractériser la mise en place de ces infections spontanées, ainsi que les mécanismes de régulation développés par les bananiers hôtes. C'est là que s'inscrit ce projet de thèse, qui vise à apporter des informations clés sur les infections liées aux intégrations de BSV pour aider à évaluer le risque épidémique qu'elles représentent. Le manuscrit présenté ici s'articule autour de différentes sections : **une introduction générale** puis trois chapitres distincts : le **chapitre 1** présente des suivis d'infections virales chez des plantains natifs et des plantains synthétiques, pour caractériser leurs dynamiques et d'éventuelles différences entre hybrides natifs et synthétiques. Le **chapitre 2** porte sur des travaux caractérisant les défenses antivirales mises en place chez les plantains, et basées sur l'interférence par ARN. Enfin, le **chapitre 3** présente des tests d'acquisition et de transmission du BSV par cochenilles, pour évaluer à terme le risque épidémique lié au BSV. Des publications soumises ou en cours de finalisation sont présentées dans chacun des trois chapitres. Enfin, une **discussion générale** clôt ce manuscrit en synthétisant les principaux résultats et en les confrontant à la littérature scientifique

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES 3

INVENTAIRE DES TABLES ET DES FIGURES (HORS ARTICLES) 6

INTRODUCTION 10

**I. Le bananier : une culture agronomique d'intérêt mondial 12**

1) Le bananier, une herbe géante 12
2) *Musa acuminata* et *Musa balbisiana* : deux espèces majeures de bananiers 14
3) La production de bananes : des ratios inégaux 18
4) Le génome B bananier : un atout et un ennemi pour la sélection variétale 20
5) Le Banana streak virus, agent causal de la maladie de la mosaïque en tirets 22

**II. Le *Banana streak virus*, un exemple clé de virus intégré 25**

1) Les virus de plantes et leur classification 25
2) Les Caulimoviridae, des pararétrovirus de plante 30
3) Le cas des pararétrovirus endogènes, ou « EPRV » 32
4) Les intégrations virales eBSV 34
5) Autres cas d'EPRV infectieux 42
6) Les intégrations virales : un mécanisme plus générique de coévolution ? 44

**III. L'interférence par ARN, ou « RNA silencing » 46**

1) Les petits ARN interférents 48
2) Les protéines Argonautes, facteurs clés de l'interférence par ARN 54
3) EPRV et défenses antivirales 58

**IV. Epidémiologie et gestion de risque 61**

1) Contrôles sanitaires pour la culture bananière 62
2) Gestion du risque épidémique lié au Banana streak virus 62
3) La transmission horizontale du BSV : un facteur épidémiologique clé 66

V. Problématique et hypothèses de recherche **72**

CHAPITRE 1 : Dynamiques d'infections BSV chez des bananiers hybrides natifs et synthétiques 76

**I. Introduction 77**

**I.1 *Article 1:* Méthode pour suivre une infection BSV chez des bananiers hybrides interspécifiques 79**

**I.2 Dynamiques d'infections chez des hybrides interspécifiques AAB 114**

**II. Matériels et méthodes 114**

**III. Résultats 120**

1) Répartition du virus dans un plant infecté et choix de l'organe de référence 120
2) Suivi de primo-infections BSV chez des hybrides natifs issus de *culture in vitro* 122
3) Infections BSV chez des hybrides natifs ramenés du champ 126
4) Infections BSV chez les hybrides synthétiques 128

5) Comparaison des charges virales entre hybrides synthétiques et natifs 132
6) Effet du mois et de la saison d'échantillonnage sur la charge virale mesurée 134
7) Sélection des plants pour la caractérisation des profils d'ARN antiviraux 136

**IV. Discussion 137**
1) Prévalence de BSOLV chez les hybrides natifs, en conditions contrôlées 137
2) Répartition du virus dans le plant et effets physiologiques 138
3) Fluctuations de charge virale et régulation d'infection 139
**V. Points clés du chapitre 1 140**

CHAPITRE 2 : Caractérisation des petits ARN impliqués dans la défense antivirale contre les eBSV et BSV 142
**I. *Article 2 (en cours)*: « How native plantain deals with viral infection derived from endogenous viral sequences of Banana streak virus » 143**
**II. Résumé de l'article et résultats annexes 143**
**III. Points clés du Chapitre 2 183**

CHAPITRE 3 : Localisation et accessibilité des particules virales BSV aux cochenilles pour leur transmission 184
**I. Introduction 185**
**II. Matériels et Méthodes 188**
**III. Résultats 196**
1) Caractérisation de l'acquisition et de la transmission du BSV par cochenilles 196
2) Localisation histologique des particules virales BSV chez le bananier 202
**IV. Discussion: 208**
1) Acquisition et transmission des particules virales BSV 208
2) Les particules virales BSV ne semblent pas être restreintes au phloème 209
3) Des taux de transmission qui restent à déterminer pour évaluer le risque épidémique 209
**V. Points clés du chapitre 3 211**
**VI. Disease Note 212**

DISCUSSION GÉNÉRALE 216
**I. Etablissement d'infections BSV d'origine endogène 218**
**II. Régulation des infections BSV chez les bananiers hybrides 225**
**III. Transmission du virus par cochenilles vectrices 234**
**IV. Perspectives : quels contrôles de la dispersion du BSV dans une bananeraie ? 236**

**REFERENCES 240**

# LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES

**Abréviations, acronymes**

ADN : Acide Désoxyribonucléique
Anova : Analysis of variance
ANSES : Agence Nationale de Sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'Environnement et du travail
ARN : Acide Ribonucléique
*ARN*sb: *ARN* simple-brin
*ARN*db: *ARN* double-brin
ARNm: ARN Messager
BAC: Bacterial Atificial Chromosom
BBL: Bois Blanc (cultivar)
BE: Big Ebanga (cultivar)
BEL: BSV Expression Locus
BGPI: Biologie et Génétique des interactions Plantes-Parasites (unité de recherche)
BLAST: Basic Local Alignement Search Tool
BSD : Banana Streak Disease
BSA: Bovine Serum Albumine
BWA : Burrows-Wheeler Aligner
CARBAP : Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains (Cameroun)
CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CIV : Culture *in vitro*
CP : Capsid Protein
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
dCAPS : derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
CRBP : Centre Régional Bananiers et Plantains (Cameroun)
DSBR : Double-Strand Break Repair
DCL : Dicer-Like Protein
eBSV: endogenous BSV
EF1α: Elongation factor 1 α
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPG : Electropénétrographie
EPRV : Endogenous Pararetrovirus
EMBRAPA : Entreprise brésilienne de recherche agricole (Brésil)
EVE : Endogenous Viral Element
FAO : Food and Agriculture Organization of United states
FHIA : Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
HN: Hybride Natif
HS: Hybride Synthétique

IC-PCR : Immunocapture-PCR
ICTV : International Comittee on Taxonomy of Viruses
IITA : Institut International d'Agriculture Tropicale (Nigeria)
IR : Intergenic Region
IRFA : Institut de Recherche sur les Fruits et Agrumes
ITC : International Transit Center (Belgique)
ISEM : Immunosorbent Electron Microscopy
LAMP : Loop Mediated Isothermal Amplification
LSV : Laboratoire de la Santé des Végétaux
LTR : Long Terminal Repeat
MxH: Macho x Hembra
NB: Northern Blot
NRCB : National Research Center for Banana (Inde)
NZ: Nzorba (cultivar)
nt : nucleotides
ORF : Open Reading Frame
PBS(-T) : Phosphate Buffered Saline (with Tween)
PCR: Polymerase Chain Reaction
PIF : Plantes Issues de Fragments
PKW : Pisang Klutuk Wulung
Pol (II, IV, V) : DNA Polymerase
PRV : Pararétrovirus
PTGS : Post-Transcriptionnal Gene Silencing
qPCR : quantitative PCR
RCA : Rolling Circle Amplification
RAPT : Ravageurs et Agents Pathogènes Tropicaux (unité de recherche)
RDR : RNA-dependant RNA polymerase
RISC : RNA-Induced Silencing Complex
RNaseH : Ribonuclease H
RPS2 : Ribosomal Protein S2
RT : Réverse Transcriptase
RT-PCR: Reverse-Transcriptase PCR
SB: Southern Blot
TGS : Transcriptionnal Gene Silencing
TNAU : Tamil Nadu Agricultural University (Inde)

## Types de petits ARN

miRNA : micro RNA
siRNA : small interfering RNA
hp-siRNA : hairpin-derived siRNA
natsiRNA : natural antisens siRNA
tasiRNA : trans-acting siRNA
phasiRNA : phased siRNA
easiRNA : epigenetically activated siRNA
hetsiRNA : heterochromatin-derived siRNA
rasiRNA : repeat-associated RNA
vsiRNA : viral siRNA

## Liste des virus cités

BBTV: *Banana bunchy top virus*
BSGFV : *Banana streak goldfinger virus*
BSImV : *Banana streak Imové virus*
BSMyV : *Banana streak Mysore virus*
BSOLV : *Banana streak obino l'ewai virus*
BSV : *Banana streak virus*
CaMV : *Cauliflower mosaic virus*
CMV : *Cucumber mosaic virus*
PVCV : *Petunia vein clearing virus*
ScBV : *Sugarcane bacilliform virus*
TVCV : *Tobacco vein clearing virus*

# INVENTAIRE DES TABLES ET DES FIGURES (HORS ARTICLES)

## Figures :

**Introduction**

Figure 1.1: Schéma d'un bananier et de ses organes clés……...11
Figure 1.2: Distribution géographique primaire des *M. acuminata spp.* et *M. balbisiana*…....13
Figure 1.3: Diffusion géographique des premiers bananiers triploïdes……13
Figure 1.4: Différences morphologiques entre *Musa acuminata* et *Musa balbisiana*……15
Figure 1.5: Domestication des bananiers et évolution des groupes génomiques *Eumusa*…….16
Figure 1.6: Diversité morphologique des bananes……16
Figure 1.7: Production mondiale de bananes……19
Figure 1.8: Génome et particules virales du Banana streak virus……...21
Figure 1.9: Symptômes de la maladie de la mosaïque en tirets sur des bananiers……23
Figure 1.10: Classification des virus de plantes selon leur génome……..28
Figure 1.11: Phylogénie des virus codant pour une réverse trancriptase……29
Figure 1.12: Cycle de réplication des rétrovirus et pararétrovirus animaux……..31
Figure 1.13: Chronologie des intégrations eBSV dans le génome B de bananier……35
Figure 1.14: Schéma des intégrations eBSV chez le bananier sauvage PKW……37
Figure 1.15: Environnements génomiques des eBSV……...37
Figure 1.16: Phylogénie des séquences de badnavirus décrites sur bananier ……...39
Figure 1.17: Structures des ePVCV, eTVCV et eBSV……..41
Figure 1.18: Voies de biogénèse des petits ARN endogènes chez les plantes……47
Figure 1.19: Schématisation de la production et du mode d'action des siARN antiviraux…….51
Figure 1.20: Structure de la protéine Argonaute 2 chez les eucaryotes……..53
Figure 1.21: Modes d'action des principales protéines AGO chez les plantes……53
Figure 1.22: Critères de sélection de l'ARN guide pour les principales AGO……..55
Figure 1.23: Biogénèse des siARN issus des séquences virales intégrées……..57
Figure 1.24: Prévalence mondiale de la mosaïque en tirets du bananier……63
Figure 1.25: Arbre de décision proposé pour l'échange de bananiers avec du génome B……..63
Figure 1.26: Acquisition de virus de plante par le puceron……65
Figure 1.27: Cycle de vie et élevage de cochenilles ……..68
Figure 1.28: Schéma et coupe histologique des tissus traversés par un virus lors d'une infection. 69

**Chapitre 1**

Figure 2.1 : Schéma d'une touffe de bananier……115
Figure 2.2 : Temps (mois) séparant chaque date d'échantillonnage……115
Figure 2.3 : Analyse semi-quantitative d'une immunocapture-PCR……119
Figure 2.4 : Analyse de la répartition de la charge virale par IC-PCR semi-quantitative…….119
Figure 2.5 : Statut infectieux des hybrides natifs « Big Ebanga » suivis……...121,123
Figure 2.6 : Dynamique de la charge virale chez 11 hybrides natifs suivis sur 5 à 7 dates……125
Figure 2.7 : Dynamique de la charge virale chez deux plantains ramenés du champ……125
Figure 2.8 : Schématisation du suivi d'une touffe lors d'une infection……127
Figure 2.9 : Dynamique de la charge virale chez les hybrides synthétiques……129
Figure 2.10 : Valeurs ajustées des ΔΔCt mesurées chez les hybrides synthétiques et natifs….131
Figure 2.11 : Valeurs ajustées des ΔΔCt mesurées à différentes saisons……..133
Figure 2.12 : Dynamique de la charge virale dans les échantillons sélectionnés pour la caractérisation des profils d'ARN antiviraux ……135

**Chapitre 3**

Figure 4.1 : Estimation visuelle des stades de développement de cochenilles (*P. citri*)……187
Figure 4.2 : Evaluation de l'efficacité d'amplification des amorces EF1α pour *P. citri*……..191
Figure 4.3 : Chronologie des essais associés à la transmission du BSV par cochenilles……...195
Figure 4.4 : Schématisation du test d'acquisition réalisé avec *P. citri*……..197
Figure 4.5 : Taux d'acquisition du virus dans les lots de cochenilles……197
Figure 4.6 : Charge virale mesurée dans les lots de cochenilles *P. citri* en fonction de la charge virale mesurée dans la feuille de bananier source……199
Figure 4.7 : Description histologique de nervure et de racine de bananier……..201
Figure 4.8 : Immunomarquage du Banana streak virus en microscopie à épifluorescence…..203
Figure 4.9 : Immunomarquage du Banana streak virus en microscopie confocale……204
Figure 4.10 : Immunomarquage contrôle du Banana streak virus en microscopie confocale..205
Figure 4.11 : Immunomarquage du Banana bunchy top virus en microscopie à épifluorescence 207

**Discussion**

Figure 5.1 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du cycle infectieux du BSV……...217
Figure 5.2 : Organisation des rejets autour du pied mère, en conditions naturelles……221
Figure 5.3 : Modèle général de régulation des eBSV et BSV chez des bananiers hybrides....227

## Tableaux :

**Introduction**

Tableau 1.1: Production bananière dans les principaux bassins de production mondiaux……..19
Tableau 1.2: EPRV identifiés chez les génomes de plantes depuis 1999……33
Tableau 1.3: Principales caractéristiques des modes de transmission horizontale…….65

**Chapitre 1 :**

Tableau 2.1: Origines, noms, génotypes et espèces infectant les plants suivis……113
Tableau 2.2: Résumé statistique des valeurs ΔΔCt dans la population de calibrateurs AAB…113
Tableau 2.3 : Récapitulatif des plants infectés et co-infectés par les espèces BSOLV et BSGFV 123

**Chapitre 2 :**

Tableau 3.1 : Origine, génotype et statut infectieux des 5 hybrides utilisés pour la reconstruction de génomes BSV ……181
Tableau 3.2 : Comparaison des génomes BSOLV et BSGFV reconstruit *de novo*……..181

**Chapitre 3 :**

Tableau 4.1 : Amorces utilisées en qPCR pour l'amplification de BSOLV et des gènes de références (EF1α et RPS2) chez les cochenilles (*Planococcus citri*) et bananier (*Musa*)……191
Tableau 4.2 : Descriptif des tests de transmission du Banana streak virus par cochenille…..195

# INTRODUCTION

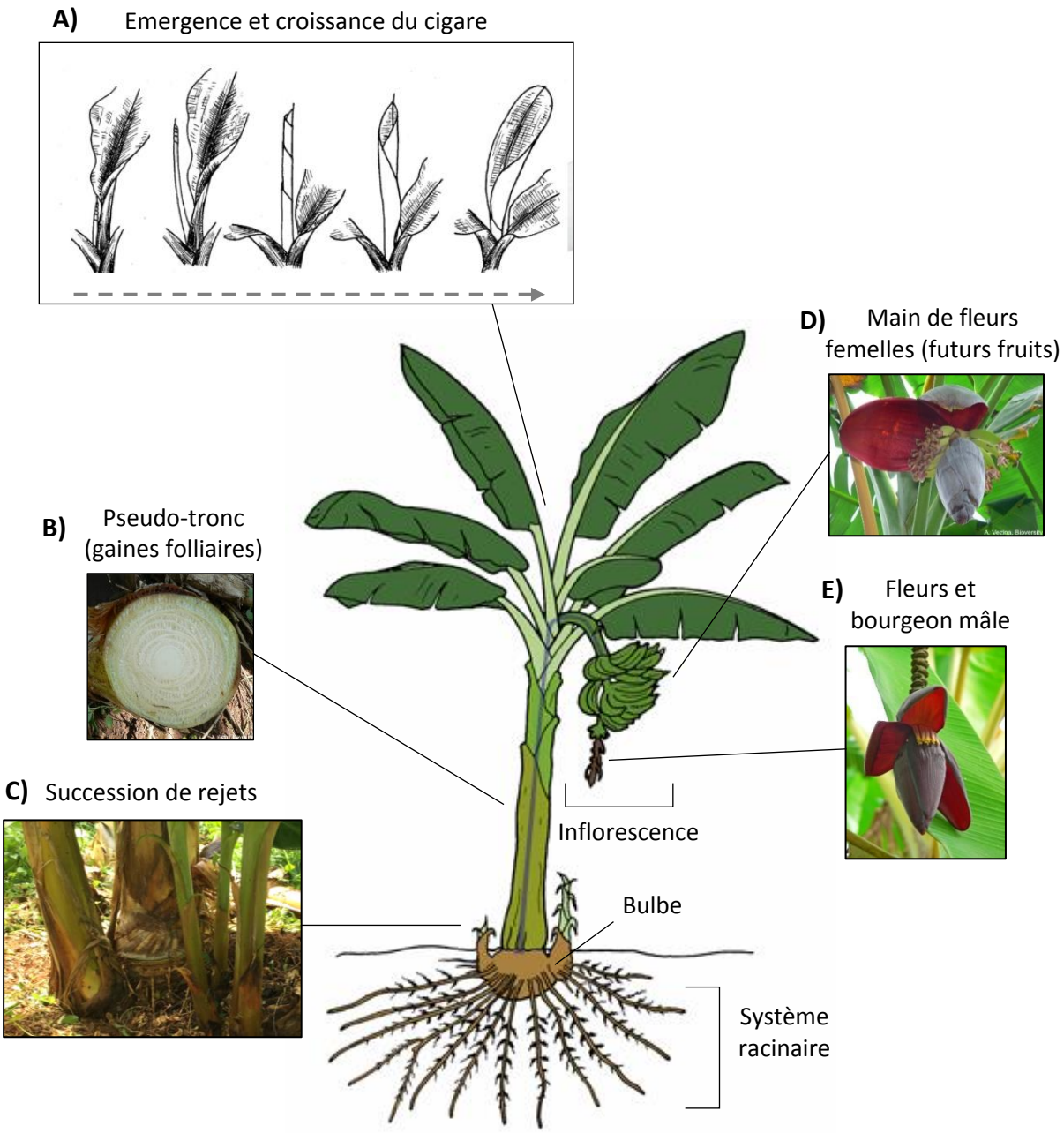



**Figure 1.1: Schéma d'un bananier et de ses organes clés** (source: promusa.org). Le bananier est composé d'un bulbe souterrain muni d'un système racinaire, d'où émerge le pied mère ainsi que des rejets (**C**, photo d'un pied mère avec un rejet principal à gauche et trois rejets secondaires à droite). Le pseudo-tronc est constitué de l'empilement des gaines folliaires (**B**, coupe transversale), entourant le méristème apical d'où émerge le cigare (**A**, phases de croissance du cigare). Lors de la phase d'inflorescence, le méristème apical forme une tige florale qui s'allonge et qui porte d'abord des fleurs femelles donnant des mains de fruits (**D**) et formant progressivement le régime de bananes. Le bourgeon mâle (**E**) apparaît à la fin de la phase florale.

# I. Le bananier : une culture agronomique d'intérêt mondial

## 1) Le bananier, une herbe géante

Le bananier est une espèce végétale naturellement présente dans les régions tropicales et subtropicales. C'est une herbe géante, monocotylédone, dont l'enchevêtrement des gaines foliaires forme un pseudo-tronc pouvant mesurer de 1 à 8 mètres de haut (Fig. 1.1). La croissance est apicale, avec un méristème apical unique d'où émergent les feuilles, d'abord enroulées en « cigare », puis déroulant leur limbe qui peut alors mesurer jusqu'à 2 m². La première phase de croissance peut durer de 6 à 8 mois, avec une production foliaire continue et en général 10 à 15 feuilles fonctionnelles simultanément. S'en suit une modification hormonale dans la fonction du méristème apical qui marque la phase d'initiation florale. L'apex central s'allonge (1m chez les Cavendish) pendant environ 3 mois avant l'émergence de l'inflorescence, qui peut alors être érigée à la verticale, perpendiculaire au pseudo-tronc ou bien être recourbée vers le bas. C'est la phase d'inflorescence. L'inflorescence forme des couronnes successives de pétales, des « mains », et sous chaque pétale se développent alors les fruits, terminés par une fleur. Les premières mains forment les fleurs femelles, avec des fruits développés qui, en l'absence de graines, se remplissent de pulpe. Les mains suivantes donnent des fleurs neutres, avec des fruits peu développés. L'inflorescence produit enfin les fleurs mâles qui tombent au fur et à mesure jusqu'à formation du bourgeon mâle composé de bractées superposées. Ce bourgeon est parfois consommé. Le décalage dans le temps de la formation des fleurs femelles et mâles empêche l'autofécondation du bananier. Le plant repose sur un bulbe, ou « rhizome », souterrain, constitué de méristèmes secondaires qui produisent les « rejets ». En conditions de culture, la coupe du pied principal, ou « pied mère », permet la croissance d'un ou des rejets formés autour, et marque le passage au cycle de culture suivant. Ce mode de multiplication végétative permet de maintenir un même bananier pendant plusieurs années et cycles de culture. La durée d'un cycle varie de 9 à 18 mois en fonction des cultivars et des zones de culture.

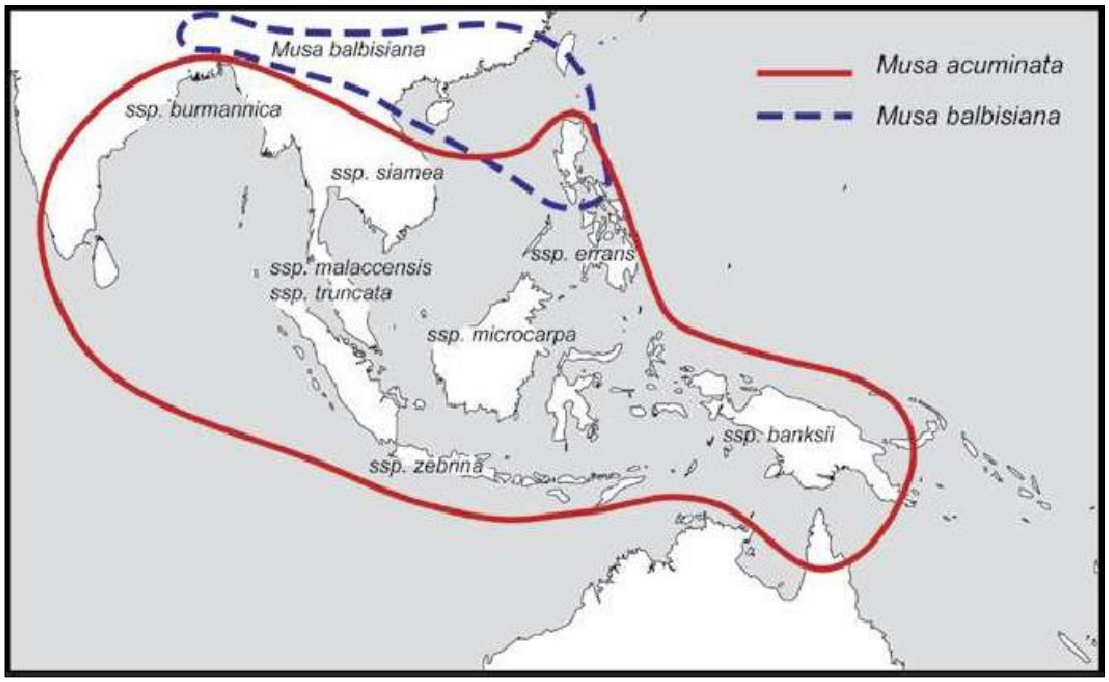



**Figure 1.2: Distribution géographique primaire de l'espèce *Musa balbisiana* et des sous-espèces (ssp.) sauvages de l'espèce *Musa acuminata*** (Simmonds, 1962)

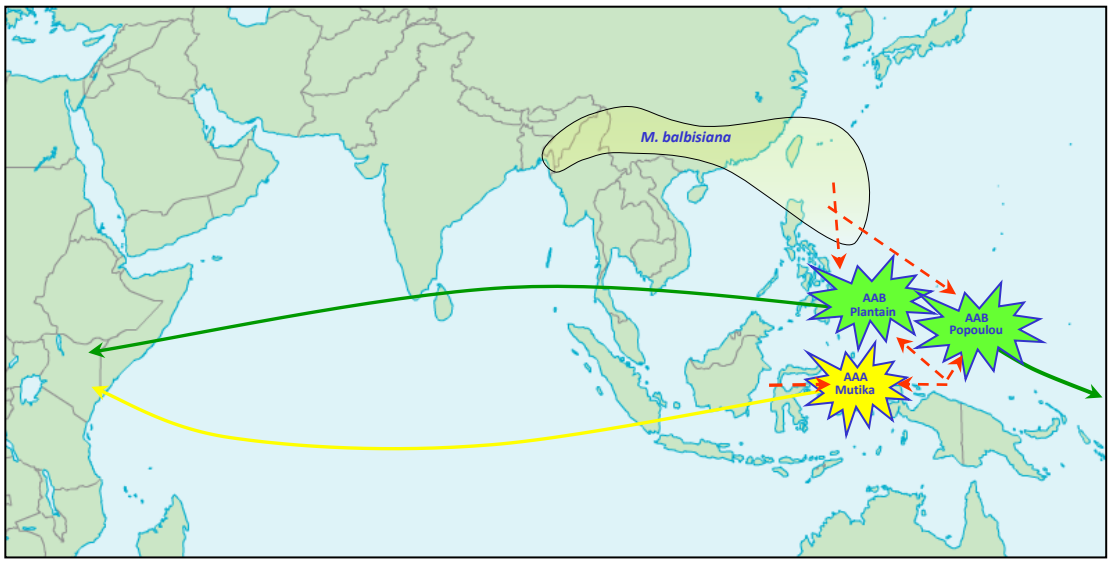



**Figure 1.3: Diffusion géographique des premiers bananiers triploïdes** (Perrier, 2009). Les lignes pleines indiquent les migrations à long terme des différents triploïdes (Plantains et Mutika vers l'Afrique, Popoulou ver l'Occéanie). Les lignes pointillées indiquent les contacts entre les diploïdes à l'origine de ces triploïdes.

## 2) *Musa acuminata* et *Musa balbisiana* : deux espèces majeures de bananiers

Les bananiers sont des espèces du genre *Musa*, et font partie de la famille *Musaceae* (ordre *Zingiberales*), qui contient également les genres *Ensete* (morphologiquement proche du bananier) et *Musella*. Le genre *Musa* contient plus de 50 espèces de bananiers, classées depuis 1947 (Argent, 1976) en 5 sections sur des bases morphologiques et sur le nombre de chromosomes : les *Eumusa* (2n=22), les *Rhodochlamys* (2n=22), les *Australimusa* (2n=20), les *Callimusa* (2n=20) et les *Ingentimusa* (2n=14). Depuis 2013, une nouvelle classification propose 2 sections, *Musa* (regroupant les *Eumusa* et *Rhodochlamys*) et *Callimusa* (regroupant les *Australimusa*, *Callimusa* et *Ingentimusa*), mais n'est pas encore mondialement utilisée (Häkkinen, 2013). La section *Musa* rassemble la majorité des espèces de bananiers cultivés, principalement issus de croisements entre les espèces ***Musa acuminata*** et ***Musa balbisiana***. Ces deux espèces ont une origine sauvage, dont le centre de diversité se situe dans le « triangle pacifique sud » qui s'étend de l'est de l'Inde au sud de la Chine et jusqu'aux îles sud d'Indonésie et de Nouvelle-Guinée (Lassoudière, 2007). Les espèces *M. acuminata* (génome noté A) et *M. balbisiana* (génome noté B) ont cependant des régions d'origine distinctes (Fig. 1.2). Des évènements de fécondations accidentelles, entre un gamète non réduit (2N) et un gamète réduit (N) de parents génétiquement distants, ont mené à l'apparition de triploïdes intra- (AAA) et interspécifiques (AAB, ABB). Ces bananiers triploïdes ont bénéficié de vigueur et de croissance plus importante, et d'une meilleure adaptation à des environnements variés, probablement grâce à l'apport d'un allèle supplémentaire pour chaque gène (Perrier et al., 2009). Leur culture s'est exportée au-delà du centre de diversité d'origine (Fig. 1.3). La domestication du bananier a été basée sur la sélection de caractères clés tels que la parthénocarpie (absence de graines dans les fruits) et la polyploïdie (principalement la triploïdie) souvent associée à une croissance plus vigoureuse et à la production de fruits plus gros (Fig. 1.5). La mutation génétique menant au caractère parthénocarpique est probablement apparue dans l'espèce *M. acuminata* (génome A), car aucun individu diploïde BB n'a été reporté à ce jour comme portant ce caractère.

Le mode de multiplication végétatif du bananier a ensuite permis le maintien de tels individus dépourvus de graines dans le temps. L'activité humaine est probablement liée à l'apparition d'hybrides interspécifiques (génomes A x génomes B) et intra-spécifiques entre des génomes A distants. Aujourd'hui, les bananiers à usage alimentaire sont classés selon leur génotype et la contribution majeure des génomes A et B dans celui-ci. On distingue quatre « groupes » : AA, AAA, AAB et ABB (Simmonds and Shepherd, 1955). Des différences morphologiques existent entre les bananiers porteurs de génomes A et B, et selon leur ploïdie (Fig. 1.4).

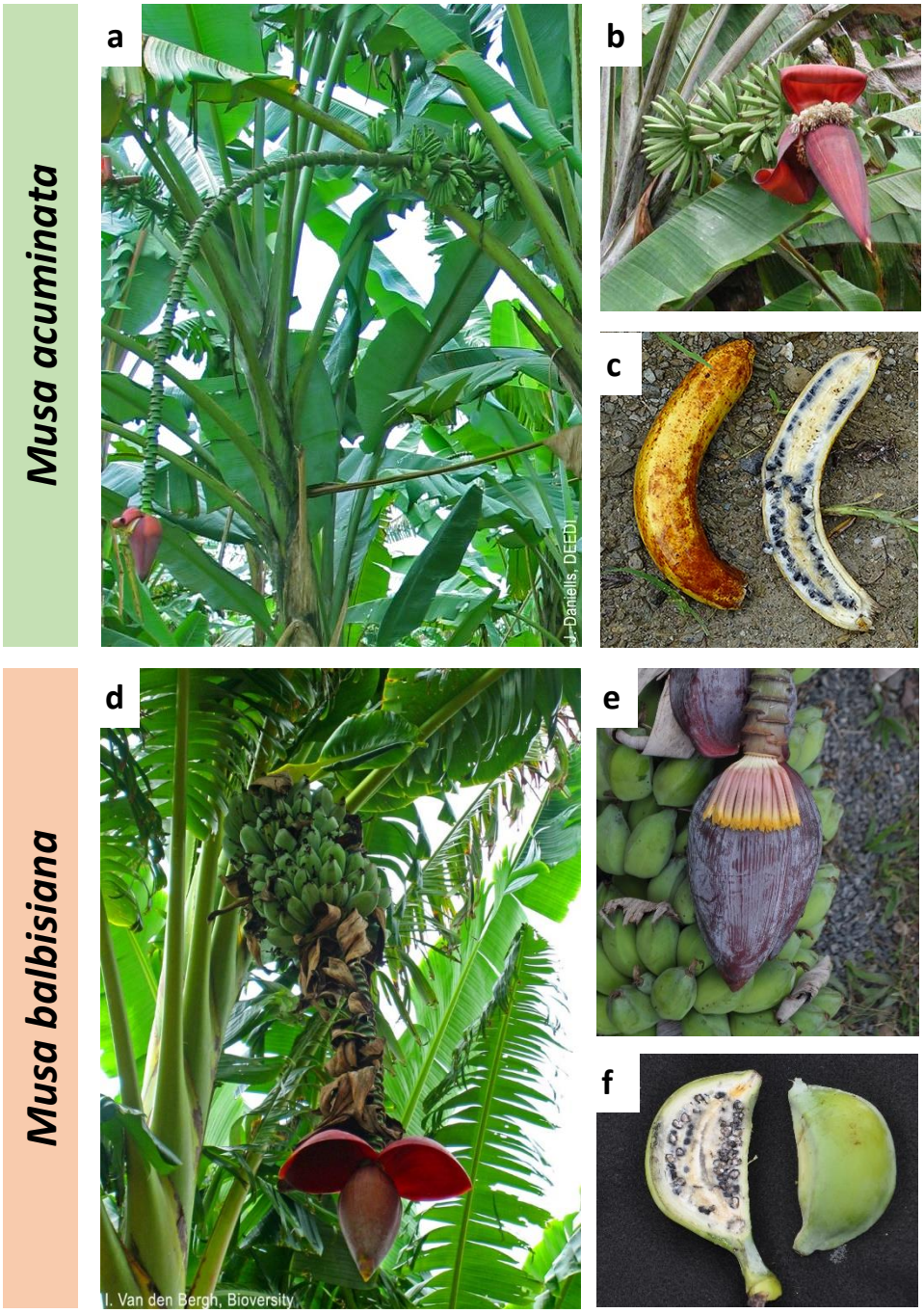



**Figure 1.4: Différences morphologiques entre *M. acuminata* et *M. balbisiana.*** **a)** Plant et inflorescence de *M. acuminata ssp. malaccensis*, **b)** Fleurs et bourgeon mâle de *M. acuminata, spp. malaccensis,* **c)** Fruit de *M. acuminata, ssp. banksii*. **d)** Plant et inflorescence de *M. balbisiana*, **e)** Bourgeon mâle de *M. balbisiana* et **f)** Fruit de *M. balbisiana*.

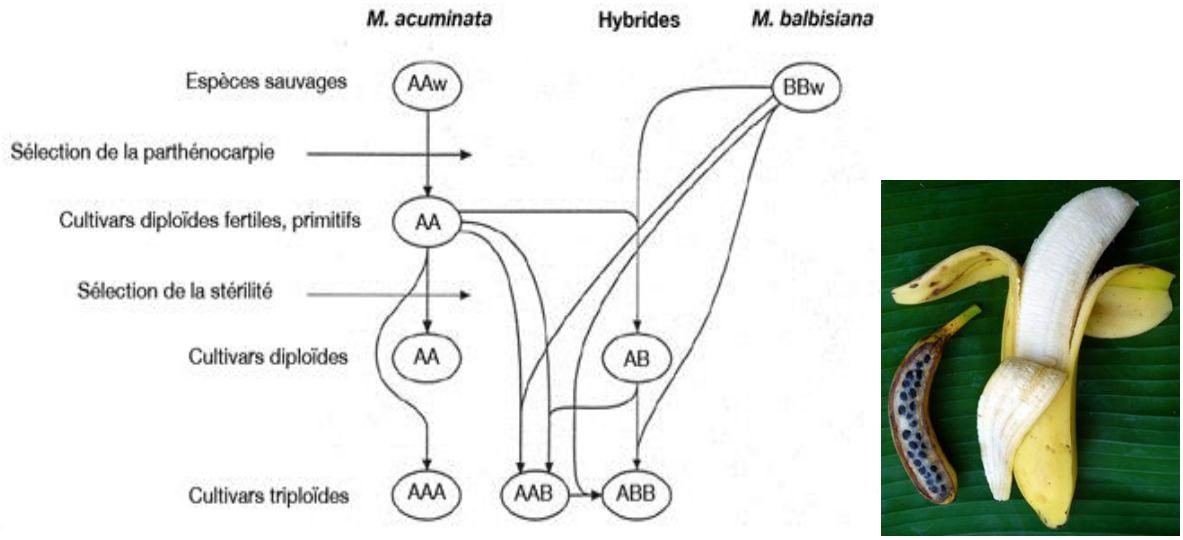



**Figure 1.5: Domestication des bananiers et évolution des groupes génomiques *Eumusa*** (Jones, 1999). « w » pour « wild type » : sauvage. **Droite**: comparaison d'un fruit de *M. acuminata* sauvage (AA), non parthénocarpique (à gauche) et d'un fruit du groupe « Cavendish » (AAA), parthénocarpique et mondialement cultivé (à droite, ©A. D'Hont, CIRAD).




**Figure 1.6: Diversité morphologique des bananes.** La lettre indiquée au-dessus de chaque régime réfère au cultivar (Heslop-Harrison et Schwarzacher, 2007). **a)** cv. « Red », AAA, banane dessert. **b)** cv. Palayam Codan", AAB. **c)** cv. "Njalipoovan", AB, banane dessert, verte ou jaune. **d)** cv. "Robusta", groupe Cavendish AAA. **e)** cv. "Nendran", AAB, banane à cuire ou banane chips. **f)** cv. « Peyan », ABB, banane à cuire. **g)** cv. « Poovan », AAB.

Ces différences ont permis d'établir une première taxonomie des bananiers, bien avant le développement d'outils moléculaires. Des caractères comme la couleur du pseudo-tronc, le port général de la plante, la forme ou la couleur de la fleur mâle permettent de différencier les espèces sauvages *M. acuminata* et *M. balbisiana* (Fig. 1.4). Les bananiers ayant un génome B ont un cycle végétatif généralement plus long, avec moins de rejets et une production fruitière plus faible que les bananiers avec un génome monospécifique $(A)_n$. La plupart des différences morphologiques se concentrent cependant dans les fleurs et donc dans les fruits (Fig. 1.6). Les bananiers du sous-groupe plantain ont des fruits fermes, à la chair jaune-orange, qui nécessitent une cuisson pour digérer une partie de l'amidon présent en forte teneur. Les bananes dessert varient également en goût selon le génotype du bananier, allant de fruits très sucrés pour le cv. Lady Finger (génome AA) à des fruits plus fades chez le sous-groupe Cavendish (génome AAA). Le bananier plantain est un sous-groupe du groupe « AAB », qui inclut 2 groupes géographiquement distincts : les plantains africains, et les plantains du Pacifique. Le terme « sous-groupe » réfère à un ensemble de cultivars et dérivés clonaux de ces cultivars. Tous les plantains ont donc un génotype AAB, mais tous les membres du groupe AAB ne sont pas des plantains. Les plantains regroupent une grande diversité de cultivars (>100), dont les fruits sont des bananes dites « à cuire ».

### 3) La production de bananes : des ratios inégaux

La production de bananes dessert d'export repose aujourd'hui très majoritairement sur le sous-groupe « Cavendish » (triploïde AAA). Surnommées parfois les « bananes dollars », les bananes Cavendish ont remplacé le cultivar « Gros Michel » du sous-groupe AAA dans les années 1960, autrefois cultivé mondialement mais sensible à la maladie de la fusariose. Les cultures de bananiers Cavendish sont des monocultures intensives et clonales qui irriguent le marché mondial de la banane, ce qui en fait un des fruits les plus consommés dans le monde. En 2018, l'exportation mondiale de bananes dessert atteignait 19.2 millions de tonnes, soit 4% de plus qu'en 2017 (FAO 2018). Les pays exportateurs majeurs se situent en Amérique latine et dans les Caraïbes (15 millions de tonnes), l'Equateur exportant à lui seul plus de 6 millions de tonnes de bananes chaque année, suivi par le Guatemala et le Costa Rica. Les Etats-Unis et l'Europe représentent 59% de l'import mondial de cet or jaune (FAO, 2018). Malgré cette exportation importante, 87% des bananes cultivées restent destinées à l'alimentation locale (Bioversity International, 2008). La production mondiale de bananes dessert en 2017 était de 114 millions de tonnes (FAOSTAT, 2017), principalement cultivées en Amérique centrale et Amérique de sud et en Asie du sud-est où les principaux producteurs, la Chine et l'Inde, n'exportent quasiment rien de leur production bananière (Fig. 1.7, Tableau 1.1).

Le marché de la banane plantain est radicalement différent. La banane plantain est très peu exportée, et principalement cultivée à petite échelle, dans des cultures vivrières en association avec d'autres plantes comme le manioc, la pomme de terre ou les légumineuses. La production mondiale de plantain s'élève à 40 millions de tonnes par an (FAOSTAT, 2017), soit près de trois fois moins que celle de la banane dessert. L'Afrique subsaharienne est un acteur majeur de production de bananes plantain, où leur production dépasse celle de la banane dessert (Fig. 1.7). La banane plantain contribue dans cette région à la sécurité alimentaire *via* l'autoconsommation et les revenus générés par sa vente. Cependant la demande alimentaire locale pour la banane plantain augmente, et l'on observe en réponse une augmentation de la production de plantain. La production globale de plantain était de 29 millions de tonnes dans le monde en 2014, soit une augmentation de plus de 25% en trois ans (FAOSTAT, tableau 1.1), et la diminution de la disponibilité par habitant indique une augmentation de sa mise sur le marché. Les principaux pays producteur (La République Démocratique du Congo, l'Ouganda, le Cameroun, le Ghana, la Colombie, le Nigeria) bénéficient depuis les années 2000 de l'obtention de matériel en grande quantité, notamment grâce aux techniques de plantes issues de fragments (PIF) et plus récemment de culture *in vitro* (CIV).

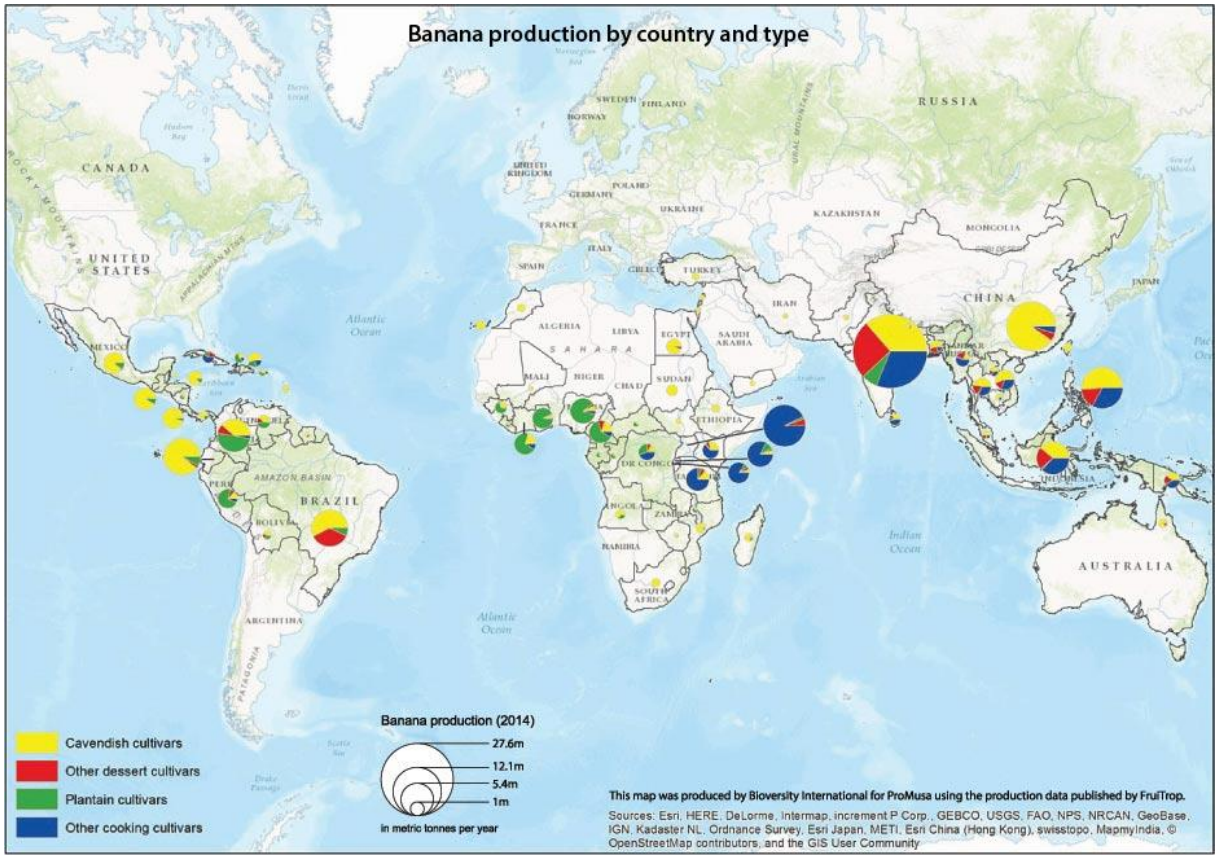



**Figure 1.7: Production mondiale de bananes** (rapport FruiTrop, 2014). La production de bananes dessert du sous-groupe AAA « Cavendish » (jaune), d'autres cultivars de bananes dessert (rouge), de bananes à cuire du sous-groupe AAB « Plantain » (vert) et des autres cultivars de bananes à cuire (bleu) sont indiqués pour chacun des principaux pays producteurs.

| | *Mondiale* | *Amérique centrale* | *Caraïbes* | *Amérique du Sud* | *Afrique* | *Asie du Sud-est* | *Océanie* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Banane dessert** | **114** | 10 | 2 | 18 | 20 | 17,6 | 1,7 |
| **Plantains** | **40** | 1 | 2 | 4,3 | 24 | 7,5 | 0,02 |

**Tableau 1.1: Production bananière, en millions de tonnes, dans les principaux bassins de production mondiaux** (FAO, 2018)

### 4) Le génome B bananier : un atout et un ennemi pour la sélection variétale

Face à la demande alimentaire croissante pour la banane, différents programmes de sélections variétales ont vu le jour. Le principal objectif au-delà des caractères agronomiques lié au régime porte sur la sélection de variétés résistantes aux principaux pathogènes de bananier, et notamment les pathogènes fongiques comme *Fusarium oxysporium*, l'agent responsable de la fusariose (ou maladie de Panama). Le deuxième objectif porte sur le rendement des plants et la robustesse des fruits pour l'export. Les objectifs prioritaires sont cependant différents selon si l'idéotype visé sert le marché d'exportation ou le marché local. On compte aujourd'hui 6 pôles majeurs impliqués dans l'amélioration variétale du bananier : le FHIA (Honduras), l'EMBRAPA (Brésil), l'IITA (Nigeria), le CARBAP (Cameroun), les pôles du TNAU et NRCB (Inde), et le CIRAD (France). Le génome B de l'espèce *Musa balbisiana* a bénéficié d'un fort intérêt au regard des avantages agronomiques qu'il apporte dans les croisements interspécifiques : robustesse, production d'un système racinaire fort, résistances à divers pathogènes (Bakry et al., 2009). Dans les années 1990, les hybrides interspécifiques avec du génome B créés au sein de ces programmes ont été mondialement commercialisés grâce à l'apport de résistances face à des pathogènes, ou bien grâce à de meilleurs rendements (hybrides type banane plantain de la FHIA dont FHIA-1, -3 et FHIA-21 (AAAB), et hybrides type banane dessert du CIRAD dont IRFA-909, -910, -914 (AAB), par exemple). Distribués et commercialisés à grande échelle en Amérique Latine (Costa Rica, Equateur, Colombie) et dans la zone Caraïbe (Cuba, République Dominicaine), les hybrides de la FHIA, dont le FHIA-21, ont systématiquement développés les symptômes de la maladie de la mosaïque en tiret (décrite dans la section suivante), sans explication possible de contamination extérieure. Dans le même temps, le CIRAD a envoyé en Australie des hybrides AAB (IRFA-909, -910 et -914) pour tester la résistance fongique avant leur mise en marché. Les essais furent rapidement stoppés suite à l'émergence de la maladie de la mosaïque en tirets. L'agent causal de cette maladie est le virus de la mosaïque en tirets ou **Banana streak virus (BSV)**, un badnavirus de la famille *Caulimoviridae*, qui a été trouvé intégré de manière naturelle aux génomes B de bananiers (LaFleur, 1996; Harper et al., 1999; Ndowora et al., 1999a). Certaines de ces intégrations virales se sont révélées « actives », et à l'origine des infections spontanées reportées sur les hybrides AAB et AAAB nouvellement créés (voir section II.4.a).

Dès lors, les échanges internationaux de matériel végétal contenant du génome B ont été fortement impactés et régulés. Un moratoire diffusé par le CIRAD en 2000 demandait l'arrêt

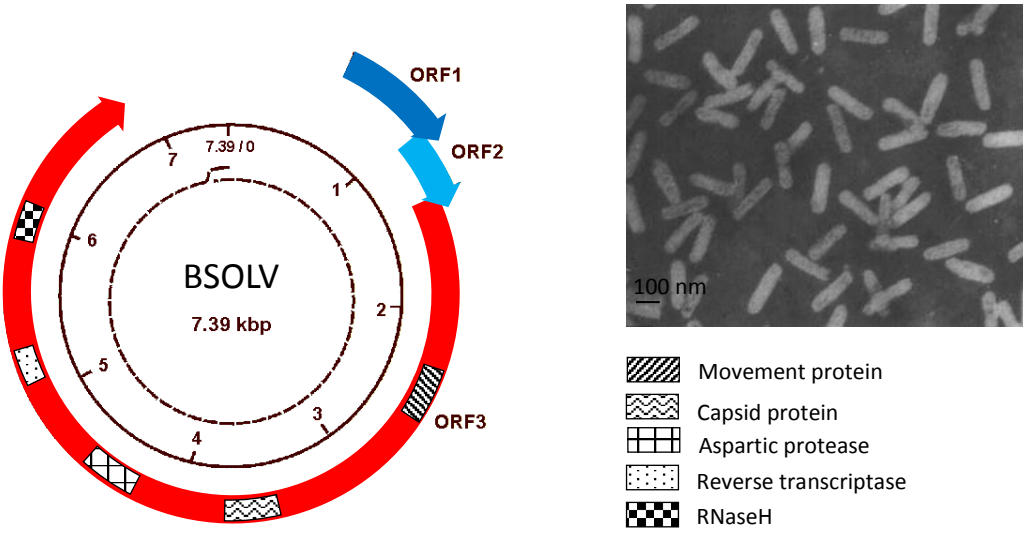



**Figure 1.8: Génome et particules virales du Banana streak virus.** (**gauche**) Organisation du génome BSOLV (Harper & Hull, 1998). Les flèches bleu foncé, bleu ciel et rouge indiquent les ORF1, ORF2 et ORF3, respectivement. Le génome ADNdb circulaire du BSOLV (7,39kb) est indiqué en trait plein, l'ARN pré-génomique est indiqué en trait pointillé. (**droite**) Particules virales de BSV bacilliformes observées en microscopie électronique (Lockhart, 1986).

complet d'échanges de bananiers comportant un génome B, incluant les différents hybrides interspécifiques sélectionnés par le CIRAD. En 2008, près de 300 accessions de plantains et autres groupes génétiques (AAB hors plantains, ABB, AAAB) présents dans la collection de référence mondiale de bananiers *in vitro* (international transit center, ou ITC) et représentant 20% de la diversité des accessions *Musa* de l'ITC ont été retirés des échanges mondiaux. Ces accessions incluaient également du matériel destiné à des croisements pour la production de nouveaux hybrides résistants à des stress biotiques et abiotiques.

### 5) Le Banana streak virus, agent causal de la maladie de la mosaïque en tirets

Le Banana streak virus, ou « BSV », est un complexe d'espèces virales appartenant au genre *badnavirus*, famille *Caulimoviridae*. Les badnavirus sont des virus à ADN encapsidés dans des bacilles de 30 à 120nm de longueur (Lockhart, 1986, Fig. 1.8). Le génome du BSV est circulaire à ADN double-brin, et mesure de 7,2 à 8,2kb selon les espèces (Fig. 1.8). La réplication du génome se fait *via* un ARN pré-génomique, grâce à une réverse transcriptase (RT) codée par le génome viral. Le BSV, comme tous les Caulimoviridae, est donc classé parmi les pararétrovirus (détaillés dans la section II.2). Le génome du BSV contient trois cadres ouverts de lecture, ou « ORF ». Les ORF 1 et 2 codent pour des petites protéines (~14kD) aux fonctions inconnues à ce jour, et l'ORF 3 code pour une poly-protéine (~210kD) comprenant les modules de protéines de mouvement, de capside, de la protéase aspartique qui permet le clivage de la poly-protéine, de la réverse transcriptase (RT) qui permet la synthèse de l'ARN pré-génomique pendant la réplication, et enfin le module de la RNaseH1, qui permet le clivage de l'ARN pré-génomique.

Quinze espèces de BSV sont différenciées sur la base d'une région nucléotidique de la RT/RNaseH (dernier rapport de l'ICTV, Siddell et al., 2019). Ces espèces se distribuent dans deux des trois clades phylogénétiques rassemblant les séquences « badnavirales » isolées de bananiers (Gayral and Iskra-Caruana, 2009; Iskra-Caruana et al., 2014a, 2014b). Ainsi, le clade 1 regroupe les espèces BSV pour lesquelles il existe les formes épisomales (particules virales libres) distribuées à travers le monde et ayant ou non une forme intégrée au génome B des bananiers (Fig. 1.16). Le clade 3 comprend les espèces BSV pour lesquelles aucun homologue intégré n'a été rapporté, ces espèces étant toutes originaire d'Ouganda où plusieurs épidémies ont été reportées. Ces différentes espèces de BSV sont néanmoins responsables d'une seule et même maladie, **la mosaïque en tirets du bananier.**

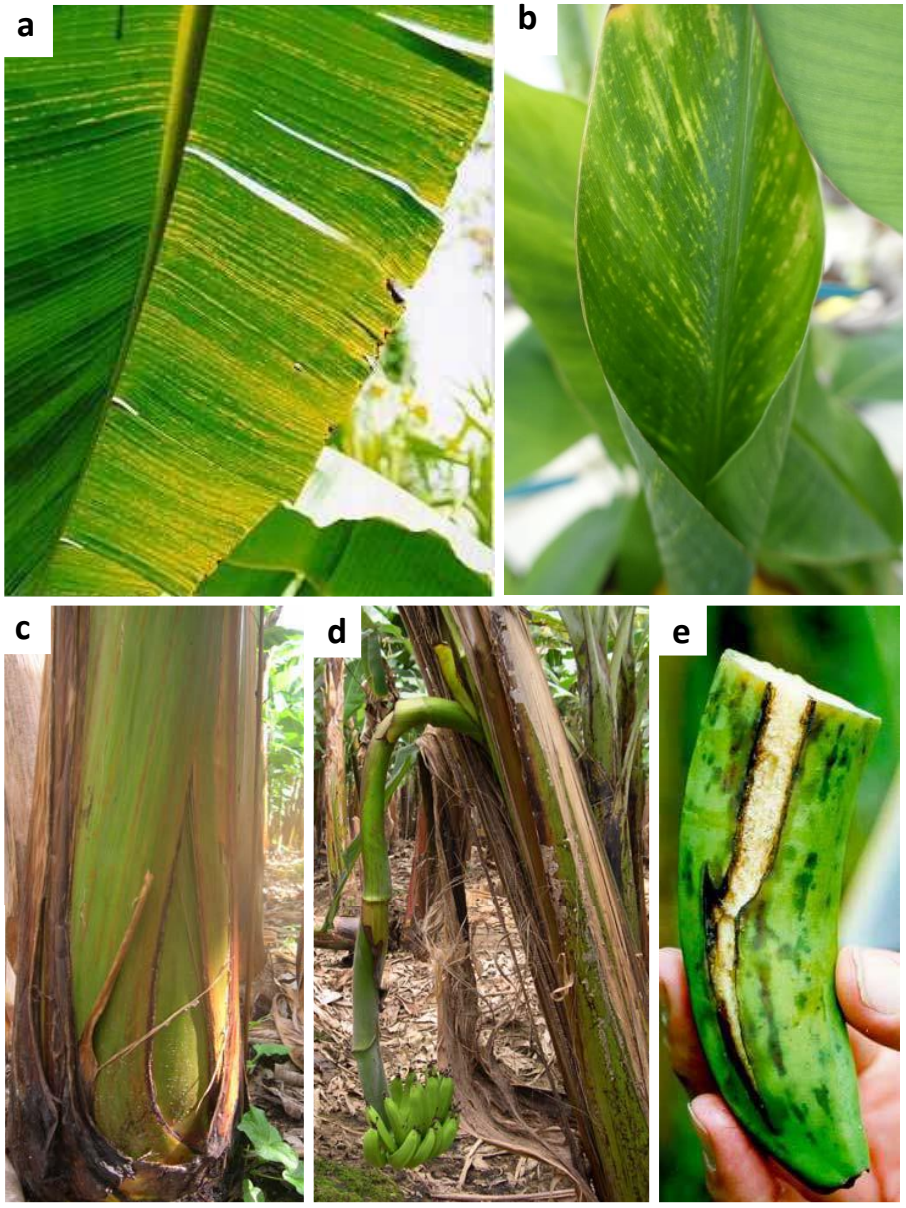



**Figure 1.9: Symptômes de la maladie de la mosaïque en tirets sur des bananiers**. Les symptômes d'une infection par le Banana streak virus sont **a)** des cassures chlorotiques sur les feuilles développées et **b)** sur le cigare en développement (lorsque l'infection est systémique), **c)** un éclatement du pseudo-tronc duquel peut émerger la tige florale et le régime **(d)**, et éventuellement des nécroses et cassures sur les fruits **(e)**. Photographies a) M-L Iskra-Caruana; c) et d): P-Y Teycheney; b) E. Ricciuti; e) S. Dallot.

La mosaïque en tirets tient ce nom des principaux symptômes qu'elle provoque : des cassures de la ligne chlorotique sur la feuille se transformant en nécroses (Fig. 1.9). Un autre symptôme marquant est l'éclatement du pseudo-tronc, parfois remplacé par un rejet sortant directement de celui-ci, et laissant une brèche dans le pseudo-tronc qui peut favoriser une surinfection. Le méristème peut également pourrir, stoppant alors la croissance du pied. Si le plant parvient à donner un régime, des tirets ou points nécrotiques apparaissent sur les fruits, et la peau des fruits est éclatée. La maladie affecte la taille du pied, le rendement fruitier ainsi que la vitesse de croissance (Jones, 1999). Lassoudière *et al.* (1974) reportaient en Côte d'Ivoire une différence de 30 à 40cm sur des bananiers Cavendish (cv. « Poyo ») infectés par rapport aux bananiers sains, au bout du 2$^{ème}$ cycle de culture sous infection. La conséquence de ce retard de croissance consiste en un écart d'environ un mois pour l'apparition des rejets, et une perte de rendement fruitier allant de 7 à 90% selon la sévérité des symptômes. En Australie, les infections BSV sont à l'origine d'un retard de production de 18 jours et d'une perte annuelle de rendement d'environ 6% (Daniells et al., 2001). D'autres cas extrêmes de mosaïque en tirets du bananier ont par le passé été reportées au Rwanda et au Nigéria, où la maladie menait à la mort des bananiers (Lockhart, 1995).

Les symptômes et leur intensité sont extrêmement variables selon les cultivars, l'espèce BSV, et les conditions environnementales (effet de la température et de la saison sur l'apparition et l'intensité des symptômes, Dahal et al., 1998). Au cours d'un même cycle de culture, la gravité des symptômes varie, avec une corrélation entre le stade d'initiation florale et l'apparition ou l'augmentation des symptômes (Bhat et al., 2016a). Ainsi, des plants infectés peuvent être asymptomatiques dans certaines conditions. La ressemblance des symptômes avec ceux induits par le Cucumber mosaic virus (CMV) a longtemps laissé penser que ces deux infections n'en étaient qu'une, avant que les particules virales de Banana streak virus ne soient identifiées (Lockhart, 1986). Le BSV est retrouvé sur les membres de la famille *Musacea* uniquement (*Musa* et *Ensete*), et a été reporté sur une grande diversité de cultivars *Musa* de tous les groupes génomiques (incluant les génomes A et B).

# II. Le Banana streak virus, un exemple clé de virus intégré

## 1) Les virus de plantes et leur classification

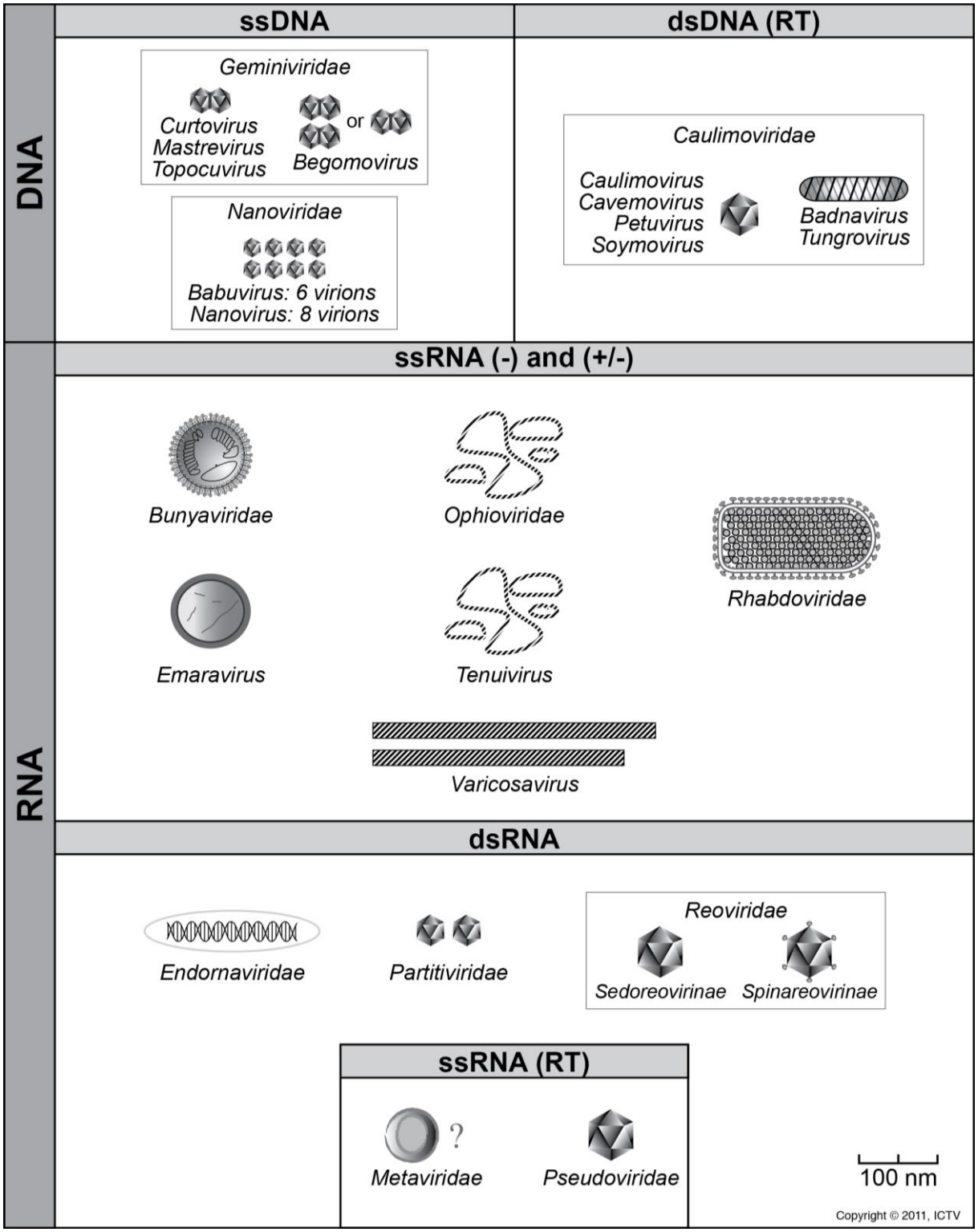
Les virus sont des entités composées de matériel génétique (ARN ou ADN), et nécessitant une machinerie cellulaire externe pour se répliquer. Leur classification dans le vivant, et le critère d'organisme « vivant » fait débat. D'abord définis dans les années 1930 comme des entités pathogènes de petite taille, c'est-à-dire capables de passer par des pores retenant tous les microorganismes connus, ils apparaissent aujourd'hui comme un ensemble bien plus vaste, incluant des entités pathogènes et non pathogènes, de tailles extrêmement variables. R. Hull a proposé dans la 5ème édition de « Plant Virology » (Hull, 2014) une définition des virus intégrant tous les critères qui les distinguent des organismes cellulaires et des plasmides :

« *Un virus est un ensemble d'une ou plusieurs molécules composées d'acides nucléiques, ARN ou ADN, normalement encapsulées dans une enveloppe protective ou dans une enveloppe protéique ou lipoprotéique, capable d'organiser sa propre réplication uniquement dans certaines cellules hôtes. Un virus peut généralement être transmis horizontalement entre hôtes. Dans les cellules hôtes, la réplication du virus i) dépend de la machinerie de synthèse protéique de l'hôte, ii) est organisée à partir d'un ensemble du matériel génétique requis et non pas par fission binaire, iii) est localisée dans des sites non séparés de la cellule hôte par une membrane continue à bicouche lipidique, et iv) produit en continue des variants génétiques via différents types de modification des acides nucléiques*. »

La classification utilisée pour les règnes du vivant repose sur une hiérarchisation de l'importance des critères pour distinguer différents taxons (unités taxonomiques), et n'est pas adaptée pour les virus. Il n'existe en effet pas assez d'informations fonctionnelles sur l'importance relative de différents critères tels que la sérologie, la transmission ou la stratégie de réplication d'un virus pour son maintien dans une population hôte. Par ailleurs, la simple séquence nucléotidique ne suffit pas à estimer les différences mécanistiques entre deux virus, puisqu'une différence de nucléotide peut être silencieuse comme modifier drastiquement le fonctionnement d'un virus, selon le type de différence et le locus concerné. C'est pourquoi une classification internationale a été mise en place depuis les années 70 avec la création d'un comité international pour la taxonomie des virus (ICTV), qui prend en compte à la fois les homologies de séquences nucléotidiques mais également les critères biochimiques, sérologiques et épidémiologiques des virus. Cette classification regroupe les virus en espèces,

genres, familles et ordres (niveau croissant de regroupement). L'ICTV est l'organisme référent pour la classification des virus à ce jour, et est chargé de valider ou d'invalider la définition de nouvelles espèces virales et la création de nouveaux taxons viraux. Cette classification est en constante modification et amélioration. Au-delà de cette classification en taxons hiérarchisés, les virus peuvent également être assignés à des groupes génétiques, selon la nature de leur génome (ADN, ARN, simple ou double-brin). Cette classification a été proposée par Baltimore (Baltimore, 1971) et propose sept groupes distincts selon la méthode de synthèse de l'ARN messager : les virus à ADN double-brin (groupe I), les virus à ADN simple-brin (groupe II), les virus à ARN double-brin (groupe III), les virus à ARN simple-brin positif (groupe IV), les virus à ARN simple-brin négatif (groupe V), les virus à ARN simple-brin codant pour une réverse-transcriptase (RT) (groupe VI) et les virus à ADN double-brin codant pour une RT (groupe VII). Les différents taxons de la classification de l'ICTV ségrégent dans chacune de ces classes. D'autres agents « pseudoviraux » tels que les prions, les viroïdes ou les virus satellites ne sont pas inclus dans ces groupes, bien que considérés dans la classification de l'ICTV.

Parmi les virus de plantes, ou « phytovirus », 1016 espèces sont décrites à ce jour (auxquelles s'ajoutent 306 espèces supposées), regroupées en 92 genres et 21 familles (King et al., 2011). Les phytovirus sont retrouvés dans 6 des 7 groupes génétiques proposés par Baltimore (Fig. 1.10). Le groupe non représenté chez les phytovirus est celui des virus à ADN double-brin ne codant pas pour une RT. En effet, une seule famille virale à ADN double-brin infecte les plantes, la famille *Caulimoviridae*, qui codent pour une réverse-transcriptase, et qui sont également nommés « **pararétrovirus** ».


DNA
ssDNA
dsDNA (RT)
Geminiviridae
Curtovirus
Mastrevirus
Topocuvirus
or
Begomovirus
Nanoviridae
Babuvirus: 6 virions
Nanovirus: 8 virions
Caulimoviridae
Caulimovirus
Cavemovirus
Petuvirus
Soymovirus
Badnavirus
Tungrovirus
RNA
ssRNA (-) and (+/-)
Bunyaviridae
Ophioviridae
Rhabdoviridae
Emaravirus
Tenuivirus
Varicosavirus
dsRNA
Endornaviridae
Partitiviridae
Reoviridae
Sedoreovirinae
Spinareovirinae
ssRNA (RT)
?
Metaviridae
Pseudoviridae
100 nm
Copyright © 2011, ICTV

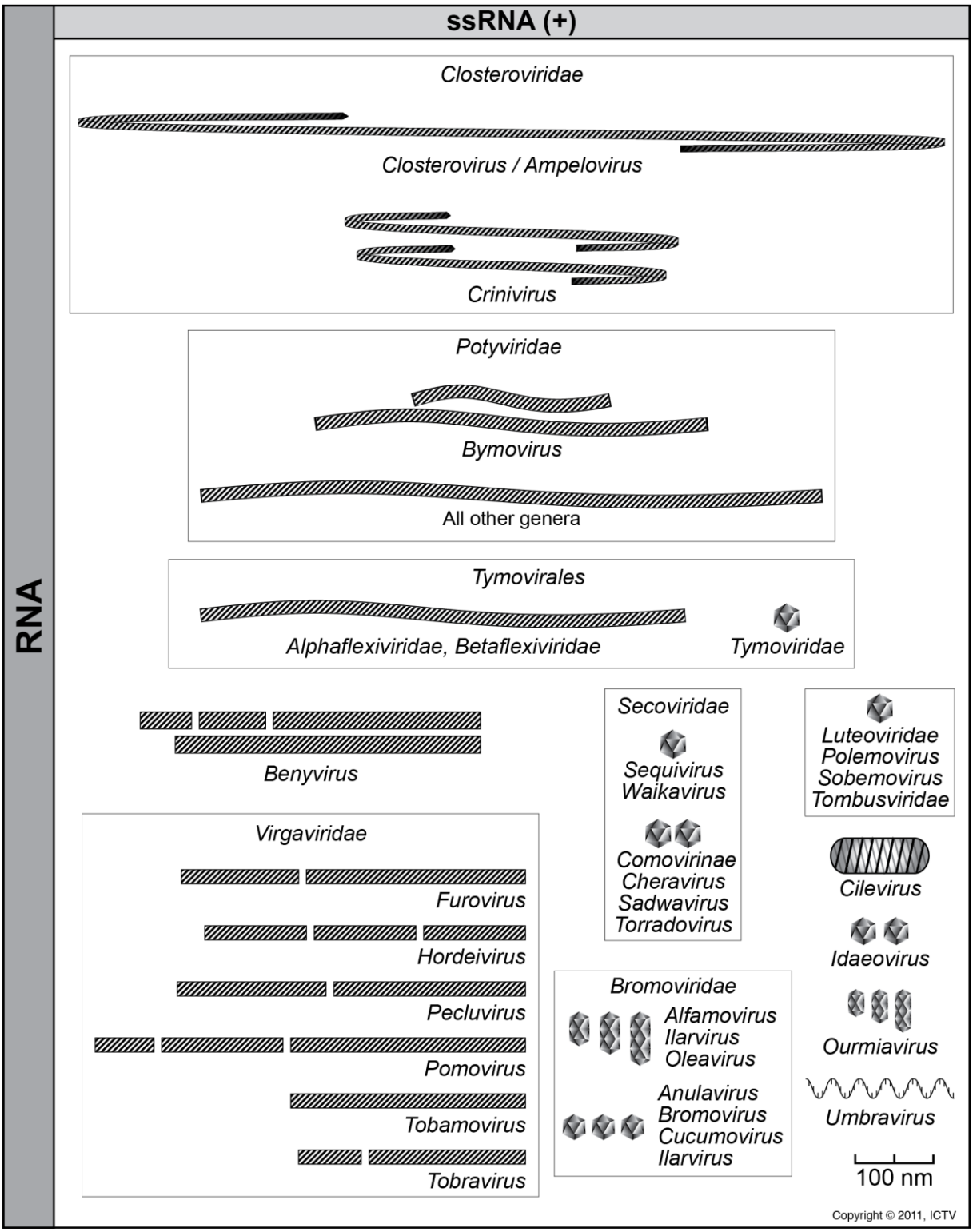



**Figure 1.10: Classification des virus de plantes selon leur génome** (King, 2011).

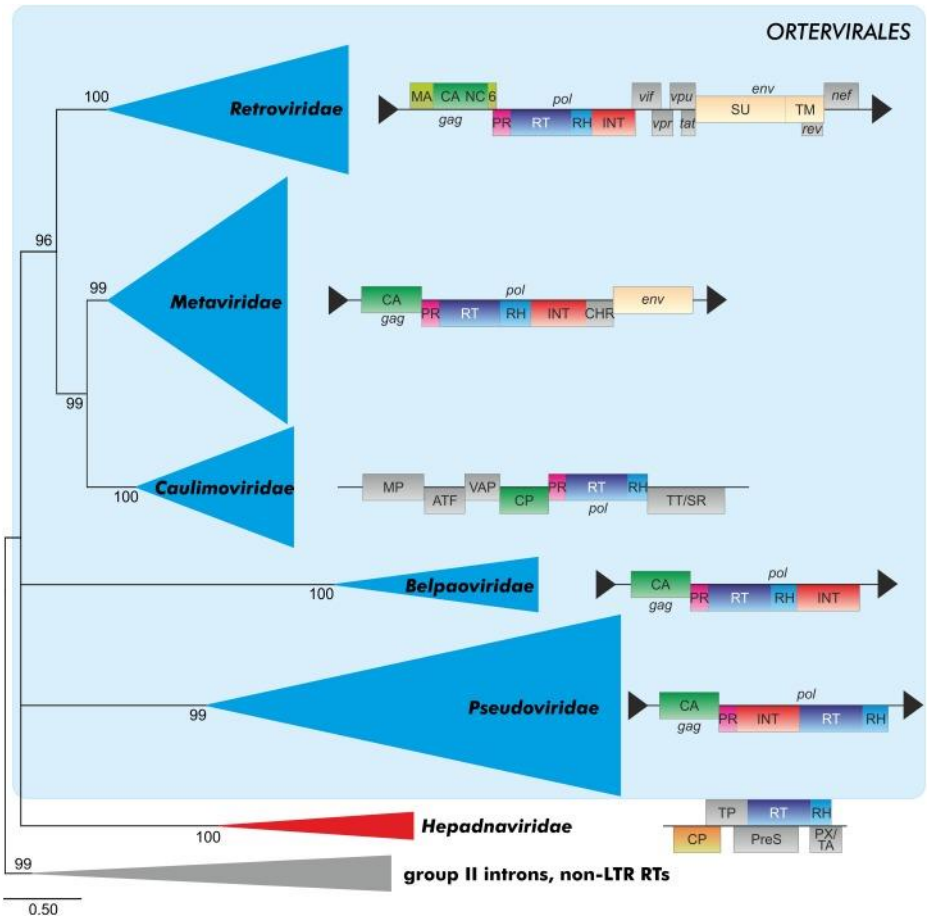



**Figure 1.11: Phylogénie des virus codant pour une réverse trancriptase** (Krupovic et al., 2018). La phylogénie des réverses transcriptases (RT) virales est calculée d'après la méthode de "maximum-likelihood", et sur la base de 290 virus. L'organisation des génomes de chaque taxon est indiquée à côté de celui-ci. Les triangles noirs indiquent les "long terminal repeats " (LTR). Abbréviations: 6: protéine de 6-kDa; ATF, "aphid transmission factor"; CA/CP, "capsid protein"; CHR, "chromodomain"; INT, "integrase"; MA, "matrix protein"; MP, "movement protein"; NC, "nucleocapsid"; PR, "protease"; PreS, "presurface protein (envelope)"; RH, "RNase H"; SU, "surface glycoprotein"; TM, "transmembrane glycoprotein"; TP, "terminal protein domain"; TT, "translation *trans*-activator"; SR: "suppressor of RNA interference"; VAP, "virion-associated protein".

## 2) Les Caulimoviridae, des pararétrovirus de plante

A ce jour, la famille *Caulimoviridae* est classée dans le sous-ordre des pararétrovirus (*Pararetrovirinae*), eux-mêmes classés dans l'ordre des *Retrovirales* (Hansen and Heslop-Harrison, 2004), un ordre qui inclut également les rétrovirus (sous-ordre *Orthoretrovirinea*) et les rétro-transposons (sous-ordre *Retrotransposineae*, qui regroupe les familles *Metaviridae* et *Pseudoviridae*). Cette classification est néanmoins changeante, avec les récentes études phylogénétiques prenant en compte les similarités de gènes clés comme les gènes codant les protéines de capsides et nucléocapsides (Krupovic and Koonin, 2017). Une nouvelle classification propose le la disruption du sous-ordre des pararétrovirus pour regrouper les *Caulimoviridae* avec les familles *Metaviridae*, *Retroviridae*, *Belpaoviridae* et *Pseudoviridae* dans l'ordre des *Ortervirales* (Fig. 1.11, Krupovic et al., 2018). Cet ordre exclut la famille *Hepadnaviridae*, qui regroupe des pararétrovirus animaux, car considéré comme issus d'un ancêtre distinct. J'utiliserais néanmoins dans ce manuscrit le terme de « pararétrovirus » pour référer aux virus à ADN codant pour une RT et ayant une étape de réverse-transcription médiée par cette RT dans leur cycle de réplication.

La famille *Caulimoviridae* contient huit genres (King et al., 2011): les *Caulimovirus*, les *Cavemovirus*, les *Petuvirus*, les *Rosadnavirus*, les *Solendovirus*, les *Soymovirus*, les *Tungrovirus* et les *Badnavirus* (dont fait partie le virus de la mosaïque en tirets des bananiers – le Banana streak virus). A ces genres acceptés par l'ICTV s'ajoutent d'autres genres supposés appartenir aux *Caulimoviridae*, tels que les *Florendovirus*, un genre regroupant des séquences virales intégrées aux génomes d'une grande diversité d'angiospermes (Geering et al., 2014), ainsi que d'autres *Caulimoviridae* integrés aux génomes de mousses et fougères (*Fernendovirus* 1 et 2), aux conifères (*Gymnendovirus* 1 à 4) et à nouveau à des angiospermes (*Xendovirus*, *Yendovirus*, *Zendovirus*) (Diop et al., 2018; Gong and Han, 2018). Les Caulimoviridae sont des virus à ADN double brin circulaire codant pour une RT, et dont le cycle de réplication comporte des similitudes avec celui des rétrovirus animaux. La figure 1.12 permet de comparer les cycles de réplication des rétrovirus et pararétrovirus (incarnés par le genre *Hepadnavirus*) chez les animaux. Une fois entrés dans les cellules hôtes, les pararétrovirus sont dirigés vers le noyau *via* un signal de localisation nucléaire porté par les protéines de capsides virales. Le virus est désencapsidé et seul l'ADN pénètre dans le noyau de la cellule, où il forme un minichromosome circulaire par association à des protéines d'histone une fois ses interruptions de séquences réparées par des enzymes cellulaires. Ce minichromosome est appelé « ADN viral épisomal ».

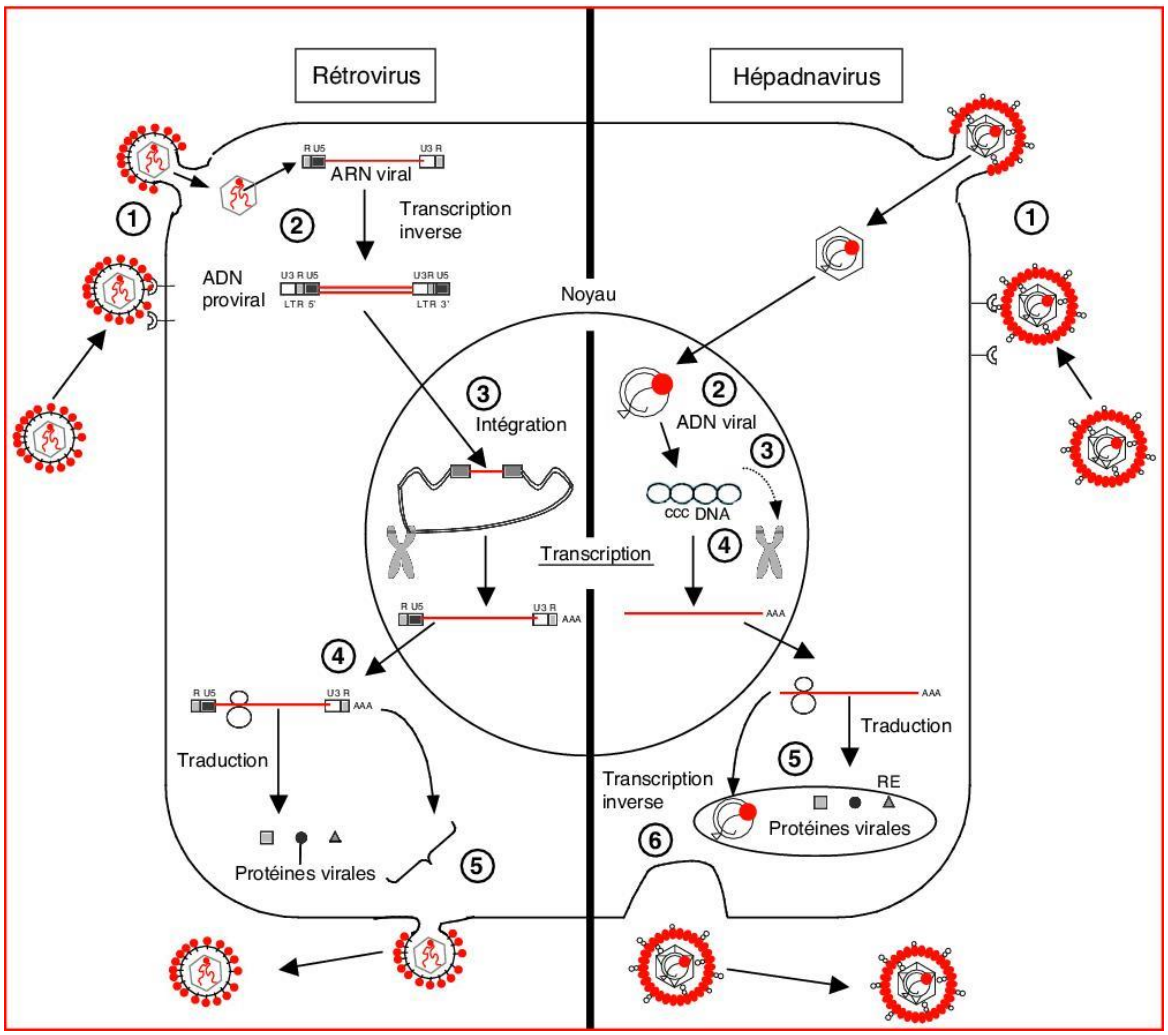



**Figure 1.12: Cycle de réplication des rétrovirus et pararétrovirus animaux** (Iskra-Caruana, 2003) **Rétrovirus :**Les rétrovirus pénètrent dans la cellule (1), où la reverse transcriptase (RT) virale convertit l'ARN en ADN (2). De courtes séquences de 6 à 13 nt, situées dans les séquences longues de répétition (LTR) du génome viral, permettent l'intégration du provirus dans l'ADN nucléaire de la cellule hôte (3), grâce à une intégrase codée par le virus. Le provirus intégré est transcrit en ARN messager puis traduit (4) par la machinerie de transcription et de traduction de l'hôte. L'ARNm sert à la fois à la production de protéines virales et constitue une réplique de l'ARN génomique viral. Les cellules infectées assemblent et relarguent des particules virales infectieuses contenant l'ARNsb viral (5). **Hépadnavirus :** Les hépadnavirus pénètrent dans la cellule (1) où l'ADNdb génomique viral (comportant des discontinuités) est transporté vers le noyau puis transformé en ADNdb super-enroulé (2, cccDNA pour « covalently closed circular DNA »). Des intégrations accidentelles au génome de l'hôte peuvent alors résulter de recombinaisons illégitimes avec l'ADN génomique de l'hôte (3). L'ADN viral super-enroulé sert de matrice pour la transcription des ARNm viraux (4), et ces ARN pré-génomiques sont exportés vers le cytoplasme où ils servent d'ARNm pour la production des protéines virales et de matrice pour la synthèse par RT de l'ADN génomique (5). Les cellules infectées relarguent des particules virales infectieuses contenant l'ADNdb viral (6). RE : réticulum endoplasmique.

L'ARN polymérase ADN dépendante de la cellule hôte synthétise un transcrit viral légèrement plus long que le génome complet, avec une séquence redondante, qui est exporté vers le cytoplasme de la cellule. Il y est utilisé comme ARN messager pour l'expression des protéines virales et comme ARN pré-génomique pour la production d'ADN viral par réverse transcription grâce à la séquence redondante. Au-delà de la nature de leur génome, une différence majeure distingue le cycle de réplication des pararétrovirus de celui des rétrovirus. Les pararétrovirus ne codent pas pour une intégrase et n'ont pas d'étape obligatoire d'intégration sous forme de « provirus » au génome hôte au cours de leur réplication, à l'inverse des rétrovirus.

### 3) Le cas des pararétrovirus endogènes, ou « EPRV ».

Des intégrations virales dans l'ADN hôte existent fréquemment bien que les pararétrovirus n'aient aucune obligation d'intégration dans leur cycle de multiplication. Ces intégrations sont le résultat d'évènements de recombinaison illégitime lors du passage de l'ADN viral dans le noyau de la cellule hôte (Fig. 1.12). Elles peuvent survenir lors des réparations de cassures ADN double brin (« Double strand break repair » ou DSBR). Lorsque ces évènements se produisent dans des cellules germinales, ou méristématiques dans le cas de plantes à reproduction végétative, elles sont transmises à la descendance. Un nombre croissant d'intégrations virales appartenant à la famille *Caulimoviridae* a été découvert chez les plantes depuis les années 2000 (Tableau 1.2). Ces séquences virales sont nommées « EPRV » pour « Endogenous pararetrovirus » (Staginnus et al., 2009). La majorité de ces éléments viraux endogènes sont largement fragmentés, réarrangés, et généralement incapables de générer une infection ; et sont donc pour la plupart considérés comme des intégrations fossiles. Les seuls cas d'intégration virale infectieuse décrits à ce jour résultant d'évènements accidentels, leur classification en tant que virus a fait débat lors de leur découverte (Hull, 2014). La classification proposée par l'ICTV intègre actuellement les rétro-transposons, éléments génétiques mobiles codant pour une réverse transcriptase, et pour la plupart ayant une étape d'intégration dans l'ADN de l'hôte. C'est le cas des familles *Metaviridae* et *Pseudoviridae*, retrouvées chez tous les eucaryotes. Les EPRV entrent donc dans la classification de l'ICTV, et sont classés sur la base de la séquence RNaseH, codée par tous les pararétrovirus. Certains EPRV ont un homologue épisomal, c'est à dire sous forme de particule virale libre, comme les espèces Banana streak virus BSGFV, BSOLV et BSIMV (Chabannes et al., 2013; Gayral et al., 2008a), tandis que d'autres n'existent que sous forme intégrée et constituent une nouvelle espèce, comme les LycEPRV (Staginnus et al., 2007).

| Hôte | Virus | Virus proche | Genre | Référence |
|---|---|---|---|---|
| F. imperialis (fritillaire) | FriEPRV | PVCV | Petuvirus | Becher 2014 |
| Nicotiana clevelandii, glutinosa, kawakamii, otophora, tabacum, tomentosa, tomentosiformis, sylvestris | *unassigned* | TVCV | Begomovirus, Solendovirus | Bejarano, 1994; Jakowitsch, 1999; Gregor, 2004; Matzke, 2004; Murad, 2004; Geering, 2010 |
| Vitaceae (vigne) | multiples séquences partielles EPRV | | Caulimovirus, Tungrovirus | Bertsch, 2009 |
| Populus trichocarpa (peuplier) | *unassigned* | | unassigned | Bertsch, 2009 |
| Oryza sativa, O. japonica | eRTBV | | Tungrovirus | Chen, 2014, Kunii, 2004 |
| Piper nigrum (poivre noir) | ePYMoV | | Badnavirus | Deeshma, 2017 |
| Dahlia variabilis (dahlia) | DvEPRS | | Caulimovirus | Eid and Pappu 2014 |
| Ananas comosus (ananas) | AcomV | | *unassigned* | Gambley, 2008; Geering, 2010 |
| Musa schizocarpa | *unassigned* | | *unassigned* | geering, 2005 |
| Solanum tuberosum (pomme de terre) | SotuI, SotuIII | TVCV | Cavemovirus | Hansen, 2005 |
| Alhagi sparsifolia | eABV (new specie) | PYMAV | Badnavirus | Li, 2018 |
| Angelica dahurica | AnBSV (new specie) | | Caulimovirus | Lim 2017 |
| Nicotiana edwardsonii | eTVCV | TVCV | Cavemovirus | Lockhart, 2000 |
| Citrus sinensis (orange douce) | CitPRV | CTV | *unassigned* | Matsumura 2017 |
| Musa balbisiana | eBSGFV, eBSOLV, eBSIMV | | Badnavirus | Ndowora, 1999; Geering, 2005 |
| Musa acuminata | unassigned | | Badnavirus | Ndowora, 1999; Geering, 2005 |
| Solanum lycopersicon (tomate) | LycEPRV | TVCV | Cavemovirus | Noreen 2005 PhD, Staginnus 2007 |
| Dahlia mirabilis | *unassigned* | | Caulimovirus | Pahalawatta, 2008 |
| Poncirus trifoliata (citrange) | EPRV | PVCV | Petuvirus | Roy, 2014 |
| Eucalyptus grandis | EgEVE_1 | | *unassigned* | Sanches Marcon 2017 |
| Dioscorea cayenensis-rotundata (igname) | eDBV, 4 species | | Badnavirus | Seal, 2014, Umber, 2014, Turaki 2017 |
| Ananas comosus (ananas) | ePBCOV | | Badnavirus | Sether 2012 |
| Rubus spp. (mûre) | eBVF | | Badnavirus | Shahid 2017 |
| Solanum cheesmaniae, habrochaites, peruvianum, pimpinellifolium, tuberosum | unassigned | TVCV | Solendovirus | Staginnus, 2007; Geering, 2010 |
| Dracaena sanderiana (bambou) | DrMV | | Badnavirus | Su, 2007 |
| Aristotelia chilensis | AcV1 | PVCV | Petuvirus | Villacreses, 2015 |

**Tableau 1.2: EPRV identifiés chez les génomes de plantes depuis 1999**

## 4) Les intégrations virales eBSV

### *a) Phylogénie et évolution des eBSV*

Des séquences de badnavirus sont retrouvées intégrées aux génomes de trois espèces *Musa*: *M. acuminata* (génome A), *M. balbisiana* (génome B) et *M. schizocarpa* (génome S) (Gayral & Iskra-Caruana 2009). Ces séquences se distribuent sur deux des trois clades structurant la phylogénie des séquences badnavirus des bananiers (Fig. 1.16) : le clade 1, où ces intégrations ont des homologues épisomaux connus et sont nommées endogenous BS-*espèces*-V (eBS-*espèces*-V) (Staginnus et al., 2009), et le clade 2 pour les espèces n'ayant pas d'homologue épisomal connu (nommées BEV pour Banana endogenous virus) (Gayral and Iskra-Caruana, 2009; Geering, 2005, Staginnus et al., 2009). Les études phylogénétiques menées sur les séquences connues à ce jour montrent des évènements d'endogénisation répétitifs résultant au moins de 27 évènements d'intégrations distincts et successifs dans les génomes bananiers hôtes (Gayral and Iskra-Caruana, 2009; Gayral et al., 2010a; Geering, 2005).

Les premières infections dérivées d'eBSV ont été étudiées sur le cultivar Obino l'Ewai, un plantain africain de génotype AAB. Les études d'apparition d'infections BSOLV sur des plants issus de culture *in vitro* à partir d'individus sains ont conduit à la découverte et première description d'intégrations virales contenant un peu plus d'un génome viral BSV et pouvant être à l'origine de l'infection (Ndowora et al., 1999a). L'homogénéité d'espèces des particules virales issues de ces infections contraste avec la grande hétérogénéité d'espèces des isolats collectés au champ (Lockhart and Olszewski, 1993), qui résulte de l'évolution de populations virales en contexte d'épidémie. Les auteurs ont donc proposé que ces infections dérivaient uniquement d'intégrations eBSV présentes dans le génome du cultivar Obino l'Ewai, puisque les particules virales ne semblent pas soumises à la même évolution qu'au cours d'épidémies médiées par des vecteurs.

Les intégrations virales à l'origine d'infections spontanées sont aujourd'hui mieux connues, et trois espèces virales BSV « actives » ont été caractérisées et sont présentes uniquement dans le génome B de bananiers : l'espèce *Obino L'ewai* (BSOLV), l'espèce *Goldfinger* (BSGFV) et l'espèce *Imove* (BSIMV) (Gayral et al., 2008 ; Chabannes, Baurens et al., 2013). Des observations et arguments convergent également quant à la présence de séquences intégrées de l'espèce *Mysore* « actives » (BSMYV, Geering et al., 2005) dans le cultivar Mysore sans qu'aucune séquence intégrée n'ait été décrite à ce jour.

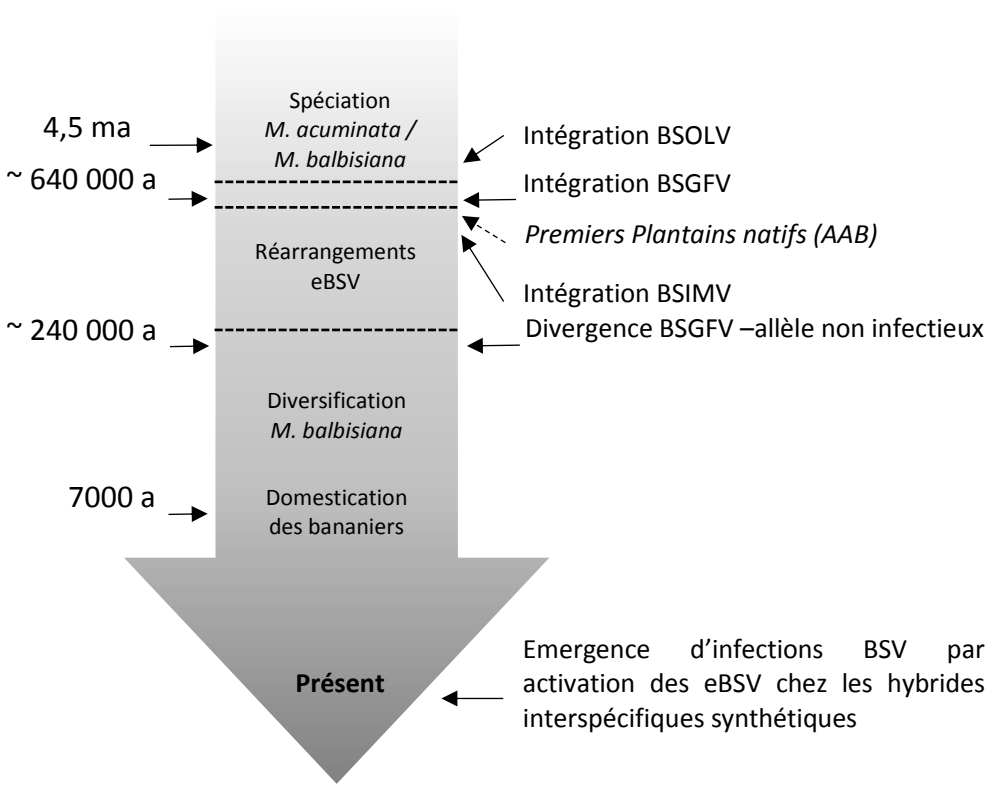



**Figure 1.13: Chronologie des intégrations eBSV dans le génome B de bananier** (Gayral et al., 2010)

### *b) Structure des eBSV*

#### *i.* Des évènements d'intégrations distincts

Les intégrations eBSGFV, eBSIMV et eBSOLV résultent d'évènements d'intégrations distincts et successifs, survenus après la spéciation des génomes A et B de bananiers (daté d'il y a ~4,3 millions d'années) et avant la diversification des génomes B. La diversité allélique eBSOLV plus importante que celle observée pour eBSGFV et eBSIMV, dont les profils sont plus conservés, laisse supposer que BSOLV est l'intégration la plus ancienne (Gayral et al., 2010; Iskra-Caruana et al., 2014a, 2014b; Duroy et al., 2016). L'intégration de l'espèce BSGFV qui semble être survenue après celle de BSOLV, a pu être estimée à 640 000 ans environs, grâce au rétro-transposon dans lequel elle se trouve (Gayral et al., 2010a), et la divergence allélique est estimée à 230 000 ans. L'intégration de l'espèce BSIMV est la moins réarrangée, porteuse de moins de mutations, monoallélique, et donc considérée comme la plus récente (Chabannes et al., 2013). La figure 1.13 montre une estimation de la chronologie des intégrations eBSV chez le diploïde BB, PKW.

#### *ii.* Des intégrations alléliques

Les structures eBSV ont été décrites à partir d'analyses génomiques, génétiques et cytogénétiques pour les 3 espèces BSV (Chabannes et al., 2013; Gayral et al., 2008a) à partir du bananier sauvage « Pisang Klutuk Wulung » PKW, diploïde BB. Ce bananier est utilisé au Cirad comme géniteur femelle pour introgresser le génome B par croisements génétiques dans les hybrides interspécifiques. Pour chacune des trois espèces BSV, les structures sont intégrées de manière unique à trois loci distincts. Chaque structure est constituée de fragments de génome viral réarrangés, avec plusieurs motifs inversés-répétés (Fig. 1.14). Alors que les génomes épisomaux BSOLV, BSGFV et BSIMV mesurent 7,8 - 7,26 - 7,8kb, respectivement ; les intégrations eBSOLV, eBSGFV et eBSIMV recouvrent entre 13kb et 23kb selon l'allèle intégré. eBSOLV et eBSGFV sont di-alléliques, l'un étant infectieux et l'autre non. Pour eBSOLV, l'allèle 1 (eBSOLV-1, 22,9kb) contient au moins un génome viral complet non muté et est l'allèle infectieux (Chabannes et Iskra-Caruana, 2013). L'allèle 2 (eBSOLV-2, 23,9kb) est non infectieux car il est incomplet et ponctuellement muté, rendant impossible le relargage d'un génome viral fonctionnel. Pour eBSGFV, l'allèle 7 (eBSGFV-7, 13,3kb) est infectieux tandis que l'allèle 9 (eBSGFV-9, 15,6kb) ne l'est pas. eBSGFV-9 contient un fragment supplémentaire (1,9kb) par rapport à eBSGFV-7 et bien qu'il y ait possibilités de restitution d'un génome viral à partir de ces deux allèle, eBSGFV-9 présente des mutations ponctuelles

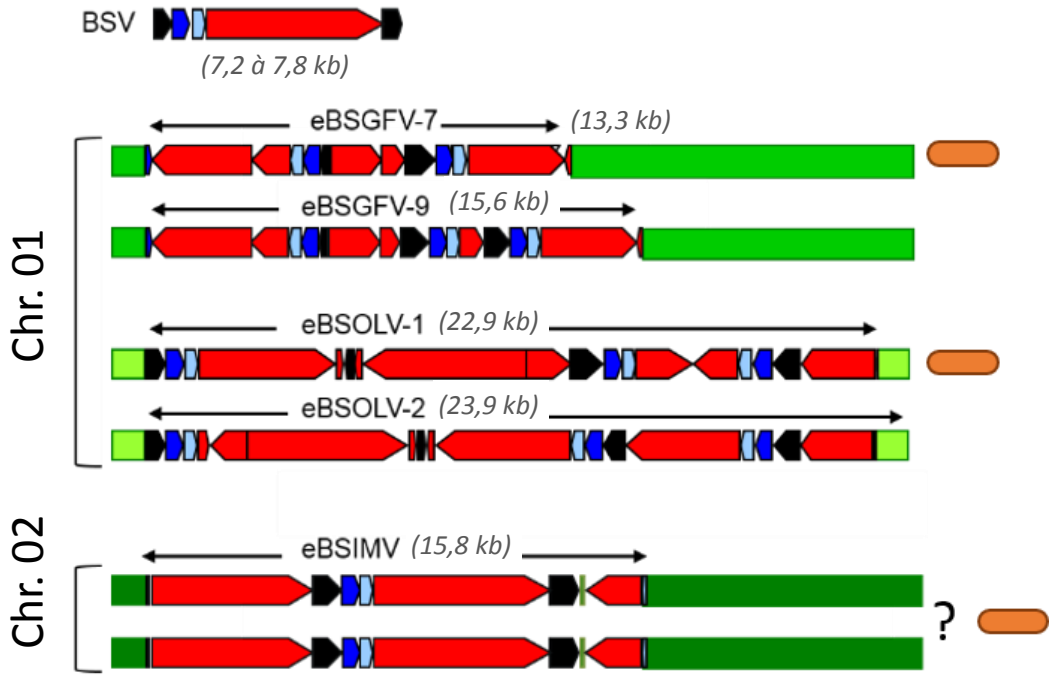



**Figure 1.14: Schéma des intégrations eBSV chez le bananier sauvage PKW** (Gayral, 2008 ; Chabannes & Baurens, 2013). Les intégrations virales eBSGFV (allèle -7 et -9), eBSOLV (allèle -1 et -2) et eBSIMV sont indiquées sur les chromosomes 01 et 02 des deux génomes B de PKW. L'organisation générique du génome épisomal est indiquée au-dessus, avec un code couleur commun entre BSV et eBSV : bleu foncé, bleu clair, rouge et noir indiquent l'ORF1, l'ORF2, l'ORF3 et la région intergénique, respectivement. Les allèles infectieux sont indiqués avec une particule virale bacilliforme orange.

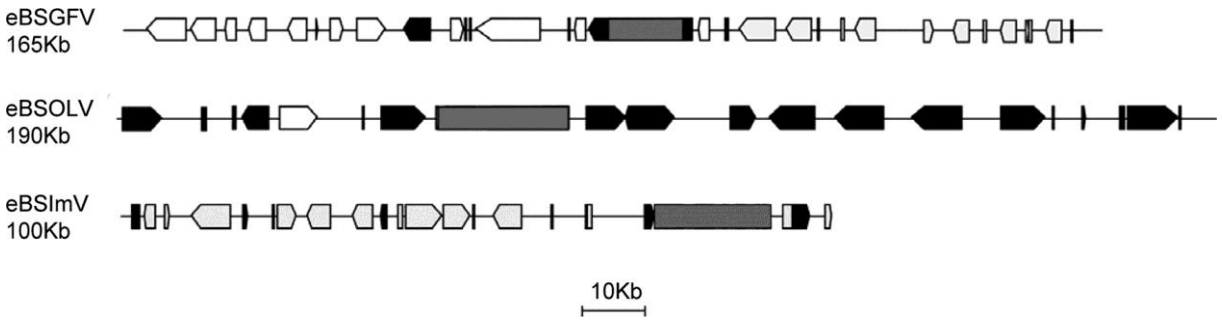



**Figure 1.15: Environnements génomiques des eBSV** (Chabannes, Baurens et al. 2013). L'environnement génomique tel que caractérisé dans les clones BAC est indiqué pour chacun des trois loci d'integrations d'eBSV. Les boîtes noires correspondent aux élements transposables (TE), les boîtes grises aux eBSV et les boîtes blanches aux gènes des clones BAC dans lesquels ont été intégrées les eBSV pour être caractérisés.

qui le rendent non fonctionnel. L'intégration eBSIMV (15,8kb) n'est pas considérée comme allélique car les deux structures intégrées chez PKW sont identiques et infectieuses, contenant toutes les deux un génome viral et demi peu réarrangé. eBSOLV et eBSGFV sont localisés sur le chromosome 01 de PKW (BB), chacun des génomes B ayant un des deux allèles, eBSIMV est sur le chromosome 02.

#### *iii.* Des environnements génomiques différents

Les loci d'intégrations des différentes espèces BSV sont différents (Fig. 1.15). eBSGFV et eBSOLV sont sur le même chromosome 01 et situés dans des environnements génomiques différents. eBSOLV se trouve dans une région riche en éléments transposables (Chabannes et al., 2013), entre deux rétro-transposons, certainement dans l'hétérochromatine centromérique. eBSGFV est situé dans une région riche en gènes, à l'intérieur d'un rétro-transposon du groupe *Ty3/gypsy*, une séquence d'origine virale et codant pour une réverse transcriptase (RT), lui-même inséré dans le 5ème intron du gène *mom* (Gayral et al., 2008). eBSIMV est situé sur le chromosome 02, et est flanqué de régions inversées répétées dans un environnement génomique riche en éléments transposables similaire à celui de eBSOLV.

### *c) Prévalence des eBSV infectieux*

L'étude détaillée des structures des eBSV chez PKW, diploïde sauvage BB, a permis la mise au point d'outils moléculaires (marqueurs alléliques, marqueurs dérivés de séquences polymorphiques amplifiées [dCAPs, CAPs], amorces PCR) pour détecter et identifier les structures intégrées et leurs allèles infectieux (Chabannes et al., 2013; Gayral et al., , 2008, 2010). La recherche du polymorphisme de ces profils d'intégrations pour les espèces BSGFV, BSIMV et BSOLV au sein de la diversité *Musa*, basée sur l'étude de bananiers natifs à génomes BB, AB, AAB et ABB, a permis de décrire l'historique de coévolution entre génomes B et intégrations eBSV et d'assigner pour la première fois les génome diploïdes BB à des zones géographiques (Duroy et al., 2016). Les intégrations eBSV sont conservées dans les génomes sauvages diploïdes BB et ABB. Les génomes haploïdes pour le génome B (AB, AAB, AAAB), montrent un polymorphisme d'intégration plus important témoignant d'un processus de pseudogénisation bien engagé allant pour certains jusqu'à l'absence d'intégration BSV. Pour autant que le processus évolutif semble indiquer un processus de pseudogénisation majeur lié à la localisation des intégrations et à l'absence de pressions épidémiques, le sous-groupe Plantains, au génome AAB, reste porteur des allèles eBSGFV-7 et eBSOLV-1 infectieux (Duroy et al., 2016).

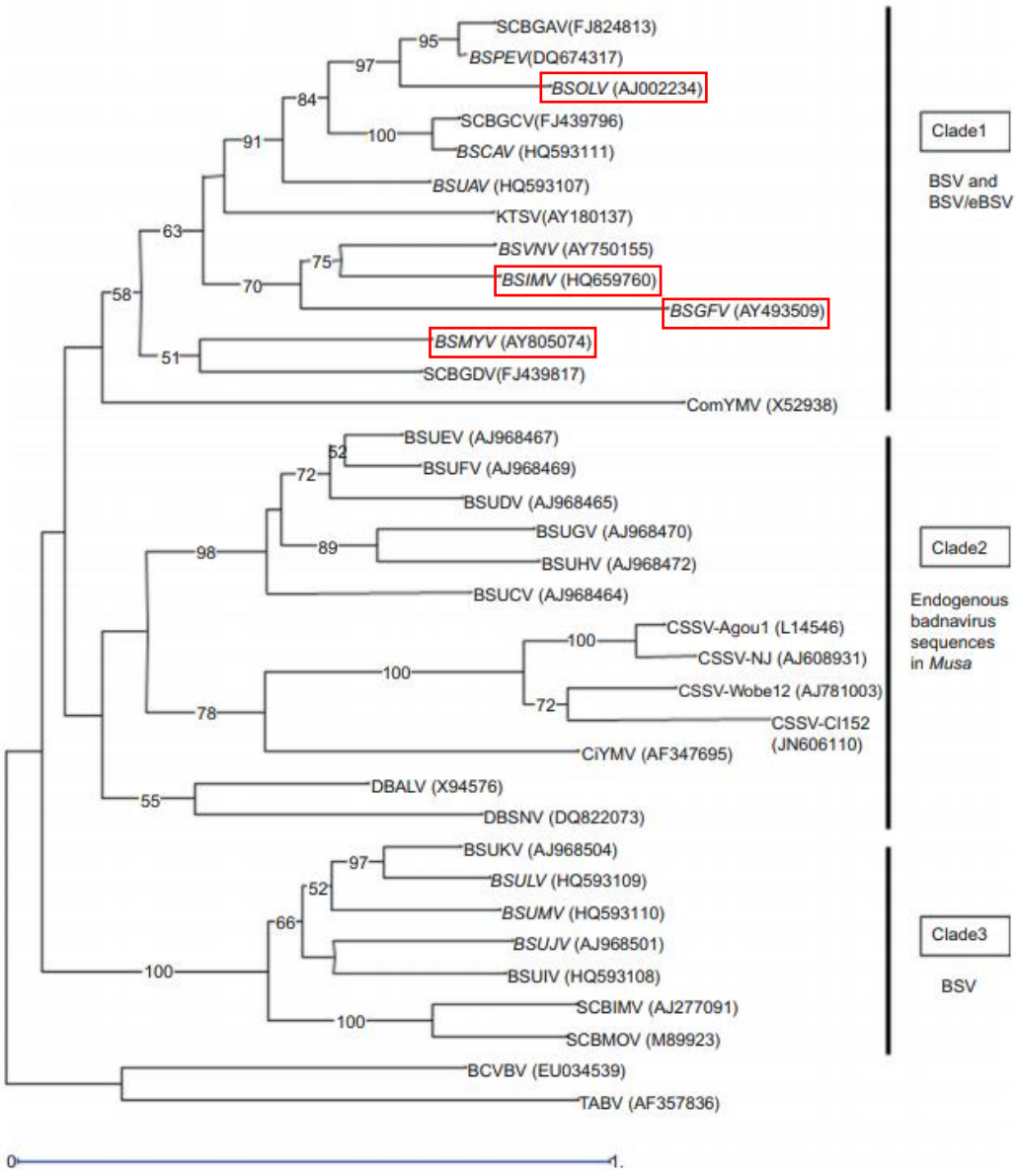



**Figure 1.16: Phylogénie des séquences de badnavirus décrites sur bananier** (Kumar et al., 2015). Cette phylogénie a été réalisée à partir de l'alignement de séquences badnavirus de la région RT/Rnase H (540 pb) et analysées par la méthode de « maximum likelyhood ». Les espèces BSV identifiées à ce jour sont réparties dans les clades 1 et 3 selon la présence de forme épisomale et/ou intégrée. Sont encadrées en rouge les espèces BSV connues ou fortement suspectées d'avoir des intégrations infectieuses.

Le terme de pseudogénisation réfère ici à l'inactivation progressive des séquences virales au cours de l'évolution *via* des altérations génétiques dirigées par l'hôte.

L'absence d'intégration de l'espèce BSIMV dans les génomes de plantains est en faveur d'une fixation postérieure à leur apparition, dans les diploïdes sauvages BB, ou d'une origine de parent BB n'ayant pas été en contact avec cette espèce et non identifié à ce jour. Dans les populations d'hybrides synthétiques AAB crées par le Cirad et issues de croisements artificiels entre le géniteur femelle BB (PKW) et le géniteur mâle tétraploïde AAAA (IDN110T), les généticiens ont observé une ségrégation Mendélienne monogénique de chacune des intégrations (Lheureux et al., 2003 ; Lheureux, thèse 2002). La descendance hérite dans 50% des cas d'allèles infectieux, mais seulement 50% de ceux héritant de l'allèle infectieux eBSGFV-7 déclenchent une infection (25% au final) contre 100% de ceux héritant de l'allèle infectieux eBSOLV-1 (50% au final). Lheureux et al. (2003) ont montré que la transmission de l'allèle infectieux n'est pas une condition suffisante pour avoir un infection et qu'elle doit être associée à la présence d'un facteur génétique hétérozygote présent chez le parent BB PKW: le facteur BEL (pour « BSV expression locus », Lheureux et al., 2003). Le facteur BEL est lié génétiquement à eBSOLV et situé sur le chromosome 01, ce qui explique la ségrégation de l'infection de 50/50 pour BSOLV et 25/75 pour BSGFV (Lheureux et al., 2003, Lheureux, thèse 2002). A ce jour, aucun marqueur de BEL n'existe.

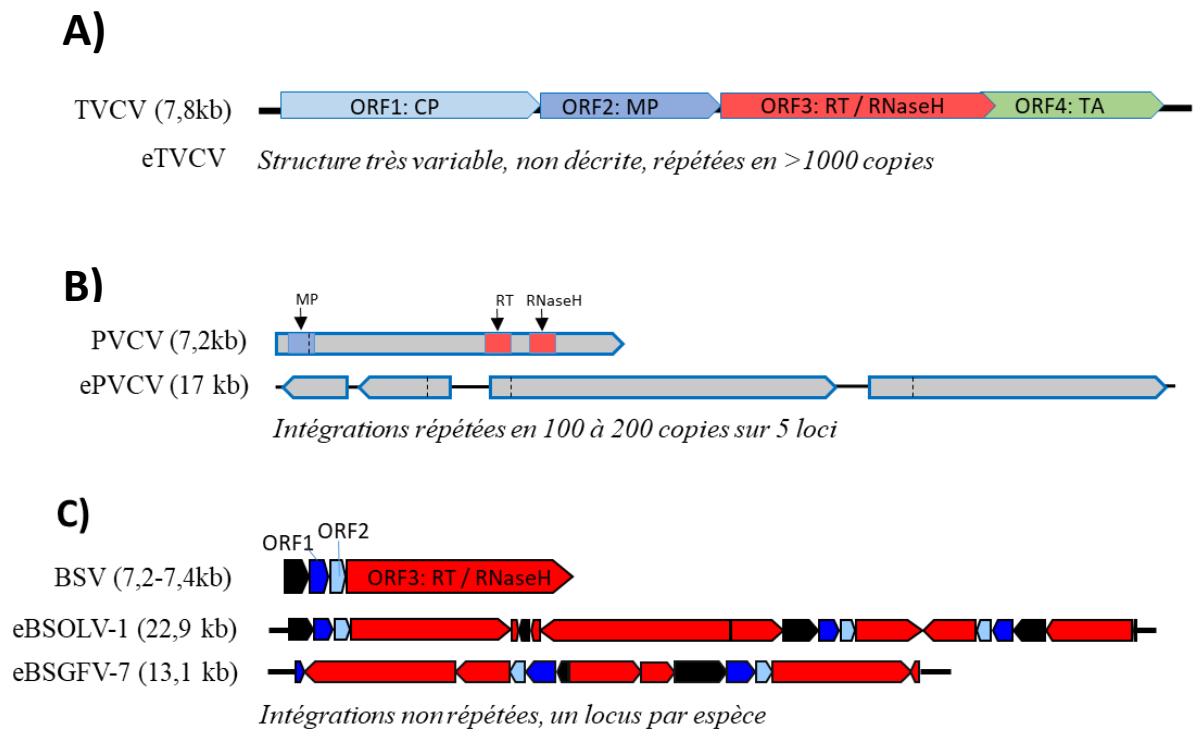



**Figure 1.17: Structures des ePVCV, eTVCV et eBSV. A)** La structure eTVCV n'est pas connue mais reportée comme fortement répétée sur le génome (>1000 fois, Lockhart et al., 2000). Les différentes ORF sont caractérisées par homologie avec le CsVMV (Cassava vein mosaic virus) pour reconstituer le génome complet TVCV. **B)** La structure de l'intégration ePVCV chez *P. hybrida* est dupliquée et inversée répétée (Richert-Pöggeler, 2003). La ligne pointillée représente le site de restriction *ScaI* et donne un repère sur la séquence. **C)** Les eBSV sont caractérisés pour les espèces BSOLV, BSGFV et BSIMV (non montré ici), et sont inversées-répétées et dupliquées sur le génome du bananier sauvage diploïde PKW (Pisang Klutuk Wulung) (Gayral, 2008 ; Chabannes, 2013).

### 5) Autres cas d'EPRV infectieux

Deux autres cas d'intégrations virales associées à des infections sont connus à ce jour : les intégrants de Tobacco vein clearing virus (eTVCV) chez le tabac (Lockhart et al., 2000), et les intégrants de Petunia vein clearing virus (ePVCV) chez le pétunia (Richert-Poggeler, 2003).

#### *a) Les intégrants Tobacco vein clearing virus chez le tabac*

Chez le tabac, des symptômes d'éclaircissement des nervures sont observés sporadiquement sur des plants en serre en fin de culture, et des tests sérologiques ont révélé la présence d'un virus non décrit jusque-là, nommé Tobacco vein clearing virus ou « TVCV » (Lockhart et al., 2000). Les particules virales n'étant pas transmissibles par inoculation, par vecteur ou par greffe, il a été proposé qu'une telle infection provenait de séquences virales intégrées au génome hôte, l'hybride *Nicotiana edwardsonii*. L'intégration a été confirmée par la suite par hybridation *in situ* dans le génome du tabac. Le TVCV appartient au genre *Solendovirus*, a une taille de 7,8 kb et comporte quatre ORFs (Fig. 1.17.**A**). Sa séquence est proche d'une séquence de pararétrovirus identifiée dans le génome de l'espèce *N. tabacum* (Jakowitsch et al., 1999), et intégrée en près de 1000 copies dans le génome hôte, ce qui laisse penser que les intégrants eTVCV sont également intégrés en multiples copies chez *N. edwardsonii*, l'hybride interspécifique des espèces *N. clevelandii* et *N. glutinosa*. Des séquences eTVCV identiques sont retrouvées chez le parent *N. glutinosa*, où aucun symptôme viral n'a cependant été reporté ; tandis qu'on ne retrouve pas de séquences eTVCV chez le parent sauvage *N. clevelandii*.

#### *b) Les intégrants de Petunia vein clearing virus chez le pétunia*

Chez le pétunia, des symptômes d'éclaircissement des nervures ont été observés à l'issue de greffes à partir de plant sains (Richert-Poggeler, 2003), mais également à l'issue de choc thermique (Zeidan et al., 2000) et de choc hydrique (Lockhart and Lesemann, 1998). Ces symptômes sont dus à un virus du genre *Petuvirus*, le Petunia vein clearing virus (PVCV), dont le génome mesure 7,2 kb et pour lequel des séquences intégrées ont été localisées par hybridation *in situ* dans le génome de *Petunia hybrida* (Richert-Poggeler, 2003, Fig. 1.17.**B**). Comme pour le TVCV, la transmission du PVCV est uniquement verticale (pas de vecteur identifié). Là encore, l'hôte chez lequel les séquences ePVCV ont été identifiées et associées à des infections virales est un hybride interspécifique des espèces *P. axillaris* et *P. inflata* S6. Les séquences ePVCV sont héritées du parent *P. axillaris*, où elles sont réarrangées (Bombarely et al., 2016).

### *c) Trois pathosystèmes, et des similarités clés*

Les pathosystèmes eBSOLV/eBSGFV/eBSIMV - *M. balbisiana* (génome B du bananier), eTVCV - *N. edwardsonii*, et ePVCV - *P. hybrida* sont les trois seuls pathosystèmes où des intégrants viraux de pararétrovirus (EPRV), sont à l'origine d'infections. Etudiés au début des années 2000, ces trois systèmes partagent des similarités clés. Tout d'abord les infections dérivées des intégrants viraux n'ont été reportées que pour des hybrides interspécifiques. Dans les trois cas, l'intégrant viral est hérité d'un seul des deux parents, le parent sauvage, chez lequel les intégrants ne semblent pas induire d'infection. Ces observations laissent supposer un mécanisme d'immunité chez le parent, perdu lors du croisement avec une autre espèce. Cette hypothèse a été explorée plus en détail chez le pétunia et chez le bananier. Chez le pétunia, une étude portant sur le parent porteur des ePVCV, *P. axillaris*, a montré que des modifications d'histones induisaient une expression à partir des ePVCV ainsi que la production de petits ARN (vsiARN) dirigés contre le PVCV (Noreen et al., 2007). L'hypothèse découlant de cette étude propose qu'une perturbation de la répression transcriptionnelle au niveau des histones lors de croisement génétique peut être à l'origine de l'expression des ePVCV et des infections qui en découlent. Par ailleurs, les ePVCV sont à l'origine d'une production d'ARN antiviraux principalement de 24 nt chez *P. hybrida*. Chez le bananier également, des études portant sur le géniteur diploïde *M. balbisiana* (PKW, génome BB) révèle une méthylation de l'ADN aux loci eBSV, ainsi que la production de siARN de 24 nt dirigés contre le BSV, cette observation ayant été faite pour tous les génomes sauvages diploïdes disponibles (Duroy, 2012, thèse).

Une autre similarité réside dans la structure des intégrants. Les EPRVs dans chacun de ces trois cas sont réorganisés (eTVCV), en répétition en tandem (ePVCV), ou en duplication directe et en inversion répétition (eBSV). Ces réarrangements génétiques traduisent très certainement un processus de défense mécanique de l'hôte (ici, les parents porteurs sains) pour inactiver ces éléments génétiques étrangers, bien que cela soit insuffisant pour empêcher la restitution de génomes viraux dans des hybrides interspécifiques. Des mécanismes de recombinaison homologue menant à la restitution d'un génome viral complet et fonctionnel à partir d'EPRV ont été proposés pour les ePVCV (Richert-Poggeler, 2003) et les eBSV (Chabannes et Iskra-Caruana, 2013; Iskra-Caruana et al., 2010; Ndowora et al., 1999b).

## 6) Les intégrations virales : un mécanisme plus générique de coévolution ?

L'accélération de l'accès aux génomes, facilité par la forte progression des techniques de séquençage à haut débit, a montré que les EPRV ne sont pas les seuls éléments viraux intégrés aux génomes de plantes. D'autres séquences virales dérivées de virus à ADN comme à ARN ont été détectées dans les génomes de plantes. Les premières sont des séquences dérivées des géminivirus (famille de virus à ADN simple-brin), nommées généralement GRD pour « geminivirus-related DNA elements ». Elles été identifiées dans des génomes du genre *Nicotiana* (Kenton et al., 1995) puis dans des génomes d'igname (*Dioscorea spp*, Filloux et al., 2015). Parmi les virus à ARN, le cas le mieux étudié est celui des séquences de Potato virus Y, (PVY, un potyvirus à ARN simple brin positif) intégré dans le génome de la vigne (Tanne and Sela, 2005). Ces séquences sont flanquées de rétro-transposons dupliqués, indiquant un possible rôle des éléments rétro-transposables dans l'intégration à l'origine de ces séquences virales. Parmi les séquences ePVY chez la vigne, il est intéressant de noter que l'ORF de la capside de protéine est intacte et exprimée, et que des protéines de capsides PVY réagissent à leur antisérum chez des vignes saines (Tanne and Sela, 2005). Chiba *et. al* (2011) ont décrit une grande diversité de séquences virales intégrées dérivant de virus à ARN simple brin (+ et -) et double brin, intégrées dans une vaste gamme de génomes de plantes incluant des monocotylédones (*S. bicolor*, *Z. mays*) et des dicotylédones (*Arabidopsis*, *Nicotiana*, *Brassica*). La plupart de ces séquences sont dérivées de protéines de capside des Partitiviridae (famille de virus à ARN double-brin), nommées séquences « PCLs » pour « Partitivirus Capsid Protein-like ». Les auteurs ont émis l'hypothèse d'une coévolution entre le génome de l'hôte et l'intégration virale, dans un système où l'intégration virale pourrait avoir une fonction bénéfique pour l'hôte. De tels exemples de coévolution entre génome hôte et intégrants viraux sont bien décrits dans le règne animal, où les rôles de nombreux gènes viraux ont été détournés par l'hôte (Dupressoir et al., 2012). L'exemple le plus célèbre est celui de la syncytin-1, une protéine impliquée dans le développement du placenta chez les mammifères et originellement dérivée d'un rétrovirus (Mi et al., 2000).

Dans le règne végétal, il apparaît aujourd'hui qu'une grande diversité de génomes de plantes hébergent des séquences virales intégrées, avec généralement une corrélation positive entre la taille du génome et le nombre d'intégrants viraux (Diop et al., 2018). Une étude portant sur une grande variété de plantes vasculaires, allant des mousses primitives jusqu'aux angiospermes récents, montre que presque tous les trachéophytes testés contiennent des séquences virales

intégrées, le plus souvent dérivées de Caulimoviridae, et donc considérées comme EPRV (Diop et al., 2018). Les plus anciens de ces intégrants datent d'il y a 320 millions d'années, et sont le reflet d'invasions régulières et indépendantes des génomes de plante. La plupart de ces EPRV dits fossiles proviennent de virus éteints (ou du moins pour lesquels la forme épisomale n'existe plus) ou non découverts à ce jour (Mushegian and Elena, 2015). L'abondance de ces séquences virales intégrées a mené plusieurs équipes à émettre l'hypothèse d'une coévolution entre séquences virales et génome hôte, à l'instar de ce qui a été reporté dans le règne animal. Ces virus retenus dans le génome de leurs hôtes maintiennent ainsi une transmission verticale, seul mode de persistance pour les espèces sans homologue épisomal. Dans le cas du Banana streak virus, l'intégration au génome bananier permet une double transmission, verticale et horizontale (détaillée dans la section IV.4), particulièrement avantageuse dans le cas de propagation par multiplication végétative comme pour le bananier.

Pour la plante hôte, le maintien de séquences virales intégrées peut conférer ou avoir conféré par le passé un avantage sélectif pour ses défenses antivirales, notamment *via* un mécanisme générique de défenses nommé « interférence par ARN », ou « RNA silencing » (détaillé dans la section suivante). Le maintien d'un faible niveau de transcription des séquences virales intégrées peut enrichir ce système de défense dans des environnements épidémiques.

## III. L'interférence par ARN, ou « RNA silencing »

Les premières études mettant à jour l'interférence par ARN datent des années 1990, avec la découverte du phénomène de co-suppression chez des pétunias transgéniques (Napoli et al., 1990). En transformant des plants de pétunia avec un transgène « chalcone synthase » (CHS) chimère, et en s'attendant à augmenter ainsi l'activité de cette enzyme, Napoli et al. (1990) observèrent l'effet inverse avec une diminution drastique des transcrits codés par le gène CHS. D'autres études portées sur *Caenorhabditis elegans* et sur le champignon *Neurospora* (Cogoni et al., 1996; Guo and Kemphues, 1995) mènent à des observations similaires. L'introduction d'un transgène portant une séquence identique à l'un des gènes de l'hôte conduit à une interférence avec ce même gène, nommée parfois « quilling » pour « étouffement ». L'interférence observée n'est pas liée à une interaction ADN-ADN, et les études de Fire et al. (1998) ont montré que la molécule clé de ce mécanisme était un ARN double-brin. Ces travaux sur le mécanisme de l'interférence sur *C. elegans*, partagés avec C. Mello, leur ont valu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006. Bien qu'étant déjà remarquables, ces études n'abordaient qu'une partie d'un mécanisme majeur de régulation et de protection chez les eucaryotes, aujourd'hui souvent anglicisé par « RNA silencing ».

Le « RNA silencing », ou interférence par ARN, regroupe différentes voies métaboliques mais repose sur un principe commun : l'utilisation de petits ARN simple-brin (entre 20 et 27 nucléotides), recrutés par le complexe multiprotéique RISC (RNA-induced Silencing Complex) et guidant ce complexe vers une cible nucléique homologue (ARN messager ou ADN) présentant une séquence complémentaire. L'interférence peut alors agir à deux niveaux : transcriptionnellement, principalement *via* la méthylation de l'ADN, on parle alors de « **TGS** » pour « Transcriptionnal Gene Silencing » ; ou post-transcriptionnellement, *via* le clivage ou l'inhibition de la traduction des ARN messagers ciblés, on parle alors de « **PTGS** » pour « Post-Transcriptionnal Gene Silencing ». On distingue deux grandes classes de petits ARN, selon leur origine de production. Les « micro ARN », ou **miARN**, et les « small interfering ARN », ou **siARN**. Les miARN sont produits à partir de structures ARN simple-brin repliées en tige-boucle (Fig. 1.18, **a**). Les siARN sont produits à partir d'ARN double-brin, d'origine endo- ou exogène (Fig. 1.18 **b-e**), soit par transcription de séquences inversées-répétées, soit par l'action d'une ARN polymérase ARN-dépendantes (RDR) synthétisant le brin complémentaire d'un ARN simple-brin et le convertissant un ARN double brin.

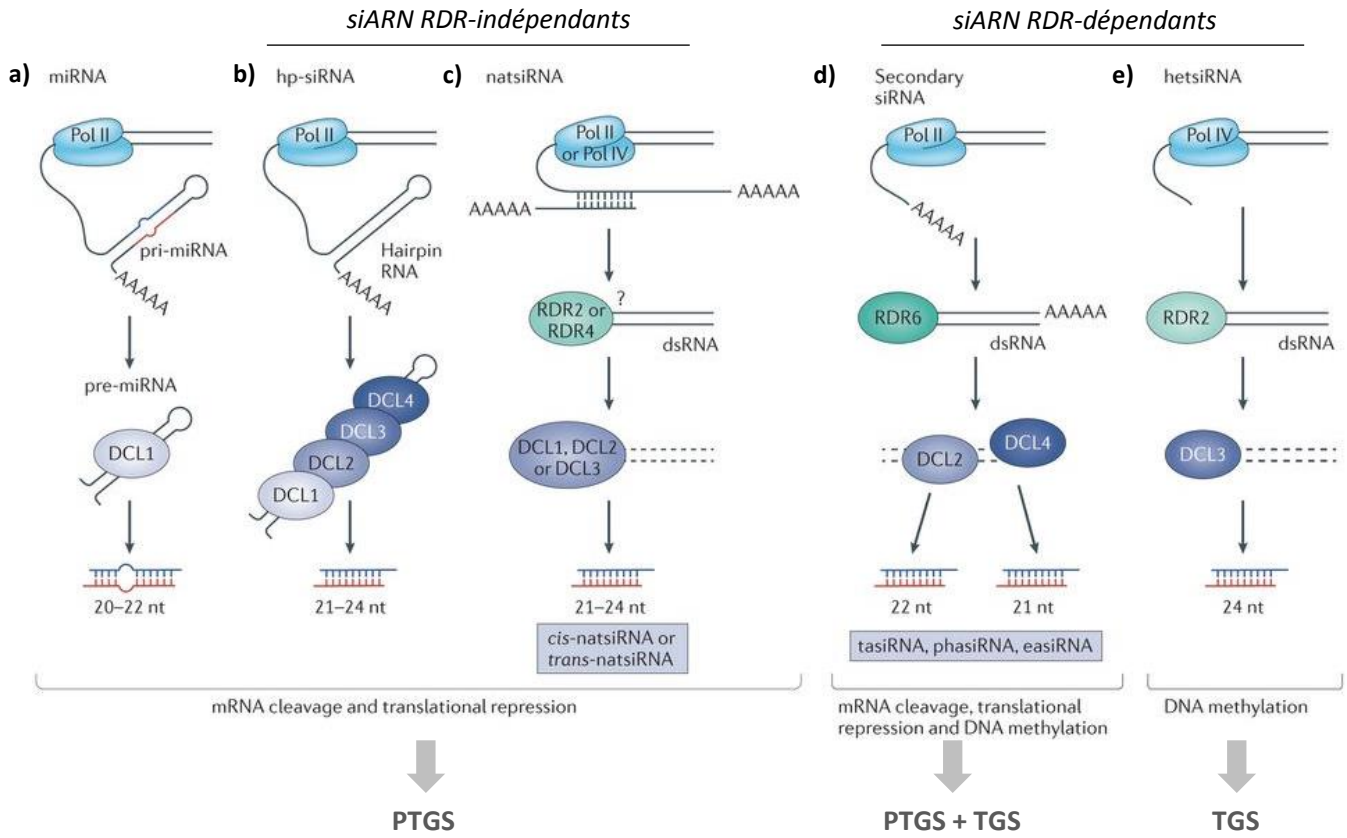



**Figure 1.18: Voies de biogénèse des miARN et des différents siARN endogènes chez les plantes** (adaptée de Borges and Martienssen, 2015). Voies de biogénèse et mode d'action siARN RDR-indépendants : **a)** miRNA, **b)** hp-siRNA (hairpin-derived siRNA), **c)** natsiRNA (natural antisens RNA), et des siARN RDR-dépendants : **d**) secondary siRNA et des **e**) hetsiRNA (heterochromatic siRNA). TGS: transcriptionnal gene silencing. PTGS : post-transcriptionnal gene silencing. RDR : RNA-dependant RNA polymerase.

Une autre classe de petits ARN, les piwiARN, qui diffère des deux décrites ci-dessus par leur biogénèse et les enzymes requises pour leur production, est impliquée dans la régulation des éléments rétro-transposables dans les lignées germinales animales, mais est absente du règne végétal (Cerutti and Casas-Mollano, 2006).

## 1) Les petits ARN interférents

### *a) Les « micro ARN »:*

On décompte plusieurs centaines de miARN chez les espèces où ils ont été étudiés (registre de MicroARN : mirbase.org), et certains d'entre eux sont communs entre plusieurs espèces. D'abord identifiés chez *C. elegans* (Rougvie, 2001), ils ont ensuite été largement décrits dans le règne végétal (Chen, 2008). Les miARN ciblent principalement des ARN messagers d'origine endogène, et ont un rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes de l'hôte et donc dans la régulation de mécanismes physiologiques clés (Ambros, 2001; Chen, 2008). Les miARN sont issus d'ARN précurseurs transcrits à partir de gènes non-codants ou d'introns de pré-ARNm (Bartel, 2004). La polymérase II transcrit un long ARN simple-brin polyadenylé, le « pri-miARN », qui porte une séquence se repliant en tige-boucle. Dans le règne végétal, les enzymes impliquées dans les clivages des précurseurs de petits ARN sont des homologues des protéines « Dicer » identifiées dans le règne animal, nommées DCL pour « Dicer-like protein ». Les protéines DCLs comportent un domaine catalytique de type ribonucléase III qui permet le clivage endonucléolytique de la séquence ARN double-brin de la tige-boucle. Les clivages aux deux extrémités de la tige-boucle sont effectués dans le noyau par l'enzyme DCL1 (Kurihara and Watanabe, 2004; Reinhart et al., 2002), qui libère majoritairement des duplex de 22 nucléotides (Fig . 1.18, **a**). Les duplex miARN libérés sont méthylés à l'extrémité 3' par une méthyltransférase HEN1, qui protège le duplex durant l'export vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, seul le brin guide, « brin mature » du duplex, est intégré au complexe RISC. L'autre brin, nommé « brin passager » ou « miR* », est dégradé. Le miARN chargé dans le complexe RISC guide l'interférence au niveau post-transcriptionnel, vers l'ARN messager homologue dont la traduction est inhibée, et qui peut être clivé pour induire la production de siARN secondaires.

### *b) Les siARN d'origine endogène*

#### *i.* Les siARN endogènes RDR-dépendants :

La majorité des siARN d'origine endogène sont issus d'ARN simple brin où le brin complémentaire est synthétisé par une ARN polymérase ARN dépendante, ou « RDR », une protéine qu'on retrouve chez les plantes, champignons, virus, protistes et chez certaines espèces du règne animal. La présence d'une RDR permet d'amplifier le signal de production de siARN, avec plusieurs précurseurs possibles à partir d'un même transcrit, tandis qu'un précurseur ARNsb de miARN ne permet la production que d'un miARN mature. Le clivage du précurseur ARN double-brin est effectué par les enzymes DCL2, DCL3 et DCL4, qui produisent des siARN de 22-, 24- et 21 nucléotides, respectivement, guidant l'interférence vers des cibles différentes (Brodersen and Voinnet, 2006). On décompte généralement deux classes de siARN chez les plantes : les **siARN secondaires** et les siARN hétérochromatiques (« **hetsiARN** »).

Les siARN endogènes les plus abondants sont les **hetsiARN**, qui sont issus de la transcription d'ADN non codant dans des régions hétérochromatiques, à partir de la polymérase IV. La synthèse d'un brin d'ARN complémentaire s'effectue par l'ARN polymérase ARN-dépendante 2 (RDR2) et le clivage par l'enzyme DCL3, qui libère des petits ARN de 24 nucléotides : les hetsiARN (Fig. 1.18, **e**). Cette classe de siARN guide un complexe protéique comprenant une ADN méthylase ARN dépendante (ou « RdDM ») vers des séquences complémentaires de l'hetsiARN, souvent des séquences répétées ou des transposons, pour en empêcher la transcription (Matzke and Mosher, 2014).

Les siARN secondaires peuvent être divisés en plusieurs sous-classes : les « *trans*-acting siARN » (**tasiARN**), les « phased siARN » (**phasiARN**) et les « epigenetically activated siARN » (**easiARN**). Ces classes de siARN sont dites « secondaires » car elles dépendent de la production de microARN pour initier leur biogénèse. Les **tasiARN** et les **phasiARN** sont produits à partir de longs transcrits non-codant, nommés « *TAS* » pour « trans-acting siARN producing locus » et « *PHAS* » pour « phased-siARN producing locus », respectivement. Le brin complémentaire du transcrit est synthétisé par la RDR6, et le clivage s'effectue par la protéine DCL4, guidée par des miARN, libérant des siARN de 21 nt : les **tasiARN** et les **phasiARN** (Fei et al., 2013; Yoshikawa, 2013, Fig. 1.18, **d**). Les tasiARN guident le complexe RISC vers des cibles ARNm avec peu d'homologie de séquence et permettent leur clivage et la régulation de leur traduction. Les phasiARN guident l'interférence vers des cibles complémentaires à leurs séquences, et semblent fonctionner de manière similaire aux miARN,

à la différence de leur origine de biogénèse. Les **easiARN** sont produits à partir de transcrits de transposons, ciblés par une cinquantaine de miARN chez *A. thaliana* (Creasey et al., 2014). Ces siARN sont dit « activés épigénétiquement » car ils sont produits en réponse à la réactivation des transposons pendant la reprogrammation des cellules souches et la perte de méthylation de l'ADN. Les easiARN permettent de maintenir la répression de la transcription de ces transposons pendant cette période de latence.

#### *ii.* Les siARN endogènes RDR-indépendants

Comme indiqué plus haut, certains siARN ne dépendent pas d'une RDR pour être produit, mais résultent de la formation naturelle d'une structure ARN double-brin à partir de différents transcrits ayant une complémentarité de séquence, ou bien à partir de transcrits portant une séquence inversée-répétée (Brodersen and Voinnet, 2006). Dans le premier cas, l'hybridation sens/anti-sens de deux transcrits forme une structure double-brin clivée par des enzymes DCL pour donner des siARN de 21 à 24 nucléotides nommées **natsiARN** pour « natural antisens siARN » (Fig. 1.18, **c**). Leur biogénèse et leurs fonctions sont encore peu décrites dans la littérature. Dans le deuxième cas, un transcrit comportant une séquence inversée-répétée peut se replier en structure tige-boucle, plus longue que celles à l'origine de la production de miARN, et peut être clivé par toutes les protéines DCL pour donner des siARN de 21- à 24 nucélotides, nommés **hp-siARN** pour « hairpin-derived siARN » (Fig. 1.18, **b**).

### *c) Les siARN d'origine exogène*

Les premières observations d'interférence par ARN, avec le phénomène de co-suppression, ont mis à jour la production de petits ARNs à partir de transgènes exogènes. Fire et al (1998) ont montré que la production de petits ARN était dépendante du caractère double-brin de l'ARN introduit, ou de sa capacité à se replier en tige-boucle dans la cellule hôte. Ce mécanisme est aujourd'hui utilisé pour plusieurs applications basées sur l'interférence pour cibler des gènes particuliers, allant de l'outil moléculaire en laboratoire (avec la création de mutant « *knock-down* » où l'on induit une interférence pour réprimer l'expression d'un gène cible) au traitement thérapeutique (Hannon and Rossi, 2004). Il a été découvert plus tard que la production de siARN est initialement un mécanisme de défense contre du matériel génétique étranger comme les transposons ou les virus. La production de siARN en réponse à une infection permet aujourd'hui la détection d'une infection et la reconstruction du ou des génomes viraux présents chez l'hôte, faisant ainsi du séquençage des siARN un outil performant d'identification de virus connus (Pooggin, 2018).

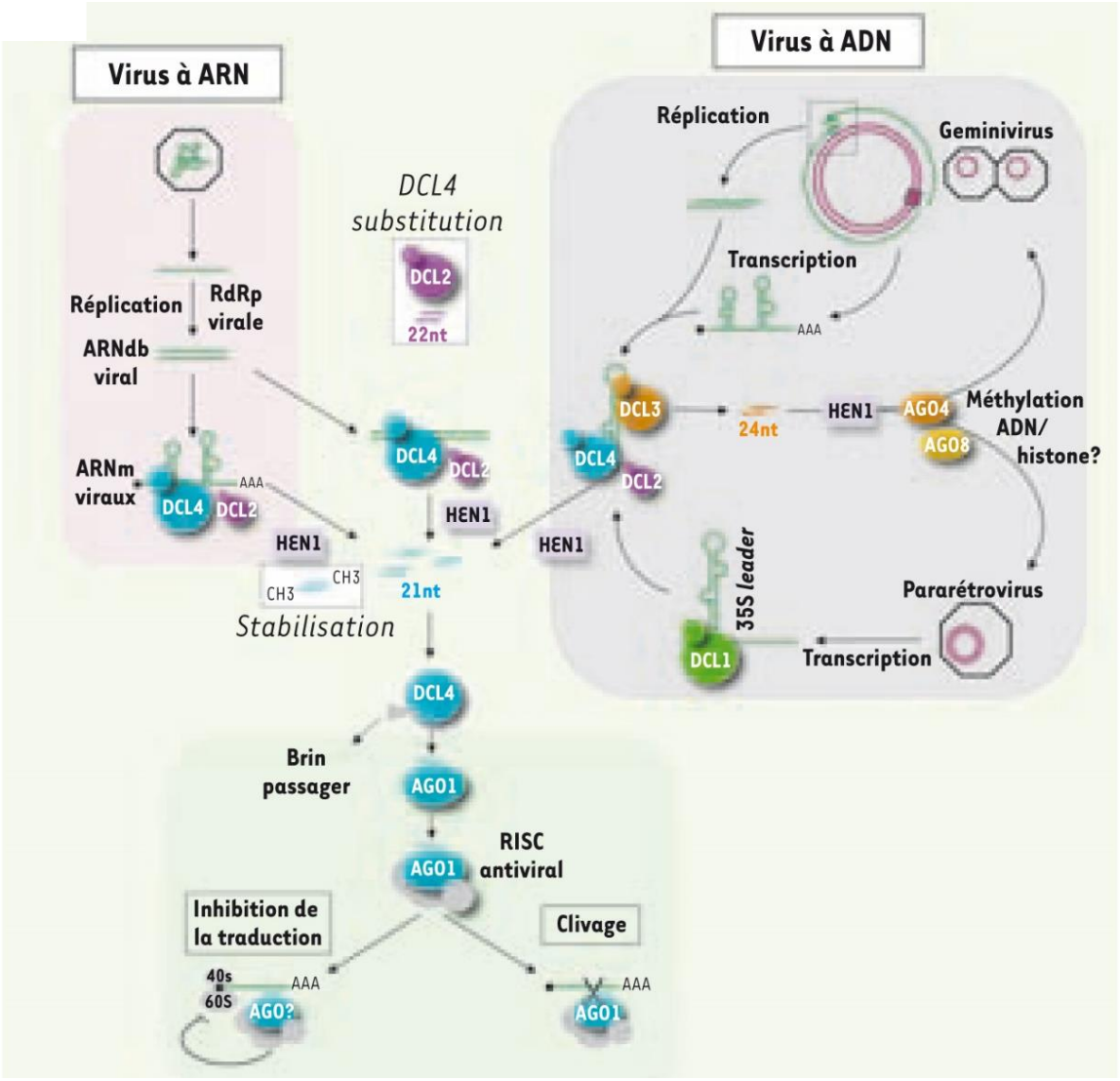



**Figure 1.19: Schématisation de la production et du mode d'action des siRNA antiviraux** (Dunoyer, 2009). Les ARN aberrants arrivant dans la cellule hôte au cours d'une infection, soit par un virus à ARN, soit par la transcription d'un génome de virus à ADN, servent de matrice pour l'ARN polymérase ARN dépendante (RDR) de l'hôte qui synthétise le brin complémentaire. Ce duplex ARN sert de précurseur clivé par différentes enzymes DCL pour produire des siARN de différentes tailles et recouvrant l'intégralité du génome viral. Pour les virus à ARN, DCL4 est l'enzyme Dicer principale et DCL2 lui substitue lorsqu'elle n'est pas fonctionnelle. DCL4 clive les précurseurs en siARN de 21 nt, et DCL2 en siARN de 22 nt. Pour les virus à ADN, DCL1 facilite l'accès à l'ARN double-brin pour DCL4 et DCL3, les deux enzymes Dicer principales produisant des siARN de 21 et 24 nucléotides respectivement. Là aussi, DCL2 peut substituer à DCL4. Les siRNA antiviraux sont stabilisés par un groupement méthyl ajouté à l'extrémité 3' par la protéine HEN1. Le duplex est séparé et un seul des deux brins est incorporé au complexe RISC (le brin « passager » est dégradé). Selon la protéine AGO associée au siARN guide et chargée dans le complexe RISC, ce dernier peut avoir plusieurs cibles. Pour les virus à ARN, le complexe RISC cible les ARN messagers viraux grâce à l'homologie de séquence au siARN guide, et clive l'ARNm ou inhibe sa traduction. Pour les virus à ADN, les siARN supplémentaires de 24 nt guident le complexe RISC vers l'ADN viral super-enroulé dans le noyau pour inhiber sa réplication *via* la méthylation de l'ADN ou des histones associées.

### *d) Mécanismes génériques de production de siARN antiviraux*

L'interférence par ARN est un mécanisme de défense antiviral majeur parmi les espèces munies de siARN (Ding and Voinnet, 2007). Les premières évidences de production de siARN induite par une infection virale viennent d'inoculation du Potato virus X chez *Nicotiana benthamiana*, où Hamilton et Baulcombe (1999) ont détecté une augmentation de petits ARN corrélée avec une augmentation de la charge virale. Les siARN dérivés d'infections virales concernent tous les groupes génétiques de virus de plantes, virus à ARN comme virus à ADN. Lors d'une infection virale, les ARN viraux (soit support génétique principal des virus à ARN, soit transcrits de virus à ADN) sont la cible des ARN polymérase ADN dépendante (RDR) de l'hôte qui synthétisent le brin complémentaire pour former des précurseurs ARN double-brin (Fig. 1.19). Ces précurseurs sont clivés par différentes enzymes DCLs pour produire des siARN qui recouvrent la totalité du génome viral. Ces siARN « antiviraux » guident ensuite les défenses de l'hôte vers les autres copies de génomes viraux homologues, pour induire leur méthylation, et vers les transcrits viraux pour induire leur clivage ou inhiber leur traduction. Lors d'infections par des virus à ARN, les principaux siARN qui en dérivent mesurent 21- et 22 nucléotides, selon s'ils sont produits par l'enzyme DCL4 ou DCL2, respectivement. En revanche lors d'une infection par un virus à ADN, des siARN de 24 nucléotides s'ajoutent à ceux de 21- et 22 nt, résultant de l'activité de l'enzyme DCL1. Le modèle de production de siARN à partir de virus à ADN découle des pathosystèmes *A. thaliana* / Cauliflower mosaic virus (CaMV, *Caulimoviridae*) et *A. thaliana* / Cabbage leaf curl virus (CaLCuV, *Geminiviridae*), où les quatre enzymes Dicer-like sont recrutées pour la production de siARN (Blevins et al., 2006). Le modèle proposé pour ces infections implique que l'enzyme DCL1 excise les tige-boucles retrouvées sur les transcrits primaires afin d'en faciliter l'accès pour les enzymes DCL2, -3 et -4. Les enzymes DCL4 et DCL2 sont les plus actives (avec une proportion différente selon l'espèce hôte), tandis que l'enzyme DCL3, qui libère des siARN de 24 nucléotides, a une activité mineure.

Un modèle spécifique de la production de siARN à partir de Caulimoviridae a été proposé par M. Pooggin (Pooggin, 2013; Pooggin and Ryabova, 2018a). Dans le noyau où s'accumulent les génomes circulaires des virus à ADN de la famille *Caulimoviridae*, l'ARN polymérase II transcrit des ARN pré-génomiques, ou « pgARN » à partir de l'ADN viral, qui sont ensuite réverse-transcrits dans le cytoplasme par la RT virale en ADN double brin circulaire, discontinus. L'ADNdb discontinu est alors redirigé vers le noyau, où ces discontinuités sont réparées grâce à la machinerie de réparation de l'ADN de l'hôte. L'ARN polymérase II

produirait alors massivement des ARN précurseurs nommés « 8S » à partir de la région de fixation de l'ARNt$^{Met}$ si la discontinuité sur le brin (-) n'est pas réparée. Les siARN issus de ces précurseurs dirigeraient les défenses antivirales préférentiellement vers la région 8S de l'ARN pré-génomique, comme un leurre (« decoy ») permettant alors de préserver la traduction des autres régions codantes (Pooggin and Ryabova, 2018a) en mobilisant la défense de la plante sur une seule partie du génome viral. Néanmoins, ce mécanisme ne semble pas concerner les virus du genre *badnavirus* dont fait partie le BSV, car les données de séquençage des siARN produits lors d'infections BSV chez le bananier ne montrent pas de production massive dans cette région du génome viral (Duroy, 2012, thèse; Rajeswaran et al., 2014).

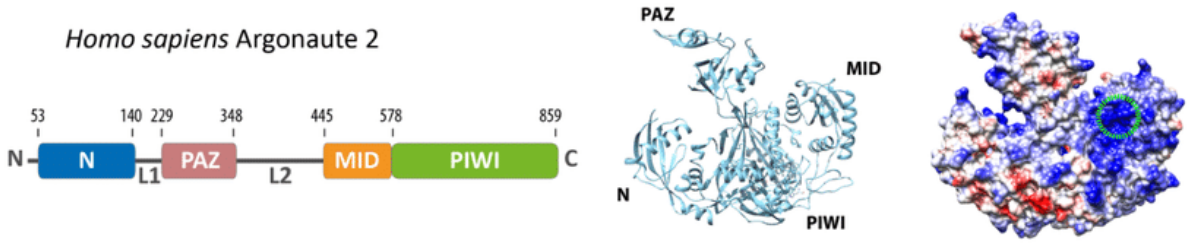



**Figure 1.20: Structure de la protéine Argonaute 2 chez les eucaryotes** (Willkomm, 2015). Les domaines N, PAZ, MID et PIWI sont indiqués sur la séquence (gauche) et sur la structure tridimensionnelle (milieu). La structure incluant l'encombrement stérique est indiquée à gauche, en montrant en bleu les zones chargées positivement, en rouge les zones chargées négativement. La poche accueillant l'extrémité 5' de l'ARN guide dans le domaine MID en encerclée en vert.

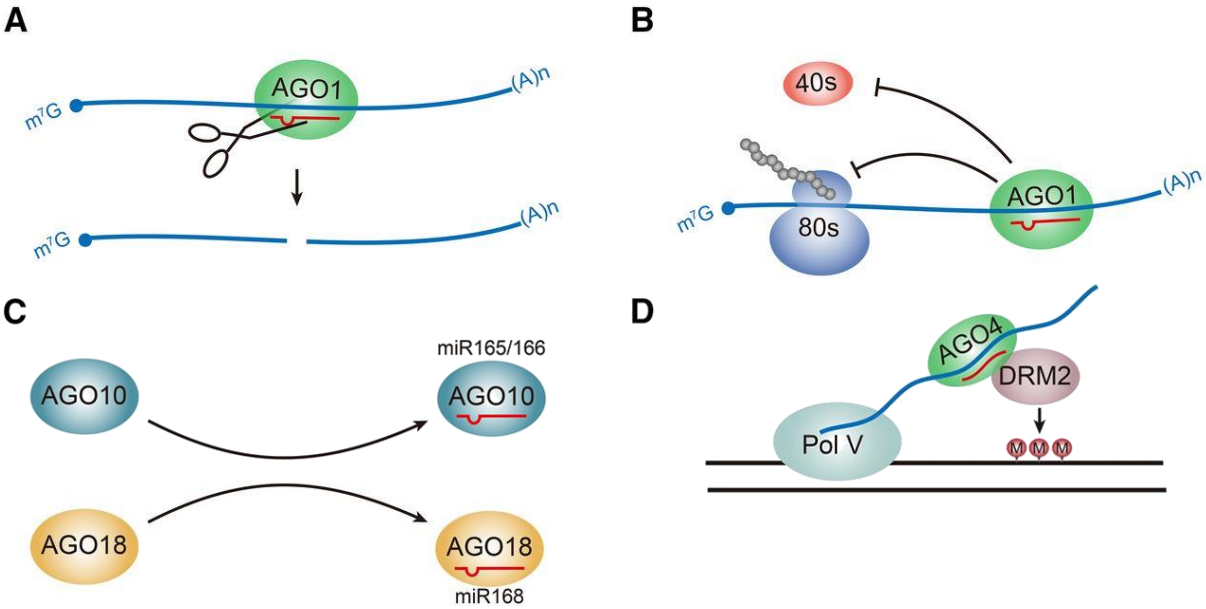
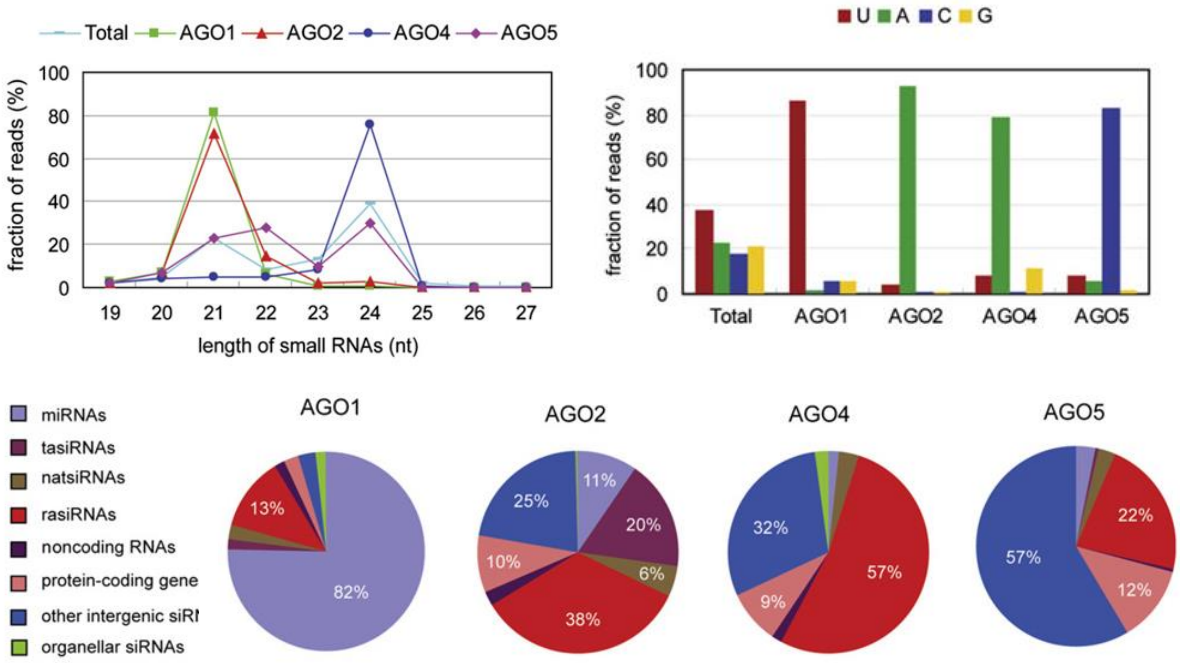



**Figure 1.21: Modes d'action des principales protéines AGO chez les plantes** (Fang and Qi, 2016). **A)** La protéine AGO1 peut fixer les miRNAs ou tasiRNA et cliver l'ARNm cible ou **B)** réprimer sa traduction. **C)** Les protéines AGO10 (chez *A. thaliana*) et AGO18 (chez le riz) ont des fonctions de leurre en séquestrant les miR165/166 et miR168, respectivement. **D)** La protéine AGO4 fixe les hesiRNA ou miRNA transcrits par la Pol IV à partir d'hétérochromatine, et guide la méthylation de l'ADN des séquences cibles.

## 2) Les protéines Argonautes, facteurs clés de l'interférence par ARN (Fang and Qi, 2016)

Les protéines de la famille « Argonaute », ou protéines AGO, sont des composants majeurs du complexe RISC, le complexe effecteur de l'interférence par ARN. Les protéines AGO ont été identifiées chez les archées, bactéries et eucaryotes, et sont supposées avoir une origine ancienne dans l'évolution (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). Le nombre de protéine AGO varie selon les espèces, avec 10 protéines identifiées chez *A. thaliana* (qui sert de modèle majeur pour le règne végétal), 17 chez le maïs et 19 chez le riz. Ces différentes protéines sont néanmoins regroupées en trois famille phylogénétiques : les protéines AGO1/5/10, AGO2/3/7 et AGO4/6/8/9 (Fang and Qi, 2016). Les protéines AGO arborent 4 domaines (Fig. 1.20) : **i)** un domaine variable en N-terminal, le domaine « N » ; **ii)** un domaine conservé « PAZ » (pour « PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE ») ; **iii)** un domaine MID (pour « middle ») et **iv)** un domaine PIWI (Tolia and Joshua-Tor, 2007). La fonction du domaine « N » est encore peu connue. Le domaine PAZ porte un site d'interaction oligonucléotides / oligosaccharides qui permet une interaction avec des acides nucléiques simple-brin, ainsi qu'un site de fixation avec l'extrémité 3' de l'ARN guide. Le domaine PAZ contribue également au déroulement du duplex de petits ARN. Le domaine MID interagit avec l'extrémité 5' de l'ARN guide et contribue à sa sélection selon le premier nucléotide en 5'. Enfin, le domaine PIWI porte une activité endonucléolytique de type RNase-H et procède au clivage de la cible ARNm dans certains cas, notamment lorsque que la complémentarité de séquence entre l'ARN guide et l'ARNm cible est forte. La protéine AGO est donc un facteur clé du complexe RISC car c'est elle qui sélectionne le petit ARN qui guidera ensuite le complexe vers sa cible, et qui définit le type de régulation : transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle.

Les rôles associés à chaque protéine AGO chez *Arabidopsis*, le riz ou le maïs, sont décrit par Fang and Qi (2016, Fig. 1.21). Parmi le clade AGO1/5/10, les protéines AGO sont impliquées dans des processus de régulation physiologique. La protéine AGO1 interagit principalement avec des miARN et est impliquée dans la régulation du développement et de diverses voies physiologiques. La protéine AGO10 régule le développement du méristème par un mécanisme de séquestration des miARN, et régule ainsi indirectement l'expression des gènes ciblés par ces miARN. La protéine AGO5 est probablement impliquée dans la régulation de la gamétogénèse.




| AGO | Taille (nt) | Nucléotide en 5' | Type (biogénèse) |
|---|---|---|---|
| AGO 1 | 21 | U | miRNA |
| AGO 2 | 21 | A | rasiRNA |
| AGO 4 | 24 | A | rasiRNA |
| AGO 5 | 21, 22, 24 | C | Autres siRNAs |

**Figure 1.22: Critères de sélection de l'ARN guide pour les principales AGO chez *A. thaliana* (Mi et al., 2008).** Les résultats obtenus par Mi et al. (2008) sur les caractéristiques des petits ARN interagissant préférentiellement avec les principales protéines AGO chez *A. thaliana* sont décrits ici. La taille, le premier nucléotide à l'extrémité 5' ainsi que le type des petits ARNs (origine de production) interagissant préférentillement avec les protéines AGO 1, 2, 4 et 5 sont indiqués. « **rasiRNA** » : « repeat-associated RNA », correspond aux classes « **easi-RNA** » et « **hetsi-RNA** », décrites plus tôt, et sont issus de transposons et de séquences méthylées.

Les protéines AGO1, AGO5 et AGO10 agissent également dans les défenses antivirales en chargeant les siARN dérivés du virus en cas d'infection. Dans le clade AGO2/3/7, les protéines AGO2 et AGO3 sont impliquées dans la réponse antivirale chez les plantes, avec une activité de clivage des transcrits viraux *in vitro*. AGO7 est impliquée dans la régulation de la production de tasiARN, et dans la régulation de la croissance et du développement des organes. Enfin parmi le clade AGO4/6/8/9, l'activité principale est la méthylation de l'ADN et donc la régulation de la transcription. La protéine AGO4 dirige les hetsiARN vers leurs cibles ADN, mais semble également être impliquée dans la méthylation des ADN viraux, contribuant ainsi à la défense antivirale en réprimant la transcription des génomes viraux. AGO6 interagit mieux avec les siARN, et dirige également la méthylation de l'ADN, sur des loci différents de ceux de AGO4. AGO9 interagit avec les siARN de 24 nucléotides dérivés des éléments transposables et semble avoir un rôle pour leur répression dans les gamètes.

La sélection de l'ARN guide par la protéine AGO repose sur deux facteurs principaux : la **taille du brin** guide et le **nucléotide à l'extrémité 5'** du brin guide. Chez *A. thaliana*, la protéine AGO1 fixe préférentiellement les miARN avec une base U en 5', AGO2 fixe les siARN avec une base A en 5', AGO5 fixe les siARN avec une base C en 5', et la protéine AGO4 fixe les hetsiARN avec une base A en 5' (Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008). Un résumé des critères de sélection caractérisés par Mi et al. (2008) est indiqué ans la figure 1.22. La substitution du nucléotide en 5' sur le brin guide affecte la protéine AGO avec laquelle il interagit, et donc ses fonctions biologiques (Mi et al., 2008). Etudier ces deux facteurs lors du séquençage de petits ARNs renseigne sur leur rôle éventuel *via* la protéine AGO avec laquelle ils interagissent préférentiellement.

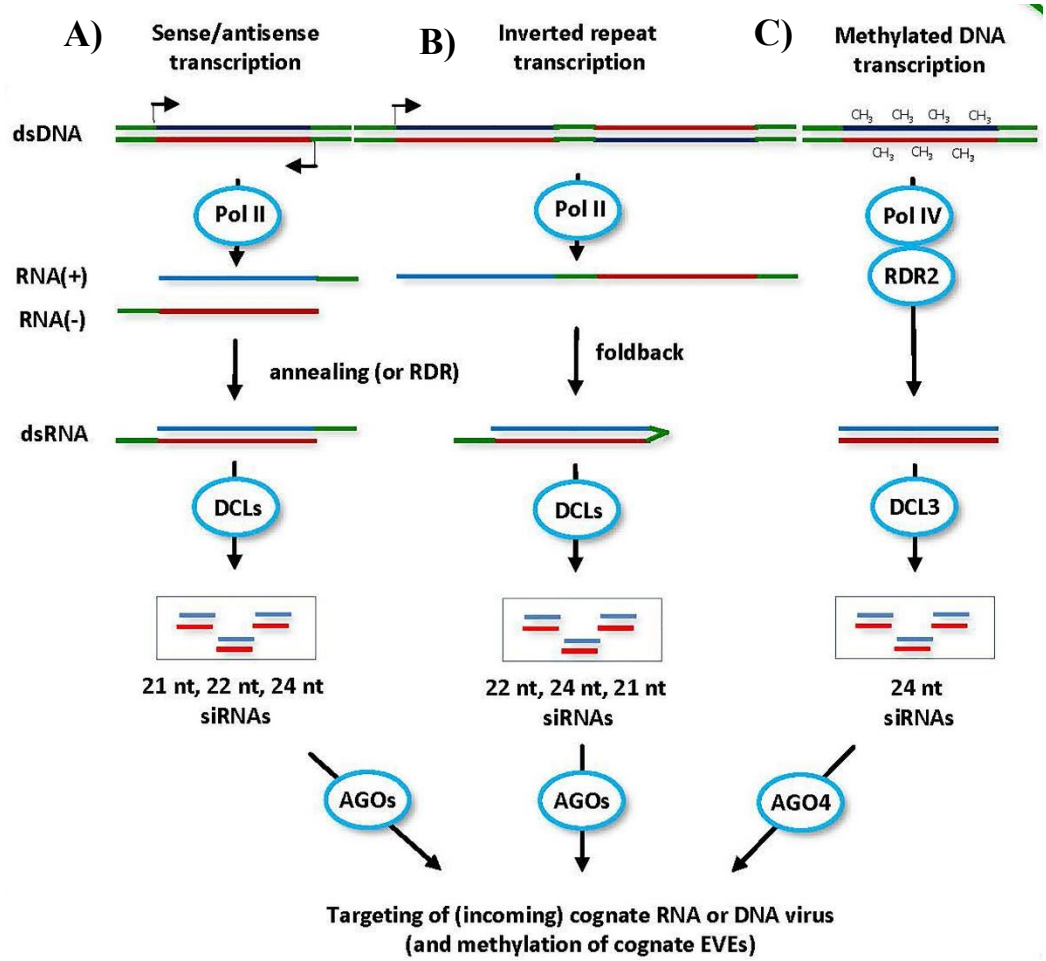



**Figure 1.23: Biogénèse des siARN issus des séquences virales intégrées (Pooggin, 2018).**

### 3) EPRV et défenses antivirales

#### *a) Mécanisme de production de siARN à partir d'EPRV*

Comme indiqué plus haut dans la section II. 6, il est proposé que les séquences virales intégrées peuvent constituer un avantage pour leurs hôtes *via* la production de siARN impliqués dans les défenses antivirales. La diversité des voies de biogénèse des petits ARN décrite dans cette section permet de comprendre les origines des siARN dérivés de séquences virales intégrées. La répétition de multiples copies de séquences virales, transcrites même à faible niveau, permet la synthèse de transcrits viraux en orientations sens et antisens et facilite la formation de précurseurs ARN double-brin aberrants pouvant être clivés par des protéines DCL pour donner des siARN antiviraux (Fig. 1.23, **A**). La répétition-inversion de séquences virales comme le révèlent les structures ePVCV et eBSV permet aux transcrits viraux de former une tige-boucle avec une région à ARN double-brin, pouvant servir de précurseur pour la production de siARN (Fig. 1.23, **B**). Enfin, ces séquences intégrées peuvent être méthylée par la machinerie de régulation des ADN/ARN aberrants ou étrangers de l'hôte. Cette méthylation permet une transcription des EPRV par la Pol IV de l'hôte pour donner un transcrit clivé par la protéine DCL3 en siARN de 24 nucléotides (Fig. 1.23, **C**). Ces siARN antiviraux peuvent alors guider la méthylation de l'ADN vers les séquences cibles, soit d'autres intégrants viraux (et ainsi maintenir ces intégrants viraux silencieux), soit des ADN viraux homologues d'origine exogène, en cas de nouvelle infection.

### *b) Cas d'EPRVs induisant une production de siARN*

Comme mentionné plus haut, les intégrants ePVCV chez *Petunia hybrida* et eBSV chez *Musa balbisiana* sont la source de productions de siARN antiviraux que l'on retrouve chez l'hôte. Chez le pétunia, des expériences de réverse-transcription suivies d'amplification PCR (RT-PCR) ont montré une faible transcription des séquences ePVCV, pouvant être à l'origine de précurseurs desquels dérivent les siARN antiviraux observés chez l'hôte (Noreen et al., 2007). Ces petits ARN, selon leur biogénèse, peuvent soit guider la répression transcriptionnelle, *via* la méthylation de l'ADN au niveau des séquences intégrées (siARN de 24 nt) ; soit guider le complexe RISC vers une défense post-transcriptionnelle ciblant les génomes viraux en réplication, d'origine endo- ou exogène. Chez *P. hybrida*, une méthylation de l'ADN au niveau des séquences ePVCV a été observée, renforçant ainsi l'idée d'une boucle de contrôle rétroactive médiée par les siARN, sans pour autant être suffisamment efficace pour empêcher la restitution de particules virales sous l'effet de stress abiotiques (Richert-Poggeler, 2003).

Chez le bananier, les séquences intégrées eBSV semblent uniformément méthylées chez le diploïde BB (Duroy, 2012, thèse); qui ne développe pas les symptômes de la maladie de la mosaïque en tirets. Ces séquences eBSV sont la source d'une production de siARN principalement de 24 nt (Duroy, 2012, thèse) suspectés de guider la méthylation de l'ADN au niveau des séquences eBSV et limitant leur transcription. Cette production de siARN est supposée conférer au bananier diploïde BB (PKW) son phénotype résistant aux infections BSV qu'elles soient d'origine endogène ou exogène (transmise par cochenille, Lheureux, 2002, thèse). En revanche, ces eBSV n'induisent chez le bananier PKW qu'une faible quantité de siARN de 21 ou 22 nt, témoignant ainsi d'une faible transcription médiée par Pol II, et d'une faible utilisation de la voie de régulation post-transcriptionnelle.

Une expérience chez le tabac, peu après la caractérisation des TEPRV (Jakowitsch et al., 1999) et eTVCV (Lockhart et al., 2000), laissait déjà supposer un rôle des EPRV dans la défense antivirale de leur hôte. Lors de l'introduction d'un transgène composé d'un promoteur dérivé de TEPRV, celui-ci est méthylé et inactif chez le tabac où l'on retrouve les mêmes TEPRV, tandis qu'aucune méthylation n'est observée chez *Arabidopsis*, qui n'héberge pas de TEPRV (Mette et al., 2002). Cette observation a mené les auteurs à proposer que les EPRV étaient maintenus dans le génome de l'hôte pour leurs fonctions antivirales. Cette hypothèse semble aujourd'hui renforcée par la découverte de siARN dérivés de nombreux intégrants viraux, comme l'illustrent les exemples suivants de séquences virales intégrées et non associées à des

infections chez leurs hôtes. Chez la tomate (*Solanum lycopersicon*), où l'on retrouve des intégrants viraux nommés LycEPRV (Tableau 1.2), la transcription de ces intégrants est active, et l'on retrouve des siARN dirigés contre les loci d'intégration. La production de ces siARN augmente lors d'infections par des virus hortologues codant pour des suppresseurs de « silencing », laissant supposer un rôle de ces siARNs dans la défense antivirale chez la tomate (Staginnus et al., 2007). Chez l'eucalyptus, les loci de la RT et RNaseH de l'intégration virale EgEVE_1, sont transcrits et sont couverts par des siARN, probablement issus de cette transcription, et qui pourrait jouer également un rôle dans la défense antivirale (Marcon et al., 2017). Chez *F. imperiallis* (fritillaire), des séquences virales intégrées nommées FriEPRV sont ciblées par des siARN de 24 nt, potentiellement impliqués dans leur méthylation (Becher et al., 2014). Un exemple similaire existe pour une séquence intégrée du CMV, un virus à ARN simple-brin chez le soja, où des séquences intégrées nommés eCMV ont été identifiées. Le séquençage des siARN chez cet hôte révèle qu'une partie des siARN sont issus des eCMV, et recouvrent principalement les régions inversées-répétées de l'intégrant viral.

L'expression de séquences virales intégrées et la production de siRNA à partir de ces transcrits supporte l'hypothèse que de telles séquences ont été fixées dans leurs populations hôtes grâce aux avantages de résistance antivirale qu'elles ont ou continuent de conférer dans un environnement épidémique passé ou présent, respectivement. Néanmoins certaines de ces intégrations représentent encore une menace pour leur hôte, à l'instar des eBSV pour les bananiers hybrides AAB, et posent la question de l'équilibre risque / bénéfice pour l'hôte. Dans ces cas, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité de la régulation des infections d'origine endogène, notamment chez des espèces d'intérêt agronomique majeur tel que le bananier, pour ensuite caractériser le risque épidémique associé à de telles infections.

## IV. Epidémiologie et gestion de risque

En agronomie comme en santé publique, on considère dans l'étude des maladies trois facteurs majeurs : l'agent pathogène, sa transmission et son/ses hôtes. Un quatrième facteur, l'environnement, agit sur chacun de ces trois facteurs. Dans certains cas, l'interaction de ces facteurs amène à l'apparition d'une épidémie. Une **épidémie** correspond à une augmentation rapide de la **prévalence** (portion d'une population atteinte) et de **l'incidence** (nombre de nouveaux cas sur une période donnée) d'une maladie dans une population à un lieu précis et à un temps *t*. **L'épidémiologie** est définie comme l'étude des facteurs influant les maladies, et inclut donc l'étude de l'agent pathogène, de l'hôte, du mode de transmission et de l'effet de l'environnement sur ces interactions. L'épidémiologie végétale a été développée dans les années 1960 pour prévenir des épidémies sur les principales cultures d'intérêts agronomique (Van den Planck, 1963).

La gestion d'un risque épidémique repose sur l'étude épidémiologique d'une maladie, et peut se traduire par différentes stratégies de gestion, dont on distingue quatre niveaux : 1) ***l'éradication***, qui consiste à faire disparaître l'agent pathogène de la population ; 2) la ***suppression***, qui consiste à diminuer la taille de la population ; 3) ***l'enrayement***, qui consiste à prévenir la dissémination du pathogène, et 4) le ***confinement***, qui consiste à enfermer un pathogène en quarantaine pour empêcher sa propagation (FAO, 2017). En agronomie, différents outils sont utilisés dans la gestion de risque épidémiologique, tels que l'usage de produits phytosanitaires ou de lutte biologique, pour diminuer la population de pathogène ; le développement de variétés résistantes, pour réduire la gamme d'hôte, ou enfin l'arrachage des hôtes malades, pour enrayer la dissémination du pathogène.

### 1) Contrôles sanitaires pour la culture bananière

La culture industrielle de bananes reposant sur la propagation clonale d'un seul sous-groupe variétal (« Cavendish », AAA), le risque qu'un foyer de maladie se transforme en épidémie est très élevé. L'exemple le plus marquant est celui de l'épidémie de fusariose du bananier (ou maladie de Panama), maladie fongique causée par *Fusarium oxysporum* f. sp *cubense*, qui a décimé les cultures intensives du cultivar « Gros Michel » dans les années 1950. S'en est suivie la mise sur le marché du cultivar « Cavendish », variété résistante à la fusariose, et aujourd'hui mondialement cultivée. La gestion de risque épidémique dans la culture bananière repose d'abord sur le contrôle des échanges de matériel végétal. L'échange jusque dans les années 1970 de matériel sous forme de rhizome ou de rejets entiers permettait la dispersion de champignons, bactéries ou nématodes présents dans le sol et associés aux racines, comme ce fut le cas pour la fusariose (Astier, 2001). Aujourd'hui, la majorité des échanges s'effectue avec des **vitroplants** de bananiers (issus de culture *in vitro*), cultivés dans un milieu de culture artificiel permettant d'éliminer toute contamination par un pathogène fongique, bactérien ou parasitaire. Cependant, cette stratégie ne permet pas de déceler des infections virales, pour lesquelles un diagnostic systématique est appliqué pour le BSV et les autres virus connus (*Banana bunchy top virus* (BBTV), *Banana bracht mosaic virus* (BBrMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV), *Banana virus X*).

### 2) Gestion du risque épidémique lié au Banana streak virus

La mosaïque en tirets du bananier (ou « BSD » pour « Banana streak disease ») a été reportée et décrite en 1974 (Lassoudière, 2007), bien qu'elle ait vraisemblablement déjà été observée dans les années 1930 en Australie et en Amérique. La maladie est présente dans toutes les zones de production de bananiers (Fig. 1.24). Les épidémies de mosaïque en tirets ayant conduit à l'éradication de plants malades n'ont été reportées jusqu'à aujourd'hui que sur des parcelles de bananiers sans génome B, en Ouganda, Costa Rica et Pérou, sur des bananiers des sous-groupes AAA, « Poyo », « Grande Naine » et « Cavendish », respectivement (Lockhart and Olszewski, 1993; Pasberg-Gauhl et al., 2000, 2007). Elles restent cependant rares, avec une propagation par cochenilles lente et restreinte à la parcelle cultivée. Lors de foyers épidémiques observés en Equateur dans les années 1990 sur des plantations commerciales de bananes Cavendish, les plants exposant des symptômes de mosaïque en tiret ont été arrachés, et des parcelles entières (de 50m²) suivaient ce traitement à partir de 10 plants symptomatiques détectés (Jones, 1999).

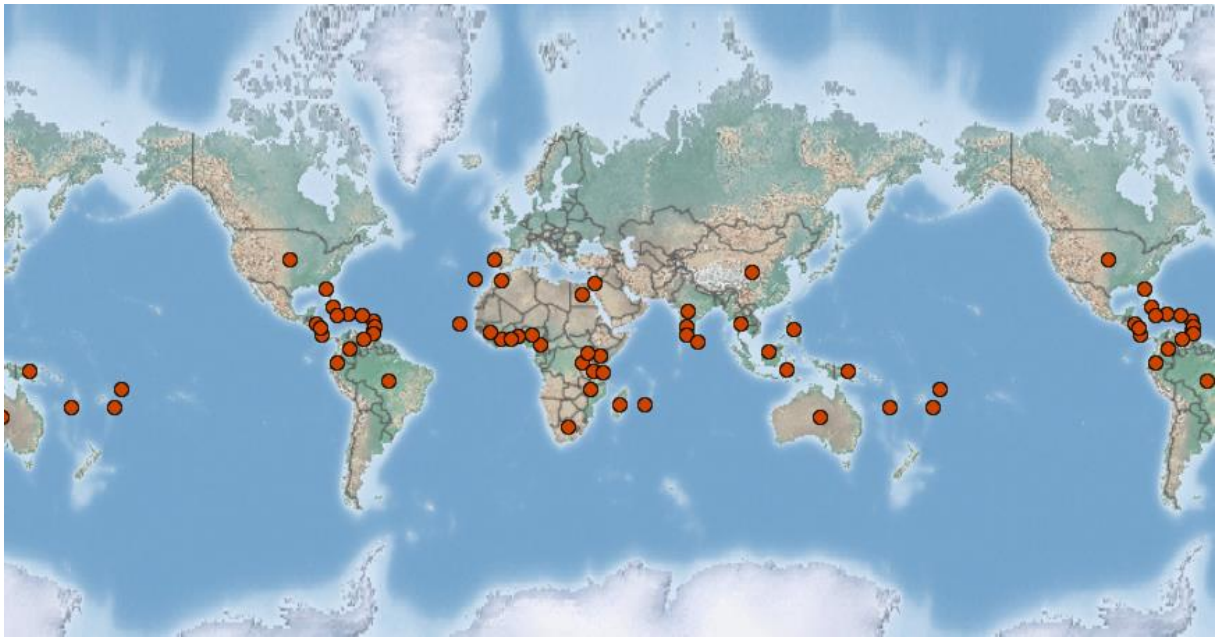


**Figure 1.24: Prévalence mondiale de la mosaïque en tirets du bananier.** Les points rouges indiquent les foyers d'infections reportés, d'après le site plantwise.net.

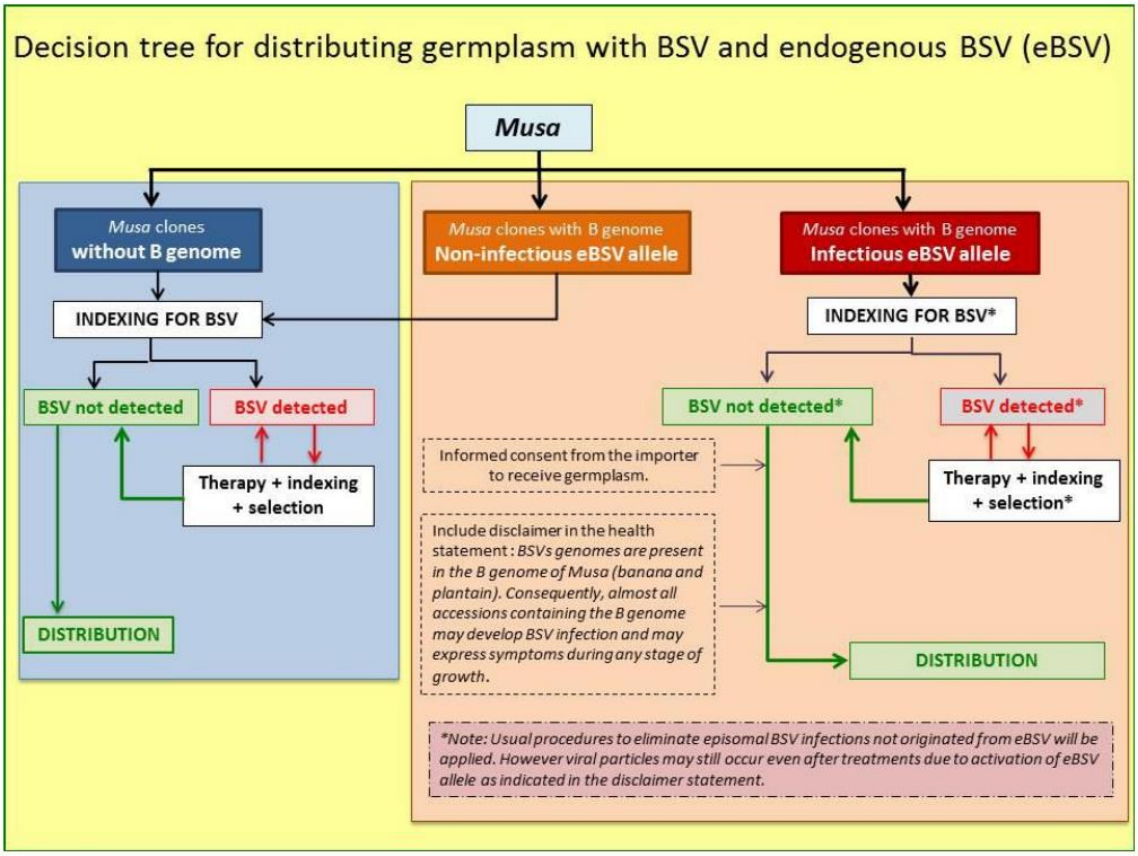



**Figure 1.25: Arbre de décision proposé à l'issue d'un atelier portant sur l'échange de matériel végétal avec du génome B** (Thomas et al., 2015)

Le Banana streak virus a également été reporté sur des parcelles de plantains, au Zanzibar et au Cameroun (Gauhl et al., 1997; Vuylsteke et al., 1998a), avec des plants symptomatiques, mais sans que le foyer infectieux ne devienne épidémique.

Au regard des nouvelles connaissances et outils disponibles sur les eBSV, le moratoire sur les échanges internationaux de bananiers à génomes B a été réévalué. S'est alors posée la question du contrôle de ce matériel végétal à risque et de son statut. En 2015, un atelier rassemblant plusieurs chercheurs travaillant sur le risque lié aux eBSV a abouti à la publication d'un arbre de décision générique pour l'échange de matériel végétal de bananier avec et sans génome B (Thomas et al., 2015; Fig. 1.25). Cet arbre autorise les échanges de matériel hybride avec du génome B dès lors que ces derniers sont sans particules virales épisomales, incluant les hybrides porteurs d'allèles infectieux, et sous réserve d'informer le bénéficiaire du risque de déclenchement de la maladie au champ. Plusieurs techniques utilisant la sérologie ont été développées dans les années 1990 pour la détection des particules virales épisomales de BSV comme l'ELISA et l'immunosorbent electromicroscopie ISEM (Ndowora and Lockhart, 2000), mais leur utilisation est limité par la diversité d'espèces BSV ou par leur coût (Jones, 1999). La principale méthode de diagnostic utilisée aujourd'hui est une méthode sérologique suivie d'une amplification moléculaire: l'immunocapture-PCR, ou IC-PCR (Harper et al., 1999, Leprovost et al., 2006). Le développement d'un diagnostic par amplification isothermique médiée par boucle (LAMP) a également été développé récemment pour faciliter la détection des principales espèces BSV sur le terrain dans des environnements de laboratoires modestes (Peng et al., 2012a, 2012b). Lorsque des particules virales BSV sont détectées, la cryo-préservation (Helliot et al., 2002) de l'ensemble du matériel permet de les éradiquer, et les plants sont à nouveau indexés avant d'être échangés.

Néanmoins, les bananiers hybrides natifs ou issus de sélection génétique et cultivés à ce jour sont toujours soumis au risque d'activation spontanée et non contrôlée des eBSV produisant un inoculum disponible pour les cochenilles vectrices. L'unique stratégie durable de gestion de risque pour contrôler les eBSV infectieux consiste donc à développer des bananiers dépourvus d'intégrations. Deux approches sont possibles, l'une consiste à améliorer les géniteurs BB pour qu'ils n'aient plus d'eBSV ou de sélectionner selon les croisements des hybrides les ayant éliminés (Noumbissie Touko, 2014; Umber et al., 2016) ; l'autre propose une élimination par édition génique de type CRISPR-Cas 9. Ce type d'hybride est en cours de développement au Cirad et à l'IITA (Tripathi et al., 2019).

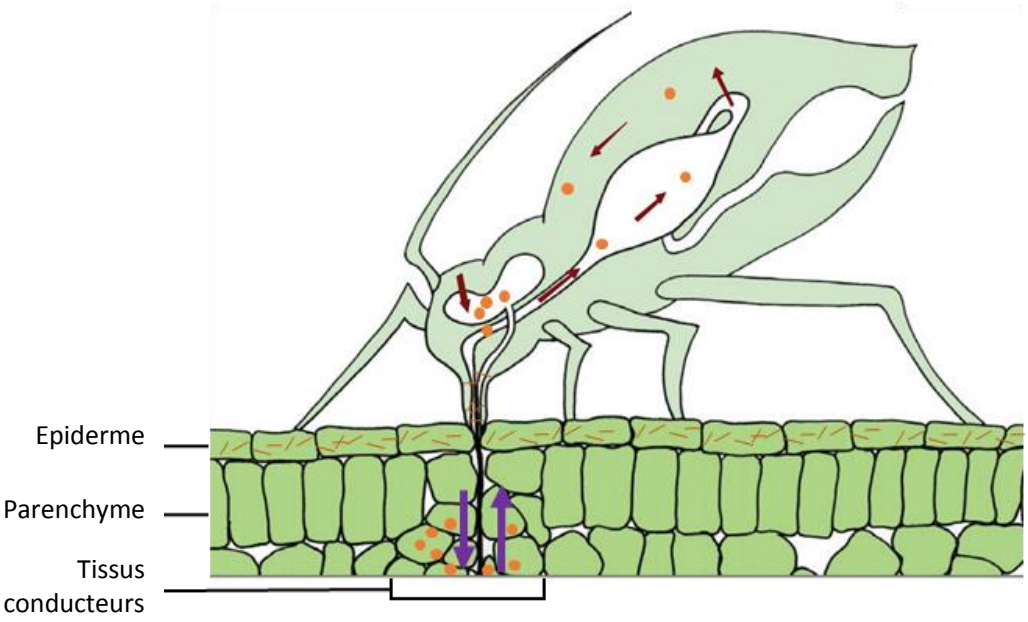



**Figure 1.26: Acquisition de virus de plante par le puceron.** Lorsque le puceron s'alimente sur la plante hôte, les piqûres d'essai dans l'épiderme et le parenchyme lui permettent d'acquérir les virus situés dans les tissus superficiels et de soutien de la plante (bâtonnets oranges). Lors de la phase de ponction dans le phloème, il peut acquérir et inoculer (flèches violettes) les virus restreints au phloème (ronds orange). Si la transmission du virus est non-circulante (ici, cas des bâtonnets), les particules virales s'accrochent à la cuticule externe du stylet ou remontent dans l'œsophage. Si la transmission est circulante (ici, cas des ronds), les particules virales transitent dans le système digestif du puceron, et passent la paroi intestinale pour atteindre l'hémolymphe et rejoindre les glandes salivaires (flèches rouges). Schéma adapté de Astier, 2001.

| | Virus non circulants | | Virus circulants | |
|---|---|---|---|---|
| | Non persistants | Semi-persistants | Virus persistants | |
| | | | Non multipliants | Multipliants |
| **Acquisition** | secondes | minutes | heures | heures |
| **Latence** | non | non | oui | oui |
| **Rétention** | Quelques heures | Heures - jours | Plusieurs jours - vie entière | Vie entière |
| **Conservation après une mue** | non | non | oui | oui |

**Tableau 1.3: Principales caractéristiques distinguant les différents modes de transmission horizontale des virus de plantes** (Astier, 2001).

### 3) La transmission horizontale du BSV : un facteur épidémiologique clé

#### *a) Les différents modes de transmission horizontale*

La transmission d'un virus est dite « horizontale » lorsqu'un nouvel hôte est infecté. De rares cas de transmission horizontale se font par simple contact entre deux plantes, mais dans la grande majorité ce type de transmission fait intervenir un acteur extérieur. On parle alors de vection. L'acteur extérieur peut être abiotique (vent, sol, eau) ou biotique, mais dans la grande majorité les vecteurs de virus de plantes sont des insectes. En effet, la paroi pectocellulosique des cellules végétales représente une barrière que les virus traversent grâce à l'effraction réalisée par l'insecte lors de son alimentation sur la plante.

Il existe chez les virus de plantes trois grands modes de transmission : la transmission circulante multipliante, la transmission circulante non-multipliante, et la transmission non-circulante. Les deux modes de transmission circulante impliquent que le virus, une fois acquis par l'insecte vecteur, circule dans le système digestif de celui-ci en passant la barrière intestinale, puis rejoint les glandes salivaires du vecteur en passant par l'hémolymphe (Fig. 1.26). Le virus peut alors être transmis à une nouvelle plante *via* la salive du vecteur. Ce mode de transmission nécessite que le vecteur se nourrisse dans le phloème pendant plusieurs heures. L'insecte reste ensuite virulifère (c'est-à-dire capable de transmettre le virus) toute sa vie. Si le virus se multiplie dans l'organisme du vecteur, la transmission est circulante multipliante, autrement elle est dite circulante non-multipliante. D'autres virus ont une transmission non-circulante, indiquant qu'ils ne passent pas la barrière intestinale du vecteur. Le virus reste accroché aux parties externes cuticulaires du rostre de l'insecte (Fig. 1.22). Lors de transmission non circulante, le virus peut être non persistant ou semi-persistant. S'il est non persistant, le virus reste accroché au stylet du vecteur pendant quelques secondes à quelques minutes et requiert un délai très court pour être transmis à une plante saine. Si le virus est semi-persistant, il est supposé qu'il remonte dans l'œsophage du vecteur, où il peut être retenu de quelques heures à quelques jours, augmentant ainsi ses chances de transmission. Le tableau 1.3 indique les principales différences entre ces différents modes de transmission

### *b) Transmission du BSV par cochenille*

L'insecte vecteur du Banana streak virus est la cochenille. Les cochenilles font partie de l'ordre des Hémiptères, qui regroupe la majorité des vecteurs de pathogènes chez les plantes : les pucerons (*Aphididae*), les aleurodes (*Aleyrodidae*), les cicadelles (*Cicadellidae*), les delphacides (*Fulgoroidea*) et les cochenilles (*Coccoidea*). Plusieurs espèces de cochenilles sont connues pour être vectrices de badnavirus, notamment parmi les genres *Pseudococcus, Planococcus, Planococcoides, Ferrisia, Saccharicoccus* et *Dysmicoccus* (2014). Parmi celles-ci, sont décrites à ce jour comme espèces vectrices du BSV les espèces *Planococcus citrii* (Jones, 1999; Lockhart and Olszewski, 1993), *Planococcus ficus, Dysmicoccus brevipes,* (Kubiriba et al., 2001; Meyer et al., 2008a), *Paracoccus burnerae* (Muturi et al., 2013), *Pseudococcus comstiki* (Su et al., 1997). Cette liste non exhaustive s'allonge régulièrement, et la grande ressemblance morphologique entre certaines espèces limite l'identification de nouvelles espèces vectrices sur des critères visuels. Des études de la maladie de la mosaïque en tiret au champ, en Ouganda et en Australie, qualifient la dispersion du virus comme lente (Daniells et al., 2001; Kubiriba et al., 2001), notamment grâce à la faible mobilité des cochenilles. La cochenille est en effet considérée comme un vecteur peu efficace, car seuls les premiers stades larvaires (Fig. 1.27, stades D et E) sont mobiles (Fargette et al., 2006). Cette faible mobilité est néanmoins compensée par l'interaction des cochenilles avec les fourmis (Fig. 1.27), qui en font des élevages pour prélever leur miellat (Sether et al., 2012).

L'acquisition et l'inoculation des virus transmis par cochenilles se fait lors de leur alimentation sur la plante hôte. Les cochenilles sont des insectes « piqueurs-suceurs » dont le stylet leur permet de se nourrir dans le phloème (Cid and Fereres, 2010). Les comportements alimentaires des insectes sur plante sont caractérisables grâce à la méthode d'électropénétrographie (EPG) qui consiste à mesurer les différences de potentiel électrique lors de l'alimentation de l'insecte, grâce à un branchement reliant l'insecte, la plante et un circuit électrique (McLean & Kinsey, 1964, Tjallingii, 1978). Lors de son arrivée sur une plante hôte, la cochenille procède à des « piqûres d'essais » dans le mésophylle, avant d'atteindre le phloème (Cid and Fereres, 2010 ; études portée sur *Planococcus citri*). Chez le puceron, un vecteur majeur des virus de plante, ces piqûres d'essai sont associées à l'acquisition et l'inoculation de différents virus, parmi lesquels le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV), un autre virus de la famille des *Caulimoviridae* (Palacios, 2002).

La transmission du BSV par la cochenille au bananier est **non-circulante**, **semi-persistante** (Bhat et al., 2016a; Muturi et al., 2016). Des tests de transmission du BSV par différentes espèces de cochenilles ont été reportés. En Ouganda, des tests sur *D. brevipes* reportent un taux de transmission de 10 à 15%, avec un temps d'acquisition de un jour et une période de rétention du virus dans la cochenille de cinq jours (Kubiriba et al., 2001), ce qui concorde avec un mode de transmission semi-persistent. Un autre test effectué sur *P. citri* reporte un taux de transmission de 75%, 3 à 4 semaines après inoculation du virus (Su, 1998). Les tests d'acquisition et de transmission présentés dans ce manuscrit (Chapitre III) se basent sur ces études ainsi que sur d'autres études de la vection par cochenille de virus de vigne (Alliaume, 2016, thèse) et du *Sugarcane bacilliform virus* (ScBV) chez l'ananas (Sether et al., 2012).

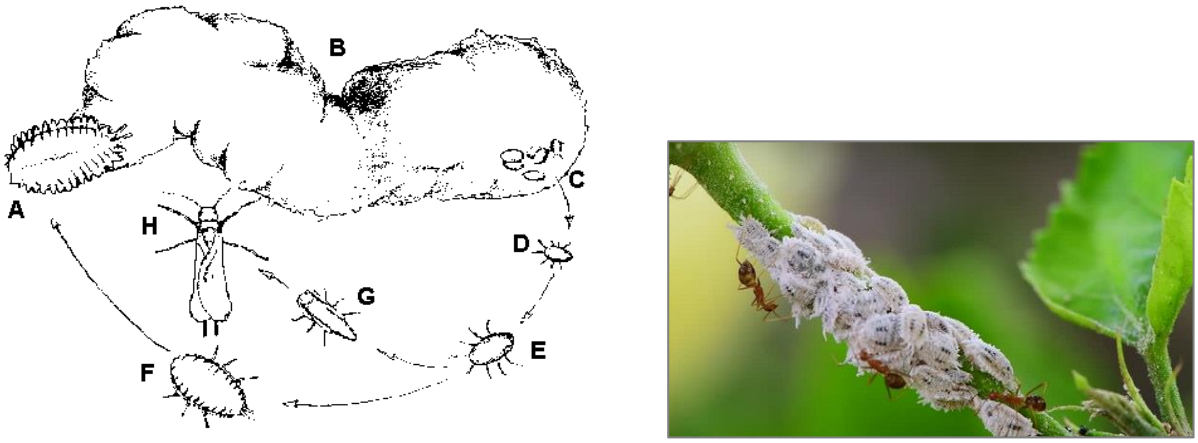



**Figure 1.27: Cycle de vie et élevage de cochenilles.** Droite : Cycle de vie de *Planococcus citri*. **A)** femelle adulte, **B** et **C)** œufs, **D)** premier stade larvaire, **E)** deuxième stade larvaire, **F)** troisième stade larvaire, **G)** pupe, **H)** adulte mâle (d'après le site de l'UF/IFAS). Gauche : élevage de cochenilles par des fourmis.

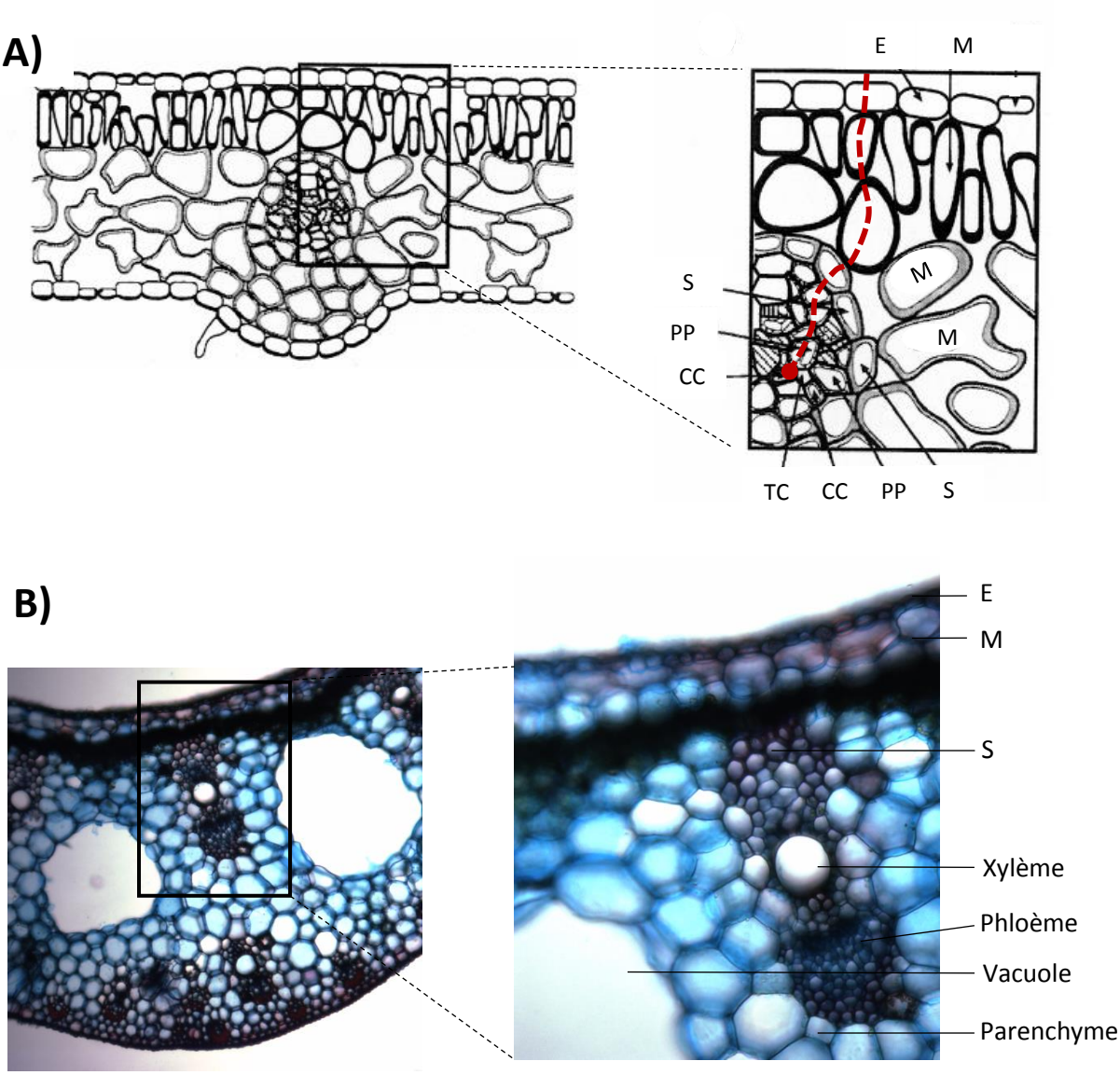



**Figure 1.28: Schéma et coupe histologique illustrant les tissus traversés par un virus au cours d'une infection**. **A)** schéma d'une coupe de feuille et du trajet réalisé par le virus lors de son entrée dans l'organisme hôte (ligne pointillée rouge), adapté de Hull, 2015. E: Epiderme, M: Mésenchyme, S: Sclérenchyme, PP: Parenchyme phloémien, CC: cellules compagnes, TC: tubes criblés. **B)** Coupes histologiques de pétiole de bananier coloré au FASGA, avec les indications des principaux tissus distinguables. Le FASGA colore les parois cellulaires, et distingue les polysaccharides (colorés en bleu) de la lignine (colorée en rouge). Grossissement 10x. Coupe et coloration: E. Ricciuti

### *c) Localisation et mouvement des virus dans les tissus infectés*

A l'intérieur de la cellule hôte, le virus utilise des réseaux de transport pour rejoindre les différents compartiments cellulaires nécessaires à sa multiplication, et transite notamment par les microtubules et microfilaments qui représentent le cytosquelette de la cellule hôte. La réplication et multiplication du virus s'effectue alors dans un compartiment nommé « viroplasme », avec un passage obligatoire dans le noyau de la cellule hôte pour certains virus comme ceux de la famille *Caulimoviridae*. Afin de coloniser la plante entière et d'entraîner une infection généralisée, dite « **systémique** », les virus peuvent emprunter deux types de mouvements : les mouvements de cellule à cellule ; et les mouvements de longue distance *via* les tissus vasculaires (Samuel, 1934).

Le mouvement de cellule à cellule se fait *via* les **plasmodesmes**, qui sont des canaux reliant les cellules adjacentes. Les plasmodesmes ont une taille limite d'exclusion inférieure à la taille de la plupart des virus, pourtant des modifications de leur structure lors d'infections semblent permettre le passage des virus. Le mouvement de cellule à cellule suit un trajet dirigé vers les tissus vasculaires, où le virus profitera d'un mouvement de longue distance. Ainsi, les virus entrant dans des cellules du mésenchyme rejoignent progressivement les cellules du parenchyme péri-vasculaire, puis quelques cellules du parenchyme phloémien, les cellules compagnes et enfin les tubes criblés du phloème (Fig. 1.24).

Le mouvement de longue distance, également qualifié de « transport passif », profite des flux de nutriments dirigés depuis les organes « sources » (exportateurs de sucre produit par photosynthèse : feuilles adultes) vers les organes « puits » (importateurs de sucre : méristèmes, racines, jeune feuilles). Ce flux s'effectue dans les tubes criblés du **phloème**, un des tissus vasculaires de plante, chargé de transporter la sève « élaborée » (produits de la photosynthèse). Les virus capables de mouvement de cellule à cellule peuvent alors sortir des tubes criblés pour infecter des cellules du mésenchyme dans des tissus distants du site d'infection initial. En revanche, certains virus sont restreints au phloème, et ne sont pas capables de mouvement de cellule à cellule hors du phloème. C'est le cas par exemple des virus de la famille *Nanoviridae* tels que le *Banana bunchy top virus* (genre *babuvirus*) infectant le bananier.

La localisation histologique des virus et notamment la restriction au phloème de certains d'entre eux conditionne leur mode de transmission. En effet, les virus restreints au phloème nécessitent un mode de transmission circulant ou non-circulant semi-persistant, car nécessitent un laps de temps de quelques minutes à quelques heures pour être acquis (correspondant au temps pour le

vecteur d'atteindre le phloème). A l'inverse, les virus à transmission non circulante non persistante peuvent être localisés dans les tissus de soutien comme le mésenchyme, car nécessitent un laps de temps court, de quelques secondes à quelques minutes pour être acquis, correspondant aux piqûres d'essais avant d'atteindre le phloème (Tableau 1.3).

Lors de l'étude d'un pathosystème virus-plante impliquant un insecte vecteur, la caractérisation de la localisation histologique du virus dans les tissus infectés peut fournir de précieuses informations quant à son accessibilité pour le vecteur. Ce type de données, absentes pour le pathosystème BSV – bananier, peut aider à évaluer le risque de transmission du virus et donc le risque épidémique lié à ce virus.

# V. Problématique et hypothèses de recherche

La demande alimentaire est croissante et cible en Afrique la banane plantain, ce qui entraine une intensification de sa culture dans un contexte climatique changeant. Le génome des bananiers du sous-groupe « plantain », triploïdes AAB, héberge des séquences des espèces virales de Banana streak virus (eBSOLV-1 et eBSGFV-7) capables de déclencher une infection, entraînant la maladie de la mosaïque en tirets. Les stress environnementaux attendus dans les décennies à venir comme le stress hydrique ou le stress thermique sont des stress activateurs de ces eBSV, dont il n'existe aujourd'hui aucun contrôle ni anticipation de l'activation. A ce jour, aucune épidémie de mosaïque en tiret n'a été reportée à partir de parcelles de plantains, qui restent majoritairement des cultures villageoises. Cependant, l'intensification de la culture (telle que planifiée par exemple en Côte d'Ivoire) risque de favoriser la proximité géographique avec les cultures intensives de bananes dessert (Kwa et Temple, 2019). Ce nouveau contexte de culture représente un risque épidémique pour les bananiers du sous-groupe « Cavendish », dépourvus d'intégrations eBSV (génome AAA), et pour lesquels des épidémies de mosaïque en tiret ont déjà été reportées par le passé. L'intensification de la culture de plantain risque d'entraîner une augmentation de l'inoculum viral disponible pour les cochenilles, lié aux intégrations eBSV, et nécessite d'évaluer le risque épidémique résultant de la transmission horizontale du BSV aux cultures de bananier Cavendish (AAA).

L'évaluation d'un risque épidémique repose sur l'étude de quatre facteurs : agent pathogène, hôte, transmission et environnement. Les travaux présentés dans ce manuscrit se concentrent sur deux de ces quatre facteurs, l'hôte et la transmission.

**L'hôte**

***Régulation des eBSV et des infections BSV***

Le génome du bananier affecte sa susceptibilité au Banana streak virus. Le bananier diploïde BB sauvage Pisang Klutuk Wulung (PKW) est résistant aux infections BSV, contrairement aux cultivars Cavendish (AAA) qui y sont extrêmement sensibles et connus pour être le foyer d'épidémies de mosaïque en tirets. Les bananiers hybrides natifs interspécifiques AAB, porteur d'une unique copie du génome B, peuvent développer une infection BSV à partir des eBSV qu'ils hébergent, sans cependant être à l'origine d'épidémies. La présence des intégrations virales dans leur génome est soupçonnée d'alimenter le mécanisme de défense antiviral basé sur l'interférence par ARN. En effet, l'importante production de siARN de 24-nt chez le

bananier PKW (diploïde BB), et issus des intégrations eBSV et de la co-évolution eBSV/génome BB, suggère que ces mêmes intégrations présentes chez les hybrides AAB natifs agissent de manière similaire. Néanmoins, la différence de ploïdie pour le génome B semble être à l'origine d'une différence d'efficacité de régulation, amenant les bananiers hybrides natifs habituellement sains à subir sporadiquement des infections BSV d'origine endogène.

L'hypothèse de recherche découlant de ces observations propose que les hybrides natifs AAB bénéficient continuellement d'une régulation antivirale basée sur l'interférence par ARN, leur procurant un phénotype résistant comme PKW. Cette régulation est supposée agir au niveau transcriptionnel pour limiter la transcription des eBSV en conditions de culture optimale. Lors de stress environnementaux, cette régulation transcriptionnelle issue d'un seul génome B serait insuffisante, et libèrerait des génomes viraux fonctionnels responsables d'une infection. L'interférence par ARN basculerait alors au niveau post-transcriptionnel dès le relargage de génomes viraux, pour en limiter la multiplication et enrayer l'infection.

***Distinction entre hybrides AAB synthétiques et natifs***

En parallèle, les nouvelles variétés issues de croisements artificiels et porteuses d'une copie du génome B (triploïdes AAB, tétraploïdes AAAB) sont également soumises aux mêmes risques d'infection dérivant des eBSV. Ces hybrides dit « synthétiques » diffèrent des hybrides « natifs » (tels que les plantains) par le caractère récent du croisement entre génome A et B, et par l'absence de coévolution entre leurs génomes et les intégrations virales. La régulation des eBSV infectieux apparaît moins forte que pour les hybrides natifs, au regard des infections observées lors de cultures intensives de FHIA 21 et de IRFA 909 par le passé.

L'hypothèse de recherche émise en amont de ces travaux propose que les hybrides natifs ont une régulation des eBSV utilisant l'interférence par ARN et héritée de la co-évolution des génomes viraux et de bananier. Ces bananiers seraient habituellement sains et capables de réversion rapide lors d'échappées d'infection liées à des stress environnementaux. Cette défense serait moins efficace pour des bananiers hybrides synthétiques et augmenteraient le risque épidémique lié aux intégrations eBSV pour la culture de ces nouvelles variétés.

**La transmission**

L'apparition sporadique d'infections BSV en champs, ainsi que les hypothèses de régulation antivirale exposées ci-dessus, proposent que l'inoculum viral (la quantité de particules virales disponibles pour une infection) varie au cours d'une infection BSV chez des bananiers hybrides

AAB. L'absence d'épidémie de mosaïque en tirets dans des parcelles de bananiers plantains laisse penser que la régulation des infections chez des hybrides natifs AAB limite l'inoculum viral à une quantité insuffisante pour une transmission massive d'infection par cochenilles vectrices. Cependant, l'absence d'information sur la localisation histologique du virus chez le bananier et de données de transmission à partir de bananiers hybrides natifs ne permet pas d'évaluer le risque de transmission du BSV dans les conditions de culture actuelles. Les travaux présentés dans le troisième chapitre de ce manuscrit visent à apporter de nouvelles informations quant à la quantité d'inoculum accessible aux cochenilles vectrices, et quant au risque de transmission de la maladie.

Ce manuscrit s'articule autour de trois chapitres. Le **chapitre I** présente des essais de **suivis d'infection** BSV chez des hybrides AAB natifs et synthétiques, ainsi qu'une **méthode** pour **quantifier la charge virale** au cours du temps (Article 1). Le **chapitre II** présente les **profils de siARN antiviraux** correspondants à différents stades de régulation d'infection chez ces mêmes bananiers, et sous tendant les mécanismes d'interférence par ARN (Article 2). Le **chapitre III** présente les résultats préliminaires de **transmission** et **d'acquisition** du virus, travail réalisé en étroite collaboration avec l'ANSES (« Disease Note »), ainsi que des données de **localisation histologique** du virus chez des bananiers infectés.

---

Article 1 (p. 81) : *Soumis en septembre 2019 dans la revue "Journal of General Virology"*

**Extrachromosomal viral DNA produced by infective endogenous viral elements in non-infected banana hybrids impedes quantitative PCR diagnostics of *Banana streak virus* infections**
Emeline Ricciuti, Guy Noumbissié, Matthieu Chabannes, Nathalie Laboureau, Mikhail Pooggin, Marie-Line Iskra-Caruana

Article 2 (p.143): *Manuscrit en cours de finalisation, soumission prévue après évaluation de la thèse*

**How native plantain deals with viral infection derived from endogenous viral sequences of Banana streak virus.**
Emeline Ricciuti, Mikhail Pooggin, Marie-Line Iskra-Caruana

Disease Note (P. 212) : *Soumise en octobre 2019 dans la revue « Plant Disease »*

**First report of *Dysmicoccus neobrevipes* as vector of Banana streak virus**
D. Massé, E. Ricciuti, M-L Iskra-Caruana, B. Hostachy

# CHAPITRE 1

## Dynamiques d’infections BSV chez des bananiers hybrides natifs et synthétiques

# I. Introduction

La maladie de la mosaïque en tirets (ou BSD pour « Banana streak disease ») est causée par le complexe d'espèces Banana streak virus (BSV). Deux sources d'infections existent: 1) chez tous les bananiers, le virus est transmis à partir de plants infectés vers des plants sains par au moins 5 espèces de cochenilles selon le mode non-circulant, semi-persistant (Kubiriba et al., 2001; Meyer et al., 2008; Muturi et al., 2013; Su, 1998), et 2) chez les bananiers porteurs d'une copie de génome B (issu de l'espèce *Musa balbisiana*), le virus est restitué à partir des intégrations virales eBSV infectieuses du génome B induisant une auto-infection. Dans les deux cas, les symptômes de la maladie sont identiques. Les symptômes les plus courants sont des cassures chlorotiques sur les feuilles, se transformant en nécroses, et l'éclatement du pseudo-tronc (Lassoudière, 2007, voir Fig. 1.9).

Le bananier est une plante à croissance végétative. Le cœur du plant est constitué d'un bulbe, d'où émergent le méristème principal et les méristèmes secondaires (Fig. 2.1). Le méristème principal produit le pied principal, également appelé « pied mère » (PM), qui est le pied sélectionné pour produire un régime fruitier en conditions de culture. Les méristèmes secondaires produisent des rejets (numérotés R1, R2, …, Rn) qui assurent les cycles de culture suivants, faisant du bananier une culture pérenne. Lorsque le pied mère abouti à la production d'un régime et que celui-ci est récolté, le pied mère est coupé pour laisser la place à un des rejets désormais considéré comme le nouveau pied mère, et qui donnera à son tour un régime fruitier. Ce mode de croissance génère une « touffe » de bananier à partir d'un bulbe portant le pied mère et les différents rejets (Fig. 2.1). En conditions de culture, les producteurs sélectionnent généralement un rejet principal et deux rejets secondaires en plus du pied mère ; et renouvellent les bananeraies en remplaçant les touffes entières tous les 10 à 15 ans en moyenne.

Ce mode de croissance végétatif implique une transmission des particules virales entres les différents organes d'une touffe (pied mère et rejets) lors d'une infection systémique, lui permettant de persister dans une même touffe sur plusieurs cycles de culture, et augmentant ainsi le risque de propagation. Néanmoins, les différentes observations au champ rapportent des apparitions sporadiques et transitoires d'infections, sans induire d'épidémie sur les parcelles de bananiers hybrides porteurs de génome B. De plus, certains plants montrent une réversion des symptômes et parfois de l'infection après un temps donné, indiquant une régulation efficace de l'infection jusqu'à une guérison complète. Ces observations laissent supposer que les hybrides

porteurs d'une copie de génome B régulent les infections BSV, limitant ainsi la dispersion du virus sur les parcelles.

Les essais présentés dans ce chapitre visent à décrire les dynamiques d'infections BSV d'origine endogène en conditions contrôlées. L'hypothèse développée en amont de ce travail propose que la coévolution entre les génomes hybrides AAB et les intégrations eBSV ont permis le développement d'une régulation efficace des infections BSV par les bananiers hybrides natifs AAB (tels que les plantains). Le terme ici de régulation « efficace » implique des cas de réversion de l'infection, et de retour à un phénotype sain après une infection. Cette hypothèse implique également que les hybrides AAB et AAAB « synthétiques », développés au cours des programmes de sélections de bananiers (tels que l'hybride FHIA-21, AAAB) et ne profitant pas du même historique de coévolution, ont une régulation moins efficace que les hybrides natifs. Une récente étude épidémiologique indique qu'en République Dominicaine où l'hybride FHIA-21 (issu d'un croisement plantain AAB x AA) est largement cultivé, la prévalence du BSV est plus importante dans les parcelles de culture du FHIA-21 que dans celles de plantains natifs (Membo x Hembra ou « MxH », AAB, Martinez, 2015, thèse). Cependant les génomes du FHIA-21 et du plantain comparés dans cette étude diffèrent par la ploïdie du génome A (AAAB pour FHIA-21, AAB pour MxH). Lors de mes travaux de thèse, nous avons souhaité comparer la régulation d'infections chez des hybrides natifs et synthétiques tous deux triploïdes AAB. Ainsi, des hybrides synthétiques (AAB issus du croisement IDN 110T (AAAA) x PKW (BB)) et des hybrides natifs (AAB, plantains des cultivars « Big Ebanga », « Bois Blanc » et « Nzorba ») ont été suivis au cours d'infections BSV d'origine endogène. Les résultats sont présentés dans ce chapitre.

L'objectif de ce premier chapitre a été **i)** de quantifier les fluctuations de charge virale au cours du temps, **ii)** d'observer la répartition de la charge virale dans la touffe, et **iii)** de tester l'hypothèse de coévolution entre génome AAB et eBSV en comparant les dynamiques d'infection entre des hybrides AAB natifs et synthétiques.

**Quelle méthode pour suivre une infection BSV chez des bananiers hybrids interspécifiques ?**

Diverses méthodes sérologiques et moléculaires ont été développées pour la détection de particules virales chez les plantes (Hull, 2014). L'une des plus utilisées pour la détection du BSV chez le bananier est la méthode qui associe sérologie et biologie moléculaire : l'immunocapture-PCR (« IC-PCR », Harper et al., 1999). La capture de particules virales par des anticorps polyclonaux reconnaissant plusieurs espèces de BSV permet de sélectionner spécifiquement les particules virales libres. Des amorces spécifiques de chaque espèce BSV, parfois utilisées en multiplex (Le Provost et al., 2006), sont utilisées pour amplifier par PCR l'ADN viral contenu dans les particules immunocapturées, et permettent une détection sensible de l'infection. Cependant, l'immunocapture-PCR ne permet pas de quantifier précisément la charge virale (c'est-à-dire, la quantité de particules virales dans le plant infecté). Une semi-quantification reste possible en diluant le broyat de plante dans lequel les particules virales sont fixées avec les anticorps, pour estimer des différences entre charges virales importantes (Fig. 2.3). Néanmoins, la principale limite quantitative de cette méthode réside dans la saturation des anticorps lors de leur fixation sur les tubes et dans un encombrement stérique lors de la capture des particules virales. Pour cette raison, nous avons souhaité développer une méthode de quantification du BSV par PCR quantitative (qPCR) pour mesurer la charge virale dans des bananiers infectés. Le principal objectif de cette méthode est de distinguer *a posteriori* l'amplification provenant des séquences ADN eBSV présentes dans le génome B de celle provenant des ADN épisomaux des particules virales infectant le plant. L'article suivant présente cette méthode et les limites de son utilisation pour du diagnostic. Cet article a été soumis dans la revue « Journal of General Virology » en septembre 2019.

# Article 1 :

**Extrachromosomal viral DNA produced by infective endogenous viral elements in non-infected banana hybrids impedes quantitative PCR diagnostics of *Banana streak virus* infections**

**Extrachromosomal viral DNA produced by infective endogenous viral elements in non-infected banana hybrids impedes quantitative PCR diagnostics of *Banana streak virus* infections**

**Emeline Ricciuti[1], Guy Noumbissié[1], Matthieu Chabannes[1], Nathalie Laboureau[1], Mikhail Pooggin[2], Marie-Line Iskra-Caruana[1,*]**

[1] BGPI, CIRAD, Univ Montpellier, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, 34984, France.

[2] BGPI, INRA Centre Occitanie, CIRAD, SupAgro, Université de Montpellier, Montpellier, 34984, France

[*]Corresponding author: marie-line.caruana@cirad.fr

**Keywords:**

*Banana, quantitative PCR, Banana streak virus, endogenous viral elements, virus titration*

**Abstract**:

The main edible and cultivated banana varieties are intra and interspecific hybrids of the two main *Musa* species, *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*, having diploid genomes denoted A and B, respectively. The B genome naturally hosts sequences of Banana streak virus (BSV) named endogenous BSV (eBSV). eBSVs correspond to at least three BSV species that, upon stress, can be released as episomal viruses, causing banana streak disease. For each species, BSV and eBSV share >99.9% sequence identity, complicating PCR-based diagnostics of viral infection in B genome-containing bananas. Here, we designed a quantitative PCR-based method to quantify multiplication of episomal BSV particles, overcoming the above limitation by using eBSVs present in the banana genome as "calibrators" to set an amplification baseline. However, our results revealed unexpected variation of eBSV amplification among a population of 53 virus-free banana plants having the same genotype. We recommend that such variation be taken into account during quantitative profiling of the viral titre of infected plants. Our in-depth molecular analyses suggest that calibrator variation is likely due to the variable abundance of non-encapsidated extrachromosomal viral DNA.

## 1. Introduction:

Most cultivated banana varieties (*Musa* sp.) are derived from two major wild *Musa* species, *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*, having diploid genomes denoted A and B, respectively. *Musa* B genomes naturally host endogenous viral elements derived from Banana streak virus (BSV), a circular double-stranded DNA pararetrovirus belonging to the genus *Badnavirus* of family *Caulimoviridae* (Ndowora *et al.*, 1999). Some of these integrated, endogenous BSV (eBSV) elements, namely eBSOLV, eBSGFV and eBSIMV are infective, and, following biotic and abiotic stresses, can release a complete episomal virus through homologous DNA recombination (Ndowora *et al.*, 1999; Dallot *et al*, 2001; Gayral *et al.*, 2008; Côte *et al.*, 2010; Iskra-Caruana *et al.*, 2010; Chabannes *et al.*, 2013), resulting in banana infection and outbreaks of banana streak disease (BSD). BSD symptoms consist of chlorotic streaks on leaves and pseudo-stem splitting, with severity depending on the cultivar, BSV species, and likely on environmental conditions. BSD affects general plant growth and fruit yield (Geering *et al.*, 2001; Lockhart *et al.*, 2000). BSD diagnosis based on symptoms is unreliable as symptoms depend on temperature (Dahal *et al.*, 1998), stage of growth) and cultivar. In all cases of BSD, the virus is transmitted from plant to plant by mealybug vectors. Serological tests such as ELISA or immuno-capture PCR (IC-PCR) (Harper *et al.*, 1999, Leprovost *et al*., 2006) are commonly used for BSV detection. However, these tests have limitations due to the broad diversity of BSV species and epitope polyvalence, and because they are not quantitative. Indeed, besides the three episomal virus species (BSOLV, BSGFV, and BSIMV) which have endogenous counterparts as described above, 12 additional distinct viral species of the genus *Badnavirus* are associated with BSD (Iskra-Caruana *et al.* 2014; King *et al*., 2012).

Quantitative PCR (qPCR) is used widely for diagnosis of various infections in living organisms. It is extremely sensitive, e.g., for detection of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) in infected tomato, as few as 10 particles were sufficient to provide detectable signal (Mason *et al*., 2007). qPCR has been reported to be more sensitive than nested PCR or serological methods, not only in diverse pathosystems (TRV-tobacco, PMTV-potato; Mumford *et al.*, 2000) but also in vectors (TYLCSV in aphids, Olmos *et al.*, 2005). According to new rules and technical guidelines established recently for international banana germplasm exchange (Thomas *et al.*, 2015), there is a need to develop sensitive BSD diagnostic methods such as qPCR. Thus, qPCR is of great interest to diagnose *Musa* cultivars having one copy of the B genome, such as plantains with a triploid AAB genome, because such banana hybrids

regularly undergo BSD outbreaks derived from eBSV integrants. Despite sporadic BSD outbreaks, no epidemics have been reported to date in plantains, likely due to the natural down-regulation of episomal BSV infections (Iskra-Caruana *et al.,* 2014). However, episomal viral particles may still be mealybug-transmitted to surrounding susceptible dessert bananas such as the worldwide-cultivated Cavendish bananas (AAA), which are highly susceptible to BSV. qPCR-based monitoring of the disease should allow the epidemiological risks linked to eBSV-derived infections to be limited. However, the major limitation to reliable quantification of episomal virus load in infected plantains is the very high identity (>99.9%) between endogenous and episomal BSV DNA sequences (Gayral *et al.*, 2008; Chabannes *et al.*, 2013). A first PCR-based diagnostic developed for detection of episomal BSOLV only, and not eBSOLV (Delanoy *et al.,* 2003), used PCR primers designed on partial eBSOLV sequences (Harper and Hull, 1998; Ndowora *et al.,* 1999) before the complete sequences of eBSOLV integration loci in the banana B genome became available (Chabannes *et al*., 2013). In the present study, we show that these primers can amplify eBSOLV sequences in addition to episomal BSOLV sequences. To overcome this problem, we have developed a qPCR-based method to quantify infection stemming from episomal BSV species that have infective endogenous counterparts in the banana B genome. We adopted the calibrator-based relative quantification method described by Pfaffl *et al.*, (2001) by using eBSVs present in episomal-virus-free banana genomes as "calibrators". Surprisingly, we found an unexpected variation in eBSV amplification among a set of clonal virus-free banana AAB hybrid plants of the same genotype. This variation complicates episomal BSV titration in infected banana hybrids, and, in some cases, results in misinterpretation of qPCR data for low-level infections. Based on these findings, and further in-depth molecular analyses, we propose here an adapted method for monitoring episomal BSV infections in banana hybrids, and discuss the origin of variation in eBSV sequence amplification from the same virus-free banana genotype.

## 2. Materials and methods:

### *2.1 Plant material and DNA extraction*

Banana plants of the "Big Ebanga" cultivar – a native interspecific hybrid of the plantain subgroup with a triploid AAB genome, originating from *in vitro* culture micropropagation (Vitropic, France) – were grown in a field in the Tiassalé district of Côte d'Ivoire. Plants were sampled from different plots after growing for 1 to 5 cycles of 9 months, and were symptomless. Control plants were grown in a greenhouse in Montpellier, France. Field samples from Côte d'Ivoire of banana plant leaves at the n–1 level, with n being the cigar leaf, were collected, stored in plastic bags at 20°C during transportation to France, and then stored at –80°C, while greenhouse samples of corresponding leaves were stored at –80°C immediately after collection. Total DNA was extracted from frozen leaf tissues (0.1 g per sample) using a DNeasy Plant Mini kit (Qiagen) following the manufacturer's protocol. DNA concentration was measured with a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

### *2.2 Immuno-capture PCR*

Leaf tissue (500 mg) was ground in 5 mL grinding buffer (2% PVP, 0.2% $Na_2SO_3$, 0.2% BSA mixed in phosphate-buffered saline with Tween 20 buffer (PBS-T) pH 6.8 composed of 1.3 M NaCl, 14 mM $KH_2PO_4$, 47 mM $(Na_2HPO_4)2H_2O$, 26 mM KCl, 0.005x Tween 20) and spun for 5 min at 5000 *g*. Supernatant (25 µL) was transferred to a tube coated with anti-BSV polyclonal antibodies (Agdia) diluted 1:200 in carbonate buffer (15 mM $Na_2CO_3$, 34 mM $NaHCO_3$, pH 9.7), and incubated for 3 h at room temperature to capture viral particles. Tubes were rinsed 5 times with PBS-T buffer and 3 times with sterile water. Extracts were then treated with DNase RQ1 (Promega) for 1 h at 37°C to remove residual plant genomic DNA. DNase was inactivated at 95°C for 10 min. PCR was then performed with specific BSV primers (2.5 mM each, see Table 1) using 1U *Taq* Polymerase (Promega) 1x GoTaq buffer (Promega) supplied with 2.5 mM dNTPs.

### *2.3 Quantitative PCR*

#### *2.3.1 Primer design*

qPCR primers for amplification of BSOLV and BSGFV sequences were designed according to the following criteria: high efficiency, specificity (amplification of one BSV species for each pair of primers), Tm of 60°C, no self-annealing or primer dimers. Primers sequences are shown in Table 1, and their positions on both episomal BSV and eBSV maps are shown in Figure 1. The BSOLV-specific qPCR primers were designed to amplify a 141-bp fragment of ORF3 from the episomal viral DNA (Banana streak Obino l'ewai virus; NCBI GenBank accession number

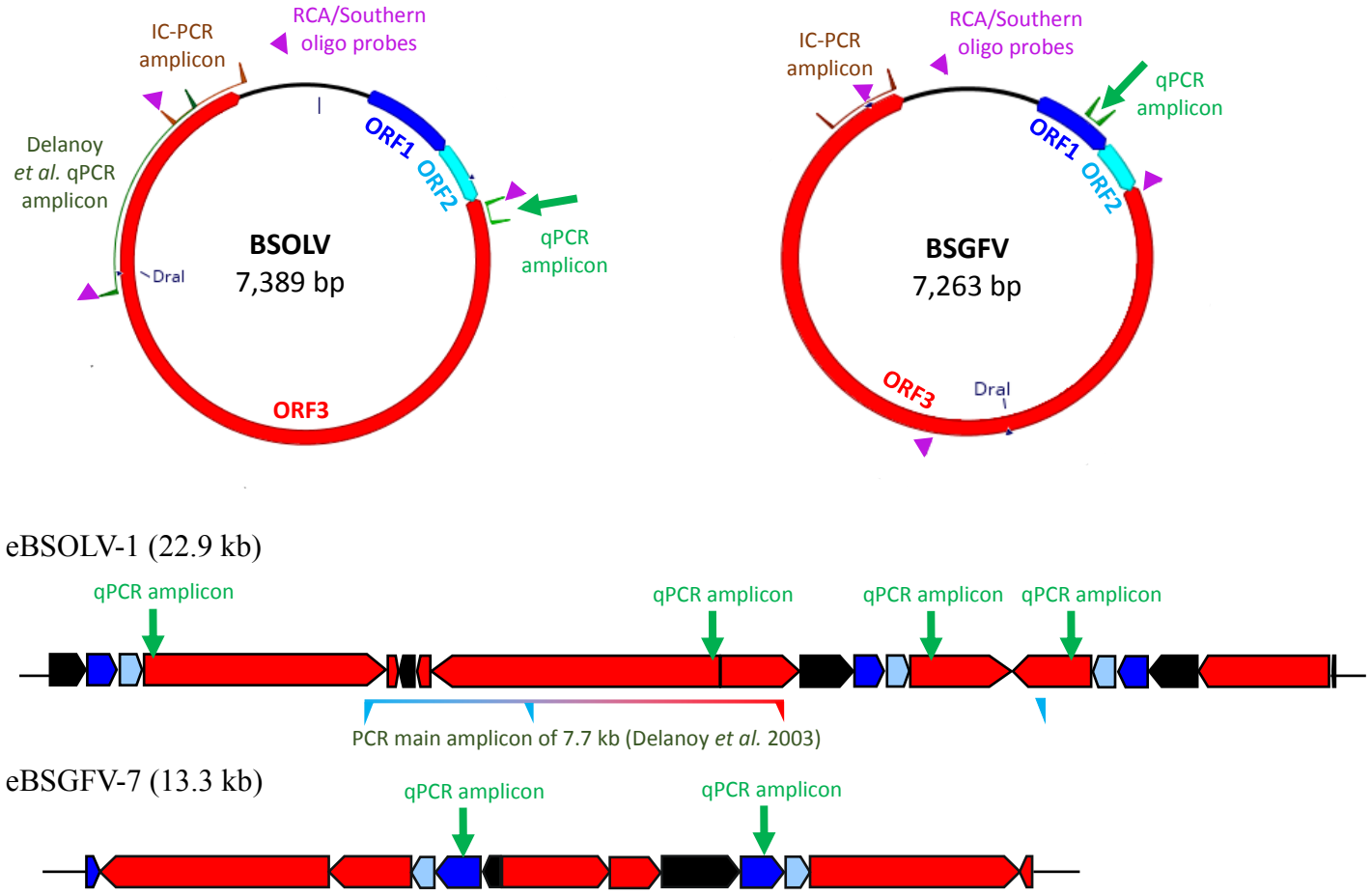



**Fig. 1. Structures of episomal and endogenous BSVs with positions of PCR, qPCR and RCA primers and Southern blot hybridization probes**. Non-quantitative IC-PCR and quantitative PCR (qPCR) primers, RCA primers and Southern blot probes used for different experiments are indicated on both episomal BSV (BSOLV, BSGFV) circular genomes and endogenous BSV (eBSOLV, eBSGFV) sequence loci. IC-PCR primers amplify 522 and 475 bp sequences at the 3' end of ORF3 in BSOLV and BSGFV, respectively (brown annotations). BSOLV qPCR primers amplify a 141 bp sequence of the viral ORF3 (green arrows, 1 hits on BSOLV and 4 hits on eBSOLV), BSGFV qPCR primers amplify a 108 bp sequence of the viral ORF1 (green arrows, 1 hit on BSGFV and and 2 hits on eBSGFV). qPCR primers designed by Delanoy *et al.* (2003) for episomal BSOLV amplify a 1.3 kb sequence of ORF3 of the episomal virus (dark green) and a main amplicon of 7.7 kb of eBSOLV (between cyan and red marks), which is not expected to be amplified under our PCR conditions. Note that the forward primer can also anneal at two additional positions of eBSOLV in reverse orientation (inverted cyan marks), making two additional unfavourable amplicons of 2.7 and 16.2 kb. Primers used to enrich RCA for viral DNA and also used for Southern blot hybridization are indicated with pink arrows within ORF3 and intergenic region (IR) of BSOLV, and ORF2, ORF3 and IR of BSGFV. Restriction sites of *Dra*I are indicated in dark blue (2 sited in BSOLV and 1 site in BSGFV). eBSOLV and eBSGFV loci are depicted according to the organization of the corresponding BSV sequences integrated in Pisang Klutuk Wulung diploid BB genomes (Gayral *et al.* 2008; Chabannes *et al.*, 2013). The viral ORF1 is shown in dark blue, ORF2 in light blue, ORF3 in red, and intergenic region (IR) in black.

NC_003381). This fragment can also be amplified from four positions of the eBSOLV repeated sequences (Fig. 1). The BSGFV-specific qPCR primers were designed to amplify a 108-bp fragment of ORF1 from the episomal viral DNA (Banana streak Goldfinger virus; NC_007002) and eBSGFV, where it is repeated twice (Figure 1). Primer concentrations were adjusted to achieve the most efficient amplification from the plasmid DNA containing a complete viral genome sequence. qPCR primers for a reference *Musa* gene encoding ribosomal protein S2 (RPS2), hereafter "normalizer" gene, were selected from a previous study (Chen *et al.*, 2011), because of the high expression stability of this gene under different stresses, and because the primers are designed to amplify a single 84-bp sequence per genome copy (1 hit on the A genome, 1 hit on the B genome, and hence 3 hits on a triploid AAB genome; Droc *et al.*, 2013), which is comparable to the hit number for each endogenous BSV amplicon in the AAB plantain genome (2 hits on the eBSGFV locus and 4 hits on the eBSOLV locus).

### *2.3.2 Quantitative PCR design*

qPCR reactions were processed with the SYBR Green detection system using LightCycler®480 (Roche). Template DNA (2–50 ng) was mixed in a final volume of 10 µL with 1x SYBR Green master mix containing BSV and RPS2 primers. Different primer concentrations were tested for each pair, leading to optimal concentrations of 0.25 µM and 0.30 µM for BSV and RPS2 primers, respectively. The qPCR program was as follows: i) pre-incubation for 5 min at 95°C; ii) 40 amplification cycles, each cycle of 30s at 95°C, 30s at 60°C, and 10s at 72°C; iii) melting for 1 min at 95°C, 30s at 60°C, followed by slow (2°C/s) heating to 95°C; and iv) cooling at 18°C. For each sample, qPCR was repeated three times on the same plate. qPCR amplification efficiency was assessed for each primer pair with a standard curve constructed from six dilution points (1x to $10^5$x) of BB and AAB genomic DNA. Raw Ct data were transformed by LC480 Converter software and further exported to LinReg software to recalculate individual amplification efficiency. A quality score was assigned for each well, and this was used to discard inefficiently amplified samples from the analysis.

## *2.4 Statistical analysis of variance (ANOVA)*

qPCR tests were repeated twice. For each assay, each sample was included on the plate in triplicate. Standard deviation (sd) was calculated for each sample, and replicates considered as outliers (with sd >1) were excluded from the analysis. Analysis of variance (ANOVA) was performed in R to compare the effects of assay repetitions ($n$ = 2) and samples ($n$ = 53) on the ΔCt values.

| primer type | target | sense | Sequence | amplicon size |
|---|---|---|---|---|
| IC-PCR | BSOLV-ORF3+IR | F | 5' ATCTGAAGGTGTGTTGATCAATGC 3' | 522bp |
| | | R | 5' GCTCACTCCGCATCTTATCAGTC 3' | |
| | BSGFV-ORF3 | F | 5' ACGAACTATCACGACTTGTTCAAGC 3' | 475bp |
| | | R | 5' TCGGTGGAATAGTCCTGAGTCTTC 3' | |
| qPCR (Delanoy *et al.*, 2003) | BSOLV-ORF3 | F | 5′ TTGGTGTTTAACTATAAGAGGCTGAA 3′ | 1314bp |
| | | R | 5′ TTATTGCATCCACATTTGAAAAC 3′ | |
| qPCR | BSOLV-ORF3 | F | 5' CAAGAACCACCACTGCTGAA 3' | 141bp |
| | | R | 5' GTCGTCCTACAACCCTTCCA 3' | |
| | BSGFV-ORF3 | F | 5' TGAAGCTGCTGCTCTCAAAA 3' | 108bp |
| | | R | 5' TTTTCCAGCTCTTCAACGTCTTCC 3' | |
| | *Musa* - RPS2 | F | 5' TAGGGATTCCGACGATTTGTTT 3' | 84bp |
| | | R | 5' TAGCGTCATCATTGGCTGGGA 3' | |
| RCA and Southern blot | BSOLV-ORF3 | R | 5′ TTCAGCAGTGGTGGTTCTTG 3′ | Full circular genome |
| | BSOLV-ORF3 | F | 5′ TTGGTGTTTAACTATAAGAGGCTGAA 3′ | |
| | BSOLV-ORF3 | F | 5′ ATCTGAAGGTGTGTTGATCAATGC 3′ | |
| | BSOLV-IR | R | 5′ GGAGTAAACTCGCGTTGTGG 3′ | |
| | BSGFV-ORF2/3 | R | 5′ GAGCTCTTTGAGTCGTCATTG 3′ | |
| | BSGFV-ORF3 | F | 5′ TCTGAGATCTCCAGCCAGGT 3′ | |
| | BSGFV-ORF3 | F | 5′ GGTACCAACACTTGTCATGTATGG 3′ | |
| | BSGFV-IR | R | 5′ GTATTTCCCTCGATGCCTGA 3′ | |
| RT-PCR | BSOLV | F | 5' GAAAATCTGCGTGCAGAACA 3' | 413bp |
| | | R | 5' GGAGTAAACTCGCGTTGTGG 3' | |
| | BSGFV | F | 5' ACGAACTATCACGACTTGTTCAAGC 3' | 475bp |
| | | R | 5' TCGGTGGAATAGTCCTGAGTCTTC 3' | |
| | *Musa* - actin | F | 5' TCCTTTCGCTCTATGCCAGT 3' | 343bp / 415bp (cDNA / gDNA) |
| | | R | 5' GCCCATCGGGAAGTTCATAG 3' | |

**Table 1. Primers used for PCR, qPCR, rolling circle amplification (RCA), Southern blot hybridization and reverse transcription (RT)-PCR analyses of viral and banana DNA**

### *2.5 RT-PCR*

Total RNA was extracted from 0.5 g of leaf tissue using LiCl precipitation as described by Carrier *et al*., (2014). Approximately 100 µg total RNA was extracted and treated with 5U DNase (RQ1, Promega) for 1 h at 37°C. Polyadenylated mRNAs were then isolated from total RNA with the PolyATtract® System IV (Promega) as recommended by the supplier. Reverse transcription was performed with AMV®-RT enzyme (Promega) in a final volume of 25 µL (1x AMV buffer, 0.3 mM dNTPs, 2 pM polyT primers, 10 U AMV®-RT, 8 U RNasin®), for 2.5 h at 42°C. cDNA products were amplified by PCR using BSV-specific primers (for BSOLV and for BSGFV) with actin primers used as a positive control. An mRNA sample that was not reverse transcribed was used as a negative control, and amplified with BSOLV primers. The total mRNA amount was too low to process the same control with BSGFV primers. PCR products from cDNA and mRNA were separated on 1% agarose gels.

### *2.6 Rolling circle amplification*

Rolling circle amplification (RCA) was performed using a TempliPhi™ amplification kit (GE Healthcare) in a final volume of 12 µL. The RCA reaction was supplied with degenerated BSV primers targeting three BSV species (BSOLV, BSGFV and BSIMV, see Table 1), to increase amplification of episomal BSV genomes as reported previously (Rajeswaran *et al*. 2014). RCA products were digested with 5U of *Dra*I restriction enzyme (Promega) for 1 h at 37°C. Digested and non-digested products were separated on 1% agarose gel.

### *2.7 Southern blot hybridization*

Southern blot hybridization analysis using virus-specific DNA oligonucleotide probes was performed as described previously for episomal BSVs (Rajeswaran *et al*. 2014) with some modifications. RCA products digested with *Dra*I were separated on a 1% agarose gel. The gel was placed in denaturation buffer (1 M NaCl, 0.5 M NaOH) for 45 min at room temperature and then in neutralization buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris, pH 7.0) for 45 min at room temperature. DNA was transferred to positively charged nylon membrane ($N^+$ membrane, GE Healthcare) in 20x SSC buffer (3 M NaCl, 0.35 M sodium citrate, pH 7.0) overnight at room temperature, then UV-linked to the membrane. The membrane was then hybridized with a mixture of eight, $^{32}$P-radiolabelled, DNA oligonucleotide probes specific for BSOLV and BSGFV (see Table 1) and PerfectHyb$^+$™ buffer (Sigma Aldrich) at 35°C overnight. The membrane was washed three times for 30 min at 35°C with 2x SSC buffer supplemented with 0.5% SDS, and exposed to a phosphor screen for 15 min to visualize positive controls. The

screen was scanned with a Typhoon™ phosphorimager (GE Healthcare). The membrane was then split in two parts and the part with test samples was exposed again to a phosphor screen for 7.5 hours and scanned (Fig. S6).

## 3. Results

### *3.1 Episomal BSV-specific qPCR primers might amplify endogenous viral sequences*

Delanoy *et al.*, (2003) developed a qPCR-based method using primers amplifying the BSOLV episomal form only (under their qPCR conditions) in order to counteract the problem of eBSOLV integrants in banana B genomes interfering with diagnostic qPCR, thus enabling the diagnosis of BSOLV infection. We tested these primers by non quantitative PCR on BSOLV-infected AAA banana used as a positive control, and on virus-free Big Ebanga AAB and seedy banana diploid Pisang Klutuk Wulung (PKW) BB banana plants, as well as BAC clones containing infective and non-infective eBSOLV alleles from PKW (Chabannes *et al.* 2013), all used as negative controls. Positions of the primers are shown in Figure 1 on both the circular episomal BSOLV genome and the eBSOLV integrant. The expected product of 1314 bp was observed for the BSOLV-infected AAA banana positive control (Fig. S1, lane 5) but not for other banana samples, thus confirming the results of Delanoy *et al*. (2003). However, PCR products of ~1300 bp were also observed for the two BAC clones containing eBSOLV integrants, albeit at a lower yield (Fig. S1, lanes 3 and 4). Based on analysis of the complete BAC clone sequences containing the infective eBSOLV-1 (HE983609.1) and non-infective eBSOLV-2 (AP009334.1) (Chabannes *et al.* 2013), expected PCR amplification products with the primers designed by Delanoy *et al.*, (2003) would be much larger than 1300 bp: for eBSOLV-1, the main expected product with the forward and reverse primers would be 7708 bp, and two additional products with the forward primer alone annealed at two additional positions of the BAC clone in reverse orientation would be 2681, and 16,163 bp. For eBSOLV-2, the corresponding products would be 7708, 2681, and 15,001 bp (data not shown). Under our conditions (see Materials and Methods), appearance of these amplicons is unlikely because of their long sizes and because invertedly repeated regions are located between the forward and reverse primers (Fig. 1). The observed amplification of a low-yield PCR product of ca. 1300 bp from both BAC clones may have resulted from possible termination events during the *in vitro* PCR reaction, followed by recombination between direct repeat sequences; reconstituting continuous viral DNA (see a precise mechanism for eBSOLV-1 in Fig. S2), similar to native recombination events releasing the circular episomal virus genome upon stress (Ndowora *et al*., 1999; Iskra-Caruana *et al*. 2010; Chabannes and Iskra-Caruana, 2013). According to these findings, and taking into consideration all possible homologous recombination events, both *in*

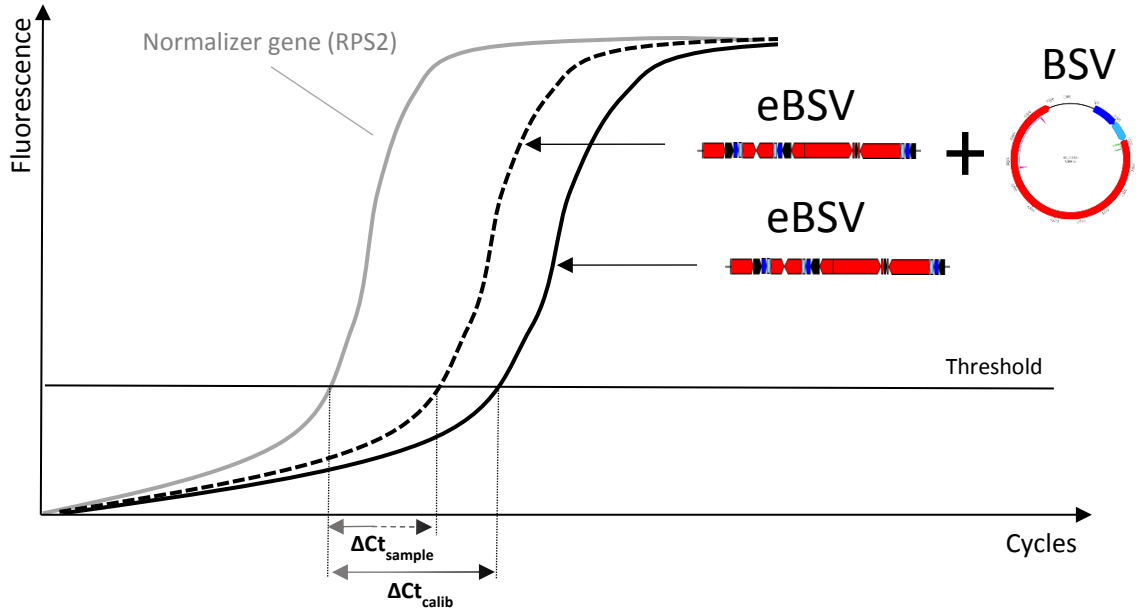



**Fig. 2: Calibrator-based relative quantification of episomal vs endogenous viral DNA.** Quantitative (q)PCR amplification curves are shown, with Y axis indicating the fluorescence signal and X axis the number of amplification cycles. Grey curve represents qPCR amplification of the normalizer gene (RPS2) in both test banana sample and calibrator. Dark curves represent qPCR amplification of the target virus gene (BSV gene) in the test banana sample (dashed line) and in the calibrator (full line). Cycles of threshold (Ct) for each amplification are depicted as vertical dotted lines. ΔCt test sample and ΔCt calib values correspond to the differences in Ct values between the target gene (dark curve) and the normalizer gene (grey curve) for the test banana sample and the calibrator, respectively.

*vivo* and *in vitro*, that might result in false positive detection of episomal virus, we decided to develop a reliable method to not only detect episomal virus but also to quantify its relative abundance in, and between, bananas with B genome-integrated eBSVs. This method was designed to detect, in addition to BSOLV, other episomal BSV species having infective eBSV counterparts whatever the B genome origin of the banana to be tested, in contrast to previous work by Delanoy *et al.* (2003), which was optimized only for BSOLV and based on partial eBSOLV sequences from the AAB genome of the Obino l'Ewai banana cultivar.

### *3.2 Calibrator-based quantification of episomal BSVs*

For relative quantification of episomal viral DNA in the presence of its integrated homolog in the host genome, we adopted a method described by Pfaffl *et al.* (2001), which relies on comparison of each sample to a calibrator. Since we aimed to quantify episomal virus in AAB hybrid bananas, our calibrator should be a non-infected banana AAB hybrid with the same genotype as the samples tested for episomal infection. In this case, qPCR amplification from the calibrator should be due to eBSV only, and thus can be considered as a baseline reference. All extra amplification above the baseline observed in tested banana samples will be due to episomal viral genome amplification, indicating viral multiplication and plant infection. The quantification of any extra amplification exceeding the eBSV baseline will allow the viral titer in infected plant samples to be estimated. The banana housekeeping gene RPS2 (encoding ribosomal protein S2) was selected to normalize samples according to the concentration of the banana genomic DNA in the qPCR reaction mixture. The difference in qPCR amplification between BSV and RPS2 DNA was calculated as follows (Fig. 2):

$$\Delta Ct = | Ct_{BSV} - Ct_{RPS2} |$$

ΔCt was calculated for each banana sample as well as in the calibrator sample. Extra amplification in tested banana samples was calculated as follows:

$$\Delta\Delta Ct = | \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{calibrator} |$$

If ΔΔCt=0, no extra amplification compared to the calibrator was recorded, indicating there is no extrachromosomal viral DNA in addition to the chromosome-integrated copies of viral DNA. Otherwise, the higher the ΔΔCt, the higher the viral load.

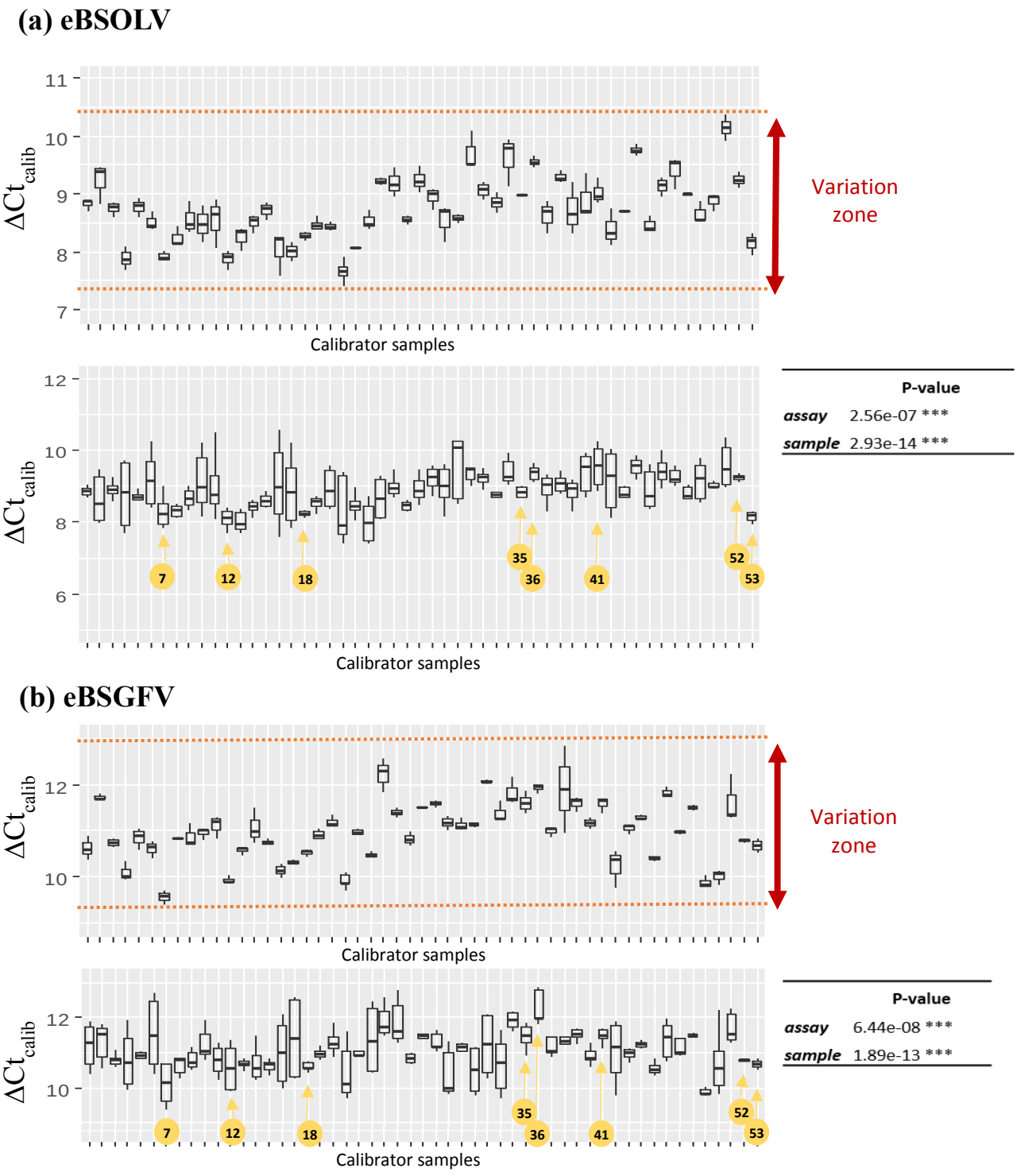



**Fig. 3: ΔCt variation among eBOLSV and eBSGFV in calibrator samples**. ΔCt was calculated for each eBSV calibrator as follows: $\Delta Ct = Ct_{BSV} - Ct_{RPS2}$. For each BSV species (eBSOLV panel (a); eBSGFV: panel (b)), means and standard deviation (3 replicates) of ΔCt values are represented. Intra-assay ΔCt variation (top box plot) and inter-assay ΔCt variation (bottom box plot) are shown for both BSV species. Variation zone within one assay is delimited by red lines. Yellow-circled numbers indicate samples that were further analysed in the study. ANOVA test P-values for assay and sample effects are shown on the right.

### *3.3 eBSV calibrator variation limits diagnostics in low-titre BSV infections*

In order to develop calibrator-based relative quantification of episomal infections, we selected a population of 53 AAB native banana hybrids (cv. Big Ebanga) as "eBSV calibrators", from field plots planted between 2007 and 2008. All plants were symptomless, and their leaf tissues were confirmed virus-free by IC-PCR (Fig. S3; IC-PCR repeated twice). All 53 banana hybrid plants are clonal, coming from *in vitro* culture, ensuring strict genome identity. qPCR performed on leaf tissue samples from these 53 virus-free banana plants showed unexpected ΔCt variation for both eBSOLV and eBSGFV (Fig. 3). The $\Delta Ct_{(BSOLV)}$ ranges from 7.75 cycles to 10.25 cycles (Fig. 3a), while the $\Delta Ct_{(BSGFV)}$ ranges from 9.75 cycles to 13.5 cycles (Fig. 3b). This range of ΔCt variation, which was similar regardless of the eBSV species considered, is hereafter called the "variation zone" (represented by red lines in Fig. 3). A second DNA extraction was performed from the same leaf samples, and the experiment was repeated. A similar tendency of ΔCt variation was observed in the second experiment (inter-experiment variation is shown in Figure 3). Statistical analysis using ANOVA indicated that ΔCt variation between two repetitions on one sample (repetition *P-value*) and between different samples (samples *P-value*) were both significant (Fig. 3).

Such significant variation indicates that the eBSV "baseline" is variable, making the proposed relative quantification method unreliable, because of the risk of establishing false-negative diagnostics for banana samples with low titer of episomal virus. Indeed, if the amplification baseline in the calibrator is overestimated due to amplification of non-infective extrachromosomal viral DNA (see below), calculation of ΔΔCt values to estimate the viral titres in the test banana samples will be underestimated (Fig. 4), resulting in a "virus free" diagnosis of samples with low-level infection, with viral titre being within the variation zone. Indeed, we detected such cases of false negative samples with ΔΔCt values close to 0, for which IC-PCR analysis detected the presence of viral particles (Fig. S4).

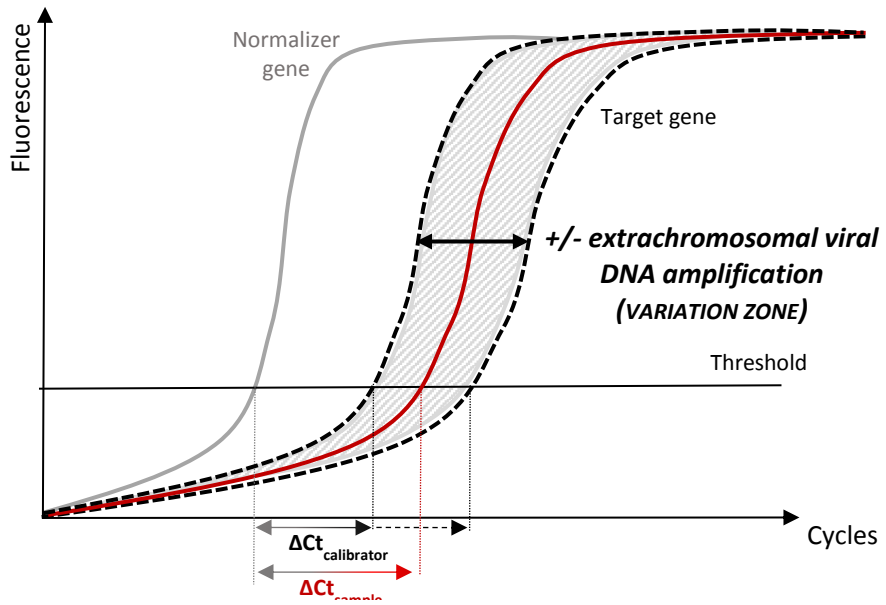



**Fig. 4. Variations in $\Delta Ct_{calibrator}$ can prevent determination of infection status in test banana samples**. Amplification curves are shown with Y axis fluorescence signal and cycles of amplification in X axis. Grey curve represents amplification of the normalizer gene (RPS2) in both test banana sample and calibrator. Red curve represents amplification of the target gene (BSV gene) in the test sample. Dashed black curves represent amplification of the target gene (BSV gene) in the calibrator, which can vary according to the presence of extrachromosomal viral DNA. We report this range of variation as « variation zone ». ΔCt are reported for calibrator and test banana samples. Since $Ct_{BSV}$ can vary in the calibrator, $\Delta Ct_{calibrator}$ is variable too. In this case, the $Ct_{BSV}$ for the test banana sample falls into the variation zone. We cannot tell whether the $\Delta Ct_{sample}$ is higher or lower than the $\Delta Ct_{calibrator}$, and we cannot further conclude on its infection status.

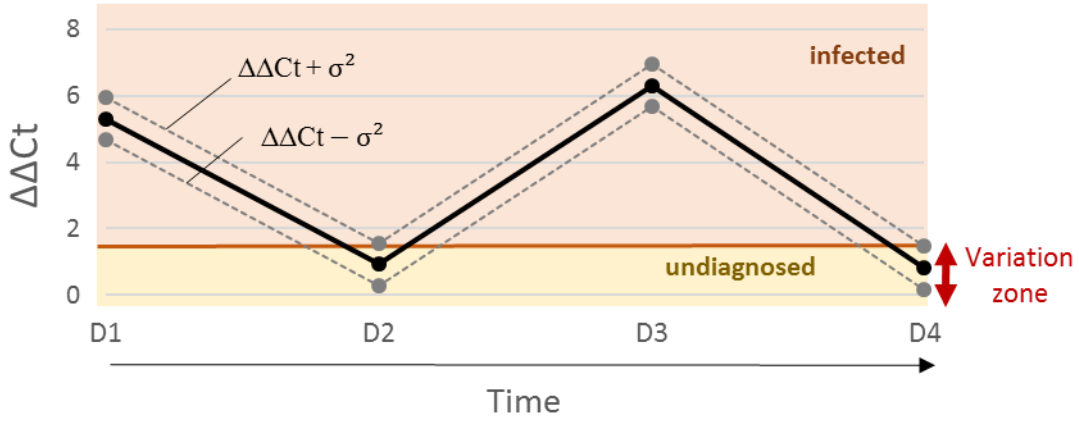



**Fig. 5: Monitoring simulation of BSV infection in AAB *Musa* hybrid over time.** Once a banana sample is diagnosed as having BSV infection, the viral load can be monitored at different dates (D1 to D4), by calculating the following difference: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{sample} - \Delta Ct_{calibrator.}$ The ΔΔCt variation zone previously calculated in a population of the episomal virus-free calibrator plants (yellow with red line showing the upper limit of variations) corresponds to the variance of amplification $\sigma^2$. The upper and lower limits of the variation zone for the test banana samples (grey lines) correspond to the ΔΔCt sample values $\pm \sigma^2$ (variance). Confidence threshold for high level infection in the test banana samples (orange line) corresponds to 0+variation zone (or twice the variance $\sigma^2$.)

### *3.4 An adjusted calibrator-based method to monitor BSV infections in AAB hybrid bananas*

Although the ΔCt "baseline" in calibrator is variable, the range of variation observed among the calibrator population is limited (Fig. 3). Three cycles of difference between the highest and lowest ΔCt sample correspond to an 8-fold difference ($2^3$) in viral particle amount. The variance ($\sigma^2$, being the mean of standard deviation to the mean) among all calibrator data was $\sigma^2$=0.42 for BSOLV and $\sigma^2$=0.40 for BSGFV. Such data should be considered, and we propose to integrate this variation when monitoring BSV infection over time in banana samples having low ΔΔCt. Figure 5 presents a schematic monitoring of episomal BSV infection regulated by the banana host plant, with ΔΔCt values in the tested plants at different time-points, taking into account the variation zone corresponding to the variance ($\sigma^2$) in ΔΔCt values for the population of calibrators. We propose to set an episomal virus-infection threshold corresponding to the variation zone (or twice the variance in the calibrator samples), over which a banana sample is considered as infected with high confidence. Below this threshold, diagnosis cannot be achieved by qPCR alone, and must rely on other methods such as IC-PCR.

### *3.5 Origin of qPCR variation in episomal virus-free banana hybrids with endogenous BSV sequences*

The observed variation in qPCR amplification of the eBSV sequences in virus particle-free banana hybrids raises the possibility that this variance reflects the presence of extrachromosomal viral DNA in addition to the eBSV sequences integrated in the *Musa* B genome, which could serve as supplementary templates. Since IC-PCR analysis was negative for all 53 calibrator plants, this presumptive extrachromosomal DNA is likely not encapsidated into BSV particles, and therefore may represent products of aberrant reverse transcription of the viral RNA, presumably originating from transcriptionally active eBSV integrants. To test this hypothesis, we selected four banana calibrators having low ΔCt values (and thus high extrachromosomal DNA amplification) for both eBSOLV and eBSGFV (samples 7, 12, 18, 53) and four others having higher ΔCt values (samples 35, 36, 41, 52).

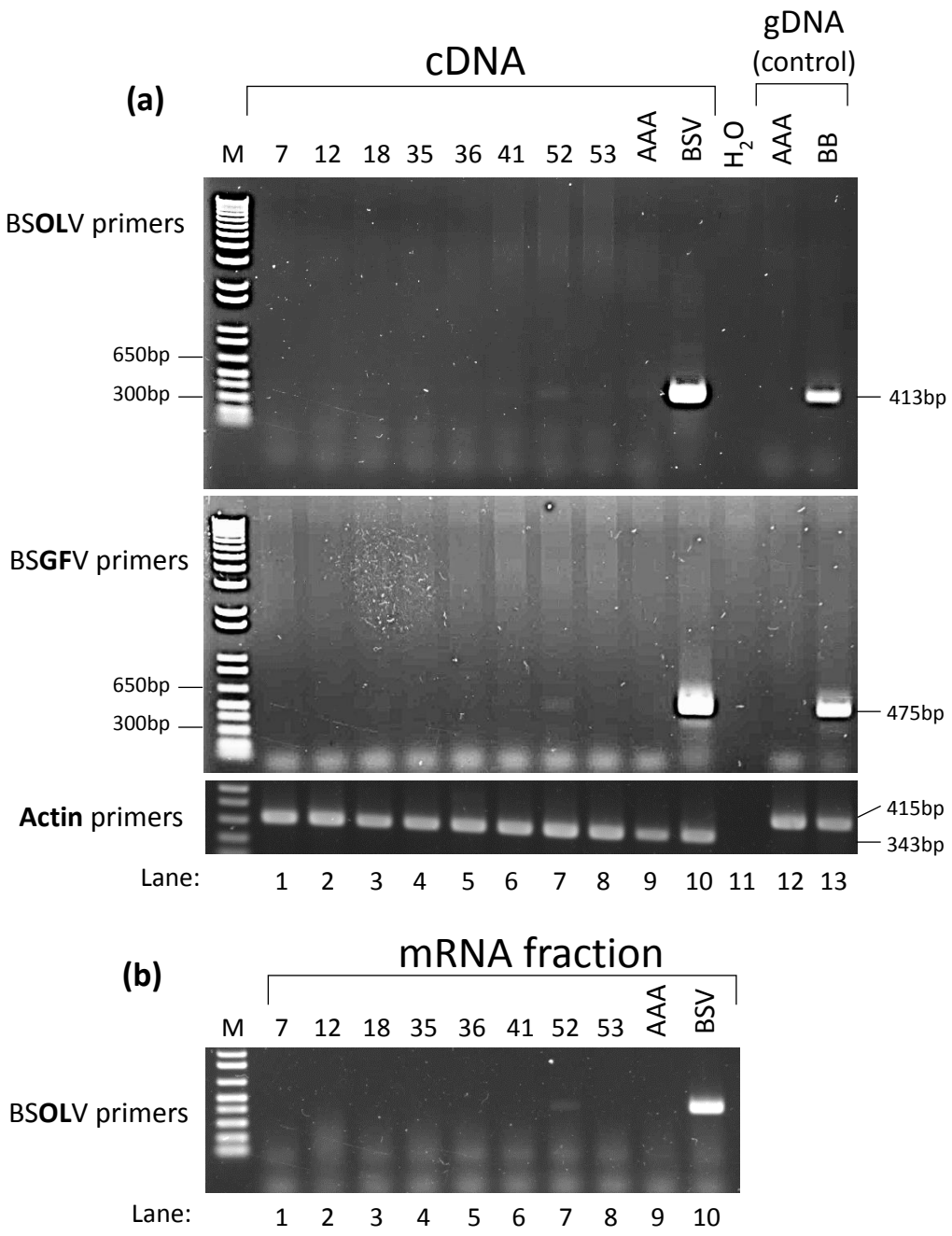



**Fig. 6: RT-PCR analysis of AAB calibrator plants. (a)** RT was performed on the mRNA fraction isolated from eight virus-free AAB banana calibrators (lanes 1 to 8). 150 ng cDNA resulting from the RT reaction was amplified with both BSOLV- and BSGFV-specific primers (top two images), and with *Musa* actin-specific primers (bottom image). RT positive control: BSV-infected AAA banana (mixed BSOLV and BSGFV infection (lane 10). RT negative controls: virus-free AAA banana (lane 9). PCR negative controls: water (lane 11), virus-free AAA banana genomic DNA (lane 12). PCR positive control: BB banana genomic DNA (lane 13). **(b)** RT negative control: 150 ng of mRNA fraction was amplified directly with BSOLV primers to check for residual genomic DNA.

### *3.5.1 eBSV might be transcriptionally active*

The eight banana calibrators identified above (yellow-circled in Fig. 3) were first analyzed by RT-PCR to characterize potential transcriptional activity of the integrated viral sequences. Total RNA was extracted using LiCl precipitation, and treated with DNase. Polyadenylated messenger RNA was selectively extracted using biotinylated oligo(dT), and reverse transcribed. The resulting cDNA products were amplified by PCR using primer pairs specific for either BSOLV or BSGFV (see Table 1). When using a small amount of template DNA (20 ng cDNA) for PCR amplification, no amplification was observed with any of the two primer pairs in the eight calibrators (Fig. S5). PCR amplification was processed on mRNA (same amount as cDNA) without DNase treatment to check for residual genomic DNA in the mRNA fraction. These controls proved negative in all samples. As a positive control, *Musa* actin cDNA was amplified in all samples, showing normal transcriptional activity.

When a higher quantity of template DNA was used (150 ng cDNA), we observed low-yield PCR amplification with BSOLV primers for some of the eight AAB calibrators, and PCR products were of the same size as those obtained for positive controls (Fig. 6). PCR amplification products were also observed with BSGFV-specific primers in calibrator 52, but this calibrator was also found to be PCR-positive when the original mRNA sample used from cDNA preparation was PCR-amplified with BSGF-specific primers, indicating that the DNase treatment of the total RNA before cDNA preparation had not completely eliminated residual amounts of viral DNA (Fig. 6, lane 7). Incomplete DNase digestion in calibrator 52 may be due to larger amounts of presumptive extrachromosomal DNA (see below) than in the other banana calibrators, or may be the consequence of contamination with episomal viral DNA from the positive control. DNase treatment did not completely eliminate viral DNA in the positive control sample either (Fig. 6, lane 10), in which infectious episomal viral DNA must accumulate at much higher copy number than extrachromosomal viral DNA in calibrators. Note that calibrator 52 showed a negative result in IC-PCR, indicating the absence of the encapsidated episomal virus (Fig. S3). A faint PCR product was also observed in the negative control sample from the virus-free AAA plant (Fig. 6, top panel, lane 9) with BSOLV-specific primers, which may have resulted from spillover cross-contamination during gel loading since no PCR product was detected in a negative (water) control in this PCR experiment. Moreover, no PCR product was detectable with BSGFV-specific primers for the same cDNA sample or for the mRNA control sample corresponding to this virus-free AAA plant (Figure 6, middle and bottom panels, lane 9). Nevertheless, the yields of BSOLV-specific PCR product appeared to be higher for

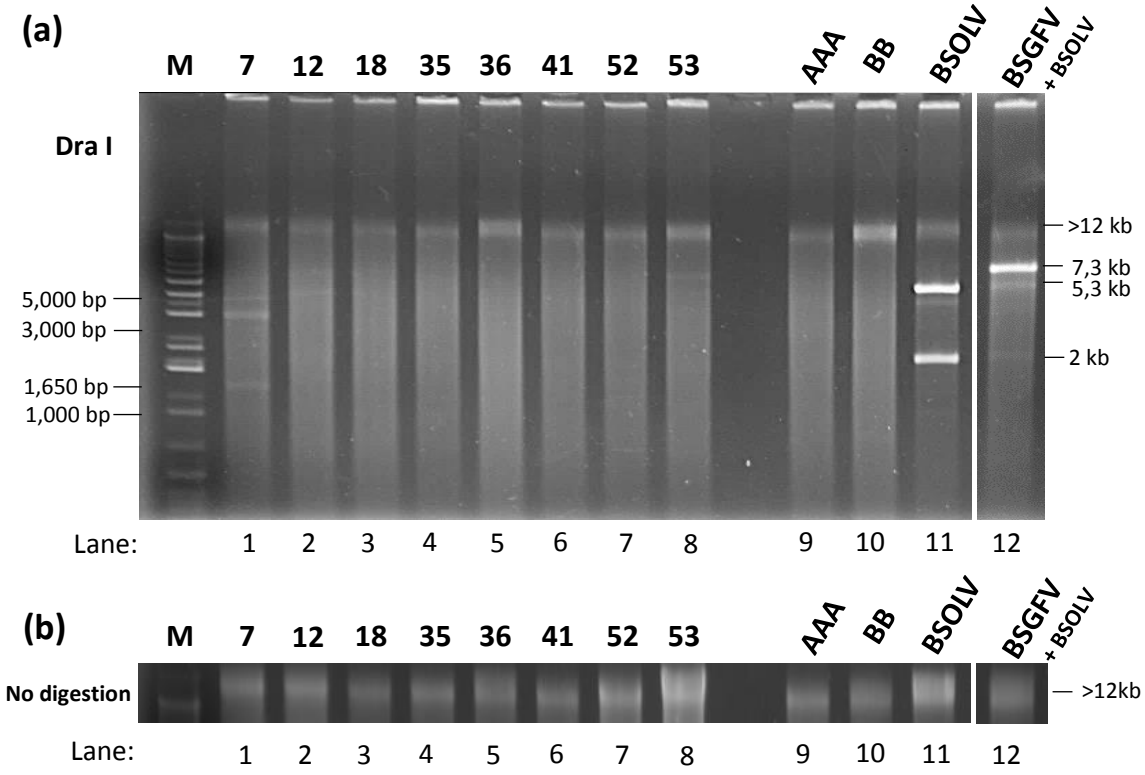



**Fig. 7: RCA amplification and restriction analysis of total DNA for eight calibrators.** Total DNA from banana AAB calibrator plants and control bananas (virus-free AAA and BB plants, and BSOLV- and BSGFV-infected AAA plants) were RCA amplified, **(a)** *Dra*I-digested and the digestion products were separated on 1% agarose gel. **(b)** Undigested RCA products were separated on another gel as a control. Eight selected AAB calibrators were tested (lanes 1 to 8). Negative controls: virus-free Cavendish AAA (lane 9) and PKW BB (lane 10) banana plants. Positive controls: BSOLV- infected (lane 11) and BSGFV and BSOLV-coinfected AAA banana samples (lane 12). Expected sizes of Dra I digestion products of the episomal BSOLV (5.3 and 2 kb) and BSGFV (7.3 kb) are indicated. Note that two lanes between lanes 11 and 12 were spliced out of both gels.

some of the AAB calibrators than for the AAA control (Figure 6). These results provide preliminary evidence for transcriptional activity of eBSOLV integrants in AAB calibrator plants.

### *3.5.2 Extra-chromosomal viral DNA is not a full-length circular episomal viral DNA*

The same eight calibrators were further analyzed by rolling circle amplification (RCA) in order to determine whether the presumptive extrachromosomal viral DNA is circular. Total DNA of each of the eight calibrators was amplified by RCA; the reaction was supplied with a mixture of 4 BSOLV- and 4 BSGFV-specific primers (Table 1) to enrich RCA products for viral DNA. The resulting RCA products were then digested by the restriction enzyme *Dra*I, which has one recognition site in BSGFV circular dsDNA and two sites in BSOLV circular dsDNA (Fig 1a), and separated on 1% agarose gel (Fig. 7a). Undigested RCA products were loaded on a separate 1% agarose gel as a control (Fig. 7b). For all the tested calibrators as well as the negative control plants (virus-free AAA and BB), the *Dra*I-digested RCA products appeared as a smear of heterogeneous sizes (Fig. 7a), whereas for calibrators 7, 12 and 53, additional faint digestion products of distinct sizes were observed over the smears (Fig. 7a, lanes 1, 2, 8). To verify if these distinct *Dra*I digestion products are of viral origin, we conducted Southern blot hybridization analysis on the same RCA-*Dra*I samples, transferred from the same gel to a nylon membrane, and probed with the same mixture of BSOLV- and BSGFV-specific probes as used for RCA. While virus-specific probes hybridized readily to *Dra*I products of expected sizes for the positive controls (5.3 kb and 2 kb for BSOLV and 7.3 kb for BSGFV; see lanes 11 and 12 in Fig. 7a and Figure S6a), no distinct hybridization bands of these sizes or sizes corresponding to those faint agarose gel bands (Fig 7A, lanes 1, 2, and 8) were observed for the calibrator samples (Fig. S6b, lanes 1–8). This indicates that those distinct *Dra*I digestion products are unlikely to be of viral origin. In support of this conclusion, cloning and sequencing of the distinct Dra I products obtained in sample 7 (Fig. 7, lane 1) confirmed their nonviral origin (data not shown). On the other hand, the smears of Dra I digestion products observed for all calibrator plants (Fig. S6, lanes 1-8) may represent viral extrachromosomal DNA of heterogenous sizes. The undigested RCA products of high molecular weight (over 12 kb) hybridized with viral probes (Fig S6b) likely represent sequences of *Musa* genomic DNA unspecifically amplified with the viral primers included in our RCA protocol, or cross hybridization of the viral probes to *Musa* genomic DNA amplified with the generic hexameric primers present in the RCA reaction buffer (see Materials and Methods). Taken together, our

in-depth molecular analyses indicate that calibrator plants do not accumulate detectable amounts of circular episomal viral DNA of 7.3 kb, but instead accumulate low abundance ok likely extrachromosomal viral DNA of heterogenous sizes. This is consistent with the IC-PCR negative and the disease negative status of these plants.

## 4. Discussion

In this study, we observed reproducible variation in qPCR amplification of endogenous BSV (eBSV) sequences from a set of clonal, virus-particle-free, AAB banana plants of the cultivar Big Ebanga, which contain infective eBSOLV and eBSGFV integrants in the B genome. This variation can potentially lead to misinterpretation of virus infection status when using qPCR for BSV diagnosis of such banana genotypes. We therefore recommend the use of serological methods such as IC-PCR for initial diagnosis of a tested plant, and to use the adjusted calibrator qPCR method we describe here when quantifying and comparing viral loads between samples or across time. As qPCR remains a sensitive method, and the most adapted approach to obtain quantitative data on viral load, we propose to take into account the variation in qPCR for virus-particle-free eBSV calibrators to follow up episomal BSV infections in banana hybrids such as AAB. Our data for a set of 53 calibrator plants enabled us to define the threshold in the qPCR variation, over which a tested sample is considered as infected with episomal virus; and below which other diagnostic methods are needed to attest the presence or absence of viral particles. Providing such quantitative information about viral load in a plant can be of great interest when studying the regulation of infection of such pathosystems, and may help better understand infections in plants that are derived from endogenous viral elements.

The variation in BSV sequence amplification we revealed here for the clonal AAB banana population raises biological questions about the origin of such differences. Endogenous BSV can undergo homologous recombination following genomic stresses, leading to the release of full-length circular episomal viral genome (Iskra-Caruana *et al*., 2010; Chabannes and Iskra-Caruana, 2013). Because no viral antigens were detected by serological test (IC-PCR) (Fig. S3), and no circular viral DNAs were amplified by RCA (Fig. 7 and Fig. S6), we can assume that the extrachromosomal BSV DNA is derived directly from the endogenous BSOLV and BSGFV sequences present in the B genome of our calibrator AAB plants. Using RT-PCR, our present results provide preliminary evidence for transcription of endogenous BSV sequences (Fig. 6), which would generate template viral RNA for endogenous plant reverse transcriptase activity,

likely expressed from active retrotransposons. Indeed, viral reverse transcriptase cannot be expressed from endogenous eBSV loci, because the reverse transcriptase ORF is split between direct and inverted repeats within these loci and is reconstituted only upon recombination events that release episomal viral DNA (Gayral *et al.*, 2008; Chabannes *et al.*, 2013). Our preliminary evidence obtained with RT-PCR (Fig. 6), along with detection of 21, 22, and 24 nucleotide (nt) viral small interfering RNAs derived from both eBSOLV and eBSGFV loci in episomal virus-free Big Ebanga calibrator plants (Ricciuti *et al.*, in preparation), suggests that eBSV transcription is active. Viral transcripts derived from the eBSV loci may serve not only as templates for endogenous reverse transcriptase(s) generating extrachromosomal DNA, but also for recognition by the banana RNA silencing machinery and convertion into double-stranded precursors of siRNAs (reviewed in Pooggin, 2018). Indeed, abundant 21-, 22- and 24-nt siRNAs produced from dsRNA precursors and covering the entire circular episomal BSVs genomes have been detected by deep small RNA sequencing in episomal virus-infected AAA banana plants (Rajeswaran *et al.* 2014). In the present study, RT-PCR was performed on an RNA fraction enriched in Pol II-transcribed polyadenylated RNAs, excluding Pol IV and Pol V-mediated transcripts, which may also be generated from eBSV loci and be involved in siRNA production. If Pol II transcripts originating from the eBSV loci are the main precursors of both viral siRNAs and extrachromosomal DNA, their steady state levels are expected to be low and variable depending on relative activities of the RNA silencing machinery and the reverse transcriptase(s) using those transcripts as substrates.

It is worth noting that our observations were made at a single time point and on a limited pool of samples. BSV infections in AAB hybrids are known to happen sporadically, and eBSV transcription levels may therefore fluctuate. Dynamic observation of transcriptional activity of eBSV sequences, at different time-points and in different environmental conditions, may confirm latent expression of viral integrations regulated by RNA silencing, allowing the virus-free phenotype of native banana having eBSV to be maintained.

Our preliminary findings of transcriptional activity of endogenous viral elements leading to production of both extrachromosomal DNA and siRNAs raise the possibility that active transcription of the eBSV integrants in banana host plants allows native banana hybrids to down-regulate and control both infective eBSV-derived and mealybug-transmitted episomal virus infections. This possibility supports the hypothesis of a fragile balance allowing AAB bananas to stay virus-free while hosting infective eBSV integrants. Further efforts to decipher the mechanisms mediating transcriptional activity of endogenous viral elements and production

of extrachromosomal DNA and siRNAs would provide a better understanding of endogenous virus-derived infection in plants, while an increasing number of endogenous viral elements are being identified in the available genome sequences of land plants (Diop *et al.*, 2017).

**Acknowledgements:**

This work was supported by the CIRAD and the ANSES (Ph.D. grant E. Ricciuti). We thank Chockalingam Karthikeyan for cloning RCA products for sequencing and helping with Southern blotting. We thank P. Marie for helping us with the collection of field samples in Ivory Coast and VITROPIC for providing in vitro plants.

**References**

**Chabannes M, Baurens F-C, Duroy P-O, Bocs S, Vernerey M-S, *et al.*** Three Infectious Viral Species Lying in Wait in the Banana Genome. *Journal of Virology* 2013;87:8624–8637.

**Chabannes M, Iskra-Caruana M-L**. Endogenous pararetroviruses—a reservoir of virus infection in plants. *Current Opinion in Virology* 2013;3:615–620.

**Côte FX, Galzi S, Folliot M, Lamagnère Y, Teycheney P-Y, *et al.*** Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. *Molecular Plant Pathology* 2010;11:137–144.

**Dahal G, Hughes J d'A., Thottappilly G, Lockhart BEL**. Effect of Temperature on Symptom Expression and Reliability of Banana Streak Badnavirus Detection in Naturally Infected Plantain and Banana ( *Musa* spp.). *Plant Disease* 1998;82:16–21.

**Dallot S, Acuña P, Rivera C, Ramírez P, Cõte F, *et al.*** 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). *Archives of Virology* 2001;146:2179–2190.

**Delanoy M, Salmon M, Kummert J, Frison E, Lepoivre P**. Development of Real-Time PCR for the Rapid Detection of Episomal Banana streak virus (BSV). *Plant Dis* 2003;87:33–38.

**Diop SI, Geering ADW, Alfama-Depauw F, Loaec M, Teycheney P-Y, *et al.*** Tracheophyte genomes keep track of the deep evolution of the Caulimoviridae. *Sci Rep*;8. Epub ahead of print 12 January 2018. DOI: 10.1038/s41598-017-16399-x.

**Droc G, Larivière D, Guignon V, Yahiaoui N, This D, *et al.*** The Banana Genome Hub. *Database*;2013. Epub ahead of print 1 January 2013. DOI: 10.1093/database/bat035.

**Duroy P-O**. *Quels sont les enjeux au cours de l'évolution du bananier (Musa sp.) qui ont conduit au maintien de séquences virales de Banana Streak Virus dans son génome ?* Thesis; Montpellier 2. http://www.theses.fr/2012MON20165 (2012, accessed 1 July 2019).

**Gayral P, Noa-Carrazana J-C, Lescot M, Lheureux F, Lockhart BEL, *et al.*** A Single Banana Streak Virus Integration Event in the Banana Genome as the Origin of Infectious Endogenous Pararetrovirus. *Journal of Virology* 2008;82:6697–6710.

**Geering AD, Olszewski NE, Dahal G, Thomas JE, Lockhart BE**. Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of Musa cultivars. *Mol Plant Pathol* 2001;2:207–213.

**Harper G, Dahal G, Thottappilly G, Hull R**. Detection of episomal banana streak badnavirus by IC-PCR. *J Virol Methods* 1999;79:1–8.

**Harper G, Hart D, Moult S, Hull R, Geering A, *et al.*** The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. *Arch Virol* 2005;150:2407–2420.

**Iskra-Caruana M-L, Baurens F-C, Gayral P, Chabannes M**. A four-partner plant–virus interaction: enemies can also come from within. *Mol Plant Microbe Interact* 2010;23:1394–1402.

**Iskra-Caruana M, Chabannes M, Duroy P-O, Muller E**. A possible scenario for the evolution of Banana streak virus in banana. *Virus Research* 2014;186:155–162.

**King AM, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB**. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier; 2011.

**Le Provost G, al LPG et**. Improved detection of episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. - PubMed - NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16857272 (accessed 5 September 2019).

**Liu X, Giambrone JJ, Dormitorio T**. Simplified sample processing combined with a sensitive nested polymerase chain reaction assay for detection of infectious bursal disease virus in the bursa of Fabricus. *Avian Dis* 1998;42:480–485.

**Mason G, Caciagli P, Accotto GP, Noris E**. Real-time PCR for the quantitation of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in tomato plants and in Bemisia tabaci. *J Virol Methods* 2008;147:282–289.

**Mumford RA, Walsh K, Barker I, Boonham N**. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus Using a Multiplex Real-Time Fluorescent Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. *Phytopathology* 2000;90:448–453.

**Ndowora T, Dahal G, LaFleur D, Harper G, Hull R, *et al.*** Evidence that badnavirus infection in Musa can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 1999;255:214–220.

**Olmos A, Bertolini E, Gil M, Cambra M**. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted Plum pox virus RNA targets in single aphids. *J Virol Methods* 2005;128:151–155.

**Pfaffl MW**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001;29:45e–445.

**Pooggin MM**. Small RNA-Omics for Plant Virus Identification, Virome Reconstruction, and Antiviral Defense Characterization. *Front Microbiol*;9. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02779.

**Rajeswaran R, Seguin J, Chabannes M, Duroy P-O, Laboureau N, *et al.*** Evasion of Short Interfering RNA-Directed Antiviral Silencing in Musa acuminata Persistently Infected with Six Distinct Banana Streak Pararetroviruses. *Journal of Virology* 2014;88:11516–11528.

**Thomas J, Sharman M, Lassois L, Massart S, Clerck CD, *et al.*** *Technical guidelines for the safe movement of #Musa# germplasm*. Milan: Bioversity International. http://publications.cirad.fr/une_notice.php?dk=579127 (2015).

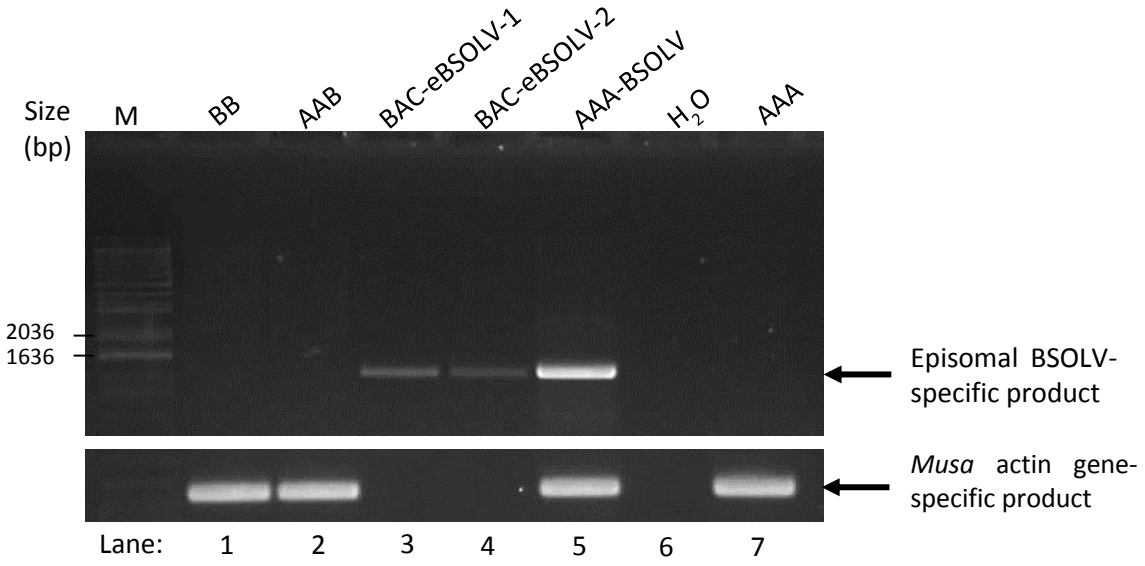



**Fig. S1: Delanoy's qPCR primers (Delanoy *et al.*, 2003) amplify 1.3 kb fragments from both BSV and eBSV.** Primers expected to be specific for episomal BSOLV were used for PCR amplification on BB banana diploid (PKW, lane 1), AAB banana hybrid (cv. Big Ebanga, lane 2) and BAC plasmids clones of both eBSOLV alleles (eBSOLV-1 and eBSOLV-2, lanes 3 and 4, respectively). BSOLV-infected AAA banana plant is used as a positive control (lane 5), $H_2O$ and healthy AAA banana plant are used as negative controls (lanes 6 and 7, respectively). *Musa* actin gene amplification is shown below as a control for the presence of plant genomic DNA.

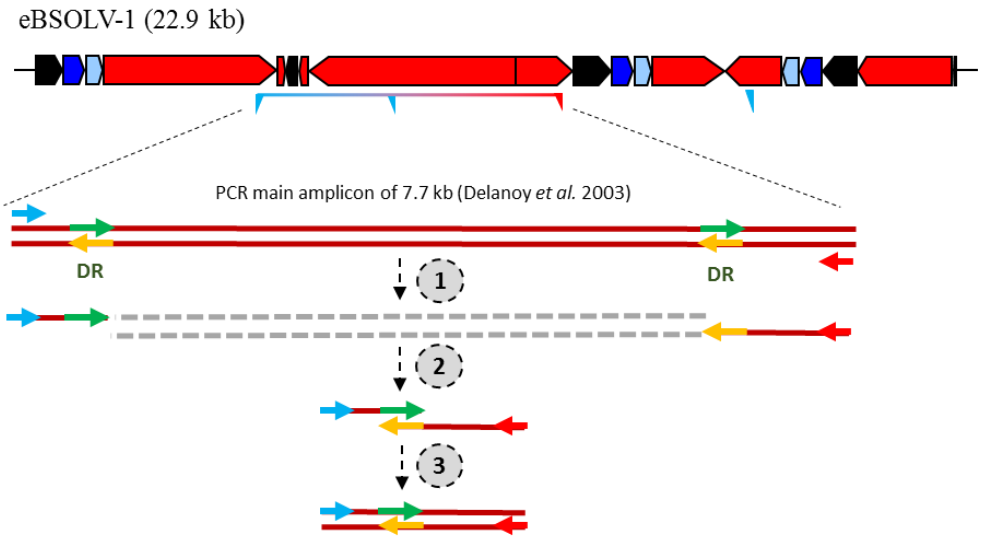



**Fig. S2: Molecular mechanism for amplification of a PCR product from eBSOLV-1 with BSOLV-specific primers designed by Delanoy *et al*. 2006.** Primers specific for BSOLV (Forward: cyan mark; Reverse: red mark) and designed for episomal DNA amplification (Delanoy *et al.*, 2003) hybridize on integrated eBSOLV sequence, at two sites flanking a direct repeat region (DR: green and yellow). The main 7.7 kb PCR amplicon from this two initial positions is unlikely to be amplified under our PCR conditions, because of its length and the presence of inverted repeated regions in between. However, rare termination events during PCR elongation steps within the two DR regions (step 1) can be followed by recombination between the two DR during annealing steps (step 2), enabling the amplification of a shorter 1.3 kb product (step 3).

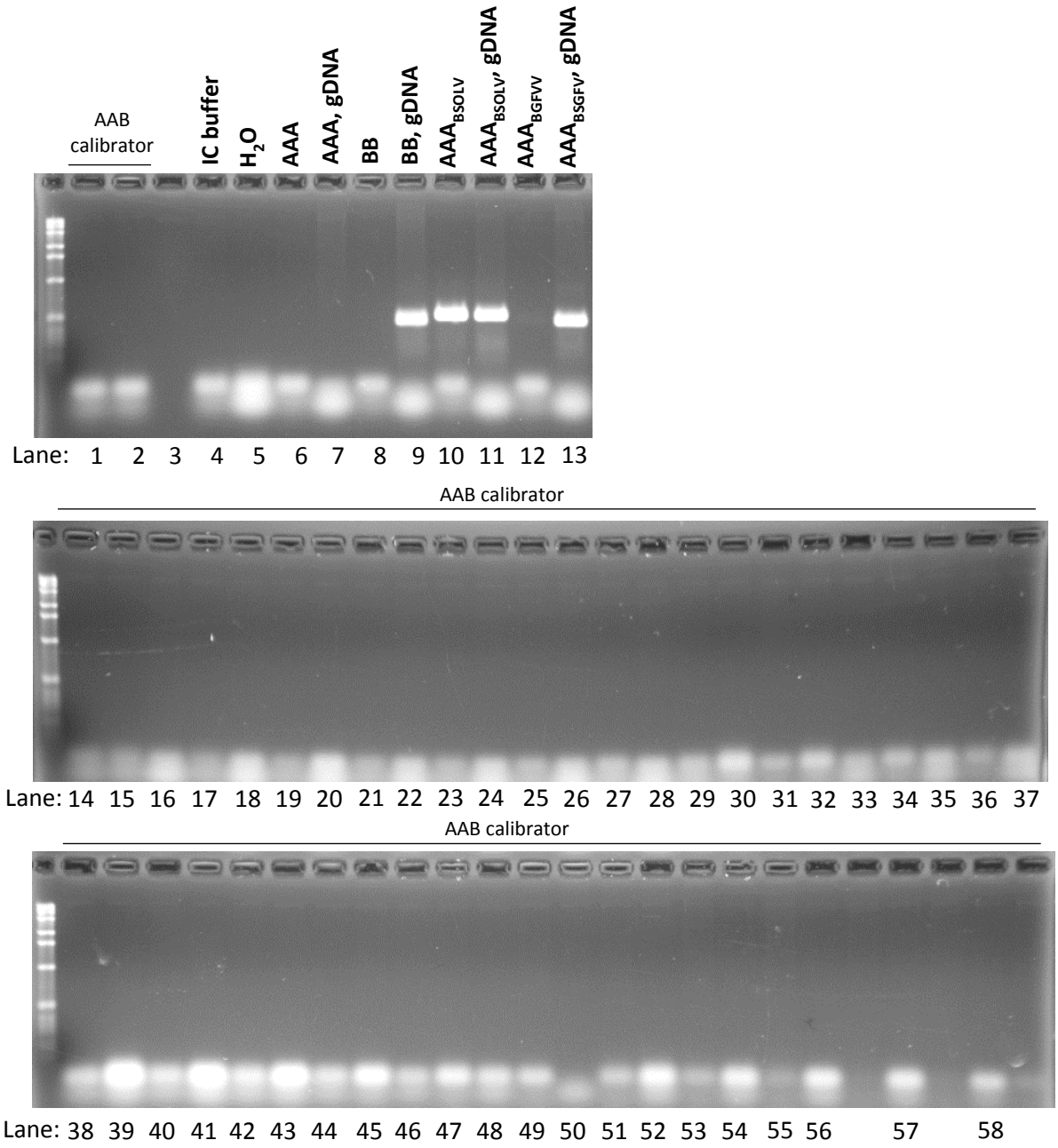



**Fig. S3: Selection of calibrator banana plants by immuno-capture (IC)-PCR.** Leaf tissue samples from calibrator plants were tested by IC-PCR using antibodies raised against both BSOLV and BSGFV species. Duplex PCR is performed to detect both BSOLV and BSGFV. IC negative controls: IC buffer (lane 4), virus free AAA (lane 6) and BB (lane 8) banana plants. IC positive controls: BSOLV- and BSGFV-infected AAA banana plants (lanes 10 and 12). PCR negative controls: water (lane 5) and genomic DNA (gDNA) of virus-free AAA plant (lane 7). PCR positive control: gDNA of BSOLV- and BSGFV-infected AAA banana plants (lanes 11 and 13) and gDNA of BB banana plant (lane 9). Lanes 1, 2 and 14 through 58 are the calibrators banana plants selected for further experiments. IC-PCR was repeated twice, showing the same results (data not shown).

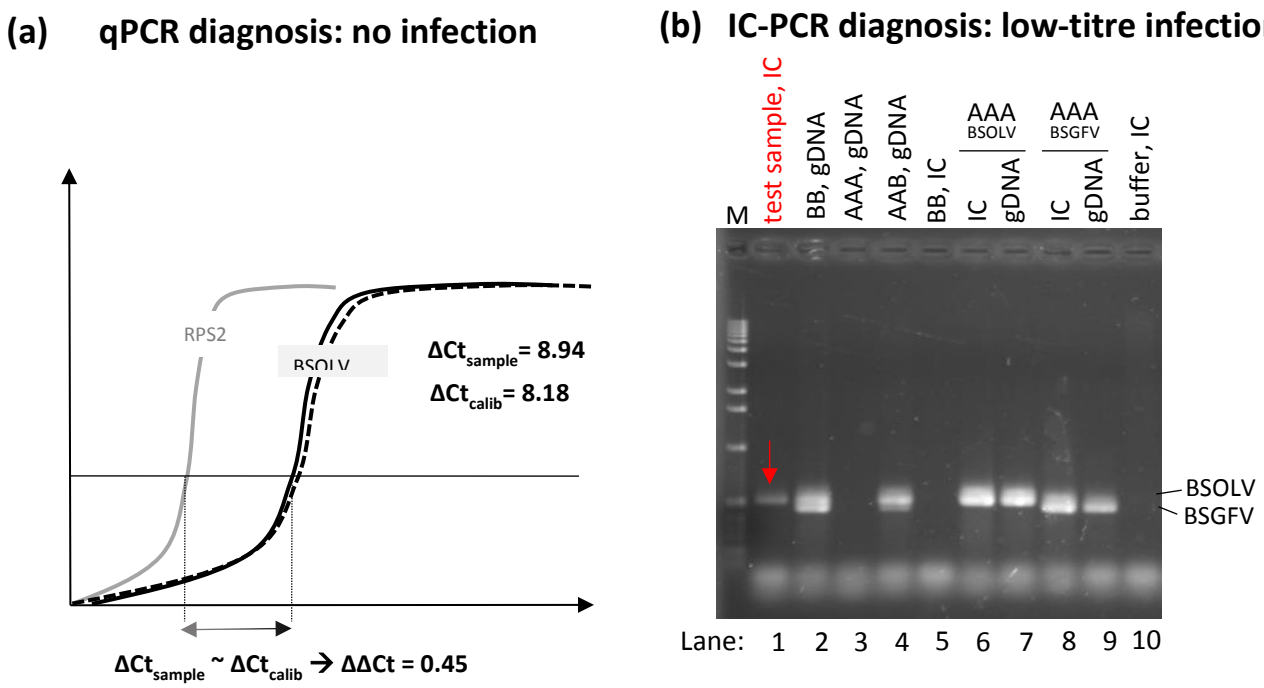



**Fig. S4: Example of false-negative diagnosis using calibrator-based relative quantification. (a)** The AAB test plant (dashed line) and the corresponding calibrator banana plant (full line) were analysed by qPCR with specific primers for BSOLV and RPS2 genes. $\Delta Ct_{sample}$ and $\Delta Ct_{calib}$ values are indicated beside qPCR curves. According to the qPCR data, the $\Delta\Delta Ct$ is close to 0, hence the diagnosis for episomal virus infection is negative. **(b)** The same plant was then tested by IC-PCR (lane 1) for the presence of BSOLV particles. The test banana plant contains encapsidated viral particles, albeit at lower level compared to the IC-PCR positive controls including AAA plants infected with BSOLV (lane 6) or BSGFV (lane 8). IC negative controls: IC buffer (lane 10), BB banana plant (lane 5). PCR negative control: gDNA of virus-free AAA banana plant (lane 3). PCR positive control: gDNA of BB (lane 2), AAB (lane 4), BSOLV- and BSGFV-infected AAA banana plants (lanes 7 and 9).

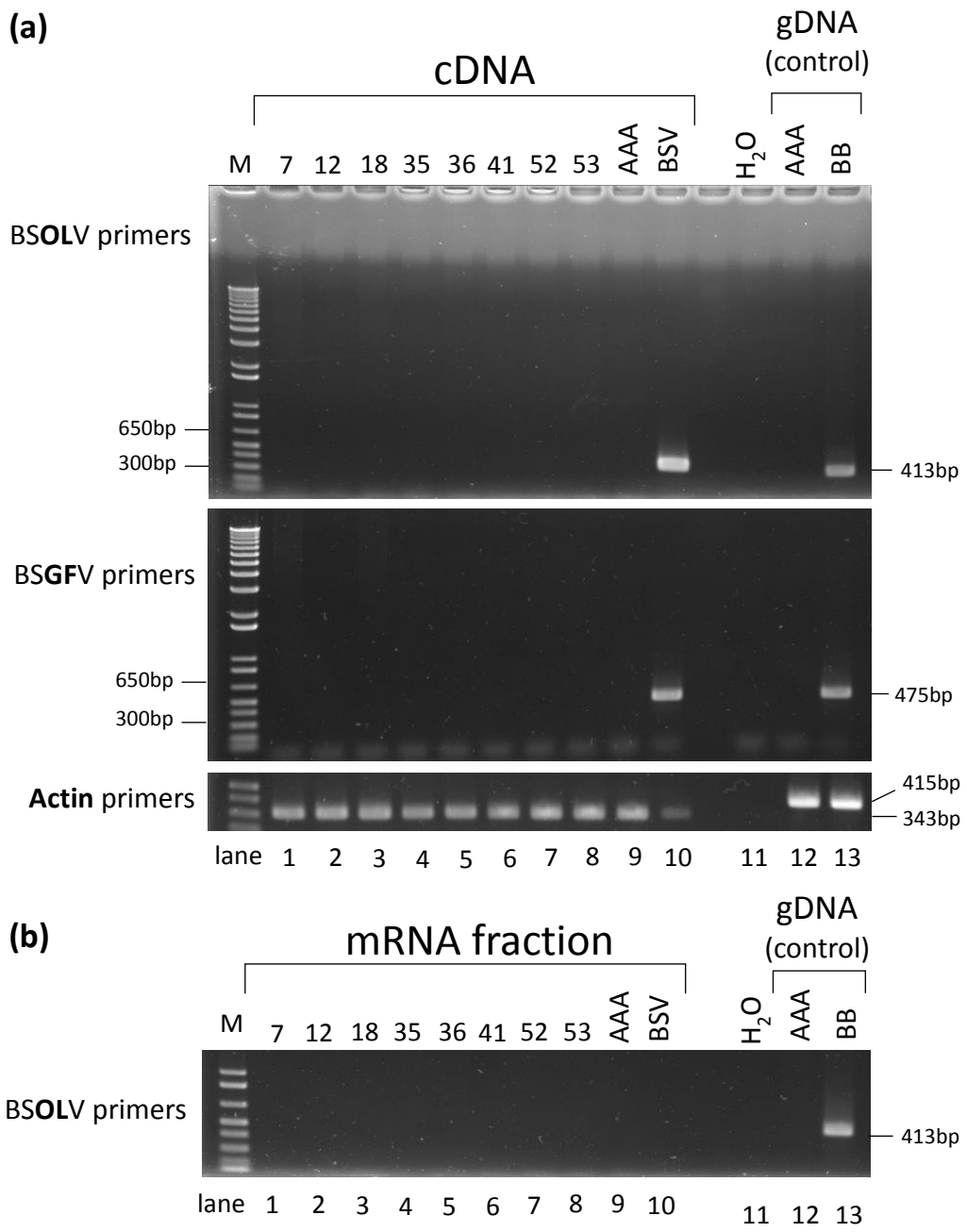



**Fig. S5: RT-PCR of AAB calibrator plants, using 20 ng cDNA template for PCR. (a)** RT was performed on mRNA fraction isolated from eight virus-free AAB banana calibrators (lanes 1 to 8). 20 ng cDNA resulting from the RT reaction were amplified with both BSOLV- and BSGFV-specific primers (top two images), and with *Musa* actin-specific primers (bottom image). RT positive control: BSV-infected AAA banana (mixed BSOLV and BSGFV infection (lane 10). RT negative controls: virus-free AAA banana (lane 1). PCR negative controls: water (lane 11), virus-free AAA banana genomic DNA (lane 12). PCR positive control: BB banana genomic DNA (lane 13). **(b)** RT negative control: 20 ng of mRNA fraction were amplified directly with BSOLV primers to check for residual genomic DNA.

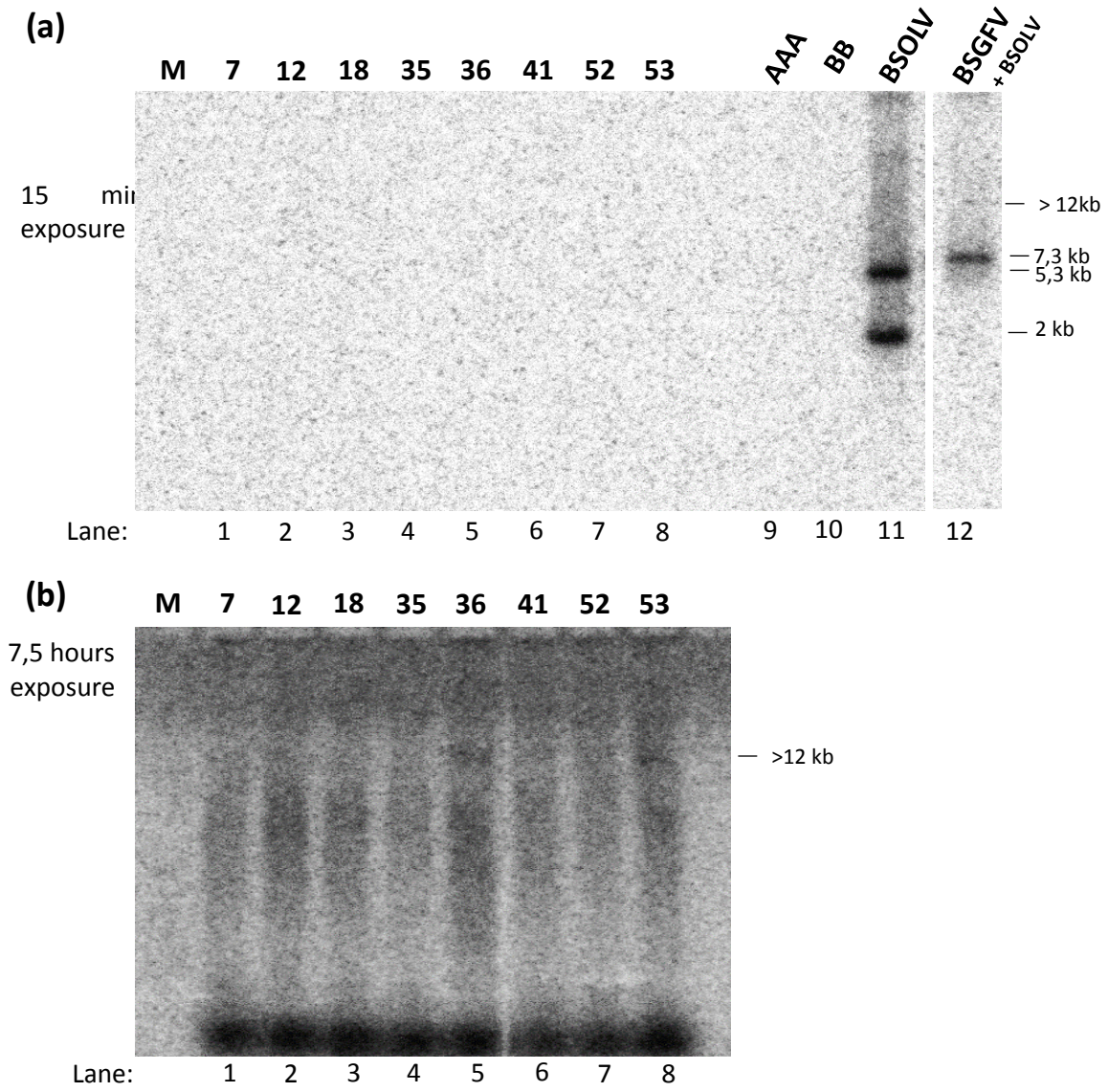



**Fig. S6: Southern blot hybridization of digested RCA products from eight calibrators.** *Dra*I-digested RCA products separated on 1% agarose gel (Fig. 7A) were transferred onto nylon membrane and hybridized with a mixture of eight, $^{32}$P-labelled, DNA oligonucleotides, also used as primers for RCA (Table 1). (**a**) The membrane was exposed on a phosphor screen for 15 min and scanned to visualize the digestion products corresponding to episomal viral DNA. Positive control: BSOLV- and BSGFV-infected AAA bananas (lanes 11 and 12). Negative controls: virus-free AAA (lane 9) and BB (lane 10) bananas. Lanes 1-8: samples from eight calibrator AAB plants. (**b**) Part of the membrane with lanes 1-8 was then cut out and exposed on phosphor screen for 7.5 hours and scanned. This was done to avoid the strong signal from the positive controls masking the weaker episomal viral DNA signals. Note that 2 lanes between lanes 11 and 12 were spliced out from the scan in panel A. For loading control, see in Fig. 7A the EtBr-stained gel before the blotting transfer of DNA to the membrane.

# CHAPITRE 1 (SUITE)

## Dynamiques d’infections BSV chez des bananiers hybrides natifs et synthétiques

| Type d'hybride | Nom | Génotype eBSV | | | Espèce BSV infectieuse |
|---|---|---|---|---|---|
| | | *eBSGFV* | *eBSOLV* | *eBSIMV* | |
| Synthétique | HS-6 | eBSGFV-**7** | eBSOLV-**1** | eBSIMV | BS**OL**V |
| | HS-8 | eBSGFV-**7** | eBSOLV-2 | eBSIMV | BS**IM**V |
| | HS-11 | eBSGFV-9 | eBSOLV-**1** | eBSIMV | BS**OL**V |
| | HS-12 | eBSGFV-9 | eBSOLV-**1** | eBSIMV | BS**OL**V |
| | HS-15 | eBSGFV-9 | eBSOLV-**1** | eBSIMV | BS**OL**V |
| | HS-16 | eBSGFV-**7** | eBSOLV-2 | eBSIMV | BS**GF**V |
| Natif | HN-BE | eBSGFV-**7** | eBSOLV-**1** | / | BS**OL**V / BS**GF**V |
| | HN-BBL | eBSGFV-**7** | eBSOLV-**1** | / | BS**OL**V + BS**GF**V |
| | HN-NZ | eBSGFV-**7** | eBSOLV-**1** | / | BS**GF**V |

**Tableau 2.1: Origines, noms, génotypes et espèces infectant les plants suivis.** L'origine de chaque hybride est indiquée (natif: HN, synthétique: HS) ainsi que l'allèle de chaque eBSV présent, avec les allèles infectieux indiqués en rouge (eBSGFV-7, eBSOLV-1). L'espèce infectant chaque plant lors du suivi est indiquée dans la colonne à droite. Les hybrides HN-BE sont majoritairement infectés par BSOLV, et quelques-uns sont infectés ou co-infectés par BSGFV

| | Variance | Moyenne | Maximum | Minimum |
|---|---|---|---|---|
| ΔCt (BSGFV) | **0,78** | **11,36** | *13,75* | *9,87* |
| ΔCt (BSOLV) | **0,42** | **9,05** | *10,50* | *7,48* |

**Tableau 2.2: Résumé statistique des valeurs ΔΔCt dans la population de calibrateurs AAB.** Les variances des ΔCt dans une population de 53 calibrateurs (bananiers sains ayant un génome AAB porteurs des intégrations eBSOLV-1 et eBSGFV-7), ainsi que les moyennes, maximum et minimum sont indiquées pour BSOLV et BSGFV, comme reporté dans Ricciuti et al. (2019, article soumis).

Dynamiques d'infections chez des hybrides interspécifiques AAB

Grâce à la méthode de quantification de la charge virale que nous avons développé (objectif **i**), j'ai réalisé des suivis d'infections pour mesurer la charge virale à différentes dates successives afin de caractériser la répartition de la charge virale dans une touffe et la dynamique d'infection au cours du temps (objectif **ii**). J'ai également comparé les dynamiques d'infection entre hybrides natifs et synthétiques pour déterminer si la coévolution entre génome AAB et eBSV a permis une régulation plus efficace chez les hybrides natifs (objectif **iii**). Les résultats de ces suivis sont présentés dans la section suivante.

# II. Matériel et méthode

## 1) Matériel végétal

### *a) Les « hybrides natifs », du sous-groupe Plantain, cultivar « Big Ebanga » :*

La principale population d'hybrides natifs suivis dans nos essais est issue de propagation clonale par culture *in vitro*. Ces hybrides natifs sont des cultivars « Big Ebanga », appartenant au sous-groupe Plantain, ayant un génome triploïde AAB. Ce cultivar est le même que celui retrouvé dans des productions commerciales de banane plantain en Afrique sub-saharienne (Kwa et Temple, 2019). Ces plants seront référés ici sous le nom « HN-BE » pour « Hybrides natifs, cv. Big Ebanga ». Ces plants ont été sevrés en pot au début de l'essai, et n'ont pas formé de touffes. Seuls quelques plants produisent un à deux rejets au cours de l'essai. Les infections BSV suivies sur ces plants sont des infections primaires (« primo-infections ») et permettent d'observer la mise en place de l'infection, sa répartition et son maintien dans le plant.

### *b)* Deux plantains natifs provenant du champ, des cultivars « Bois Blanc » et « Nzorba » *:*

Deux autres hybrides du sous-groupe Plantain, des cultivars « Bois Blanc » et « Nzorba », ont été introduits sous forme de rejets à partir de touffes cultivées en bananeraies (Haïti et Cameroun, respectivement) puis suivis en serre tropicalisée (Montpellier, France). Ces plants sont référés sont les noms « HN-BBL » et « HN-NZ » pour les cultivar « Bois Blanc » et « Nzorba », respectivement. Le plant HN-NZ est infecté par BSGFV lors de son introduction en serre, tandis que le plant HN-BBL montre une faible infection par BSOLV.

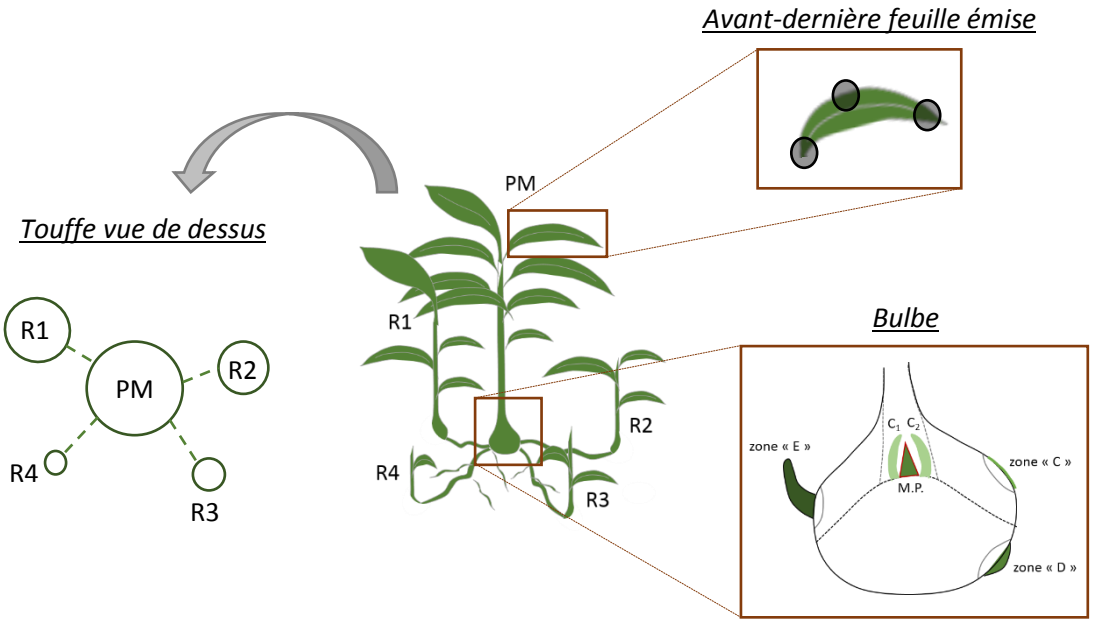



**Figure 2.1 : Schéma d'une touffe de bananier**. La touffe de bananier contient dans ce schéma un pied mère (PM) et quatre rejets (R1 à R4). L'organisation du bulbe et des différents méristèmes est indiquée dans l'encadré en bas à droite ($C_{1/2}$: cotylédons, MP: méristème principal, zones « C », « D », « E »: méristèmes secondaires. Les différentes zones échantillonnées sur l'avant-dernière feuille émise sont indiquées dans l'encadré en haut à droite. Une vue schématique du dessus de la touffe est illustrée à gauche. Les connexions entre pied mère et rejets (ligne pointillée) sont théoriques, et n'ont pas été caractérisées.

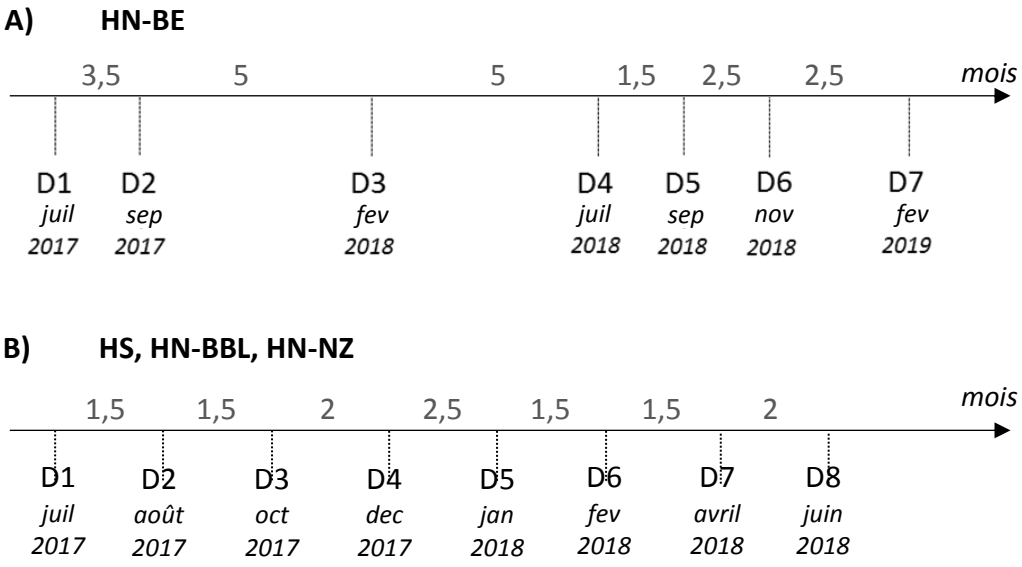



**Figure 2.2 : Temps (mois) séparant chaque date d'échantillonnage.** Le temps (en mois) séparant les dates d'échantillonnage (D1 à Dn) est indiqué pour les **A)** hybrides natifs, cv. "Big Ebanga" (HN-BE) et pour les **B)** hybrides synthétiques (HS) et les hybrides natifs des cv. "Bois Blanc" et "Nzorba" (HN-BBL et HN-NZ). La date de chaque échantillonnage est indiquée en-dessous de l'axe

### *c) Les « hybrides synthétiques »:*

Six bananiers issus du croisement entre les géniteurs PKW (génome BB) et IDN110 T (tétraploïde par doublement de son génome à la colchicine, génome AAAA), sont dit hybrides « synthétiques », et référés sous le nom « HS-x » (x pour le numéro de plant). Ces six plants sont des hybrides interspécifiques triploïdes ayant un génome AAB, avec des génotypes distincts concernant les allèles hérités du parents PKW (Tableau 2.1). Ils sont également infectés par des espèces BSV distinctes selon le plan. Ces six plants « HS » sont cultivés en serre tropicalisée à Montpellier (France) depuis plus de 15 ans, et les infections sont systémiques et persistantes depuis plusieurs années. Puisque suivis hors des conditions classiques de culture plein champ, aucune sélection de rejet n'est effectuée sur ces six plants, qui sont devenus des touffes riches en rejets, permettant ainsi de suivre la répartition de la charge virale dans la touffe.

Tous les bananiers ont été cultivés en serre tropicalisée « insect-proof » (hermétiques aux insectes) en conditions contrôlées avec une température optimale 26°C le jour / 24°C la nuit (±2°C) et un taux d'humidité de 75%. Les cycles de lumière n'ont pas été modifiés avec des lampes, et sont ceux du climat méditerranéen (jours longs en été, courts en hiver). Le tableau 2.1 résume les différents types de plants suivis, leur origine, et leur génotype concernant les allèles eBSV.

## 2) Echantillonnage

Pour chaque pied/touffe, le pied mère ainsi que tous les rejets (lorsque présents) sont identifiés et échantillonnés. Des tests préliminaires sont effectués pour déterminer la répartition de la charge virale dans le plant et définir un organe de référence pour le suivi dynamique des infections. Ces tests sont présentés au début de la section résultats, et aboutissent au choix de l'avant-dernière feuille émise pour le suivi dynamique d'infections (voir section III.1). Lorsque le cigare émerge et est en croissance, celui-ci n'est pas considéré comme la dernière feuille émise. En revanche, lorsque le cigare se déroule, il est considéré comme la dernière feuille émise. Les feuilles de bananiers mesurent jusqu'à plusieurs mètres carrés, et la répartition du virus dans une même feuille peut être hétérogène. L'avant-dernière feuille est échantillonnée en trois zones : la zone basale, médiane et apicale (Fig. 2.1). Ces trois zones sont broyées ensemble pour l'extraction d'ADN.

L'échantillonnage est effectué à intervalles de temps réguliers, lorsque l'état des plants le permet. Pour la population d'hybrides synthétiques « HS » ainsi que les deux plantains naturels ramenés du champ « Bois Blanc » et « Nzorba », les pieds/touffes sont échantillonnées toutes les huit semaines, temps nécessaire en conditions contrôlées pour l'émergence de nouvelles feuilles et d'éventuels nouveaux rejets. Pour la population de plantains naturels issus de *culture in vitro*, l'intervalle entre deux échantillonnage est plus hétérogène (de deux à cinq mois) en raisons de divers facteurs affectant l'état physiologique des plants. La chronologie des échantillonnages est indiquée dans la figure 2.2.

### 3) Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN sont faites à partir des tissus de l'avant-dernière feuille broyés dans l'azote liquide. La poudre est divisée en plusieurs lots pour l'extraction d'ARN et d'ADN à partir d'un même échantillon. Pour l'extraction d'ADN, 0.1 g de poudre sont mélangés à 500 µL de tampon d'extraction (100 mM Tris HCl (pH 8.0), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% MATAB (mixed alkiltrimethylamonium bromide), 1% PEG 6000, 0.5% sodium sulphite, 40 µg RNase) et incubés à 74°C pendant 20 min (Gawel and Jarret, 1991). L'ADN est séparé des autres composants *via* deux étapes de séparation au chloroforme-acide isoamilique (1V), en centrifugeant à 18 000 *g* pendant 10 min, à 4°C. L'ADN est précipité avec 1V de propan-2-ol, en centrifugeant à 18 000 *g* pendant 30 min, à 4°C. Les culots d'ADN sont lavés dans de l'éthanol 75% puis dans de l'éthanol 100% (centrifugation de 10 min à 18 000 *g*, à 4°C) puis repris dans de l'eau stérile.

### 4) Identification des plants infectés

L'article présenté précédemment indique que l'immunocapture PCR reste la méthode de détection la plus pertinente pour identifier les pieds infectés par le virus épisomal. Pour les hybrides synthétiques (« HS »), infectés depuis plusieurs cycles, ainsi que pour les deux plantains naturels ramenés du champ et infectés au début du suivi, aucun diagnostic n'est refait au cours de l'essai. Seules les données de charge virale sont produites, et présentées dans la section suivante. En revanche, pour la population de plantains naturels issus de culture *in vitro*, un diagnostic est effectué à chaque date d'échantillonnage sur l'ensemble des plants pour identifier les plants nouvellement infectés et les intégrer au suivi par qPCR.

### 5) Quantification de la charge virale

L'article présenté précédemment révèle une variation de l'amplification des séquences eBSV chez des bananiers non infectés de même génotype, et choisis pour servir de calibrateurs lors de nos analyses qPCR. Nous avons émis l'hypothèse que cette variation d'amplification résultait de l'amplification d'ADN viral extra-chromosomique, variant d'un bananier à un autre. Pour prendre en compte cette variation, nous avons proposé de mesurer l'amplification des eBSV sur un panel de plants contrôles, de même génotype (AAB, cultivar « Big Ebanga ») et dépourvus de particules virales. Un ensemble de 53 plantains sains, échantillonnés en conditions de culture (bananeraies dans le district de Tiassalé, Côte d'Ivoire) servent dans notre étude de « calibrateurs eBSV ». Le tableau 2.2 indique la moyenne et la variance du ΔCt pour BSGFV et BSOLV, qui correspond au nombre de cycles PCR séparant le Ct (cycle seuil de détection de l'amplification) d'un gène de référence (RPS2) du gène cible (ORF3 de BSOLV ou BSGFV).

Cette variation de ΔCt chez les calibrateurs, où l'amplification du gène cible résulte uniquement des eBSV et d'éventuels ADN viraux extra-chromosomiques, se répercute sur la mesure de la charge virale dans chacun des plants testés. Le ΔCt de chaque plant testé est calculé d'après les données d'amplification par qPCR puis comparé au ΔCt du calibrateur testé sur la même plaque. En découle une nouvelle valeur, le ΔΔCt, qui reflète le nombre de cycles d'écart entre le ΔCt de l'échantillon testé et le ΔCt du calibrateur. Le ΔCt du calibrateur est assigné de la variance calculée précédemment (Tableau 2.2), et donc le ΔΔCt, qui correspond à la différence du [ΔCt (échantillon)] – [ΔCt (calibrateur) +/- variance (calibrateur)], est également assigné de cette variance. C'est précisément cette variance dans la mesure, que l'on nomme ici « zone tampon », qui limite l'usage exclusif de la qPCR pour le diagnostic du BSV et qui peut générer des faux positifs. Si la valeur ΔΔCt est nulle, puisqu'il y a une zone tampon autour de chaque point, on ne peut assurer que le plant testé est réellement exempt de particules virales. En revanche, plus le ΔΔCt est grand, plus la charge virale est importante. Les valeurs de variance indiquées ci-dessus sont appliquées à l'ensemble des valeurs ΔCt calculées lors du suivi d'infections sur les bananiers hybrides présentés ici. De même, le ΔΔCt « seuil » en-dessous duquel un diagnostic sérologique est nécessaire pour déterminer l'état infectieux du plant est représenté par une ligne pointillée sur les graphes de suivi de la charge virale.

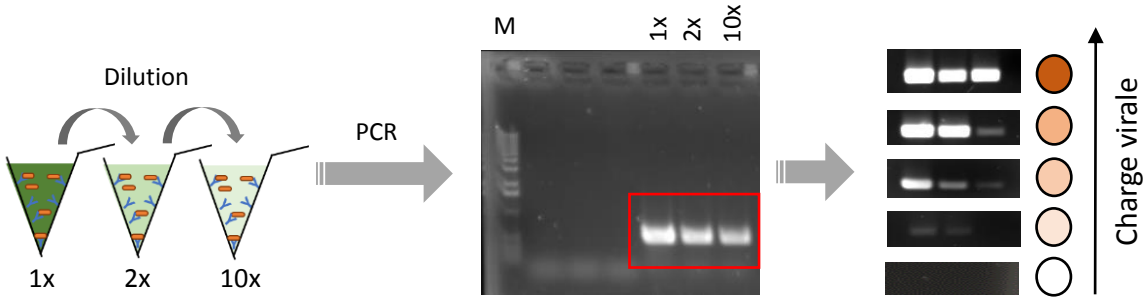



**Figure 2.3 : Analyse semi-quantitative d'une immunocapture-PCR.** Le broyat de tissu initial (« broyat mère ») est dilué à plusieurs facteurs de dilution successifs (ici, 1x, 2x et 10x) puis incubé avec les anticorps pour l'immunocapture des particules virales. Les rinçages et la PCR sont réalisés comme indiqué dans la section « Matériel et Méthodes ». L'intensité des produits PCR séparés sur gel d'agarose est alors comparée entre les différents facteurs de dilution, et permet d'associer une estimation théorique de la charge virale représentée par un code couleur: blanc pour absence de particule, puis charge virale croissante avec l'intensité du orange.

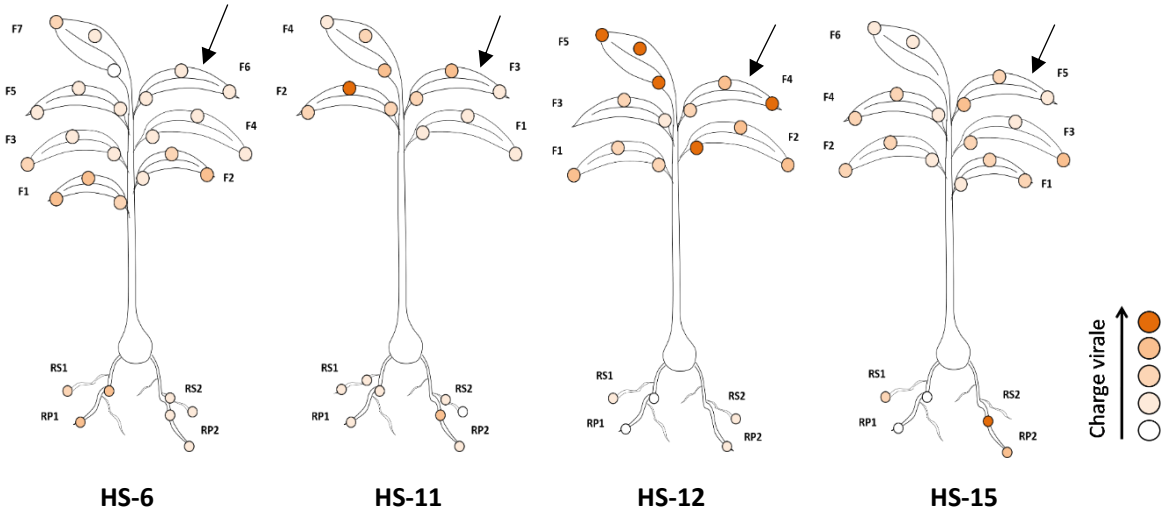


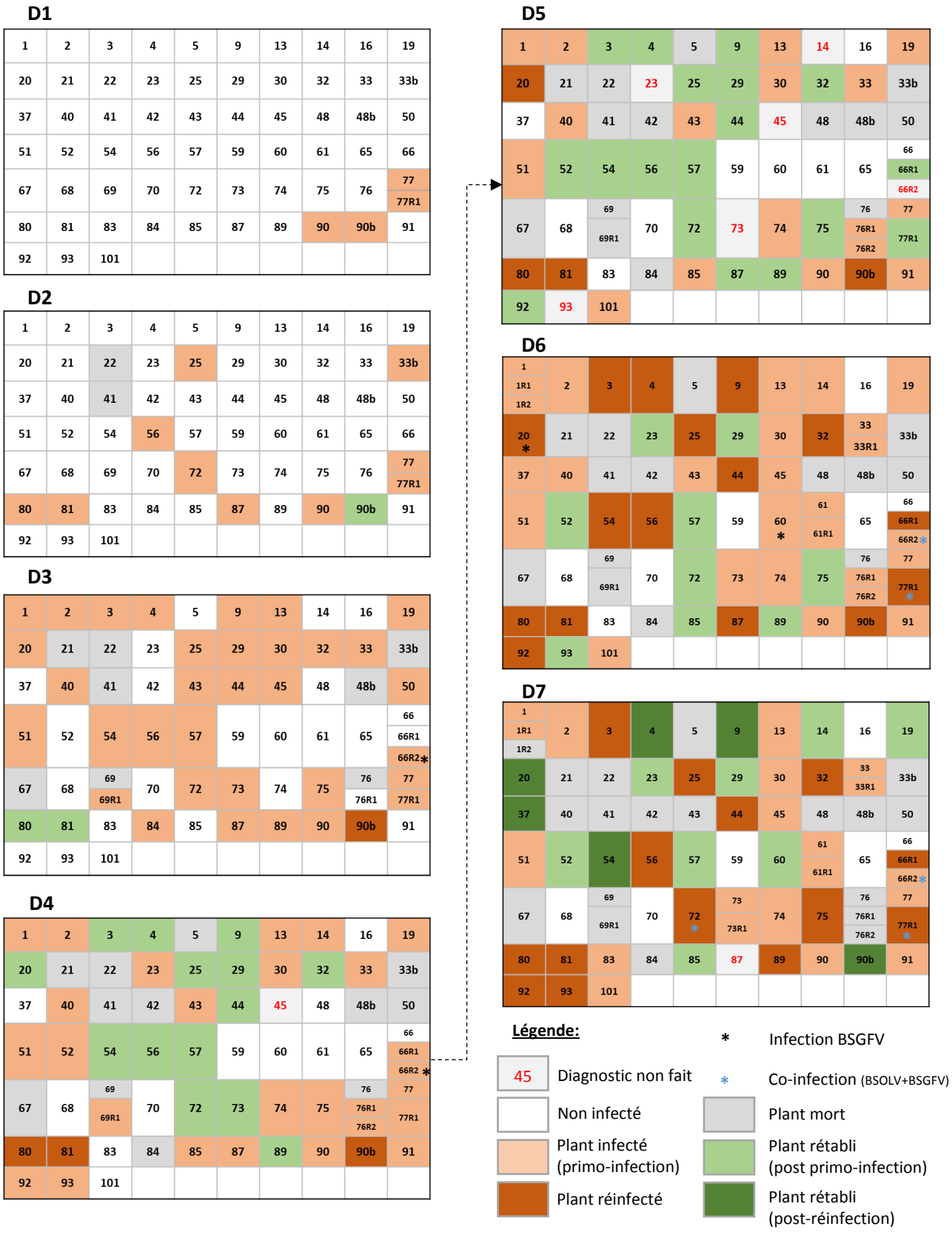

**Figure 2.4 : Analyse de la répartition de la charge virale dans un plant par IC-PCR semi-quantitative.** La charge virale est estimée par IC-PCR semi-quantitative (Fig. 2.3) sur chacune des feuilles (F) des quatre plants HS infectés par BSOLV, sur trois zones par feuille, ainsi que sur plusieurs racines primaires (RP) et secondaires (RS). La charge virale estimée est indiquée avec le code couleur présenté en bas à droite. L'avant-dernière feuille est indiquée par la flèche.

# III. Résultats

## 1) Répartition du virus dans un plant infecté et choix de l'organe de référence

Afin de définir un organe de référence à échantillonner à chaque date, nous avons réalisé en amont des suivis d'infections un test visant à caractériser la répartition de la charge virale au sein d'un plant. Les pieds mères des quatre hybrides synthétiques infectés par l'espèce BSOLV ont été échantillonnés sur chaque feuille, à raison de trois zones par feuille (base, milieu et apex), et sur plusieurs racines primaires et secondaires. La charge virale a d'abord été estimée par immunocapture-PCR semi-quantitative. Cette alternative à l'IC-PCR repose sur la dilution du broyat de plante à plusieurs facteurs de dilution avant l'incubation avec les anticorps. Lors de la visualisation des produits PCR sur gel d'agarose, la comparaison de l'intensité entre les bandes des différents facteurs de dilution permet d'estimer la quantité de particules virales initiales (Fig. 2.3). Si l'intensité du produit PCR est identique entre les facteurs de dilution 1x, 2x et 10x, cela indique une quantité initiale de particules virales forte, et saturant les anticorps. A l'inverse, si l'intensité des produits PCR diminue avec le facteur de dilution, cela indique une charge virale initiale plus faible. Un code couleur est associé à chaque niveau de charge virale (Fig. 2.3). La figure 2.4 indique les résultats pour les quatre plants infectés par BSOLV. Les deux plants HS infectés par les espèces BSGFV et BSIMV ont des niveaux d'infection trop faibles pour établir un schéma de répartition de la charge viral dans le plant. La charge virale a ensuite été mesurée en qPCR, et a confirmé la répartition indiquée sur la figure 2.4 (données non montrées). Les résultats indiquent une répartition hétérogène de la charge virale dans un plant, avec des différences au sein d'une même feuille entre les trois zones d'échantillonnage. Néanmoins, l'avant-dernière feuille émise, indiquée par une flèche sur la figure 2.4, reflète dans les quatre plants une infection. Ce niveau foliaire est donc choisi comme organe de référence pour le suivi des infections au cours du temps. De plus, un diagnostic à partir de l'avant-dernière feuille émise permet de détecter des particules virales ayant un mouvement systémique.

# A) (Figure 2.5)


D1
1 2 3 4 5 9 13 14 16 19
20 21 22 23 25 29 30 32 33 33b
37 40 41 42 43 44 45 48 48b 50
51 52 54 56 57 59 60 61 65 66
67 68 69 70 72 73 74 75 76 77 77R1
80 81 83 84 85 87 89 90 90b 91
92 93 101
D2
1 2 3 4 5 9 13 14 16 19
20 21 22 23 25 29 30 32 33 33b
37 40 41 42 43 44 45 48 48b 50
51 52 54 56 57 59 60 61 65 66
67 68 69 70 72 73 74 75 76 77 77R1
80 81 83 84 85 87 89 90 90b 91
92 93 101
D3
1 2 3 4 5 9 13 14 16 19
20 21 22 23 25 29 30 32 33 33b
37 40 41 42 43 44 45 48 48b 50
51 52 54 56 57 59 60 61 65 66 66R1 66R2*
67 68 69 69R1 70 72 73 74 75 76 76R1 77 77R1
80 81 83 84 85 87 89 90 90b 91
92 93 101
D4
1 2 3 4 5 9 13 14 16 19
20 21 22 23 25 29 30 32 33 33b
37 40 41 42 43 44 45 48 48b 50
51 52 54 56 57 59 60 61 65 66 66R1 66R2*
67 68 69 69R1 70 72 73 74 75 76 76R1 76R2 77 77R1
80 81 83 84 85 87 89 90 90b 91
92 93 101
D5
1 2 3 4 5 9 13 14 16 19
20 21 22 23 25 29 30 32 33 33b
37 40 41 42 43 44 45 48 48b 50
51 52 54 56 57 59 60 61 65 66 66R1 66R2
67 68 69 69R1 70 72 73 74 75 76 76R1 76R2 77 77R1
80 81 83 84 85 87 89 90 90b 91
92 93 101
D6
1 1R1 1R2 2 3 4 5 9 13 14 16 19
20* 21 22 23 25 29 30 32 33 33R1 33b
37 40 41 42 43 44 45 48 48b 50
51 52 54 56 57 59 60* 61 61R1 65 66 66R1 66R2*
67 68 69 69R1 70 72 73 74 75 76 76R1 76R2 77 77R1*
80 81 83 84 85 87 89 90 90b 91
92 93 101
D7
1 1R1 1R2 2 3 4 5 9 13 14 16 19
20 21 22 23 25 29 30 32 33 33R1 33b
37 40 41 42 43 44 45 48 48b 50
51 52 54 56 57 59 60 61 61R1 65 66 66R1 66R2*
67 68 69 69R1 70 72* 73 73R1 74 75 76 76R1 76R2 77 77R1*
80 81 83 84 85 87 89 90 90b 91
92 93 101
Légende:
45 Diagnostic non fait
Non infecté
Plant infecté (primo-infection)
Plant réinfecté
* Infection BSGFV
* Co-infection (BSOLV+BSGFV)
Plant mort
Plant rétabli (post primo-infection)
Plant rétabli (post-réinfection)

### 2) Suivi de primo-infections BSV chez des hybrides natifs issus de *culture in vitro*

Une centaine de plantains natifs, du cultivar « Big Ebanga » (HN-BE), ont été produits par multiplication clonale en culture *in vitro*, puis sevrés en serre tropicale en mars 2017. Lors du sevrage, un premier diagnostic par IC-PCR indique que tous les plants sont sains. Ce diagnostic IC-PCR est ensuite réalisé avant chaque date d'échantillonnage (D1 à D7), puis les plants infectés sont testés en qPCR pour en quantifier la charge virale. La figure 2.2 indique les dates précises de chaque échantillonnage, et les laps de temps écoulés entre deux dates successives. La figure 2.5 représente l'ensemble des plants suivis au cours de l'essai (**A**), avec un code couleur indiquant s'ils sont sains (blanc), infectés pour la première fois (orange) ou pour la deuxième fois (orange foncé), s'ils ont recouvert une première (vert) ou deuxième infection (vert foncé). Il indique également le nombre de plants dans chacune de ces situations à chaque date, en distinguant les nouveaux cas d'une date à une autre (**B**). La distinction entre primo-infection et « réinfection », ainsi qu'entre un premier ou un deuxième recouvrement de l'infection, apporte une précision sur la dynamique des infections au cours du temps.

Quelques observations majeures résultent du suivi dans son ensemble. La majorité des plantains (57/63 plants soit 90%) suivis lors de l'essai ont été infectés à au moins une date d'échantillonnage. Parmi les 63 plants suivis entre mars 2017 et février 2019, seuls 6 plants n'ont jamais été infectés par une espèce BSV (indiqués dans les cases blanches, à la date D7, Fig. 2.5, **A**). La majorité des infections sont dues à l'espèce BSOLV (Tableau 2.3). Cinq plants sont infectés par l'espèce BSGFV (les plants 20, 60, 72, le rejet R2 du plant 66, et le rejet R1 du plant 77), et seulement aux dates D5, D6 ou D7 (indiqués par une étoile sur la Fig. 2.5, **A**). Parmi eux, les rejets des plants 66 (R2) et 77 (R1) sont co-infectés par les deux espèces BSGFV et BSOLV à ces dates (étoile bleue, Fig. 2.5 **A**). Le suivi est réalisé en serre tropicale « insect-proof », en conditions contrôlées, et aucune cochenille n'a été observée sur la population au cours de l'essai. Cela confirme que les infections observées sont d'origine endogène, et résultent de l'activation des séquences virales eBSV. Les stress hydriques appliqués sur un matériel végétal jeune lors du suivi peuvent être à l'origine de tels relargages de particules virales. D'autres stress propres aux conditions de culture sous serre en climat méditerranéen peuvent également contribuer à la fragilité des plants (présence régulière d'acariens et de thrips, ressources limitées par pot, cycles de lumière différents de ceux en régions tropicales). Cependant les plants infectés ne montrent pas systématiquement de symptômes de mosaïque en tirets.

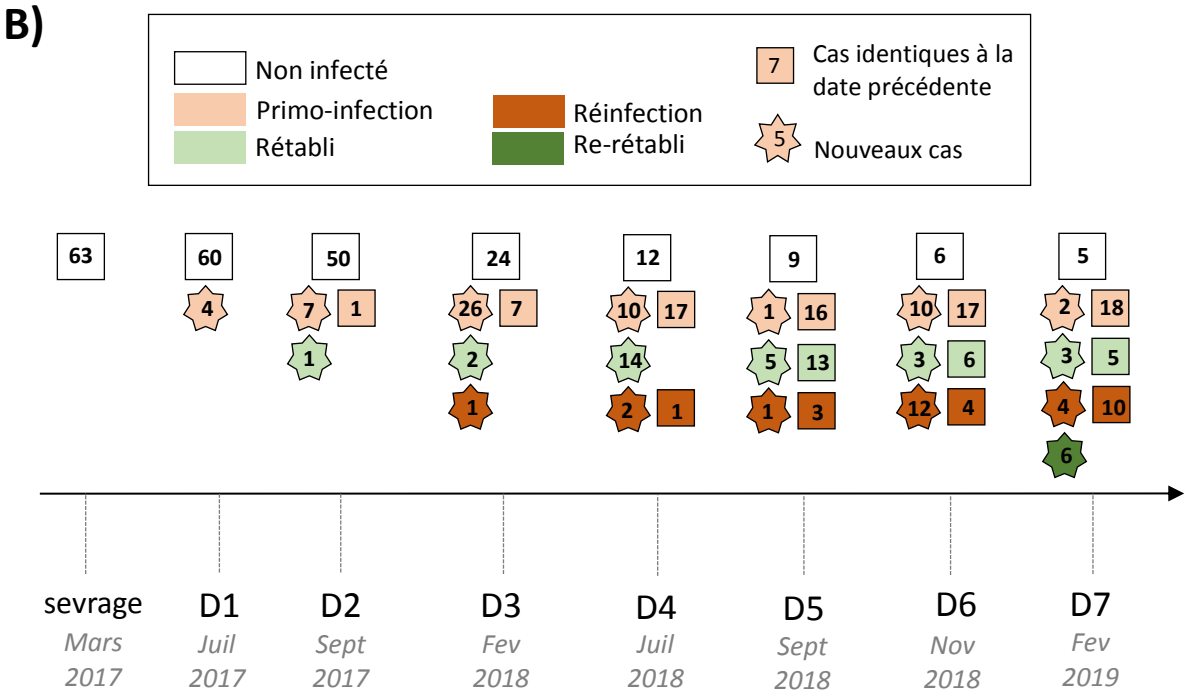



**Figure 2.5 : Statuts infectieux des plantains « Big Ebanga » suivis au cours de sept dates d'échantillonnage. A)** Les grilles schématisent les 63 plants suivis au cours de l'essai, avec les nouveaux rejets émergeant (indiqués dans les cellules fractionnées). Le numéro de chaque plant est indiqué dans la case, et la couleur de celle-ci correspond au statut infectieux : jamais infecté (blanc), infecté pour la première fois (primo-infection, orange clair), infecté pour la deuxième fois (orange foncé), rétabli suite à une première infection (vert clair), rétabli suite à une deuxième infection (vert foncé). Les étoiles noires et bleues indiquent les infections BSGFV et co-infections BSOLV et BSGFV, respectivement. **B)** Le nombre total de plants dans chacun des cas cités précédemment est indiqué pour chaque date d'échantillonnage, en distinguant les nouveaux cas dans chacune des situations d'une date à la suivante (étoiles).

| | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BSOLV** | 4 | 10 | 31 | 29 | 32 | 41 | 34 |
| **BSGFV** | | | | | 1 | 4 | 3 |
| **Co-infection** | | | | | | 2 | 3 |

**Tableau 2.3 : Récapitulatif des plants infectés et co-infectés par les espèces BSOLV et BSGFV à chaque date.** Les nombres totaux de plants infectés par chaque espèce et à chaque date incluent les plants co-infectés.

.

L'autre observation majeure qui résulte de ce suivi est la récupération d'infection (retour à un phénotype sain) observée chez plusieurs plants (vert clair sur la Fig. 2.5, 28 cas au total), et pour certains à plusieurs reprises (vert foncé, 6 cas). Cette réversion du statut viral confirme les observations reportées au champ, et supporte l'hypothèse d'une régulation efficace des infections chez certains plants, pouvant mener à la guérison complète du plant. La prévalence de BSOLV laisse supposer que les stress induisant des infections à partir des intégrations virales activent préférentiellement les séquences eBSOLV. On peut supposer qu'une infection par l'espèce BSOLV fragilise la régulation des intégrations virales et peut faciliter une co-infection par l'espèce BSGFV dans un deuxième temps, comme observée pour les plants 66 (rejet 2), 77 (rejet 1) et 72 lors de réinfections aux dates D6 et D7 (Fig. 2.5, **A**).

Lorsqu'on suit les plants infectés au début de l'essai (à partir des dates D1, D2 ou D3) au cours des dates successives d'échantillonnage, on observe également une fluctuation de la charge virale (Fig. 2.6). L'évolution de la charge virale est indiquée grâce à la valeur ΔΔCt, la ligne centrale indiquant la valeur moyenne de ΔΔCt mesurée à chaque date, entourée de la zone tampon calculée comme indiqué précédemment (±0.78 pour l'espèce BSGFV, ±0.42 pour l'espèce BSOLV, voir section « Matériel et méthodes »). Les charges virales mesurées dans les différents plants (une couleur par plant) varient entre un ΔΔCt de 0 et 10, reflétant un facteur de différence de $2^{10}$ entre les quantités minimum et maximum de particules virales mesurées au cours de l'essai. Il est intéressant de noter que la plupart de ces plants ont un profil similaire de charge virale aux dates D4 et D5, avec une baisse de la charge virale à l'une de ces deux dates. Cette diminution généralisée de la charge virale à deux dates successives est probablement liée à la saison d'échantillonnage, et ce point est discuté dans la section IV.6. Rappelons cependant que la mesure par qPCR ne permet pas de conclure sur l'état sanitaire d'un plant, et les ΔΔCt proches de 0 ne reflètent pas nécessairement l'absence de particules virales, comme cela a été discuté par Ricciuti et al. (2019, article soumis). La ligne rouge représentée en pointillés sur la figure 2.6 indique le « seuil » de ΔΔCt en-dessous duquel un diagnostic sérologique est nécessaire pour conclure sur le statut viral du plant. Par ailleurs, les charges virales de ces plants ré-augmentent après les dates D4 ou D5.

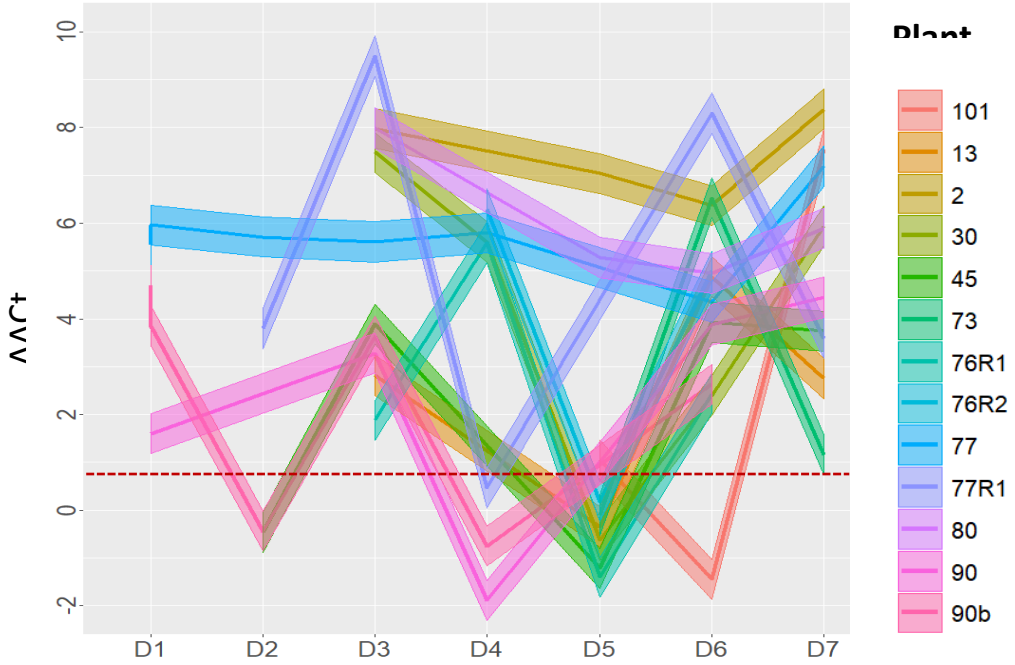



**Figure 2.6 : Dynamique de la charge virale BSOLV chez 13 plantains natifs.** La charge virale BSOLV chez 13 plantains natifs, cultivar « Big Ebanga » (une couleur par plant) est indiquée par la valeur ΔΔCt aux différentes dates d'échantillonnage (D1-D7), avec la zone de variation entourant la valeur ΔΔCt moyenne. La ligne pointillée rouge indique le seuil au-dessous duquel un diagnostic sérologique est nécessaire pour définir l'état infectieux du plant (Ricciuti et al., 2019, article soumis)

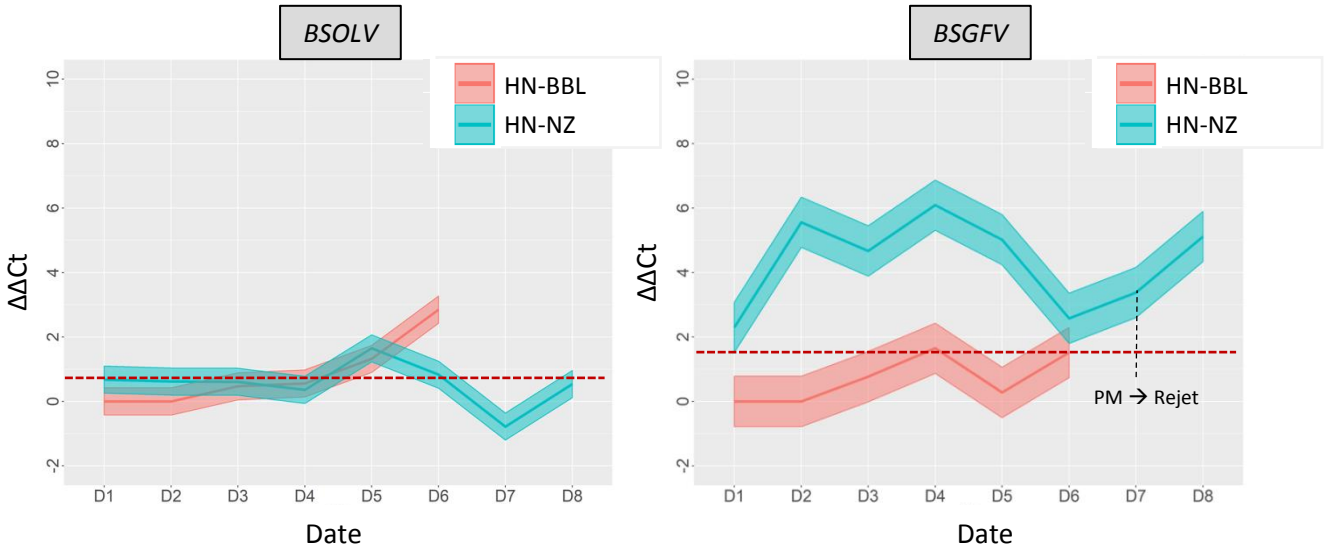



**Figure 2.7 : Dynamique de la charge virale chez deux plantains ramenés du champ et suivis sous serre.** La charge virale des deux plantains natifs (« Bois Blanc » en rose, « Nzorba » en bleu) est indiquée par la valeur ΔΔCt aux différentes dates d'échantillonnage (D1-D8), avec la zone de variation entourant la valeur ΔΔCt moyenne. La ligne pointillée rouge indique le seuil au-dessous duquel un diagnostic sérologique est nécessaire pour définir l'état infectieux du plant (Ricciuti et al., 2019, article soumis)

### 3) Infections BSV chez des hybrides natifs ramenés du champ

Deux bananiers hybrides natifs du sous-groupe plantain (cultivars « Bois Blanc » : HN-BBL et « Nzorba » : HN-NZ), ont également été suivis en serre après avoir été ramenés de bananeraies. Tous deux sont des hybrides AAB porteurs des allèles infectieux eBSOLV-1 et eBSGFV-7, et les diagnostics effectués lors de leur sevrage en serre indiquent que le plant HN-BBL est légèrement infecté par BSOLV et que le plant HN-NZ est infecté par BSGFV. Ces deux plants sont échantillonnés à 8 dates (Fig. 2.2). Les deux plants ne présentent aucun symptôme de mosaïque en tirets au cours de l'essai. La Figure 2.7 indique les charges virales (reflétées par la valeur ΔΔCt) mesurées pour les espèces BSOLV et BSGFV à chaque date. Ces deux plants n'ont pas produit de rejets dans les conditions de culture sous serre jusqu'à la date D7, date à laquelle le plant HN-NZ produit un rejet émergeant du pied mère dont le pseudo-tronc est éclaté. Les valeurs de ΔΔCt pour BSOLV restent faibles chez le plant HN-NZ tout au long du suivi, tandis qu'elles augmentent à partir de la date D5 chez le plant HN-BBL, jusqu'à la mort de ce dernier. Le plant HN-BBL subissant également une émergence d'infection BSGFV entre les dates D2 et D5, on peut supposer que la co-infection par les deux espèces BSOLV et BSGFV a abouti à la mort du plant. Le plant HN-NZ est quant à lui infecté par l'espèce BSGFV dès la date D1, avec une dynamique fluctuante au cours de l'essai, sans que le plant ne parvienne à récupérer complètement de l'infection. Ce pied étant originaire du champ, où la prévalence de l'espèce BSGFV est plus importante que celle de l'espèce BSOLV (Martinez, 2015, thèse), on peut supposer qu'il était infecté par l'espèce BSGFV lors de son prélèvement en bananeraie et que cette infection s'est maintenue en serre.

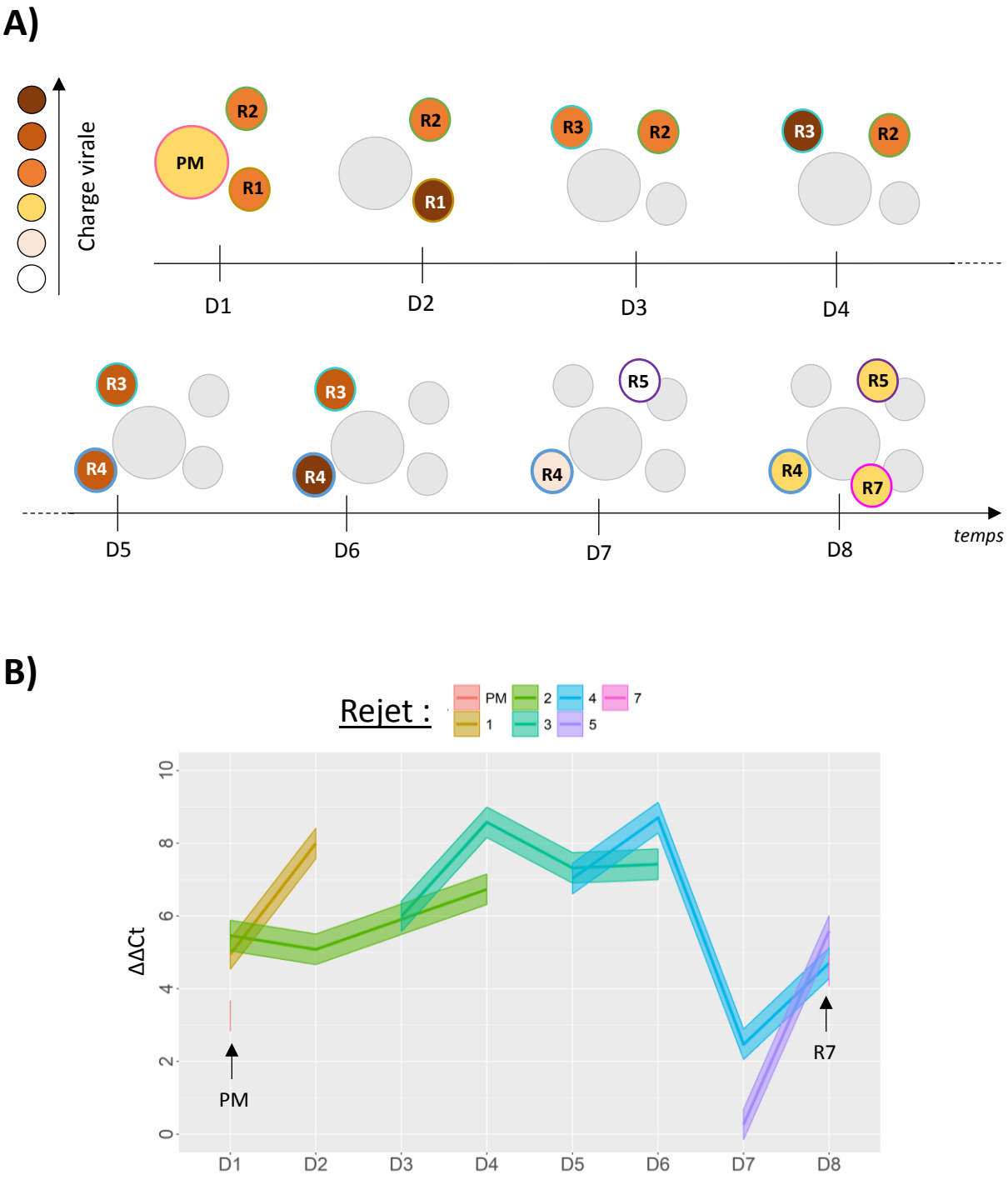



**Figure 2.8 : Schématisation du suivi d'une touffe lors d'une infection, et correspondance avec la charge virale mesurée**. **A)** L'évolution d'une touffe de bananier est schématisée (vue de dessus), avec l'apparition et la disparition successive (plants morts en gris) des rejets (R1 à R7). PM: pied mère. La couleur de remplissage de chaque rejet indique le niveau de charge virale mesurée en qPCR (valeur ΔΔCt), et visible sur le graphe **B)**.

### 4) Infections BSV chez les hybrides synthétiques -HS

Les hybrides synthétiques (HS) sélectionnés pour ce suivi sont porteurs de trois intégrations eBSV : eBSGFV, eBSIMV et eBSOLV. Le tableau 2.1 présente les génotypes eBSV de chacun des plants, en précisant l'allèle infectieux, ainsi que l'espèce BSV infectant chaque plant. La charge virale est mesurée dans chaque touffe de bananier, dans chacun des organes de la touffe (pied mère et rejets), à 8 dates (Fig. 2.2). Quatre plants HS sont infectés par BSOLV (HS-6, 11, 12, 15), un plant par BSGFV (HS-16) et un plant par BSIMV (HS-8). La figure 2.8 représente schématiquement le suivi de la charge virale dans une touffe (exemple avec le plant HS-6) au cours de temps, en indiquant l'apparition successive de rejets ainsi que la charge virale mesurée dans chacun d'entre eux et dans le pied mère. En-dessous du schéma de la touffe au cours du temps, un graphe indique la charge virale mesurée par qPCR dans le pied mère et dans chacun des rejets, aux mêmes dates. Les nouveaux rejets émergents à chaque date constituent une nouvelle ligne sur le graphe de la charge virale (et une nouvelle couleur). A l'inverse, certaines lignes s'arrêtent avant la dernière date, et correspondent aux rejets morts pendant l'essai. La figure 2.9 représente la charge virale mesurée par qPCR dans les six hybrides synthétiques sélectionnés. Le nombre de rejets produits au cours de l'essai pour les hybrides infectés par BSOLV est élevé, entre 7 (plant HS-6) et 25 (plant HS-11). Pour ces pieds, le renouvellement régulier de la touffe est probablement lié à la contrainte d'une culture en pot, et une partie des rejets meurent rapidement après leur émergence. Seuls les rejets ayant persisté pendant plus de deux dates d'échantillonnage sont représentés sur la figure 2.9.

Les quatre pieds infectés par BSOLV montrent de forts symptômes de mosaïque en tirets sur certaines feuilles. On observe néanmoins deux types d'évolution chez ces plants au niveau de leur charge virale. Certains pieds (pied mère ou rejet) subissent une évolution constante de la charge virale, jusqu'à la mort du pied. C'est le cas des rejets 5 et 10 chez le plant HS-12 (en vert et violet), ou des rejets 3, 4 et 5 chez le plant HS-11 (en rouge, orange et jaune), par exemple. Chez le plant HS-6, chacun des rejets subit une forte charge virale qui amène à un remplacement régulier des rejets les uns après les autres. En revanche, d'autres pieds ont une charge virale fluctuante, avec des phases de diminution et d'augmentation de la charge virale. C'est le cas du rejet 11 chez le plant HS-11 (en vert), ou des pieds 2, 4 et 7 chez le plant HS-12 (en rouge, jaune et bleu). Ces rejets ont une durée de vie plus longue et se maintiennent sur 5 à 6 dates, ce qui correspond à près d'une année. Parmi les nouveaux rejets émergents dans ces quatre touffes, certains sont porteurs d'une importante charge virale dès la première date d'échantillonnage, comme quasiment tous les rejets dans la touffe HS-6, qui ont un ΔΔCt

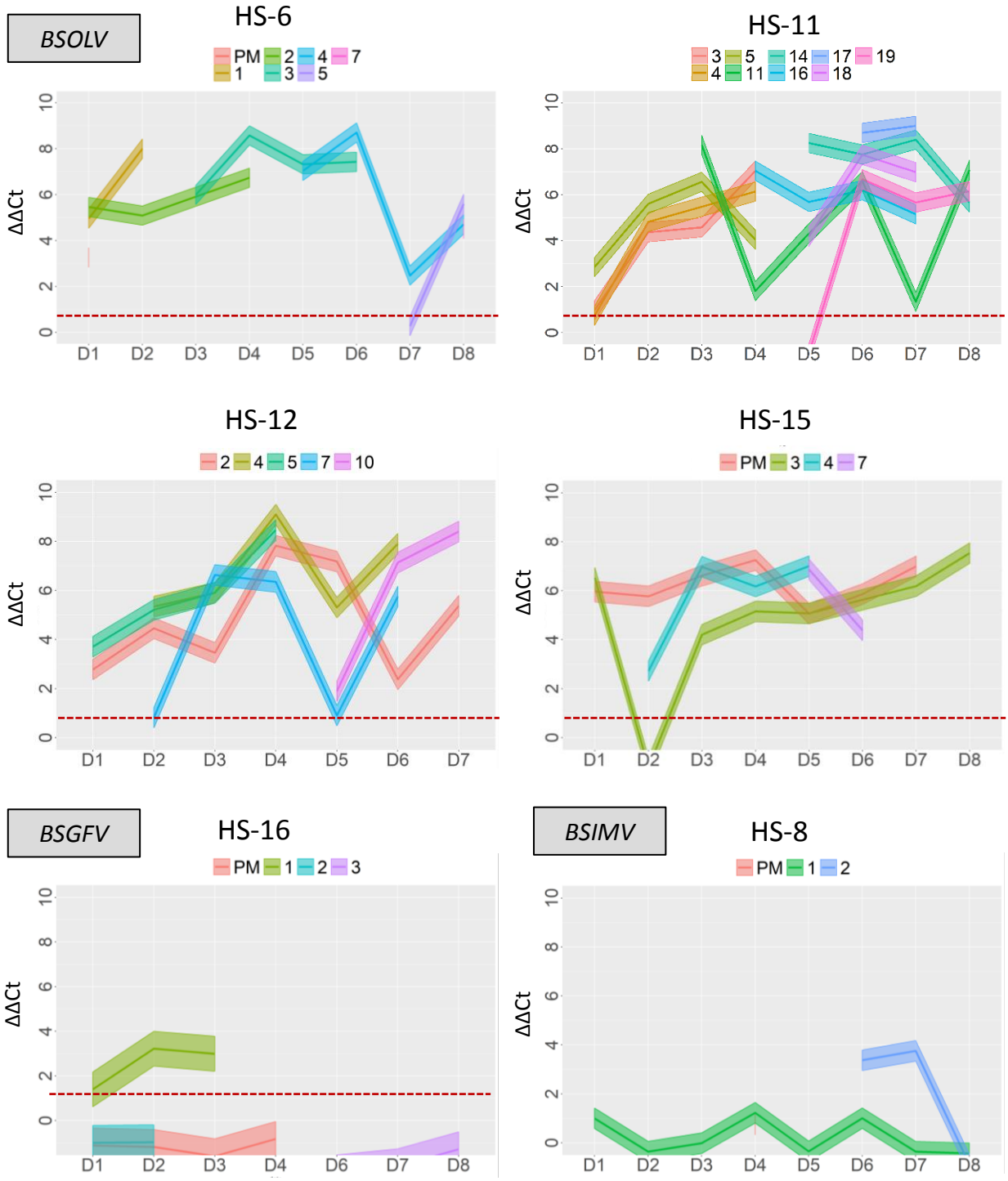



**Figure 2.9** : **Dynamique de la charge virale chez des hybrides synthétiques "HS"**. La charge virale pour le pied mère (PM) et les rejets (numérotés de 1 à n) de chaque plant est indiquée à chaque date d'échantillonnage (D1 à D8), avec la zone tampon entourant les valeurs de ΔΔCt. Les plants HS-6, HS-11, HS-12 et HS-15 sont infectés par BSOLV ; le plant HS-16 par BSGFV et le plant HS-8 par BSIMV. La couleur indique le rejet (ou pied mère) suivi. La ligne pointillée rouge indique le seuil au-dessous duquel un diagnostic sérologique est nécessaire pour définir l'état infectieux du plant.

supérieur à 5 dès leur émergence. Seul le rejet 5 émerge avec une très faible charge virale (peut-être nulle), à une date où le rejet précédent (le rejet 4) observe une chute drastique de la charge virale. D'autres rejets émergent avec une faible charge virale, qui augmente aux dates suivante pour ensuite rechuter ou alors mener à la mort du pied (cas des rejets 7 et 10 chez le plant HS-12, en bleu et violet).

Deux autres hybrides synthétiques, HS-16 et HS-8 sont infectés par les espèces BSGFV et BSIMV respectivement. Aucun de ces deux plants ne montre de symptôme d'infection BSV. L'infection du plant HS-16 par BSGFV est observée dans un seul rejet, le rejet 1, tandis que le pied mère et les rejets suivants semblent être dépourvus de particules virales (ΔΔCt et zone tampon en dessous de 0). De même, l'infection par BSIMV du plant HS-8 est relativement faible chez le rejet 1, qui a une charge virale fluctuante mais avec un ΔΔCt proche de 0. Seul le rejet 2 émerge avec une charge virale plus importante, qui chute entre les dates D7 et D8.

Bien que ce suivi d'infections BSV chez les hybrides AAB synthétiques soit difficile à interpréter, notamment au vu de l'important renouvellement des rejets dans la touffe, on peut en tirer quelques observations majeures. D'une part, les particules virales semblent circuler dans la touffe de bananier, et du pied mère aux rejets. Cela est supporté par l'infection systématique des nouveaux rejets émergents. Une fois infectés en revanche, les différents pieds (pied mère et rejets) d'une même touffe observent des dynamiques d'infections différentes. Certains rejets parviennent à se développer et à réguler l'infection, avec parfois une baisse drastique et transitoire de la charge virale ; tandis que d'autres rejets observent une augmentation continue de la charge virale jusqu'à la mort du plant. Par ailleurs, et bien que cela nécessite de répéter ces observations sur d'autres plants infectés par BSGFV et BSIMV, ces deux espèces BSV induisent des charges virales plus faibles chez leurs plants hôtes que celles induites par BSOLV.

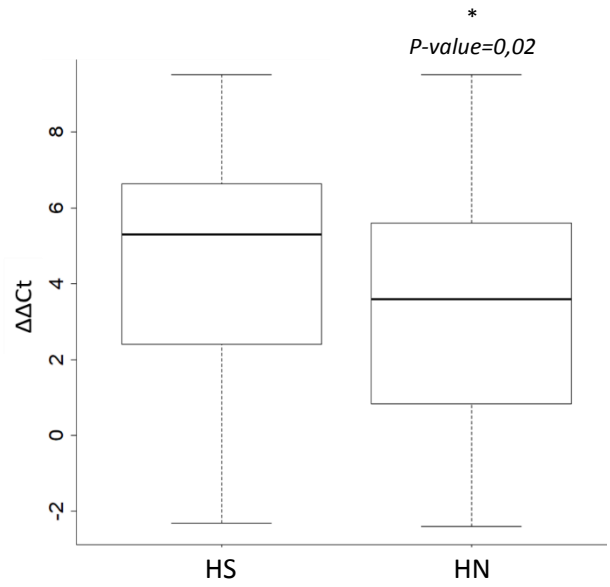



**Figure 2.10 : Valeurs ajustées des ΔΔCt mesurées chez les hybrides synthétiques (HS) et natifs (HN)**.

### 5) Comparaison des charges virales entre hybrides synthétiques et natifs

La principale différence observée entre les hybrides natifs et synthétiques réside dans l'origine de leur génome. Les plantains natifs sont issus d'un croisement interspécifique entre deux géniteurs inconnus, suspectés d'être homozygotes pour le génome A de l'espèce *M. acuminata* ou pour le génome B de l'espèce *M. balbisana*. Les intégrations d'eBSV dans les génomes B ont eu lieu après la spéciation entre les espèces *M. acuminata* et *M. balbisiana*, et leur maintien dans les génomes B est suspecté d'être associé à une forte pression de sélection due aux épidémies BSV en vigueur à cette période. Ainsi, les génomes B porteurs d'intégrations virales auraient coévolué avec les séquences eBSV pour maintenir l'avantage évolutif conféré par les séquences virales, tout en régulant ces intégrations pour maintenir un phénotype résistant (Iskra-Caruana et al., 2014a). Les hybrides interspécifiques natifs tels que le sous-groupe des plantains (AAB) et issus de croisements anciens ont eux aussi pu subir une pression de sélection liée à la réactivation des eBSV, et sont suspectés d'avoir coévolué avec les intégrations virales pour maintenir les eBSV silencieux en temps normal, et pour réguler efficacement les infections et cas d'activation accidentelle. En revanche, les hybrides synthétiques sont issus d'un croisement artificiel effectué il y environ 15 ans, entre les géniteurs PKW (BB) et IDN110 T (AAAA). Chez ces hybrides, il n'y a pas d'historique direct de coévolution entre le génome AAB et les eBSV portées par le génome B. Si cette coévolution favorise la régulation des infections BSV, la régulation d'une infection chez des hybrides synthétiques est supposée être moins efficace que chez des hybrides natifs.

Afin de tester cette hypothèse, deux critères ont été utilisés pour comparer les infections chez des hybrides synthétiques et natifs. Le premier critère est la capacité d'un plant à réguler une infection jusqu'au retour à un phénotype sain. Parmi la population de plantains natifs issus de culture *in vitro*, 32 plants sont diagnostiqués infectés à une date puis sains aux dates successives (cas de rétablissement représentés dans la Fig. 2.5, **A**). Parmi ces plants, 13 maintiennent ce phénotype sain sur au moins deux dates d'échantillonnage, parmi lesquels 2 plants restent sains pendant quatre dates (les plants 29 et 57, voir Fig. 2.5, **A**). En revanche, parmi les hybrides synthétiques, seuls quelques rejets (comme le rejet 3 du plant HS-15 ou le rejet 7 du plant HS-12) semblent récupérer d'une infection, tandis que les autres organes de la même touffe restent infectés (Fig. 2.9). Cette comparaison indique que la régulation des infections BSV chez les hybrides synthétiques semble moins efficace, et moins stable dans le temps, puisqu'aucun des pieds suivis ne maintient un phénotype sain au-delà de deux dates d'échantillonnage.

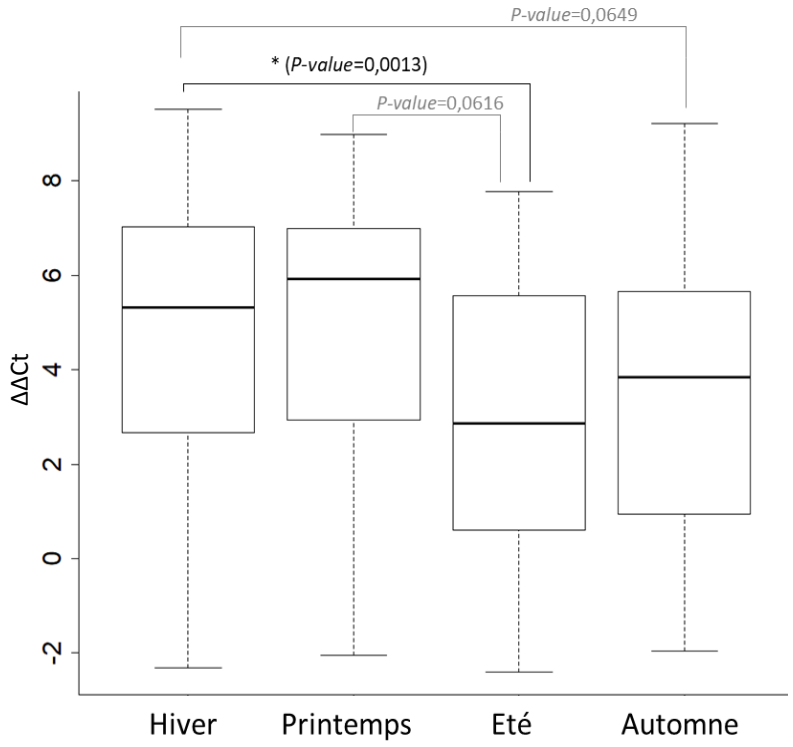



**Figure 2.11 : Valeurs ajustées des ΔΔCt mesurées chez tous les bananiers, à différentes saisons**

Le deuxième critère utilisé est la charge virale dans le plant une fois que celui-ci est infecté. Les valeurs de ΔΔCt mesurées chez les deux types d'hybrides, qui reflètent la charge virale, ont été comparées grâce à un modèle linéaire intégrant les différents facteurs impliqués dans le suivi, tels que le nombre de feuille de chaque plant, la présence de rejet(s), la date et la saison d'échantillonnage, l'origine native ou synthétique de l'hybride, et le plant dont il est issu. La figure 2.10 indique les valeurs moyennes ajustées de ΔΔCt mesurées dans les deux groupes (hybrides synthétiques et natifs). Un test d'analyse de variance indique que les valeurs ΔΔCt mesurées chez les hybrides natifs sont légèrement mais significativement plus faibles que celles observées chez les hybrides synthétiques (p-value de 0,02).

### 6) Effet du mois et de la saison d'échantillonnage sur la charge virale mesurée

Afin de tester l'effet de la date d'échantillonnage et plus globalement de la saison d'échantillonnage sur la charge virale mesurée, un modèle linéaire est construit pour comparer les charges virales entre les quatre saisons observées en climat continental, tout en intégrant les facteurs connus lors de nos analyses (hybride natif ou synthétique, nombre de rejet, nombre de feuille, âge du pied). Ce modèle inclut les charges virales mesurées dans toutes les populations de bananiers, hybrides natifs et synthétiques. Cependant les dates d'échantillonnage pour les hybrides synthétiques et natifs diffèrent, et s'étendent de mars 2017 à février 2019 (Fig. 2.2). En indiquant la saison à laquelle ont été effectués les échantillonnages, on observe une différence significative des valeurs de charge virale (ΔΔCt) parmi l'ensemble des plants testés entre les différentes saisons (Fig. 2.11). Les plants ont une charge virale significativement plus élevée aux dates d'échantillonnage réalisées pendant l'hiver que pendant l'été (p-value de 0.0013). Des écarts sont également observés entre les dates d'échantillonnage réalisées au printemps par rapport à l'été (p-value faible mais non significative), et en hiver par rapport à l'automne (p-value faible mais non significative). Cette observation est cohérente avec les dynamiques d'infections observées chez les plantains naturels aux dates D4 et D5 (Fig. 2.6), réalisées en juillet et septembre 2018, respectivement. Ces différences peuvent être en partie expliquées par les cycles de lumière variables d'une saison à l'autre, et non contrôlées lors de ces essais en serre. Des cycles de lumière plus courts (en hiver) pourraient favoriser une augmentation de la charge virale dans les plants infectés.

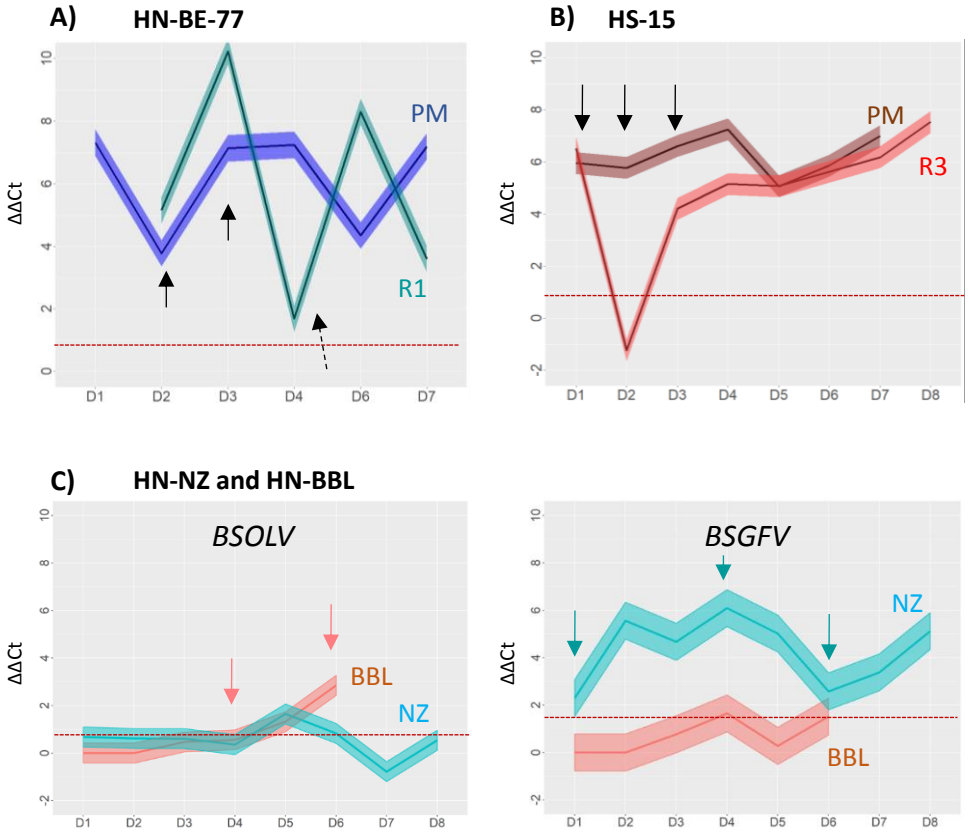



**Figure 2.12 : Dynamique de la charge virale dans les échantillons sélectionnés pour la caractérisation des profils d'ARN antiviraux.** La charge virale (valeur ΔΔCt) est indiquée pour **A)** le plant HN-BE-77, pied mère (PM, bleu foncé) et premier rejet (R1, cyan); **B)** le plant HS-15, pied mère (PM, rouge-brun) et troisième rejet (R3, rouge); **C)** les plants HN-BBL (rouge) et HN-NZ (bleu) pour les espèces BSOLV (gauche) et BSGFV (droite). Les flèches indiquent les dates sélectionnées pour caractériser les profils de siARN antiviraux.

### 7) Sélection des plants la caractérisation des profils d'ARN antiviraux

Afin de comprendre les mécanismes de régulation amenant aux fluctuations de charge virales reportées dans ce chapitre, des plants observant des charges virales fluctuantes au cours des suivis ont été sélectionnés pour caractériser à des dates clés les profils d'ARN antiviraux. Un plant issu de chaque type d'hybride a été sélectionné, en incluant lorsque cela est possible un pied de la même touffe n'observant pas de fluctuation de charge virale, afin de comparer leurs profils de petits ARN. La figure 2.12 indique les plants sélectionnés avec les dates auxquelles les petits ARN sont séquencés (flèches).

Parmi les hybrides natifs du cultivar « Big Ebanga », le plant NH-BE-77 est sélectionné en incluant le pied mère et le rejet R1. Les dates sélectionnées pour le séquençage profond des petits ARN (à partir des mêmes échantillons que ceux utilisés pour la mesure de la charge virale) sont les dates D2, D3 et six semaines après la date D4 (D4'), date à laquelle le statut viral est déterminé par IC-PCR, Chap II). Ces dates correspondent à une charge virale quasi-constante chez le pied mère, tandis que le rejet R1 observe une chute de la charge virale entre les dates D3 et D4 (Fig. 2.12, **A**). Parmi les hybrides synthétiques, le plant HS-15 est sélectionné en incluant le pied mère et le rejet R3. Le séquençage profond des petits ARN est réalisé aux dates D1, D2 et D3, dates auxquelles le pied mère a une charge virale constante tandis que le rejet R3 observe une chute drastique suivie d'une augmentation de la charge virale (Fig. 2.12, **B**).

Les deux hybrides natifs issus de bananeraies, HN-BBL et HN-NZ, sont également sélectionnés pour la caractérisation des profils d'ARN antiviraux, aux dates D4 et D6 pour HN-BBL, dates auxquelles la charge virale pour BSOLV augmente ; et D1, D4 et D6 pour HN-NZ, dates auxquelles la charge virale BSGFV augmente puis diminue (Fig. 2.12, **C**).

Les comparaisons effectuées entre charge virale et profils d'ARN antiviraux au cours du temps et pour chacun de ces plants sont décrites dans l'article "*How native plantain deals with infection derived from endogenous viral sequences of Banana streak virus*" (Ricciuti et al., 2019, en cours), qui constitue le deuxième chapitre de ce manuscrit.

# IV. Discussion

L'article « *Extrachromosomal viral DNA produced by infective endogenous viral elements in non-infected banana hybrids impedes quantitative PCR diagnostics of Banana streak virus infections* » (Ricciuti et al., 2019, soumis dans « Journal of General Virology ») présenté au début de ce chapitre propose une méthode de quantification de la charge virale BSV chez des hybrides porteurs d'intégrations eBSV, afin de réaliser des suivis dynamiques d'infections sur plusieurs dates (objectif **i**). Bien que présentant des limites quant au diagnostic des plants, et révélant une variation de l'amplification des eBSV probablement due à la présence variable d'ADN viral extrachromosomique, cette méthode de quantification relative nous a permis de caractériser l'évolution d'infections d'origine endogène chez des bananiers hybrides AAB. La première observation issue de ces résultats concerne la prévalence de l'espèce virale BSOLV.

### 1) Prévalence de BSOLV chez les hybrides natifs, en conditions contrôlées

La grande majorité des infections obtenues spontanément dans les conditions contrôlées lors de ces essais impliquent l'espèce virale BSOLV. Si les hybrides synthétiques ont des génotypes eBSV divers, incluant pour certains l'allèle non infectieux eBSGFV-9 expliquant ce constat, ce n'est pas le cas des hybrides natifs du cultivar « Big Ebanga », porteurs des allèles infectieux pour chacune des deux espèces BSV (eBSOLV-1 et eBSGFV-7) et pourtant majoritairement infectés par l'espèce BSOLV. Lors des premières observations d'activations des eBSV à la suite de culture *in vitro*, un constat similaire avait été fait concernant la proportion de plants infectés par BSGFV plus faible que celle des plants infectés par BSOLV (Côte et al., 2010a). En conditions naturelles pourtant, la prévalence de l'espèce BSGFV parmi deux hybrides interspécifiques largement cultivés (FHIA-21 et MxH (macho por hambra)) est plus importante que l'espèce BSOLV (Martinez, 2015, thèse). Tout comme l'apparition de symptômes de mosaïque en tirets dépend de facteurs multiples tels que la température (Dahal et al., 1998), le stade de floraison (Bhat et al., 2016a) ou l'altitude (Pressat, 2019); on peut supposer que les intégrations eBSGFV et eBSOLV soient activées par des stress distincts sous tendant des mécanismes d'activation différents (Noumbissié, 2013, thèse).

Cette prévalence BSOLV est à considérer au regard des mécanismes génétiques connus de l'activation des eBSV chez des bananiers hybrides AAB. Un locus d'activation des eBSV, nommé BEL pour « BSV expression locus » a été caractérisé sur le même chromosome que celui portant les intégrations eBSGFV et eBSOLV (Lheureux et al., 2003), et est retrouvé de

manière homozygote avec les allèles infectieux eBSGFV-7 et eBSOLV-1, proche génétiquement de l'eBSOLV-1. L'étude de la ségrégation de ce facteur génétique chez des hybrides AAB synthétiques montre que seulement 50% des intégrations eBSGFV-7 sont activées suite au croisement artificiel, contre 100% des intégrations eBSOLV-1 (Lheureux, 2002, thèse). Parmi les hybrides AAB natifs suivis dans notre essai, certains plants ne sont pas infectés au cours de l'essai, bien que porteurs des deux intégrations infectieuses eBSGFV-7 et eBSOLV-1. Nous émettons donc l'hypothèse qu'il existe une régulation épigénétique, probablement basée sur l'interférence par ARN, à l'instar de ce qui a été démontré chez le diploïde BB PKW (Duroy, 2012, thèse) et maintenant un phénotype sain chez ces hybrides AAB natifs, en conditions optimales.

### 2) Répartition du virus dans le plant et effets physiologiques

Les résultats de ces suivis indiquent que la charge virale fluctue au sein des touffes de bananiers, et que le virus transite certainement du pied mère aux différents rejets, avec cependant des dynamiques d'infections différentes selon les rejets (objectif **ii**). Lors de nos essais, il n'a pas été possible de distinguer si l'infection d'un rejet provenait d'une primo-infection résultant de l'activation d'eBSV ou si elle provenait de particules virales circulant la touffe *via* les flux de sève entre les différents rejets. Il est néanmoins important de discuter ici l'aspect dynamique des particules virales dans un plant infecté, lors de sa croissance et en zone continentale avec quatre saisons.

Les fluctuations de la charge virale décrites dans ce chapitre sont observées à partir d'un organe de référence, l'avant-dernière feuille émise. Une feuille en développement est considérée comme un organe « puit » (importateur de nutriments) jusqu'à ce que la photosynthèse qu'elle réalise produise suffisamment de nutriments, et qu'elle devienne un organe « source » en exportant une partie de ces nutriments. L'avant-dernière feuille émise fait donc partie des nouveaux organes sources. L'export des produits de photosynthèse depuis les organes sources vers les organes puits (racines, bulbe, méristèmes et feuilles en développement) induisent des flux utilisant le système vasculaire de la plante (Roberts et al., 2007), qui peuvent être utilisés pour les mouvements longue-distance des particules virales, comme cela a été démontré pour le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, Leisner et al., 1992). Si l'infection BSV est présente lors du développement de la feuille échantillonnée dans nos essais, l'import de nutriments et potentiellement de particules virales assure la présence du virus dans cet organe et donc sa détection. En revanche, en cas de déclenchement d'infection après le développement de la

feuille de référence, celle-ci peut être dépourvue de particules virales, bien que d'autres organes puits puissent être infectés.

Les flux de nutriments entre les organes sources et puits sont par ailleurs affectés par divers facteurs environnementaux et biotiques, parmi lesquels l'intensité de lumière, la température, ou l'infection d'un plant sont associés à des modification du transport des sucres (Lemoine et al., 2013). Il est possible que la saison impacte également ce flux *via* des modifications des cycles jours-nuits. La différence de charge virale entre printemps-hiver et été-automne dans l'organe de référence, observée dans nos essais (Fig. 2.6), peut refléter une régulation plus efficace de l'infection en été mais peut également être liée à une réallocation des nutriments, accompagnés de particules virales, préférentiellement dans le bulbe. En effet, certaines infections virales ont déjà été associées à la réallocation des ressources (carbohydrates, amidon) dans les organes puits d'une plante infectée (discuté par Culver and Padmanabhan, 2007).

### 3) Fluctuations de charge virale et régulation d'infection

La charge virale fluctue également au cours du temps, et semble résulter d'un mécanisme de régulation plus ou moins efficace selon la nature de l'hybride (objectif **iii**). Tandis que les hybrides synthétiques observent des infections persistantes, à l'exception de quelques rejets régulant négativement une infection ; les hybrides natifs semblent basculer fréquemment d'un phénotype infecté à un phénotype sain avec un niveau d'infection légèrement mais significativement inférieur à celui observé chez les hybrides synthétiques. Ces différences entre hybrides natifs et synthétiques nous amènent à penser que les fluctuations de charge virale sont liées à une régulation de l'infection, au-delà de potentielles variations physiologiques discutées au-dessus.

Nous proposons que la régulation des infections observée chez les hybrides natifs, plus efficace que celle des hybrides synthétiques, est liée à l'historique de coévolution entre génomes de plantains (AAB) et intégrations eBSV, et qu'elle est basée sur un mécanisme d'interférence par ARN plus actif. Nous faisons l'hypothèse que la présence d'intégrations eBSV dans le génome des bananiers hybrides suivis lors de nos essais limite les infections issues d'eBSV et profite à leur régulation quand elles surviennent, permettant dans certains cas une récupération complète de l'infection. Cette hypothèse est testée et discutée dans le chapitre suivant, au sein de l'article "*How native plantain deals with infection derived from endogenous viral sequences of Banana streak virus*" (Ricciuti et al., 2019, en cours).

## V. Points clés du chapitre 1

- Les **infections issues d'eBSV** semblent concerner **tous les organes d'une touffe** de bananier hybride AAB
- Tous les organes d'une touffe infectée n'observent **pas la même dynamique d'infection**
- La **charge virale** lors d'infections issues d'eBSV **fluctue au cours du temps** chez les hybrides AAB synthétiques et natifs
- **Les hybrides natifs récupèrent** plus efficacement d'**infections issues d'eBSV** que les hybrides synthétiques

# CHAPITRE 2

## Caractérisation des petits ARN impliqués dans la défense antivirale contre les eBSV et BSV

## Article 2 :

**How native plantain deals with viral infection derived from endogenous viral sequences of Banana streak virus**

**How native plantain deals with viral infection derived from endogenous viral sequences of Banana streak virus.**

**Emeline Ricciuti[1], Mikhail Pooggin[2], Marie-Line Iskra-Caruana[1,*]**
[1] BGPI, CIRAD, Univ Montpellier, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, 34984, France.
[2]BGPI, INRA Centre Occitanie, CIRAD, SupAgro, Université de Montpellier, Montpellier, 34984, France
[*]Corresponding author: marie-line.caruana@cirad.fr

**Keywords**: viral siRNA, infection recovery, banana interspecific hybrid, *Banana streak virus*, endogenous viral element (EVE).

**Abstract**:

Banana plantains are native interspecific hybrids of *Musa acuminata* and *Musa balbisiana* species, having a triploid AAB genome and naturally hosting in the B sub-genome viral integrations of Banana streak virus, so-called "eBSVs". These eBSV integrants can release complete and functional episomal viruses upon stresses, thus leading to infections of endogenous origin, further horizontally transmitted by mealybug vectors. However, such infections did not lead so far to epidemics on native AAB banana hybrids, that appear to downregulate episomal BSV replication and systemic spread. Here we provide evidence that this downregulation is mediated by the plant RNA interference and gene silencing machinery generating small interfering RNAs (siRNAs) from the integrated eBSV sequences. We monitored the dynamic of BSV infections in banana AAB hybrids across time, and comparing viral titres with viral siRNA abundance, size class, and 5'-terminal nucleotide profiles at different stages of the infection. We highlighted a reversible mechanism in which both transcriptional and postransciptional silencing mediated by 24-nt and 21-22-nt siRNAs, respectively, contribute to downregulate episomal virus multiplication, leading to recovery from infection. By comparing native and synthetic AAB hybrids, we propose that this downregulation mechanism is inherited through long coevolution between native AAB hybrids genomes with eBSV, since eBSV downregulation is less efficient in interspecific synthetic hybrids. Our results point out the dynamics of antiviral silencing mechanisms developed by a host plant harbouring infective viral integrations to resist its own endogenous-derived infection.

## Introduction

Plant genomes contain many endogenous viral sequences as signatures of viral infections inherited from ancestor interactions, and contributing nowadays to their evolution, genetic diversity and vertical as well as horizontal gene transfer (Diop et al., 2018; Gilbert and Feschotte, 2018; Mushegian and Elena, 2015). Such integrations are found in most cultivated plants, including bananas and plantains. Plantain is an interspecific, native hybrid (triploid AAB) between *Musa acuminata* genomes (denoted A) and *Musa balbisiana* genome (denoted B). All B genomes contain at least one endogenous viral sequence of *Banana streak virus* (so-called "eBSV", Staginnus et al., 2009) inherited from seedy diploid BB parents (Duroy et al., 2016; Gayral et al., 2010; Geering, 2005; Geering et al., 2001), which are resistant to BSV infections of any origin (Lheureux, 2002, PhD thesis). *Banana streak virus* (BSV) is a circular double-stranded (ds) DNA pararetrovirus from genus *Badnavirus* of the family *Caulimoviridae* causing banana streak disease (BSD). BSD affects plant growth and fruit yield (Daniells et al., 2001; Lassoudière, 2007), and is horizontally transmitted by diverse mealybugs species (Kubiriba et al., 2001; Meyer et al., 2008). At least three BSV species were reported to have endogenous counterpart (eBSV) that is infective, because of their ability to restore by recombination events a complete, replication- and infection-competent, circular viral dsDNA referred as "**episomal BSV**" (Chabannes and Iskra-Caruana, 2013; Iskra-Caruana et al., 2010; Ndowora et al., 1999). These are *Obino l'Ewai* (BSOLV), *Goldfinger* (BSGFV) and *Imove* (BSIMV) banana streak species. All exist as eBSVs in the banana B genome (Chabannes et al., 2013; Gayral et al., 2008; Ndowora et al., 1999) and as episomal dsDNA viruses, which replicates via reverse transcription. Complete genomic, genetic and cytogenetic characterisation of eBSV integrants for these three BSV have been depicted for the seedy banana diploid "Pisang Klutuk Wulung" (BB genome) (Gayral et al. 2008; Chabannes et al., 2013). All three eBSVs integrants in PKW show highly rearranged combinations of inverted and direct repeats viral sequences containing at least one complete viral genome for each BSV counterpart. Successive homologous recombination events from eBSV can likely lead to release of episomal genomes (Chabannes et al., 2013; Gayral et al., 2008). BSV infections deriving from eBSVs occurred following biotic and abiotic stresses (Bhat et al., 2016; Côte et al., 2010; Dallot et al., 2001). Such spontaneous infections were only reported in banana interspecific hybrids having one copy of the B genome, such as plantains (AAB) (Gauhl et al., 1997; Vuylsteke et al., 1998), when hybrids having two B genomes seem to be resistant, as PKW (BB). Interspecific AAB

hybrids are nonetheless usually virus-free, without any disease symptoms, under optimal conditions.

Small interfering RNA (siRNA)-generating RNA interference (RNAi) is a major antiviral defence mechanism in plants (Ding and Voinnet, 2007, more recently reviewed by Pooggin 2018). Biogenesis of DNA virus-derived 21-, 22- and 24-nucleotide (nt) siRNAs and their roles in post-transcriptional and transcriptional silencing of viral genes have been dissected in the model plant *Arabidopsis thaliana* for representatives of *Caulimoviridae* family *(Cauliflower mosaic virus*, genus *Caulimovirus*) and *Geminiviridae* (*Cabbage leaf curl virus*, genus *Begomovirus,* Aregger et al., 2012; Blevins et al., 2006, 2011). In plants, transcriptional gene silencing (**TGS**), often coinciding with DNA cytosine methylation, is mainly directed by 24-nt siRNAs, while post-transcriptional gene silencing (**PTGS**) coinciding with RNA cleavage and degradation or translational repression, is mainly directed by 21- and 22-nt siRNAs and miRNAs. All these pathways contribute to plant defences against DNA viruses, in which host Dicer like (DCL) proteins process 21-nt (DCL4, DCL1), 22-nt (DCL2) and 24-nt (DCL3) viral siRNAs from longer double-stranded RNA (dsRNA) precursors. Such precursors are generated through sense and antisense transcription of viral DNA or by host RDR-dependent RNA polymerases (RDR) (Blevins et al. 2006; Blevins et al. 2011; Aregger et al. 2012; Pooggin 2013, 2018). In endogenous silencing pathways, PTGS is mainly amplified and reinforced by RDR6 that generates dsRNA precursors from RNAs targeted by miRNAs and trans-acting siRNAs, which are then diced into 21-nt secondary siRNAs by DCL4. TGS and RNA-dependent DNA methylation are mainly reinforced and maintained through the actions of RDR2 coupled with the plant specific DNA-dependent RNA polymerases Pol IV and Pol V, generating dsRNA precursors diced into 24-nt siRNA by DCL3, and by *de novo* and maintenance methyltransferases (reviewed in Borges and Martiensses 2015). In all silencing pathways, siRNAs (and miRNAs) are loaded to Argonaute (AGO) family proteins selecting small RNA by size, 5'-terminal nucleotide identity and other factors, and forming RNA-induced silencing complexes (RISCs) that mediate PTGS and TGS (Fang and Qi, 2016). In the case of endogenous viral elements (EVEs), similar mechanisms may generate EVE-derived siRNAs capable of both PTGS and TGS (reviewed in Pooggin, 2018).

Previously, it has been shown that the RNAi machinery of *Musa acuminata* triploid AAA plants of the cultivar Cavendish persistently infected with six different episomal BSV species (BSOLV, BSGFV, BSIMV; BSCaV, BSVnV and BSMyV) produce 21-, 22- and 24-nt siRNAs that cover the entire circular dsDNA genomes with dissimilar siRNA hotspots distributed along

both strands (Rajeswaran et al. 2014). We assume the eBSV expression in plantain is downregulated by small interfering RNA (siRNA), usually preventing from infection. In this study, we compared the dynamics of eBSV-derived infections in native and synthetic AAB hybrids using deep sRNA sequencing and bioinformatics at different time over more than one year. We compared these profiles between BSV-infected plants and plants recovering from infection, and revealed changes across time in relative contributions of TGS and PTGS pathways targeting integrated and episomal viruses, correlating with infection status and episomal virus titre. By comparing eBSV siRNA profiles in native AAB hybrid and recently-generated, "synthetic" AAB hybrid plants, we provide evidence to support the hypothesis that coevolution between the virus and the host may have led to mutual benefits, by re-enforcing the antiviral defences of the host, while providing an additional vertical transmission route for the virus (Aiewsakun and Katzourakis, 2015; Chen et al., 2017; Hohn et al., 2008).

## Materials and methods:

### Banana plants and genotypes

Synthetic banana hybrid ("SH" plant) with triploid AAB genome used in our study is derived from genetic crosses between the seedy diploid PKW (BB) as female parent and the tetraploid male parent IDN110T (AAAA). It was maintained by vegetative propagation for 15 years under tropical insect proof greenhouse conditions, with ca. 75% humidity, night-temperature of 22 to 24°C, and day temperature of 28°C. All plants were genotyped for eBSV using PCR, CAPS and dCAPS markers developed by Gayral et al. (2008) and Chabannes et al. (2013). The B genome in SH plant harbours infective eBSOLV-1 and eBSIMV alleles and a non-infective eBSGFV-9 allele. Native banana hybrid ("NH") plants of the plantain cultivar "Big Ebanga" (NH-BE) were propagated by *in vitro* culture at Vitropic (Montpellier) and then grown for 2 years under the same greenhouse conditions as described above. Native banana hybrids of the plantain cultivars "Bois Blanc" and "Nzorba" (NH-BBL and NH-NZ, respectively) were collected from fields in Haïti and Cameroun, respectively, and grown for 2 years under the same greenhouse conditions as described above. All the three NH cultivars belong to the plantain AAB subgroup, and have the infective eBSGFV-7 and eBSOLV-1 alleles in the B genome. The corm is formed by the banana main plant called "mother plant" producing the bunch and "suckers" as vegetative propagules for the next cycles. For both mother plant and suckers, samples of leaves at level n-1, where n is the last emerged leaf (or "cigar" leaf if present) were taken and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for further molecular analysis.

| Name | Orientation | Sequence |
|---|---|---|
| **RCA-1** | sense | TKATGGCWTTYATGGGGTAAWWCC |
| **RCA-2** | sense | ATGGARGYTGAYCTKTCWSAAGG |
| **RCA-3** | sense | TAYGARTGGCTHGTWATGCCVTT |
| **RCA-4** | sense | ATWYCNNTGCMWRCAYSART |
| **RCA-5** | antisense | ACYARYTCYTCAACGTCYTCYTT |
| **RCA-6** | antisense | CKYTCGAAKACTTTGRYRTCAAA |
| **RCA-7** | antisense | GCTCCWGTGTCWARRATHGCRTT |
| **RCA-8** | antisense | CCAYCKKRYHCKHGAKGGTTTRT |

**Table 1: Name, orientation and sequence of degenerate primers added to rolling circle amplification (RCA) reaction to enrich for episomal viral DNA of BSGFV, BSIMV and BSOLV.**

| Name | Target | Coordinates | Orientation | Sequence |
|---|---|---|---|---|
| HSOL1 | BSOLV | 1680-1703 | sense | TTGCCCACAGAGCAAGAACAGTAC |
| HSOL2 | BSOLV | 6149-6126 | antisense | GCAGACTATCAGTTTTCCACTTAC |
| HSOL3 | BSOLV | 2181-2204 | sense | TCGGATTCGCCTATAATATTCAAA |
| HSOL4 | BSOLV | 2565-2542 | antisense | TCTCCCACCATGTTTTCAAGAGGA |
| HSOL5 | BSOLV | 6528-6505 | antisense | TCCACTGCATTGATCAACACACCT |
| miR160 | *Musa* | - | - | TGGCATACAGGGAGCCAGGCA |

**Table 2: Name, nucleotide position coordinates on BSOLV reference genome (GenBank: NC003381), orientation and sequence of DNA oligonucleotide probes used for northern blot hybridization of BSOLV-derived siRNA and endogenous plant miRNA (miR160).**

**Total DNA and RNA extraction**

Same frozen leaf tissue was used for both total DNA and RNA extractions. Total DNA was extracted using MATAB (mixed alkiltrimethylamonium bromide), method (Gawel and Jarret, 1991) as follows. 0.1 g frozen leaf tissue was ground in liquid nitrogen and incubated in 500 µL of MATAB buffer (100 mM Tris HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% MATAB, 1% PEG 6000, 0.5% sodium sulphite, 40 µg RNase A Qiagen) for 20 min at 74°C. Then, DNA was separated twice with 1 volume of chloroform-isoamylic alcohol (24:1), followed by centrifugation at 18,000 *g* for 30 min and precipitated with 1 volume of ice-cold isopropanol for 30 min to 1 h at 4°C, followed by centrifugation at 18,000 *g* for 30 min at 4°C. DNA pellets were washed in 1 mL of 75% ethanol, followed by centrifugation for 10 min at 18,000 *g*, 4°C, and then in 500 µL absolute ethanol, followed by centrifugation for 10 min at 18,000 *g*, 4°C, and were dissolved in water.

Total RNA were extracted from 1 g frozen leaf tissue, as described by Liu et al. (1998). Frozen leaf tissue was ground in liquid $N_2$ and incubated in 10 mL of extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 25 mM EDTA, 1.5% SDS, 2% PVP, 0.7% beta-mercaptoethanol) for 10 min at room temperature (RT). Insoluble debris was removed by two successive centrifugations at 2300 *g* for 20 min at RT. The supernatant was mixed with 1/3 volume of 5 M sodium acetate (pH 6.0) and incubated for 30 min on ice, followed by centrifugation at 17,000 *g* for 15 min at 4°C. The supernatant was mixed with 1 volume of phenol-chloroform-isoamilic alcohol (25:24:1, pH=4.0) and the aqueous phase was separated by centrifugation at 17,000 *g* for 10 min at 4°C. RNA was then precipitated by mixing with 1 volume of isopropanol and incubated for 5 min at RT and then for 10 min on ice, centrifuge at 25,000 *g* for 30 min at 4°C. The RNA pellets were washed with 1 mL of 75% ethanol, followed by centrifugation at 25,000 *g* for 5 min at 4°C, and dissolved in 150 µL RNase-free water. Then, total RNA from each extract was distributed in 40 µg aliquots, dried and stored at -80°C.

**Rolling circle amplification, sequencing and *de novo* reconstruction of viral genomes**

Circular viral DNA was enriched by rolling circle amplification (RCA) of the total DNA extracted from infected leaf tissues using TempliPhi™ kit (GE Healthcare), in a 12 µL final volume, according to manufacturer's instructions. RCA reaction was supplemented with degenerated primers specific for BSGFV, BSIMV and BSOLV (Table 1) to ensure preferential amplification of episomal BSV DNAs, as described by James *et al.* (James et al., 2011). RCA products were purified using Monarch© PCR & DNA cleanup kit (New England Biolabs),

following manufacturer's instructions, and eluted in 20 µL dilution buffer. Fifty nanograms DNA of the RCA products were taken for Illumina sequencing at Fasteris AG (Switzerland) using standard Nextera protocol for library preparation and HiSeq 2500 for 2x150-nt paired-end sequencing. Viral genomes were *de novo* reconstructed from the sequencing reads by selecting unique inserts sequenced 40 or more times and by assembling the selected sequences using the short read assembler Velvet with k-mers 77, 79, 83, 87, 91, 95, 99, 103, 107, 111, 113 and 117. All the resulting Velvet contigs were then scaffolded using SeqMan Pro v. 7.1.0 of DNASTAR Lasergene. Contigs of viral origin were identified by BLAST analysis and used for reconstruction of the consensus viral genome sequence. The consensus viral genomes were further validated using Illumina small RNA sequencing data (see below) for the corresponding infected plants visualized with MISIS-2 software as described by the authors (Seguin et al. 2016). Alignments of *de novo* assembled virus genomes was done using MUSCLE program of Geneious package.

**Immunocapture (IC)-PCR**

Leaf tissue (500 mg) was ground in 5 mL grinding buffer (2% PVP, 0.2% $Na_2SO_3$, 0.2% BSA mixed in phosphate-buffered saline with Tween 20 buffer (PBS-T) pH 6.8 composed of 1.3 M NaCl, 14 mM $KH_2PO_4$, 47 mM $(Na_2HPO_4)2H_2O$, 26 mM KCl, 0.005x Tween 20) and spun for 5 min at 5000 *g*. Supernatant (25 µL) was transferred to a tube coated with anti-BSV polyclonal antibodies (Agdia) diluted 1:200 in carbonate buffer (15 mM $Na_2CO_3$, 34 mM $NaHCO_3$, pH 9.7), and incubated for 3 h at room temperature to capture viral particles. Tubes were rinsed 5 times with PBS-T buffer and 3 times with sterile water. Extracts were then treated with DNase RQ1 (Promega) for 1 h at 37°C to remove residual plant genomic DNA. DNase was inactivated at 95°C for 10 min. PCR was then performed with specific BSV primers (2.5 mM each, see Table 1) using 1U *Taq* Polymerase (Promega) 1x GoTaq buffer (Promega) supplied with 2.5 mM dNTPs.

**Quantitative PCR (qPCR) for viral titre monitoring**

Viral titres were measured by qPCR across time to select plants downregulating BSV or recovering from BSV infection. Viral titre monitoring was made with real-time qPCR, using an adjusted relative quantification method developed for AAB and other banana hybrids with infective eBSVs (Ricciuti *et al,* 2019, submitted). Virus-specific primer pairs were used for amplification of the viral target gene (ORF3) of BSGFV and BSOLV, while banana gene (RPS2)-specific primers were used for normalization of viral titres. Relative quantification

relies on comparison of Ct values between target and normalizer gene, leading a ΔCt value. For the banana AAB hybrids hosting eBSVs, second relative quantification has to be done to take into account amplification of eBSV sequences in addition to those of episomal viruses when present, by using a virus-free control of same AAB genotype, referred as "calibrator". Comparison of ΔCt values between the infected banana sample and the calibrator results in the ΔΔCt value. The higher ΔΔCt, the higher titre of the episomal infection. Quantitative PCR was processed with SYBR Green detection system using LightCycler®480 (Roche). Two to fifty nanograms of template DNA were mixed in a final volume of 10 µL with 1x SYBR Green master mix containing BSV and RPS2 primers at the final concentrations 0.25 µM and 0.30 µM, respectively. The qPCR program included i) pre-incubation for 5 min at 95°C. ii) 40 amplification cycles, each cycle of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 10 s at 72°C, iii) melting curve process for 1 min at 95°C, 30 s at 60°C, followed by slow (2°C/s) heating until reaching 95°C, and iv) cooling at 18°C. For each sample, qPCR was repeated three times on the same plate. Raw Ct data were transformed by LC480 Converter software and further exported to LinReg software to calculate individual amplification efficiency. Quality score was assigned for each well, and used to discard inefficiently amplified samples from the analysis.

**Northern blot hybridization:**

Viral siRNA blot hybridization analysis was performed as described previously for banana plants infected with episomal BSVs (Rajeswaran et al. 2014). 15% polyacrylamide gel (8 M urea, 15% acrylamid-bisacrylamid 19:1, 0.06% TEMED, 0.06% APS, 1x Tris-borate-EDTA (TBE)) was pre-run at 350 V for 30 min prior to sample loading. Forty micrograms of total RNA were suspended in loading buffer (formamide with bromophenol blue), denatured at 95°C for 1 min, and loaded onto the gel. Migration was done at 300 V for 30 min and then 450 V for two to three hours, at RT. RNA was transferred on positively charged nylon membrane (GE Healthcare, $N^+$ membrane) by electroblotting (10 volts) in 1x TBE buffer at 4°C overnight. RNA was UV cross-linked to the membrane. Membrane was then hybridized with a mix of BSOLV-specific, $P^{32}$-radiolabelled probes (Table 2), using PerfectHyb$^{+}$™ buffer (SigmaAldrich) at 35°C overnight. Plant miR160-specific probe was used as a control for endogenous small RNA accumulation (Table 2). Membrane was washed three times with 2x SSC / 0.5% SDS buffer (35°C, 30 min) and exposed to a phosphor screen for 1 to 2 days when hybridized with miR160 probes, and for 7 days when hybridized with BSOLV probes, as the viral siRNA signal is weaker. Scanning was done using phosphorimager Typhoon™ (GE Healthcare).

**Small RNA sequencing and bioinformatics analysis**

Ten micrograms of total RNA were taken for Illumina sequencing at Fasteris G (Switzerland), using Illumina TruSeq sRNA kit for library preparation and multiplexing 20 libraries in one lane of HiSeq 4000 with 1x50 bp single-end reads. Bioinformatics analysis of viral and endogenous sRNAs was performed as described previously (Rajeswaran et al., 2014; Turco et al., 2018) using the scripts for sorting and counting of sRNAs by size (20-25 nt), polarity (forward, reverse) and 5'-terminal nucleotide identity (5'A, 5'C, 5'G, 5'U). Reads were aligned on reference genome using a Burrows-Wheeler Alignement Tool (BWA), allowing perfect matches only, and up to 10 different sites in case of repeated/duplicated sequences. For each reference, circular genome, the 50 first bases were added to the 3'-end to allow complete covering with sRNA. Data were visualized using MISIS-2 software (Seguin et al., 2016). Two of the 22 sRNA datasets analysed in this study (detailed in Table S1) are from the previous study by Rajeswaran et al. (2014): namely the datasets BPO-61 and BPO-64 for BSGFV- and BSOLV-infected Cavendish (AAA) plants, respectively. All datasets were normalized and expressed per million of reads according to the size of 20- to 25-nt small RNAs libraries.

## Results:

### *De novo* reconstruction of episomal BSGFV and BSOLV genomes from AAB banana hybrids

It is assumed that BSV infections in interspecific banana hybrids are derived from endogenous viral integrants. To date, no sequence data for infective eBSVs is available, except from those from the seedy BB diploid banana PKW that is never infected. Synthetic AAB hybrids (SH) used in this study have herited the B genome from PKW (the female parent of genetic cross) where sequenced data of BSV are available; while native AAB hybrids (NH) have B genomes of unknown origins. We therefore performed *de novo* reconstruction of episomal virus genomes from BSV-infected SH and NH plants including BSOLV-infected AAB synthetic hybrid with infective eBSOLV, eBSGFV, and eBSIMV alleles, BSOLV-infected AAB NH of the plantain cultivar "Big Ebanga" (NH-BE) with infective eBSOLV and eBSGFV alleles, and BSGFV-infected NH of the plantain cultivar "Nzorba" (NH-NZ) with infective eBSOLV and eBSGFV alleles. These infected plants were selected based on qPCR analysis with virus-specific primers (see Material and Methods). We focused on BSGFV and BSOLV infections of endogenous origin, since BSIMV is not integrated in the genome of native AAB plantains. Episomal virus DNA was enriched by rolling circle amplification supplemented with BSV-specific degenerated primers (see Materials and Methods) and digested by *KpnI* restriction enzyme, which recognizes a unique restriction site on each of the BSOLV and BSGFV reference genomes (GenBank accession: KJ013506 and KJ013507, respectively). In all the cases of BSV infection, *KpnI* digestion resulted in ~7-to-8 kb products likely corresponding to the BSV full-length linear genomes (BSOLV: 7.39 kb, BSGFV: 7.26 kb) (Figure 1, lanes 2, 6 and 10); no distinct digestion product was observed for virus-free PKW (BB) or qPCR-negative AAB banana plants (Figure 1, lanes 12 and 14). Undigested RCA products of four selected banana hybrids with episomal virus infection (SH-15, NH-BE-77 and NH-NZ) were separately sequenced using Illumina protocol and the consensus sequences of the viral genomes were *de novo* reconstructed from the highly-redundant sequencing reads (see Materials and Methods). The complete circular genome sequences of BSOLV obtained from SH and NH-BE were near identical with only one single nucleotide polymorphism (SNP) over the 7388 bp viral genome. For further analyses, we used the BSOLV sequence from NH-BE as a reference virus genome. This result indicates that the infective eBSOLV allele of the NH-BE is likely similar or even identical to that of the SH which is derived from the eBSOLV-1 allele inherited from PKW. This BSOLV sequence differs by

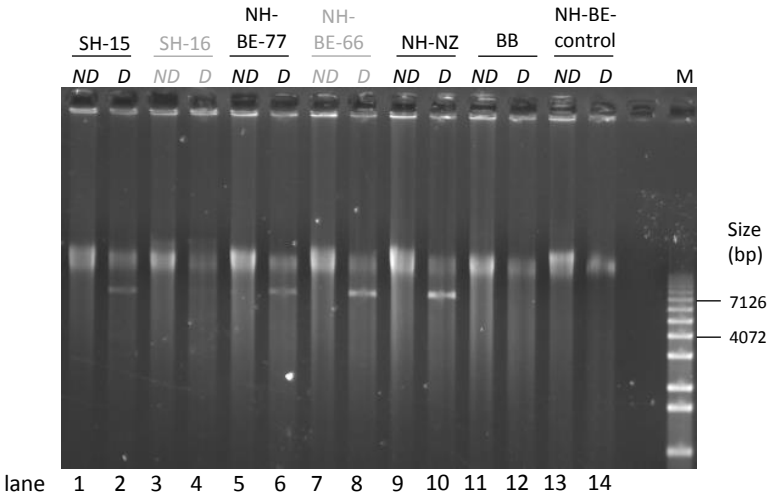



**Figure 1: Restriction analysis of RCA products obtained on total DNA from BSV-infected banana plants and virus-free control banana plants**. Non-digested (ND) and *Kpn*I-digested (D) RCA products from BSOLV-infected synthetic AAB hybrid "SH-15" (lanes 1-2) and BSGFV-infected synthetic AAB hybrid "SH-16" (lanes 3-4), BSOLV-infected native AAB hybrid cv. "Big Ebanga" plant "NH-BE-77" (lanes 5-6) and BSGFV-infected "NH-BE-66" (lanes 7-8), BSGFV-infected native AAB hybrid cv. "Nzorba" plant "NH-NZ" (lanes 9-10) were separated on 1% agarose gel and stained with EtBr. Virus-free native AAB hybrid cv. "Big Ebanga" plant "NH-BE-control" (lanes 13-14) and PKW diploid "BB" (lanes 11-12) were both used as negative controls. Plants SH-15, NH-BE-77 and NH-NZ were selected for Illumina sequencing and *de novo* reconstruction of viral genomes.

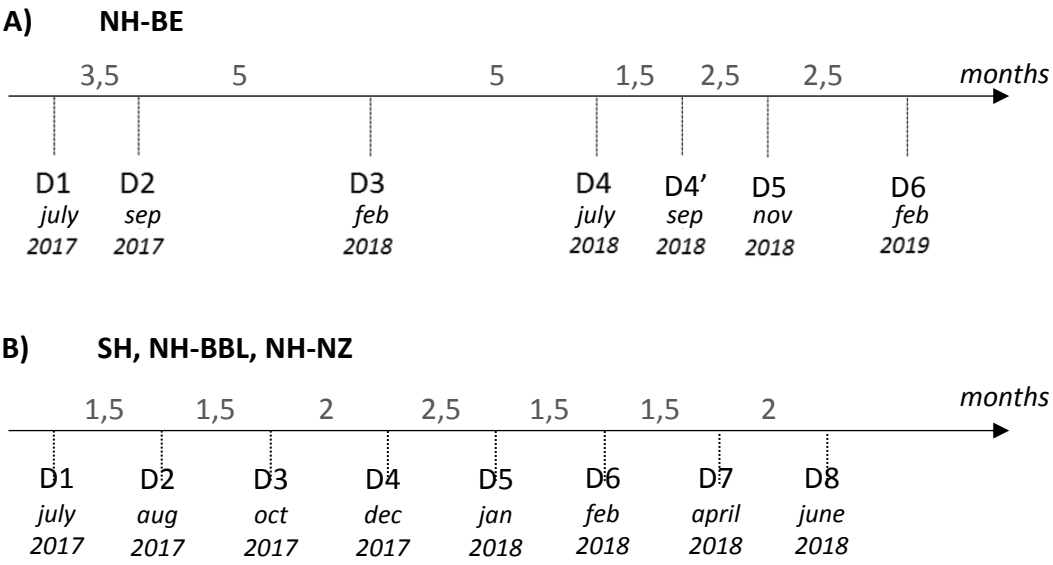



**Figure 2**. **Time-course sampling and qPCR analysis of banana AAB hybrid plants** for **A)** native AAB hybrids, cv. "Big Ebanga" (NH-BE) and for **B)** synthetic hybrid (SH) and native hybrids, cv. "Bois Blanc" and "Nzorba" (NH-BBL and NH-NZ, respectively). Time spans (in months) between the sampling time points are indicated above the axis, with dates (D) of each time point indicated below.

26 and 16 SNPs from episomal BSOLV genomes previously characterized and deposited on GenBank (KJ013506 and NC003381, respectively). The BSGFV genome sequence reconstructed from BSGFV-infected NH-NZ plant, differs by 132 and 163 SNPs from referenced BSGFV genomes KJ013507 and NC007002 (GenBank), respectively. This either indicates difference of sequence in the infective eBSGFV allele between both NH-NZ and PKW, although eBSV genotyping gave the same PCRs results (see Material ad Methods), or indicates that episomal in sample NH-NZ resulted from horizontal transmission (mealybug-mediated) on field, before the plant was moved to greenhouse. Table S2 show details of alignments.

**Both TGS and PTG contribute to downregulate BSV infection in native AAB hybrids**

Mechanism underlying eBSV control in plantain and usually preventing from infection is expected to be based on RNA interference (RNAi). To validate such hypothesis of RNAi-based downregulation mechanism, dynamic of viral titre was monitored in AAB banana hybrids (mother plant and suckers) undergoing BSV infections originating from eBSV. Leaf tissues collected from mother plant and suckers with contrasting viral titres were used for both profiling viral and endogenous small RNAs (Illumina sequencing and bioinformatics) and to compare the profiles of virus-derived siRNAs with viral titres.

***BSOLV-infected native hybrid, cv. Big Ebanga***

Infection dynamics in the NH-BE mother plant (MP) and one sucker (S) was recorded over one year and half, and viral load in both organs was measured at six time points by qPCR (Time Fig. 2, **A**). While the mother plant maintained fluctuant but continuous infection across time, the sucker strongly downregulated episomal BSOLV infection between time points D3 and D4 (Fig. 3, **A**). The presence of encapsidated viral DNA particles was evaluated by immunocaptute (IC)-PCR six weeks after the time point D4; named " D4' ", and revealed high amounts of viral particle in the mother plant and negligible amounts of viral particles in the sucker, indicating its near complete recovery from the BSOLV infection (Fig. S1). Note that despite near complete recovery at this time point, the sucker exhibited "relapse" in viral infection at the later time point (D5) followed by another "remission" at D6. Small RNA sequencing was performed at time points D2, D3 and D4' (representing high virus load in the mother plant and almost complete recovery in the sucker). In the mother plant, total amount of viral siRNAs was found to be constant across the three time points. Furthermore, the size distribution with a slight

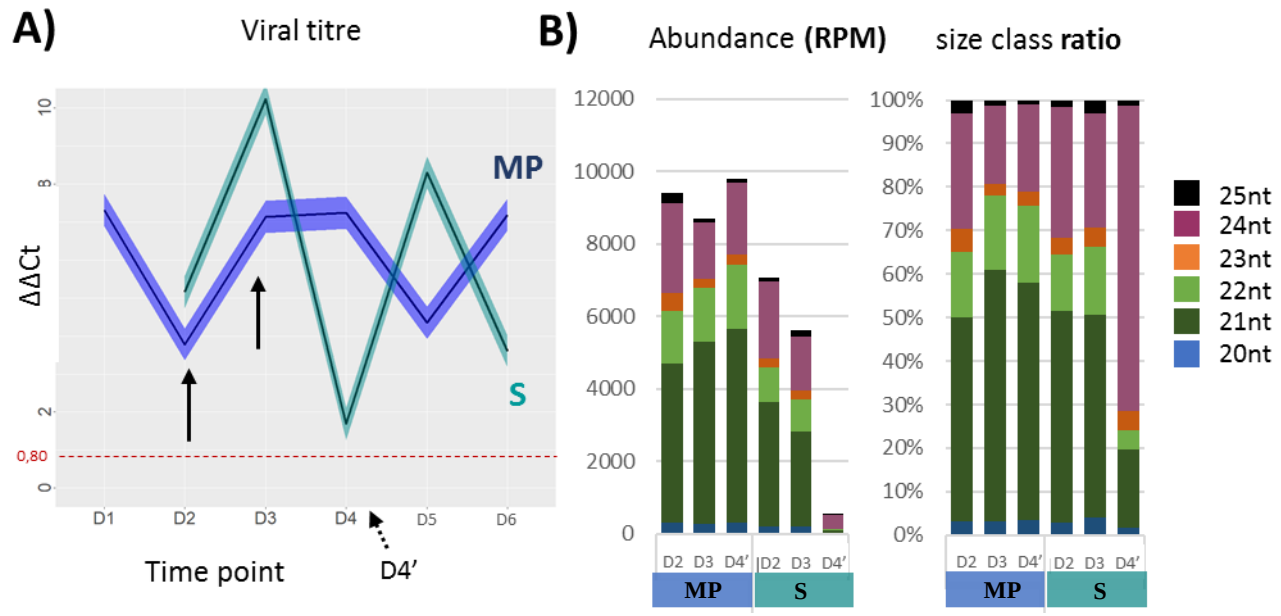



**Figure 3: Viral titre and siRNA profiles over time course of BSOLV-infection in mother plant (MP) and sucker (S) of the native AAB hybrid cultivar "Big Ebanga", NH-BE-77. A)** Viral titre (indicated with the ΔΔCt value) was measured in MP (dark blue) and S (cyan) by qPCR on total DNA extracted from the same leaf samples as those used for sRNA deep sequencing, except for D4' for which sRNA sequencing was done on the sample collected 6 weeks after D4 (dotted arrow). The sampling time points for small RNA sequencing (D1, D2, D4') are indicated with arrows. Mean ΔΔCt values are surrounded by the variation zone, and red line indicates ΔΔCt threshold under which serological tool is needed to determine the viral status, as reported by Ricciuti et al. (2019, submitted). **B)** Viral siRNA abundance (in reads per million, "RPM"), size class profile (colour coded) and ratio of each size class are indicated for both the mother plant (MP) and the sucker (S), at the three sampling time points.

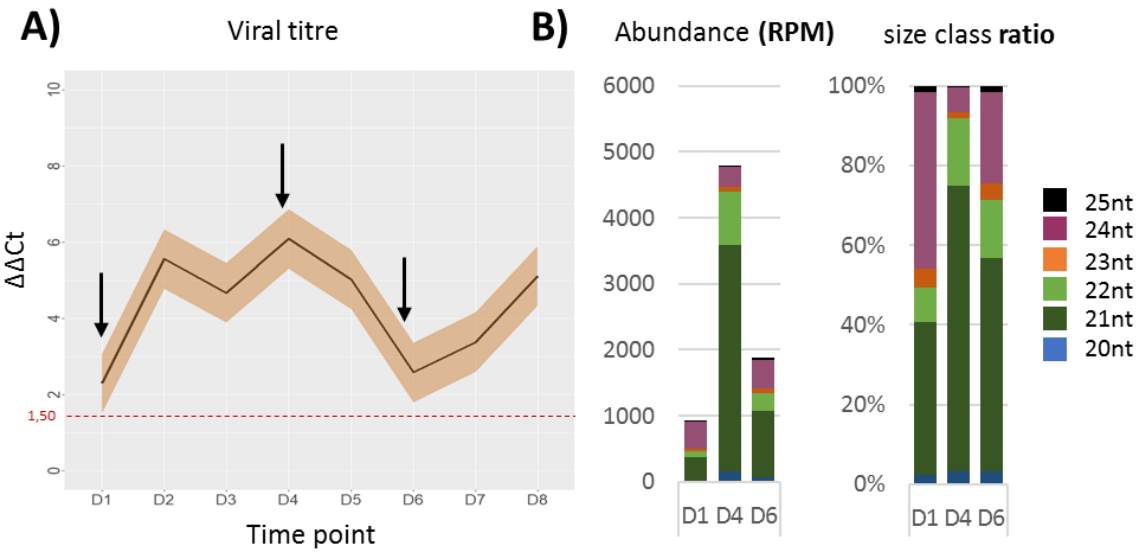



**Figure 4: Viral titre and siRNA profiles over time course of BSGFV-infection in the mother plant of the native AAB hybrid, cultivar "Nzorba". A)** Viral titre (indicated with the ΔΔCt value) was measured by qPCR on total DNA extracted from the same leaves samples. Time point of viral siRNA analysis are indicated with black arrows (D1, D4 and D6). Mean ΔΔCt values are surrounded by the variation zone, and red line indicates ΔΔCt threshold under which serological tool is needed to determine the viral status **B)** Viral siRNA amount, size class profile (colour coded) and ratio of each size class are indicated at the three sampling time points.

majority (50-60%) of 21-nt siRNAs followed by 22-nt and 24-nt siRNAs (35 to 45%). In the sucker, both the abundance of viral siRNA and the viral titre drastically decreased between time points D3 and D4' (Fig. 3). Notably, at D4' viral siRNAs were found to be mainly composed of 24-nt size class (>70%), derived from the eBSOLV integrant in the absence of the episomal virus (see below).

Although no episomal BSGFV infection was detectable during the time course analysis in the NH-BE-77 system, its B genome hosts the infective eBSGFV-7 allele. Our analysis revealed that eBSGFV sequences spawn viral siRNAs (Fig. S2, **A**). The total amount and size profile (mainly 24-nt) of eBSGFV-derived siRNAs in both mother plant and sucker were found to be very similar to those eBSOLV-derived siRNAs in the sucker at the recovery time point (D4'), with predominant accumulation of 24-nt.

***BSGFV -infected native hybrid, cv. Nzorba***

Episomal BSGFV infection in the NH-NZ plant sampled on field and then cultivated under tropical greenhouse conditions was quantified by qPCR at eight time points (Fig. 2, **B**). Although no complete recovery from the infection was observed, a clear increase of the viral load between time points D1 and D4 is recorded, followed by a strong decrease between time points D4 and D6 (Fig. 4, **A**). Thus, siRNA profiles were characterized by deep sequencing at the three time points D1, D4 and D6. Figure 4 (**B**) shows a ca. 5-fold increase in viral siRNA production between time points D1 and D4, associated with the increase of the viral titre, and a ca. 4-fold decrease in viral siRNA production between D4 and D6, coinciding with the decrease of the viral titre. Moreover, viral siRNA size profile is changing with 24-nt size class being predominant at the lowest viral titre (D1) and 21-nt size class being predominant at the highest viral titre (D4). With the decrease of viral titre by D6, the relative abundance of 24-nt viral siRNA increased, although it does not reach the one from D1. This is consistent with the above-described observations for BSOLV-infected native hybrid (NH-BE-77) where the total amount of viral siRNA was lower at lower viral titres, but the relative accumulation of 24-nt viral siRNAs was higher.

The NH-NZ plant does not undergo BSOLV infection although it hosts the infective eBSOLV allele. Our analysis revealed that eBSOLV-derived siRNAs are mainly of 24-nt in length (Fig. S2, **B**). Thus, production of 24-nt siRNAs from eBSOLV integrants coincides with the episomal BSOLV-free status of the NH-NZ plant and the recovery from episomal BSOLV in the

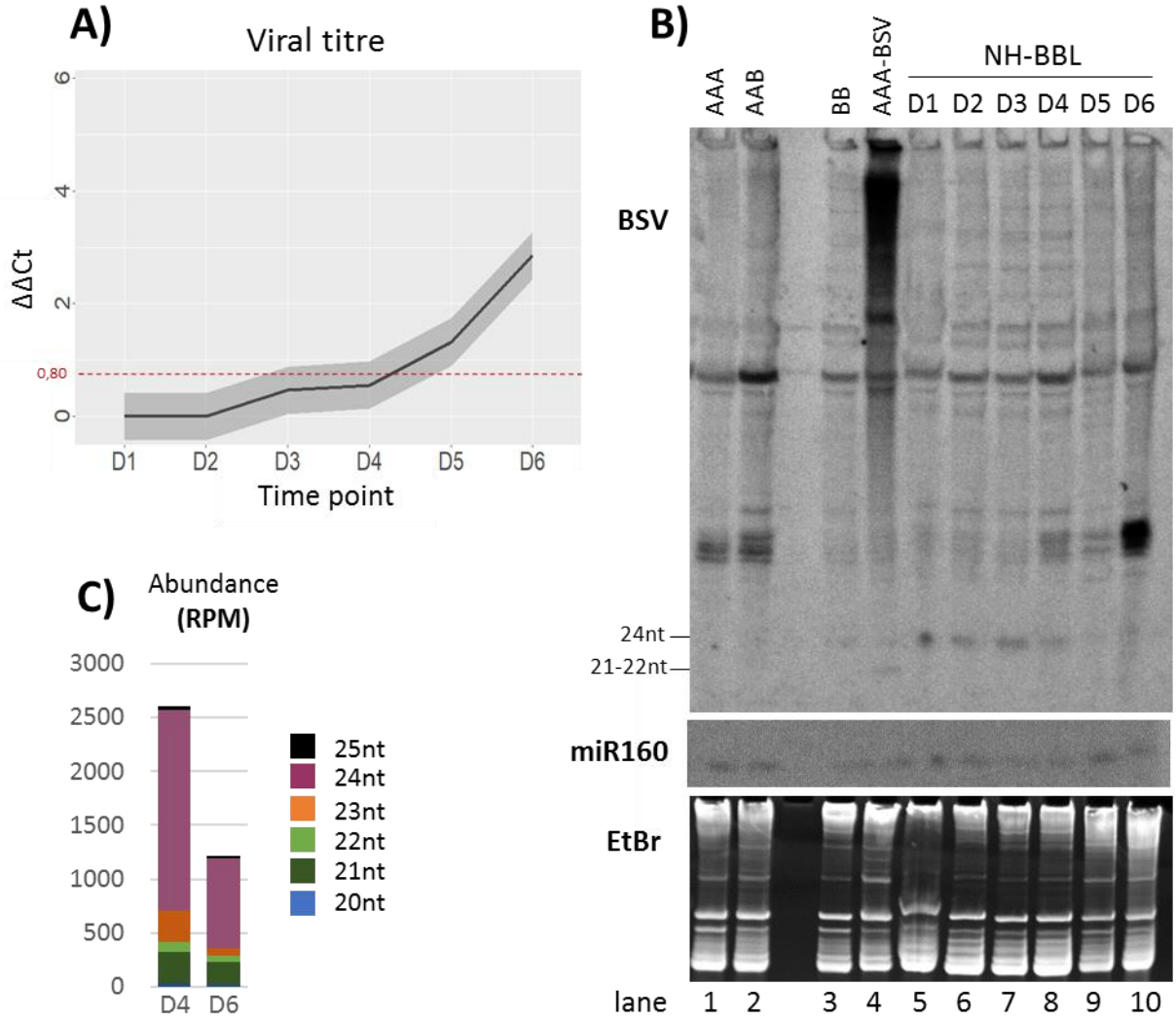



**Figure 5: Viral titre and siRNAs profiles over time course of BSOLV-infection in the mother plant of the native AAB hybrid, cultivar "Bois Blanc", NH-BBL. A)** Viral titre (indicated with the ΔΔCt value) was measured by qPCR on total DNA extracted from the same leaves samples and at the same time points (D1-D8). Mean ΔΔCt values are surrounded by the variation zone, and red line indicates ΔΔCt threshold under which serological tool is needed to determine the viral status. **B)** Total RNA were extracted from leaves sampled at eight time point (D1 to D8, lanes 3-10), separated on 15% polyacrylamide gel, transferred onto nylon membrane and hybridized with $P^{32}$-radiolabeled probes specific for BSV-derived siRNAs (top image, positions of 21-22 nt and 24 nt siRNAs are indicated) and endogenous plant miRNA 160 (miR160, middle image). Ethidium bromide (EtBr) staining of the gel is shown as loading control (bottom image). Virus-free BB (lane 3) and BSV-infected AAA (lane 4) plants were used as controls for eBSV- and episomal BSV-derived siRNAs, respectively. Virus-free AAA banana (lane 1) plant was used as negative control. Lane 2 represent another virus-free AAB native hybrid (cv. "Big Ebanga") plant that was IC-PCR negative for episomal virus. **C)** siRNA profile (amount and size class composition) was characterized by Illumina sequencing at time points D4 and D6.

NH-BE-77 plant. Interestingly, we observed higher production of eBSOLV-derived 24-nt siRNAs in NH-NZ than eBSGFV-derived 24-t siRNAs in NH-BE-77, with a number of reads overpassing 1000 at all time points (Fig. S2, A and B, note that RPM scales are different).

**24-nt siRNA decline correlates with the beginning of episomal BSV-infection in NH-BBL**

Quantitative PCR analysis of the NH-BBL plant, sampled on field and then cultivated under tropical greenhouse, showed episomal BSOLV infection gradually increased from D4 up to D6 (Fig. 5, **A**). Small RNA blot hybridization analysis of total RNA from NH-BBL leaf samples collected at six time points (D1 to D6, Fig. 2, **B**) revealed accumulation of predominantly 24-nt viral siRNAs at D1, D2, D3 and D4, whose levels are comparable to (or higher than) those of predominantly 24-nt siRNAs derived from eBSOLV integrants in the PKW plant (Fig 5.**B**, lanes 5-8 vs lane 3, respectively). With the increase in BSOLV viral titres at D5 and D4, the levels of 24-nt viral siRNAs appeared to decline, while 21-nt viral siRNAs became slightly detectable, although staying below the level episomal BSOLV-derived 21-nt siRNAs accumulating in the AAA plant of cv. Cavendish (Fig. 5. **B**, lanes 9-10 vs lane 4, respectively). Illumina sequencing confirmed the decrease in relative abundance of 24-nt viral siRNAs between the time points D4 and D6 (Fig. 5, **C**).

**Comparison of infection downregulation between native and synthetic AAB hybrids**

Same approach (viral titre quantification combined with small RNA sequencing) was used to monitor BSOLV infection and antiviral silencing in the synthetic AAB hybrid SH-15 mother plant and three suckers (Fig. S3).The B-genome of SH harbours the infective eBSOLV-1 allele and the non-infective eBSGFV-9 allele both derived from PKW. Thus, this plant can release only episomal BSOLV. The viral titre in the mother plant and the suckers persisting over two sampling time points (three suckers) was quantified by qPCR at eight time points (D1 to D8, Fig. S3). Only one sucker downregulated the infection between time points D1 and D2 (Fig. S3, sucker "3", in green), suggesting that SH-15 is less prone to recovery from episomal virus infection. Small RNA sequencing was then performed for both the mother plant (MP), undergoing persistent BSOLV infection, and the sucker (S) downregulating the infection at three time points (D1 to D3) including D2 when the sucker completely recovered from the infection and D3 when it was re-infected once again (Fig.6). Notably the complete recovery between D1 and D2 in the sucker coincided with drastic decrease in viral siRNA production, whereas re-infection of the sucker at D3 partially restored viral siRNA levels. In contrast, viral

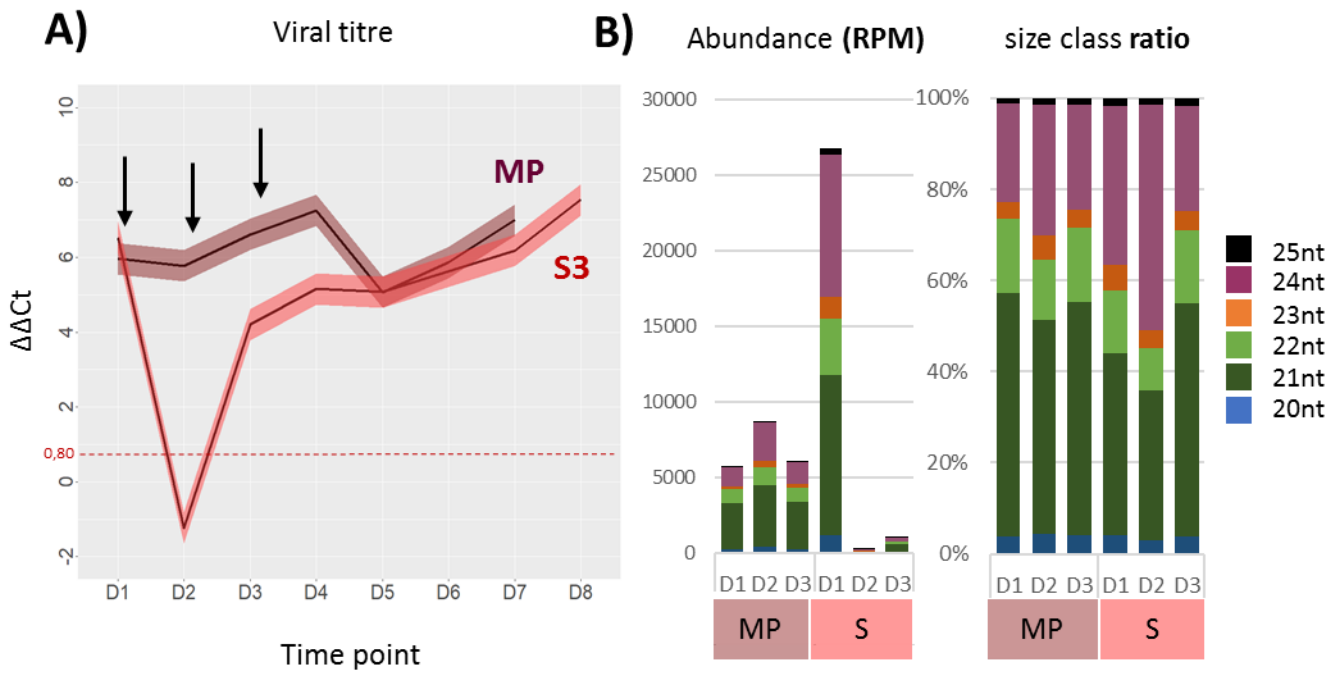



**Figure 6: Viral titre and siRNA profiles over time course of BSOLV-infection in the mother plant (MP) and third sucker (S3) of the synthetic AAB hybrid SH-15. A)** Viral titre (indicated with the ΔΔCt value) was measured in MP (brown-red) and S3 (red) by qPCR on total DNA extracted from leaves samples at eight time points (D1-D8). The leaf samples collected at D1, D2 and D3 (black arrows) were used for sRNA sequencing. Mean ΔΔCt values are surrounded by the variation zone, and red line indicates ΔΔCt threshold under which serological tool is needed to determine the viral status. **B)** Viral siRNA amount, size class profile (colour coded) and ratio of each size class are indicated for both the mother plant (MP) and the sucker (S), at the three sampling time points.

siRNA production was relatively high and comparable at all the three time points in the continuously infected mother plant (Fig. 6, **B**). Size class profile of viral siRNAs in the mother plant was similar to that in the BSOLV-infected NH plants, with predominant accumulation of 21- and 22-nt size classes (>60% in total), followed by 24-nt vsiRNA (>30%). In the sucker, 24-nt viral siRNAs are more abundant than the 21-22-nt siRNAs at the recovery time point D2, although all the size classes accumulate at very low levels (with a total number of RPM being ca ~200 reads) and all viral siRNA are derived from eBSOLV allele. Interestingly, the accumulation level of eBSOLV-derived viral siRNAs in the recovered SH-15 sucker is much lower than that in the recovered NH-BE-77 sucker (Fig. S4), suggesting episomal BSV downregulation might be stronger in native than in synthetic hybrids. This also apply to eBSGFV-derived siRNAs produced by both the mother plant and the sucker of SH-15 which are less abundant (factor >4x) compared to those produced in the mother plant and sucker of the native hybrid cv. "Big Ebanga" NH-BE-77 (Fig. S2 **C** vs. **A**, note that scales are different).

However, more replicates of recovering synthetic and native hybrids are needed to validate this observation. Moreover, the synthetic hybrid analysed here is hosting the non-infective eBSGFV-9 allele. Although both eBSGFV-7 and eBSGFV-9 structures are very close, one cannot exclude slight differences in siRNA biogenesis mechanism between these two alleles. This is under extensive studies (Duroy and Chabannes, in preparation).

**Viral siRNAs are likely associated with distinct AGOs mediating PTGS and TGS**

Analysis of 5'-terminal nucleotide identity of viral siRNAs for both BSV-infected and virus-free samples showed that 21- and 22-nt siRNAs mostly contain 5'U (~40%), and 24-nt siRNAs 5'A or 5'U (30% and 30%, respectively, Fig.7). The 5'-nucleotide profiles were similar for both eBSOLV- and eBSGFV-derived siRNAs for infected AAB plants. When regarding virus-infected samples, 24-nt siRNAs mostly contained 5'A, while 21- and 22-nt siRNA either predominantly 5'U, or 5'C and 5'U at equal ratios (in BSGFV-infected native AAB hybrid for instance). Taken together, multiple AGOs appear to be associated with viral siRNAs to mediate TGS and PTGS targeting both episomal virus and eBSV integrants.

**siRNA hotspots differ between infected AAB and AAA plants**

Global comparison of viral siRNA maps revealed differences in viral genome coverage between virus-free and BSV-infected AAB hybrids (Figure S4 and S5). While viral siRNAs do not entirely cover the reference genome in virus-free samples (for both BSGFV and BSOLV), the coverage is complete in infected samples. Moreover, and especially for BSGFV-derived

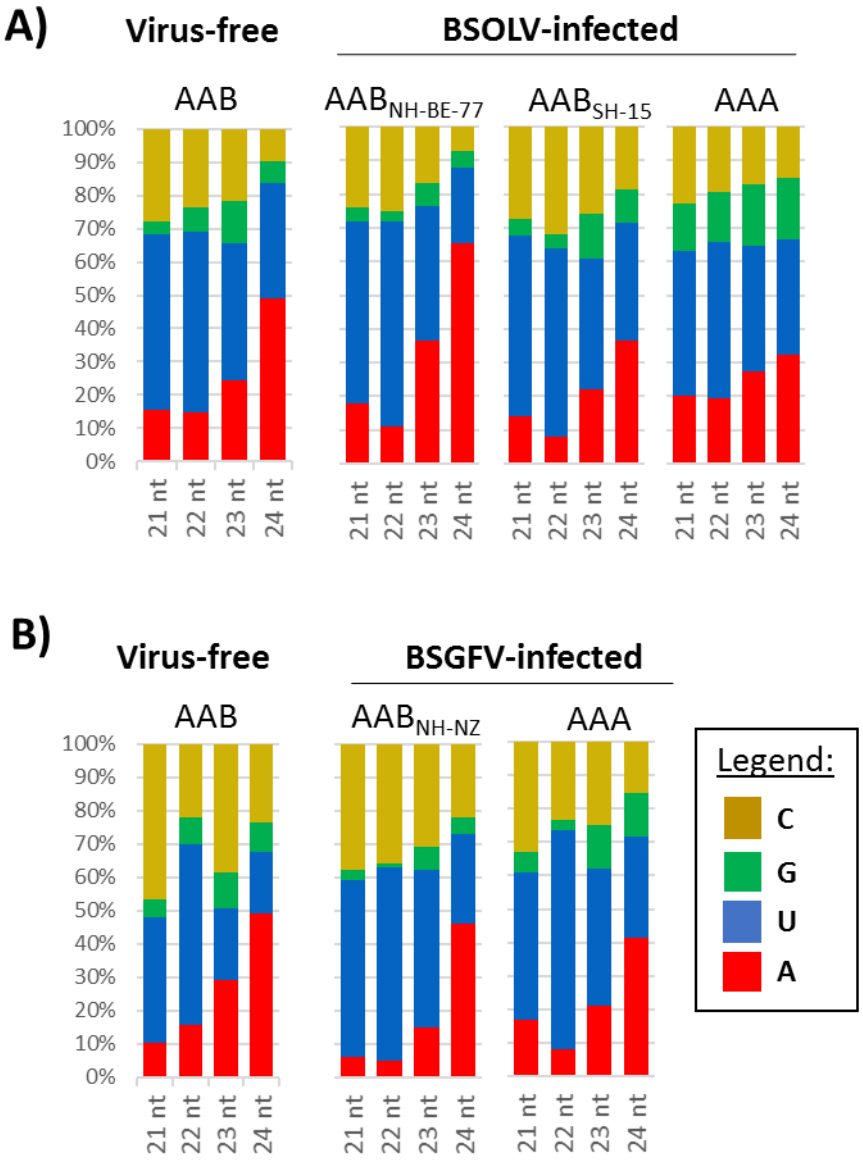



**Figure 7: 5'-terminal nucleotide composition of BSOLV and BSGFV-derived siRNAs in virus-free vs. infected banana plants. A)** BSOLV-siRNA and **B)** BSGFV-siRNA. 5'-terminal cytosine (C), guanine (G), uridine (U) or adenosine (A) are color coded (see Legend) and their frequencies are given for each size class. AAB: virus-free native AAB hybrid (NH-BE-1 and -25), AAB$_{SH-15}$: BSOLV-infected synthetic AAB hybrid SH-15 (mother plant at time points D1, D2 and D3); AAB$_{NH-BE-77}$: BSOLV-infected native AAB hybrid (mother plant at time points D2, D3 and D4'); AAB$_{NH-NZ}$: BSGFV-infected native AAB hybrid NH-NZ (at time point D4); AAA: BSV-infected AAA plant cv. Cavendish.

siRNAs, genomic regions of siRNA production clearly differ between virus-free and BSGFV-infected AAB hybrid, with the siRNA hotspot regions of the later resembling those of the BSGFV-infected AAA control (Figure S5). Note that the genome regions at which many viral siRNAs map (>30 reads in virus-free AAB plant; >300 reads in BSV-infected AAB and AAA plants) were considered as siRNA hotspots. Hotspots of vsiRNA production were analysed in depth, in virus-free and BSV-infected native hybrid and AAA banana plants. Over 90 siRNA hotspots were found in BSOLV-infected AAB hybrid, 87 of which did not appear to be hotspots in BSOLV-infected AAA banana. Instead, three of these 87 hotspot regions were also found to be hotspots in virus-free AAB. Inversely, among 229 hotspots identified in BSOLV-infected AAA, only seven were common to BSOLV-infected AAB. These different hotspots position according to the infected genome suggest different origin of biogenesis of siRNA in BSOLV-infected AAB hybrid compared to BSOLV-infected AAA. Similar observations were made for BSGFV. In BSGFV-infected AAB hybrid, 44 siRNA hotspots were identified, among which 32 were not found in BSGFV-infected AAA. Seven of these 32 hotspots are also found to be hotspots in virus-free AAB. Inversely, 152 siRNA hotspots were identified in BSGFV-infected AAA, with only two of them also found in virus-free and BSGFV-infected AAB hybrids. Thus, for both BSOLV and BSGFV, biogenesis of viral siRNAs appears to differ between AAB and AAA banana, with AAB hybrids accumulating eBSV-derived siRNAs in addition to episomal virus derived siRNAs. This may contribute to downregulation of episomal virus infection.

## Discussion

### Abundance of 24-nt siRNAs associated with TGS might serve as a marker of efficient downregulation of eBSV-derived episomal infections

Detection of 24-nt viral siRNAs in virus-free bananas containing the B genome with infective eBSVs indicate that TGS is likely involved in transcriptional downregulation of these eBSVs to maintain episomal virus-free phenotype of native AAB hybrids. These eBSV-derived siRNA in virus-free AAB hybrids are produced almost exclusively from direct and inverted repeats of the eBSV integration loci, with direct repeats being hotspots in NH while inverted repeats being hotspots in SH plants sequences (Ricciuti and Pooggin, 2019, in preparation). This is constitent with different biogenesis pathways between TGS and PTGS regulation, and according to the infectious status of the hybrid host.

Transcriptional downregulation of eBSVs is expected to act through DNA methylation. Indeed, cytosine methylation at both symmetric and asymmetric sites at eBSV integration loci was found in the seedy diploid BB PKW plants, which is resistant to BSV infection; althought DNA cytosine methylation was not restricted to the repeat regions and was also found in non-repetitive viral sequences (Duroy, 2012; Chabannes and Duroy, 2019, in preparation). DNA cytosine methylation of the eBSV loci may be reduced in AAB hybrids compare to wild BB progenitors, likely leading to reduced transcription of eBSV sequences by Pol IV that transcribes methylated DNA and thereby generates substrates for RDR2 producing dsRNA precursors of 24-nt siRNAs, as it has been established in *Arabidopsis thaliana* (Borges and Martienssen 2015). Further characterization of eBSV methylation status in virus-free AAB hybrids will help to validate this hypothesis and better understand changes in TGS mechanisms during interspecific crosses. Importantly, TGS in AAB hybrids is not sufficient to ensure strict resistance to episomal BSV infections, as sporadic infections are regularly reported (as those described in our study). Interestingly, we observed that the production of 24-nt viral siRNAs decreases during the onset of episomal virus in the native hybrid NH-BBL of cv. "Bois Blanc", which was validated by both sRNA sequencing and blot hybridization analysis. Virus-free status of the plant was instead associated with high levels of 24-nt vsiRNAs derived from eBSVs, further supporting the role of 24-nt viral siRNA in TGS-mediated down regulation of episomal virus release and replication in virus-free AAB hybrids.

**Both TGS and PTGS contribute to down regulation of eBSV-derived infection**

We demonstrated for the first time by combining viral siRNA profiling with viral titre monitoring across time changes in both abundance and size class composition of viral sRNAs when AAB hybrid plants recover from BSV infection. No difference of mechanism was observed between native and synthetic AAB hybrids, since viral siRNA production decreases during downregulation of episomal BSOLV infection in both cases. The same regulation is recorded for both BSOLV and BSGFV infection originating from infectious eBSV. This is consistent with the distinct biogenesis of viral siRNAs from episomal BSV and eBSV integrant. When virus replicates in the host cell, episomal viral DNA copy number is expected to be high, leading to a large amount of viral transcripts, eventually leading to the production of abundant 21-, 22- and 24-nt viral siRNAs, as has previously being reported for AAA banana plants persistently infected with BSV (Rajeswaran et al. 2014). The biogenesis of viral siRNAs from episomal DNA viruses likely involves sense and antisense transcription of viral DNA in the nucleus or the action of host RDRs, both producing dsRNA precursors of siRNAs (Pooggin, 2018). On the opposite, eBSV integrations are expected to be transcriptionally downregulated and methylated, leading to fewer viral transcripts and then fewer dsRNA precursors for eBSV-derived siRNA as observed for PKW (Duroy, 2012, PhD thesis; Duroy et al., in preparation). Since eBSV loci are methylated and transcribed by Pol IV as speculated above, eBSV-derived 24-nt siRNAs associated with TGS are expected to be more abundant than 21-22 nts siRNAs, while BSV-derived siRNAs produced when episomal BSV evade DNA methylation are expected to have higher proportion of 21- and 22-nt size classes associated with PTGS. This is consistent with our findings reported here.

Indeed, size class composition shifts towards 24-nt size class during infection downregulation in both native AAB hybrids NH-BE-77 and NH-NZ, and to a lesser extent in the synthetic AAB hybrid SH-15. 21- and 22-nt viral siRNAs were predominant during BSGFV and BSOLV infection in AAB hybrids, although 24-nt siRNAs were relatively more abundant in the case of BSOLV infections, which is consistent with previous observation for BSGFV- and BSOLV-infected AAA plants (Rajeswaran et al., 2014). However, the size class profile shifted from the mixture of 21-, 22- and 24-nt siRNAs towards mainly 24-nt siRNAs derived from eBSVs when AAB hybrids downregulated BSV infections. Comparisons of viral titres and viral siRNA profiles across infection downregulation indicate a reversion from dominant PTGS to mainly TGS upon infection downregulation in AAB hybrids. We further propose that, under optimal conditions in native hybrids and like in the seedy PKW (BB), eBSV-derived 24-nt siRNA

mediate TGS and DNA methylation at eBSV loci, which protects from episomal infections. Upon stresses having a slackening methylation impact on plant genome, the infective eBSV loci in native and synthetic hybrids are reactivated, releasing episomal viruses through recombination, both 24-nt and 21-, 22-nt siRNA may act synergistically to downregulate episomal virus multiplication at both TGS and PTGS levels. These mechanisms are more potent in native AAB hybrids, compared to synthetic hybrids, owing to longer coevolution naturally selecting for eBSV loci with higher levels of 24-nt siRNAs produced. Such siRNA production protect the selected AAB hybrids not only from the release of episomal virus from the B genome but also from horizontal BSV infections transmitted by mealybug vectors, making native AAB hybrids less susceptible to BSV infection than AAA plants. Indeed, no epidemic was reported so far on plantains and other native AAB hybrids (Iskra-Caruana et al., 2010).

**Viral siRNA biogenesis may differ depending on the plant genotype**

***Different 5'-terminal nucleotide***

AGO protein affinity to specific small RNAs relies on both size and 5'-terminal nucleotide and some other factors (Mi et al., 2008 reviewed in Fang and Qi, 2016). AGO functions were extensively studied in *Arabidopsis thaliana* which serves as a model for studying the plant antiviral silencing pathways (Carbonell and Carrington, 2015; Pooggin, 2018). In *A. thaliana*, heterochromatin-derived 24-nt siRNAs (hetsiRNA) with 5'-terminal A (5'A) are preferentially loaded by AGO4, which guides RISC complex towards cognate DNA to direct cytosine methylation (Mi et al., 2008; reviewed in Fang and Qi, 2016). This is consistent with our findings that 24-nt viral siRNAs have predominantly 5'A. In virus-free samples, these 24-nt viral siRNA are derived from eBSV loci, which are likely methylated and associated with transcriptionally silenced heterochromatin, thus representing typical hetsiRNAs. In BSOLV- and BSGFV-infected AAB hybrids, 24-nt viral siRNAs are derived from both eBSV and episomal viral DNA, as this is expected for DNA viruses having EVE counterparts integrated in the host genome (Pooggin, 2018). Interestingly, 24-nt viral siRNAs contain predominantly 5'A in BSOLV-infected AAB native hybrid NH-BE-77, but not in BSOLV-infected synthetic hybrid SH-15 or AAA plants which have higher proportions of other 5'-terminal nucleotides. This is not the case for BSGFV-infected plants where 24-nt viral siRNAs have similar profiles for eBSGFV and episomal virus. One can suggest that infected native hybrids keep on producing abundant eBSOLV-derived 24-nt viral siRNA upon infection while most of 24-nt viral siRNAs produced in infected synthetic AAB hybrid originate from the episomal virus, as

it is the case for BSV-infected AAA plants. 21- and 22-nt viral siRNAs with 5'C, 5'U and 5'A at their 5' ends are likely incorporated in AGO5, AGO1 and AGO2, as it was shown in *A. thaliana*, and guide the resulting RISC complexes towards viral transcripts to direct PTGS (Mi et al., 2008; Carbonell and Carrington 2015).

Overall, our analysis of both 5'-terminal nucleotide and size class profiles supports the hypothesis that 24-nt viral siRNAs are associated with TGS regulation when AAB plants are virus-free, whereas additional production of 21- and 22-nt viral siRNA associated with PTGS becomes predominant when AAB plants undergo infection. Comparison of size class and 5'nucleotide profiles between BSOLV-infected native AAB hybrids vs BSOLV-infected synthetic AAB hybrids or AAA plants further suggests that downregulation of infection in the synthetic hybrid differs from that in the native hybrids.

***Distinct siRNA hotspots***

Hotspots of viral siRNA production during BSV-infection were found to be at different positions in AAB and AAA plants. Interestingly, a few hotspots were common between virus-free and infected AAB plant. This supports the hypothesis that viral siRNAs directing TGS and DNA methylation of eBSVs are produced when the plant is virus-free and then are enriched with viral siRNAs directing PTGS of episomal virus, strengthening antiviral defences in AAB hybrids compared to AAA banana. Moreover, BSV infection in AAB hybrids might upregulate eBSV transcription, leading to production of extra siRNAs from eBSV loci, further strengthening antiviral defences. As transcripts derived from eBSVs may contain inverted repeats, or eBSV may be transcribed in sense and antisense orientation, they may lead to the production of siRNA of different sizes including 21- and 22-nt class as have been proposed for EVEs (Pooggin, 2018).

**eBSV belong to endogenous viral elements, previously reported to produce siRNAs**

An increasing number of endogenous viral elements (EVEs) are found in the plant genomes, and are thought to belong to an old, generic and ongoing evolution mechanism (Chiba et al., 2011; Diop et al., 2018; Mushegian and Elena, 2015). Although only few of them are infective (as eBSV in AAB banana hybrids, ePVCV in *Petunia hybrida* and eTVCV in *Nicotiana edwardsonii*, Chabannes et al., 2013; Gayral et al., 2008; Lockhart et al., 2000; Ndowora et al., 1999; Richert-Poggeler, 2003), EVEs are reported as sources for viral siRNA production in many host plants (reviewed in Pooggin 2018). For instance, EVE-derived siRNA were detected in Eucalyptus (from EgEVE1, Marcon et al., 2017), in *Liliaceae* family plants (mainly 24-nt

siRNA from FriEPRV, Becher et al., 2014) or in soybean (mainly 22-nt vsiRNA from CMV integrations, da Fonseca et al., 2016). In tomato, non-infective EVEs (LycEPRV) were associated with 21- and 22-nt siRNA production in healthy plant, and this production appeared to increases upon infection with heterologous RNA virus, thus suggesting a role of these EVEs for antiviral defences (Staginnus et al., 2007). This supports the hypothesis that eBSV-derived siRNAs in AAB banana hybrids strengthen antiviral defences upon infection of their host. Interestingly, infectious ePVCV copies in *P. hybrida* were reported as methylated and slightly transcribed (Noreen et al., 2007; Richert-Poggeler, 2003; Staginnus and Richert-Pöggeler, 2006). This supports the hypothesis of active transcription of eBSVs in banana AAB hybrids reported in this study, in our case leading to the production of viral siRNA of different sizes.

## Conclusion:

In this study, we compared viral titre and siRNA profiles across time, during episomal banana streak virus infection and recovery in banana AAB hybrids that host eBSV integrations. We show that predominantly 24-nt siRNAs usually associated with TGS and DNA methylation are produced from eBSV loci in episomal virus-free AAB hybrids. Upon infection in AAB hybrids, both abundance and size class profile of viral siRNAs changes towards predominantly 21- and 22-nt siRNAs, derived from the episomal BSV genome and usually associated with PTGS. Analysis of 5'-terminal nucleotide and hotspot profiles suggests that the production of eBSV-derived siRNA also alters upon infection, possibly contributing to downregulation of episomal virus multiplication. Such a crosstalk between PTGS and TGS regulation when AAB hybrids downregulate infections indicates a reversible mechanism depending on and/or resulting from episomal virus levels in AAB banana plants. Such balanced regulation likely prevents from banana streak disease epidemics in native AAB hybrids so far. In contrast, we propose weaker BSV downregulation in synthetic AAB hybrids compared to native AAB hybrids, based on our analysis of viral siRNA abundance and size class, 5'terminal nucleotide and hotspot profiles. Further experiments are required to validate these hypotheses and conclude on the relative downregulation efficiency between native and synthetic AAB banana hybrids. This is of special importance for banana breeding programs to estimate the epidemic risk related to BSV infections for upcoming intensification of cultivation of interspecific AAB and AAAB hybrids in Africa and elsewhere.

## Acknowledgments

PhD grant (E. Ricciuti) was funded by ANSES and CIRAD (50/50%). We thank Vitropic for providing plants used in this experiment. We thank R. Rajeswaran for helping with RNA extraction and blot hybridization analysis of viral siRNAs. We thank S. Ravel for handling bioinformatics analysis.

## References


Aiewsakun, P., and Katzourakis, A. (2015). Endogenous viruses: Connecting recent and ancient viral evolution. Virology *479–480*, 26–37.

Becher, H., Ma, L., Kelly, L.J., Kovarik, A., Leitch, I.J., and Leitch, A.R. (2014). Endogenous pararetrovirus sequences associated with 24 nt small RNAs at the centromeres of *Fritillaria imperialis* L. (Liliaceae), a species with a giant genome. Plant J. *80*, 823–833.

Bhat, A.I., Hohn, T., and Selvarajan, R. (2016). Badnaviruses: The Current Global Scenario. Viruses *8*.

Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.-S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Hohn, T., et al. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. Nucleic Acids Res. *34*, 6233–6246.

Carbonell, A., and Carrington, J.C. (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. Curr. Opin. Plant Biol. *27*, 111–117.

Chabannes, M., and Iskra-Caruana, M.-L. (2013). Endogenous pararetroviruses—a reservoir of virus infection in plants. Curr. Opin. Virol. *3*, 615–620.

Chabannes, M., Baurens, F.-C., Duroy, P.-O., Bocs, S., Vernerey, M.-S., Rodier-Goud, M., Barbe, V., Gayral, P., and Iskra-Caruana, M.-L. (2013). Three Infectious Viral Species Lying in Wait in the Banana Genome. J. Virol. *87*, 8624–8637.

Chen, S., Zheng, H., and Kishima, Y. (2017). Genomic fossils reveal adaptation of non-autonomous pararetroviruses driven by concerted evolution of noncoding regulatory sequences. PLOS Pathog. *13*, e1006413.

Chiba, S., Kondo, H., Tani, A., Saisho, D., Sakamoto, W., Kanematsu, S., and Suzuki, N. (2011). Widespread Endogenization of Genome Sequences of Non-Retroviral RNA Viruses into Plant Genomes. PLoS Pathog. *7*, e1002146.

Côte, F.X., Galzi, S., Folliot, M., Lamagnère, Y., Teycheney, P.-Y., and Iskra-Caruana, M.-L. (2010). Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous Banana streak virus sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. Mol. Plant Pathol. *11*, 137–144.

Dallot, S., Acuña, P., Rivera, C., Ramírez, P., Cõte, F., Lockhart, B.E.L., and 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*, 2179–2190.

Daniells, J., Geering, A., Bryde, N.J., and Thomas, J.E. (2001). The effect of Banana streak virus on the growth and yield of dessert banana in tropical Australia. Ann. Appl. Biol. *139*, 51–60.

Ding, S.-W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell *130*, 413–426.

Diop, S.I., Geering, A.D.W., Alfama-Depauw, F., Loaec, M., Teycheney, P.-Y., and Maumus, F. (2018). Tracheophyte genomes keep track of the deep evolution of the Caulimoviridae. Sci. Rep. *8*.

Duroy, P.-O. (2012). Quels sont les enjeux au cours de l'évolution du bananier (Musa sp.) qui ont conduit au maintien de séquences virales de Banana Streak Virus dans son génome ? thesis. Montpellier 2.

Duroy, P.-O., Perrier, X., Laboureau, N., Jacquemoud-Collet, J.-P., and Iskra-Caruana, M.-L. (2016). How endogenous plant pararetroviruses shed light on Musa evolution. Ann. Bot. *117*, 625–641.

Fang, X., and Qi, Y. (2016). RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. Plant Cell *28*, 272–285.

da Fonseca, G.C., de Oliveira, L.F.V., de Morais, G.L., Abdelnor, R.V., Nepomuceno, A.L., Waterhouse, P.M., Farinelli, L., and Margis, R. (2016). Unusual RNA plant virus integration in the soybean genome leads to the production of small RNAs. Plant Sci. *246*, 62–69.

Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., and Hughes, J. d'A (1997). First Report of Banana Streak Badnavirus in Plantain Landraces in Southern Cameroon, Central Africa. Plant Dis. *81*, 1335.

Gawel, N.J., and Jarret, R.L. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure forMusa andIpomoea. Plant Mol. Biol. Report. *9*, 262–266.

Gayral, P., Noa-Carrazana, J.-C., Lescot, M., Lheureux, F., Lockhart, B.E.L., Matsumoto, T., Piffanelli, P., and Iskra-Caruana, M.-L. (2008). A Single Banana Streak Virus Integration Event in the Banana Genome as the Origin of Infectious Endogenous Pararetrovirus. J. Virol. *82*, 6697–6710.

Gayral, P., Blondin, L., Guidolin, O., Carreel, F., Hippolyte, I., Perrier, X., and Iskra-Caruana, M.-L. (2010). Evolution of endogenous sequences of banana streak virus: what can we learn from banana (Musa sp.) evolution? J. Virol. *84*, 7346–7359.

Geering, A.D.W. (2005). Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. J. Gen. Virol. *86*, 511–520.

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

Gilbert, C., and Feschotte, C. (2018). Horizontal acquisition of transposable elements and viral sequences: patterns and consequences. Curr. Opin. Genet. Dev. *49*, 15–24.

Hohn, T., Richert-Pöggeler, K.R., Staginnus, C., Harper, G., Schwarzacher, T., Teo, C.H., Teycheney, P.-Y., Iskra-Caruana, M.-L., and Hull, R. (2008). Evolution of Integrated Plant Viruses. In Plant Virus Evolution, M.J. Roossinck, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 53–81.

Iskra-Caruana, M.-L., Baurens, F.-C., Gayral, P., and Chabannes, M. (2010). A four-partner plant–virus interaction: enemies can also come from within. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *23*, 1394–1402.

James, A.P., Geijskes, R.J., Dale, J.L., and Harding, R.M. (2011). Development of a Novel Rolling-Circle Amplification Technique to Detect *Banana streak virus* that also Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequences. Plant Dis. *95*, 57–62.

Kubiriba, J., Legg, J., W, T., and E, A. (2001). Vector transmission of Banana streak virus in the screenhouse in Uganda. Ann. Appl. Biol. *139*, 37–43.

Lassoudière, A. (2007). Le bananier et sa culture (Ed. Quae).

Lheureux, F. (2002). Etude des mécanismes génétiques impliqués dans l'expression des séquences EPRVs pathogènes des bananiers au cours des croisements génétiques interspécifiques. thesis. Montpellier, ENSA.

Liu, J.-J., Goh, C.-J., Loh, C.-S., Liu, P., and Pua, E.-C. (1998). A Method for Isolation of Total RNA from Fruit Tissues of Banana. Plant Mol. Biol. Report. *16*, 87–87.

Lockhart, B.E., 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*, 1579–1585.

Marcon, H.S., Costa-Silva, J., Lorenzetti, A.P.R., Marino, C.L., and Domingues, D.S. (2017). Genome-wide analysis of EgEVE_1, a transcriptionally active endogenous viral element associated to small RNAs in Eucalyptus genomes. Genet. Mol. Biol. *40*, 217–225.

Meyer, J.B., Kasdorf, G.G.F., Nel, L.H., and Pietersen, G. (2008). Transmission of Activated-Episomal Banana streak OL (badna)virus (BSOLV) to cv. Williams Banana (Musa sp.) by Three Mealybug Species. Plant Dis. *92*, 1158–1163.

Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al. (2008). Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. Cell *133*, 116–127.

Mushegian, A.R., and Elena, S.F. (2015). Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. Virology *476*, 304–315.

Ndowora, T., Dahal, G., LaFleur, D., Harper, G., Hull, R., Olszewski, N.E., and Lockhart, B. (1999). Evidence That Badnavirus Infection inMusaCan Originate from Integrated Pararetroviral Sequences. Virology *255*, 214–220.

Noreen, F., Akbergenov, R., Hohn, T., and Richert-Pöggeler, K.R. (2007). Distinct expression of endogenous Petunia vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two Petunia hybrida lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production: Epigenomes of endogenous PVCV. Plant J. *50*, 219–229.

Pooggin, M.M. (2018). Small RNA-Omics for Plant Virus Identification, Virome Reconstruction, and Antiviral Defense Characterization. Front. Microbiol. *9*, 2779.

Rajeswaran, R., Seguin, J., Chabannes, M., Duroy, P.-O., Laboureau, N., Farinelli, L., Iskra-Caruana, M.-L., and Pooggin, M.M. (2014). Evasion of Short Interfering RNA-Directed Antiviral Silencing in Musa acuminata Persistently Infected with Six Distinct Banana Streak Pararetroviruses. J. Virol. *88*, 11516–11528.

Richert-Poggeler, K.R. (2003). Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. EMBO J. *22*, 4836–4845.

Seguin, J., Otten, P., Baerlocher, L., Farinelli, L., and Pooggin, M.M. (2014). MISIS: A bioinformatics tool to view and analyze maps of small RNAs derived from viruses and genomic loci generating multiple small RNAs. J. Virol. Methods *195*, 120–122.

Staginnus, C., and Richert-Pöggeler, K.R. (2006). Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. Trends Plant Sci. *11*, 485–491.

Staginnus, C., Gregor, W., Mette, M.F., Teo, C., Borroto-Fernández, E., Machado, M.L., Matzke, M., and Schwarzacher, T. (2007). Endogenous pararetroviral sequences in tomato (Solanum lycopersicum) and related species. BMC Plant Biol. *7*, 24.

Staginnus, C., Iskra-Caruana, M.L., Lockhart, B., Hohn, T., and Richert-Pöggeler, K.R. (2009). Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. Arch. Virol. *154*, 1189–1193.

Turco, S., Golyaev, V., Seguin, J., Gilli, C., Farinelli, L., Boller, T., Schumpp, O., and Pooggin, M.M. (2018). Small RNA-Omics for Virome Reconstruction and Antiviral Defense Characterization in Mixed Infections of Cultivated Solanum Plants. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI *31*, 707–723.

Vuylsteke, D.R., Hughes, J. d'A, and Rajab, K. (1998). Banana Streak Badnavirus and Cucumber Mosaic Cucumovirus in Farmers' Fields in Zanzibar. Plant Dis. *82*, 1403.

## Supplementary data:

| Dataset ID | Sample name | Genome | eBSV genotype | Hybrid nature | Infection |
|---|---|---|---|---|---|
| BPO-64 | AAA-BSOLV | AAA | - | - | BSOLV |
| BPO-61 | AAA-BSGFV | | - | - | BSGFV |
| APVM_40 | AAA (virus-free) | | - | - | - |
| APVM_4 | SH-15, MP, D1 | AAB | eBSGFV-9 eBSOLV-1 | synthetic | BSOLV |
| APVM_27 | SH-15, MP, D2 | | | | BSOLV |
| APVM_28 | SH-15, MP, D3 | | | | BSOLV |
| APVM_29 | SH-15, S3, D1 | | | | BSOLV |
| APVM_30 | SH-15, S3, D2 | | | | - |
| APVM_31 | SH-15, S3, D3 | | | | BSOLV |
| APVM_33 | NH-BE-77, MP, D2 | AAB | eBSGFV-7 eBSOLV-1 | native | BSOLV |
| APVM_34 | NH-BE-77, MP, D3 | | | | BSOLV |
| APVM_17 | NH-BE-77, MP, D4' | | | | BSOLV |
| APVM_35 | NH-BE-77, S, D2 | | | | BSOLV |
| APVM_36 | NH-BE-77, S, D3 | | | | BSOLV |
| APVM_20 | NH-BE-77, S, D4' | | | | - |
| APVM_41 | NH_BBL, D4 | AAB | eBSGFV-7 eBSOLV-1 | native | - |
| APVM_38 | NH_BBL, D6 | | | | BSOLV |
| APVM_10 | NH-NZ, D1 | AAB | eBSGFV-7 eBSOLV-1 | native | BSGFV |
| APVM_11 | NH-NZ, D4 | | | | BSGFV |
| APVM_24 | NH-NZ, D6 | | | | BSGFV |
| APVM_21 | NH-BE-control ($AAB_1$) | AAB | eBSGFV-7 eBSOLV-1 | native | - |
| APVM_37 | NH-BE-control (AAB2) | | | | - |

**Table S1: Datasets names and correspondence with sample ID, genome, eBSV genotype, nature of hybrid and infection status**.

| New genome | length (bp) | Reference sequence | length (bp) | Nucleotide identity (%) | Nb SNP | Region | Indels | Number AA substitution |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **BSOLV SH-15** | 7,388 | **BSOLV NH-BE-77** | 7,388 | 100 | - | **IR** | - | - |
| **BSOLV NH-BE-77** | 7,388 | **NC_003381** | 7,389 | 99,8 | 17 | **IR** | 1-nt **del** | - |
| | | | | | | **ORF3/P3** | - | 6 |
| **BSOLV NH-BE-77** | 7,388 | **KJ013506** | 7,393 | 99,6 | 21 | **IR** | 3-nt, 2x 1-nt **ins** | - |
| | | | | | | **ORF2/P2** | - | 1 |
| | | | | | | **ORF3/P3** | - | 4 |
| **BSGFV NH-NZ** | 7,283 | **NC_007002** | 7,263 | 97,7 | 165 | **IR** | 2x 1-nt **ins** | - |
| | | | | | | **ORF1/P1** | - | 2 |
| | | | | | | **ORF2/P2** | - | 1 |
| | | | | | | **ORF3/P3** | 18-nt **ins** | 25 |
| **BSGFV NH-NZ** | 7,283 | **KJ013507** | 7,263 | 98,2 | 134 | **IR** | 2x 1-nt **ins** | - |
| | | | | | | **ORF1/P1** | - | 1 |
| | | | | | | **ORF2/P2** | - | |
| | | | | | | **ORF3/P3** | 18-nt **ins** | 16 |

**Table S2: SNPs, indels and amino acid (AA) substitutions in the episomal BSVs reconstrucued *de novo,* compared to the reference BSVs available in NCBI GeneBank**. Nucleotide identity (in %), number of single nucleotide polymorphisms (SNP), indels (**ins**: insertion, **del**: deletion) and number of amino acid (AA) substitution are given for each *de novo* reconstructed viral genome. SC: stop codon.

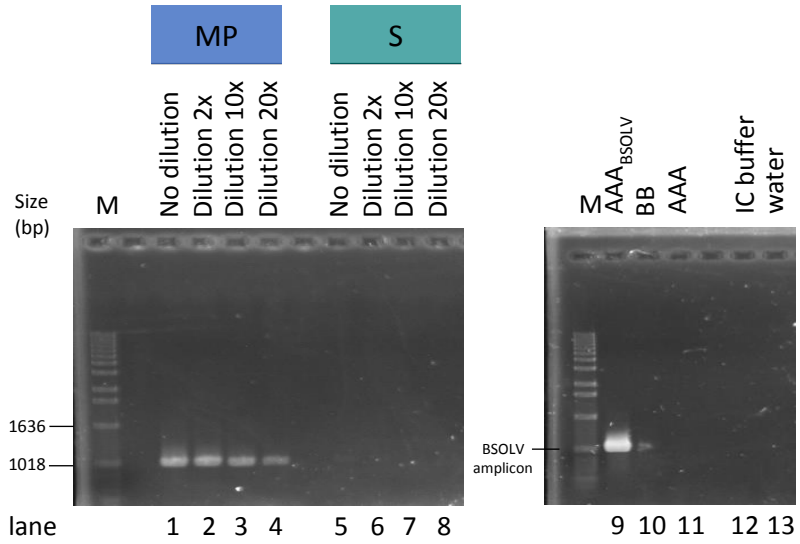



**Figure S1: Immunocapture PCR analysis of encapsidated viral DNA at time pointe D4' in the mother plant (MP) and sucker (S) of the native AAB hybrid cv. Big Ebanga (NH-BE-77).** Semi quantitative immunocapture (IC)-PCR was performed on the mother plant (MP) and the sucker (S) of the native AAB hybrid NH-BE-77, at the time point D4', six weeks after D4, as described in Materials and Methods. MP IC dilution series: lanes 1-4; S IC dilution series: lanes 5-8. IC positive control: BSOLV-infected banana AAA plant (lane 9). IC negative controls: virus-free BB PKW (lane 10), virus-free banana AAA plant (lane 11), IC buffer (lane 12) and water (lane 13).

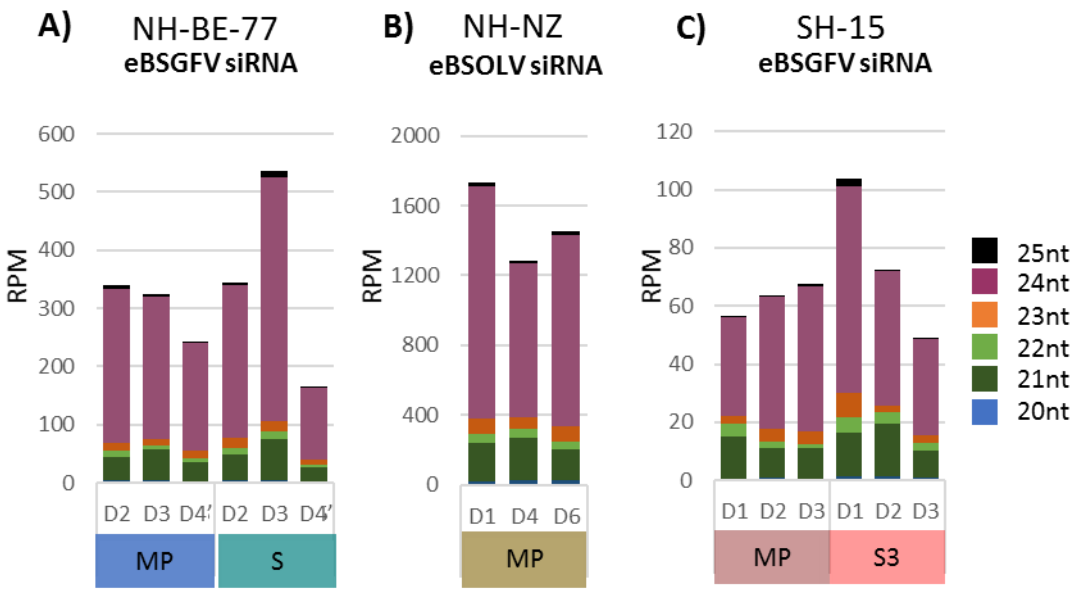



**Figure S2: Abundance and size class composition of viral siRNAs derived from inactive eBSV alleles in episomal BSV-infected AAB plants.** The abundance and size class composition (colour coded) of **A)** eBSGFV-derived siRNAs in BSOLV-infected native hybrid cv. Big Ebanga (NH-BE-77) mother plant (MP) and sucker (S), **B)** eBSOLV-derived siRNA in BSGFV-infected native hybrid cv. Nzorba "NH-NZ", and **C)** eBSGFV-derived siRNA in BSOLV-infected synthetic hybrid (SH-15) mother plant (MP) and sucker (S). Note that viral read number per million (RPM) scales are different.

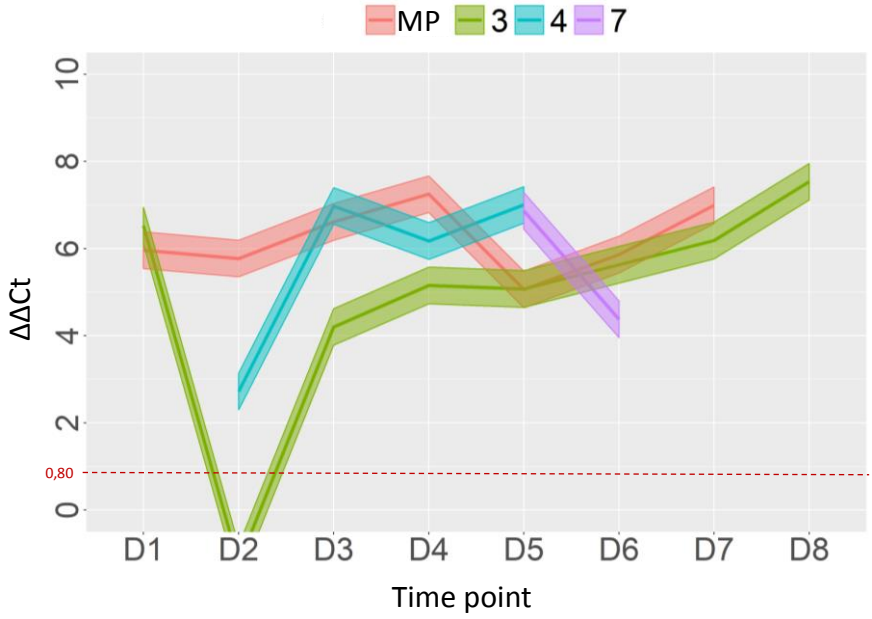



**Figure S3: Viral titre over time course in all suckers of the BSOLV-infected synthetic hybrid "SH-15".** BSOLV viral titre (indicated with ΔΔCt values) mas measured by qPCR on total DNA extracted at eight time points (D1-D8) in mother plant (MP) and three suckers (3, 4 and 7) of the banana corm. Mean ΔΔCt values are surrounded by the variation zone, and red line indicates ΔΔCt threshold under which serological tool is needed to determine the viral status.

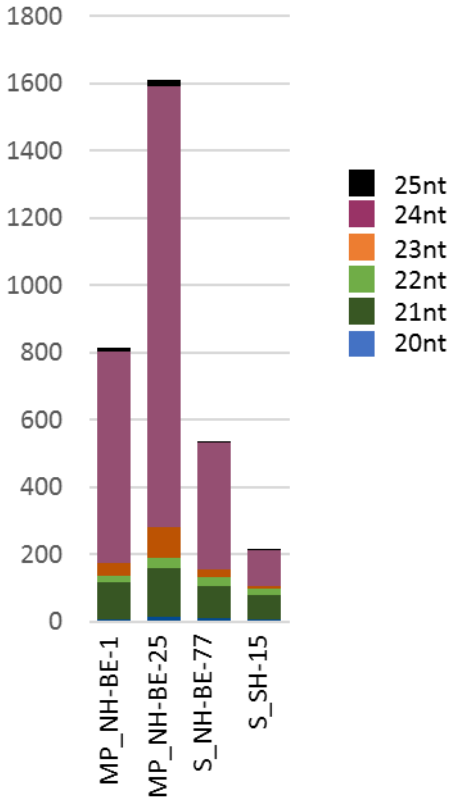



**Figure S4: Abundance and size class composition of eBSOLV-derived siRNA in native and synthetic AAB hybrids recovered from episomal BSOLV infection.** eBSOLV siRNA abundance and size class composition (colour coded) are shown for episomal virus-free native AAB hybrids cv. Big Ebanga mother plants (NH-BE-1 and NH-BE-25), and for the recovered suckers from the native (NH-BE-77) and synthetic (SH-15) AAB hybrids at D4' and D2, respectively (see Figures 3 and 6).

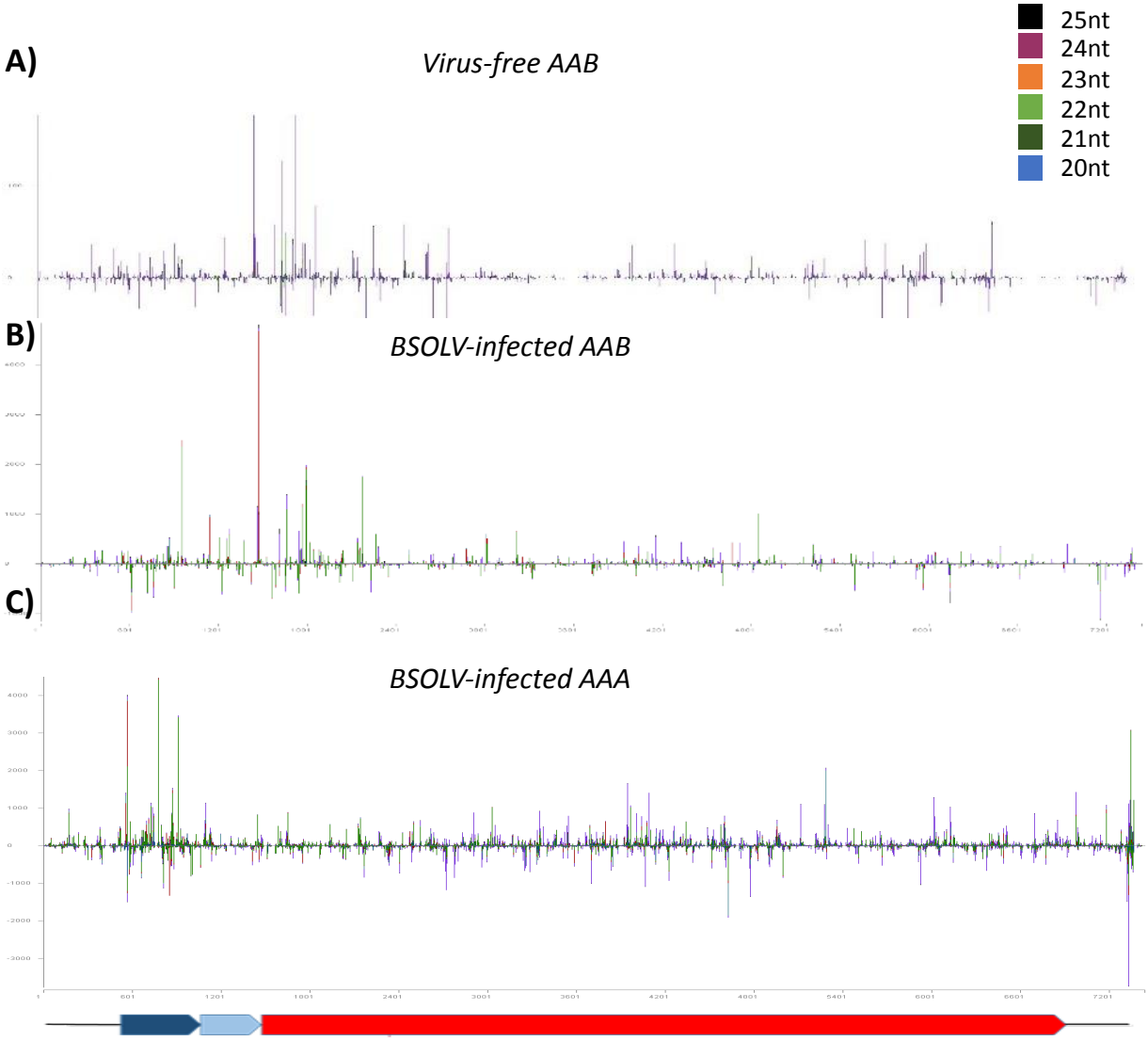



**Figure S4 : Single-nucleotide resolution maps of viral siRNAs**. 20- to 25-nt sRNA from episomal virus-free native AAB hybrid (NH-BE-25) (**A**), BSOLV-infected native AAB hybrid mother plant NH-BE-77 at time point D2 (**B**) and BSOLV-infected AAA plant (**C**) were mapped on the episomal BSOLV reference sequence (indicated under the graphs, ORF1, 2 and 3 are colored in dark blue, light blue and red, respectively) with perfect matches and resulting maps were visualized using MISIS-2 (Seguin et al., 2016). Size-classes of viral 20- to 25-nt sRNA are color coded. Note that scales are different for each dataset.

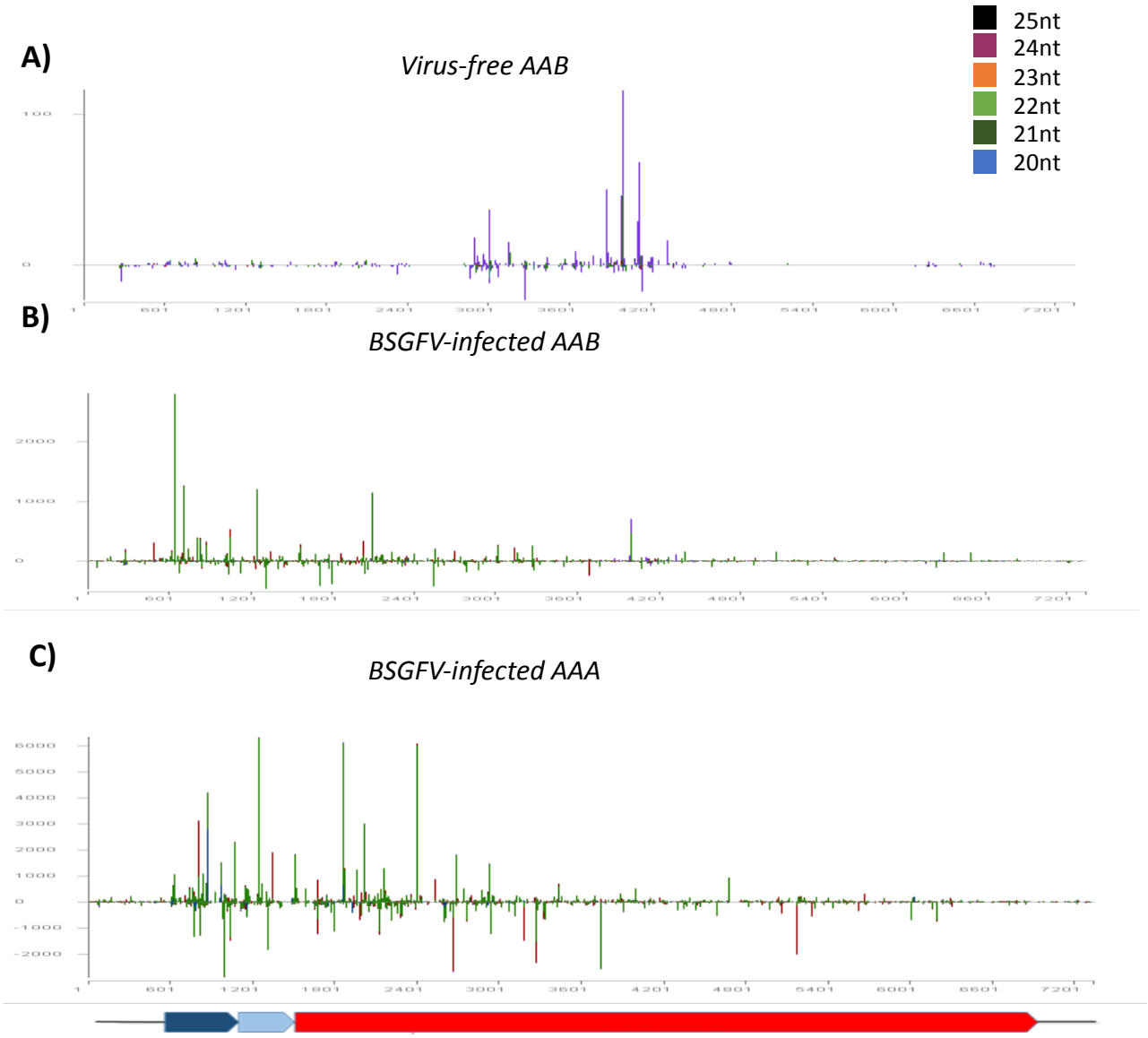



**Figure S5 : Single-nucleotide resolution maps of viral siRNAs**. 20- to 25-nt sRNA from episomal virus-free native AAB hybrid (NH-BE-25) (**A**), BSGFV-infected native AAB hybrid mother plant NH-NZ at time point D4 (**B**) and BSGFV-infected AAA plant (**C**) were mapped on the episomal BSOLV reference sequence (indicated under the graphs, ORF1, 2 and 3 are colored in dark blue, light blue and red, respectively) with perfect matches and resulting maps were visualized using MISIS-2 (Seguin et al., 2016). Size-classes of viral 20- to 25-nt sRNA are color coded. Note that scales are different for each dataset.

**Résumé de l'article : « *How native plantain deals with viral infection derived from endogenous viral sequences of Banana streak virus* »**

La comparaison des profils de petits ARN antiviraux et de la charge virale à différents temps clés de l'infection (augmentation / diminution de la charge virale) nous a permis de mettre en évidence une régulation des infections BSV chez des bananiers hybrides AAB, basée sur **l'interférence par ARN.** En conditions optimales de croissance, la production d'ARN de 24-nt, impliqués dans la régulation transcriptionnelle (**TGS**) des eBSV, permet à l'hôte de maintenir un phénotype sain. Seuls des stress biotiques et abiotiques peuvent affaiblir cette régulation basale, probablement *via* une diminution de la méthylation des eBSV, bien que cela reste à élucider. L'affaiblissement de la régulation basale (TGS) résulte en l'activation des eBSV, déclenchant une infection virale. Chez les hybrides interspécifiques AAB, natif ou synthétique ainsi que chez le cv. Cavendish (AAA), la multiplication du BSV donne lieu à une régulation au niveau post-transcriptionnel (**PTGS**) grâce à la production massive d'ARN de 21-, 22- et 24 nt dirigés contre l'ADN viral épisomal. Lorsque la charge virale diminue, parfois jusqu'au recouvrement complet de l'infection pour les hybrides natifs, les profils de petits ARNs antiviraux indiquent un retour à un mécanisme dominant de régulation TGS, démontrant le caractère réversible de la régulation des eBSV et BSV. Il est difficile de déterminer si ces changements de profils de petits ARN sont la cause des fluctuations de charge virale ou s'ils en résultent. Cependant, les différences observées parmi les régions productrices de ces petits ARN entre hybride AAB et cv. Cavendish AAA infectés ainsi que la production abondante d'ARN de 24 nt (TGS) enrichissant pour certains la régulation PTGS chez les hybrides AAB supportent l'hypothèse d'une régulation médiée par ces siARN. Nous supposons que cette régulation renforcée chez les hybrides interspécifiques est à l'origine des fluctuations de charge virale reportées dans le Chapitre 1. Bien que les profils de siARN antiviraux soient similaires entre hybrides natifs et synthétiques, les différences d'abondance de production observées en séquençage profond pourraient expliquer les différences d'efficacité de régulation reportées dans le Chapitre 1. Ainsi, les régulation basale (TGS) et répondant à une infection (PTGS) chez les hybrides synthétiques semble être moins « active », et menant plus rarement au recouvrement d'une infection. Un modèle général de régulation est proposé dans la Discussion générale de ce manuscrit (Fig. 5.3).

**Résultats annexes : Le génome B des hybrides natifs, cv. « Big Ebanga » est proche du celui du diploïde BB, PKW.**

Dans le cadre de l'étude des profils de siARN antiviraux, nous avons séquencé puis reconstruit *de novo* les génomes BSV infectant les différents bananiers hybrides AAB analysés. Ces plants incluent deux hybrides AAB synthétiques, HS-15 et HS-16, infectés par BSOLV et BSGFV, respectivement ; deux hybrides AAB natifs du sous-groupe plantain et du cv. « Big Ebanga » HN-BE-77 et HN-BE-66, infectés par BSOLV et BSGFV, respectivement ; et un hybride natif du sous-groupe plantain et cv. « Nzorba » HN-NZ, infecté par BSGFV (Tableau 4.1).

Les hybrides HS-16 et HN-BE-66, tous deux infectés par BSGFV, n'ont pas montré de recouvrement d'infection au cours du suivi présenté dans le chapitre 1, et les profils de siARN dans ces plants n'ont pas été caractérisés dans le chapitre 2. Néanmoins, la reconstruction du génome épisomal BSGFV dans ces deux plants permet d'avoir des informations indirectes sur les séquences eBSGFV intégrées dans leur génome. L'organisation des intégrations eBSV et de leur séquence dans le génome B des hybrides synthétiques HS est connue, puisque le génome B est issu du géniteur BB PKW chez lequel les eBSV ont été caractérisées en totalité. En revanche, on dispose de peu d'informations quant à la séquence et organisation des eBSV chez les hybrides natifs du sous-groupe plantain.

Le génotypage des eBSV grâce aux amorces PCR, CAPs et dCAPs, dont certaines ciblent les zones de jonction entre différents fragments des eBSV (Chabannes et al., 2013; Gayral et al., 2010, 2008), a permis d'identifier les allèles eBSGFV-7 et eBSOLV-1 chez les plantains natifs HN-BE et HN-NZ, suggérant une organisation des eBSV proche voire identique de celle caractérisée chez PKW.

La reconstruction *de novo* des génomes BSOLV et BSGFV directement à partir des bananiers infectés apporte des informations complémentaires. Les séquences BSOLV et BSGFV obtenues à partir des hybrides natifs du cv. « Big Ebanga » HN-BE-77 et HN-BE-66, sont extrêmement proches de celles des hybrides artificiels HS-15 et HS-16 respectivement (Tableau 4.2). Cela reflète une forte identité de séquences eBSOLV et eBSGFV entre les hybrides natifs du cv. « Big Ebanga » et les hybrides synthétiques, et donc le diploïde BB, PKW. On propose donc que le géniteur porteur du génome B à l'origine du croisement ancien ayant donné les plantains du cv. « Big Ebanga » est proche de celui du diploïde BB, PKW. Dès lors, les différences observées quant à la dynamique des infections BSV et leur régulation par ARN interférent entre

| ID séquence | espèce BSV | taille (bp) | Type hybride | Plant source | Génotype eBSV | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | *eBSGFV* | *eBSOLV* | *eBSIMV* |
| ALYU_1 | BSOLV | 7388 | synthétique | HS-15, PM | eBSGFV-9 | eBSOLV-**1** | eBSIMV |
| ALYU_2 | BSGFV | 7262 | synthétique | HS-16, PM | eBSGFV-**7** | eBSOLV-2 | eBSIMV |
| ALYU_3 | BSOLV | 7388 | natif | HN-BE-77, PM | eBSGFV-**7** | eBSOLV-**1** | - |
| ALYU_4 | BSGFV | 7262 | natif | HN-BE-66, R2 | eBSGFV-**7** | eBSOLV-**1** | - |
| ALYU_5 | BSGFV | 7283 | natif | HN-NZ | eBSGFV-**7** | eBSOLV-**1** | - |

**Tableau 3.1**: **Origine, génotype et statut infectieux des 5 hybrides utilisés pour la reconstruction de génomes BSV.** Le nom de la séquence, l'espèce BSV séquencée, la taille du génome, la nature de l'hybride et le nom du plant hôte ainsi que le génotype eBSV sont indiqués pour chaque plant. Les allèles infectieux sont eBSGFV-7, eBSOLV-1 et eBSIMV.

| ***Comparaisons de séquences*** | | | |
|---|---|---|---|
| **seq. A** | **seq. B** | **SNPs** | **Substitution AA / ORF** |
| ALYU_1 | ALYU_3 | 0 | - |
| ALYU_2 | ALYU_4 | 2 | 1 / ORF3 |
| ALYU_4 | ALYU_5 | 129 | 1 / ORF1<br>19 / ORF3 |

**Tableau 3.2**: **Comparaison des séquences des génomes BSOLV et BSGFV reconstruits à partir des hybrides AAB natifs (HN) et synthétiques (HS).** Récapitulatif des alignements de séquences indiquant le nombre de nucléotides différents (SNP) et de substitutions d'acide aminé (AA) en résultant, ainsi que l'ORF porteur de la substitution le cas échéant.

les hybrides natifs « Big Ebanga » et synthétiques sont d'autant plus marquantes puisqu'elles ne résultent pas de différences de séquences ni de structure des eBSV. Cela renforce l'hypothèse d'un mécanisme de régulation des eBSV et des infections qui en dérivent commun entre hybrides natifs et synthétiques, plus actif chez les hybrides natifs que synthétiques.

Par ailleurs, le génome BSGFV reconstruit à partir de l'hybride natif cv. « Nzorba » montre une différence de séquence plus importante avec les génomes BSGFV des hybrides synthétiques et natif « Big Ebanga », de 129 nucléotides sur le génome complet (7,26kb) avec 20 SNPs induisant des substitutions d'acide aminé (Tableau 4.2). Le génotypage des eBSV révèle pourtant une organisation proche de celle des eBSV chez PKW. Il est important de noter que cet hybride ayant été prélevé au champ (bananeraies au Cameroun), et diagnostiqué infecté BSGFV dès son sevrage en serre, il peut avoir une infection BSGFV d'origine endogène (activation de l'allèle eBSGFV-7), ou transmise par cochenille lors de sa culture au champ. Si l'infection est d'origine endogène, alors cette différence de séquence du génome épisomal révèle des différences de séquences dans l'intégration eBSGFV et indiquerait que le géniteur porteur du génome B et à l'origine de ce cultivar est plus éloigné de celui des plantains « Big Ebanga » et de PKW. Cela indiquerait également l'existence d'un autre allèle eBSGFV infectieux au même site. Si l'infection est d'origine exogène, alors ce génome épisomal peut être considéré comme un isolat BSGFV, issu d'une population virale épisomale profitant d'un taux de mutation plus élevé que celui contraint par le génome bananier des eBSGFV, comme reporté par Gayral et al. (2010).

## Points clés du Chapitre 2 :

- Les séquences **eBSV** chez les hybrides sains AAB sont la **source d'une production de siARN**, principalement de **24 nt**
- Lors **d'infections BSV**, le mécanisme dominant est le **PTGS** (siARN de 21, 22 et 24 nt)
- La régulation **bascule du PTGS au TGS lors de recouvrements d'infections** BSV
- Le **mécanisme de régulation est commun** aux hybrides AAB **natifs et synthétiques**
- La quantité de **siARN** impliqués dans le **TGS chez les hybrides natifs** est **plus importante** que chez les hybrides synthétiques

# CHAPITRE 3

## Localisation et accessibilité des particules virales BSV aux cochenilles pour leur transmission

# I. Introduction:

Les espèces de Banana streak virus infectant le bananier bénéficient d'un double mode de transmission, lié au mode de culture de leur hôte. Leur transmission est d'une part verticale, grâce à la propagation clonale des bananiers en culture *in vitro*, et *via* la multiplication végétative et l'utilisation de rejets de bananiers. Le BSV existant également sous forme intégrée au génome bananier, sa transmission est héritée lors de croisements génétiques. Leur transmission est d'autre part horizontale, de plante à plante, grâce à la vection médiée par plusieurs espèces de cochenilles (*Planococcus citrii, Planococcus ficus, Dysmicoccus brevipes, Paracoccus burnerae, Pseudococcus comstiki, Saccharicoccus sacchari;* Kubiriba et al., 2006; Lockhart and Olszewski, 1993; Meyer et al., 2008a; Muturi et al., 2013; Su, 1998; Jones, 2018). Plus de 20 espèces appartenant à 14 genres distincts ont été identifiées sur bananiers, et d'autres espèces pourraient également s'avérer vectrices du BSV sans que cela n'ait été reporté à ce jour (Kubiriba and Watson, 2005). C'est notamment le cas de l'espèce *Dysmicoccus neobrevipes*, retrouvée lors de nos prospections dans des zones de culture bananière à La Réunion et en Côte d'Ivoire, notamment sur des parcelles de banane plantain.

Les particules virales épisomales, quelle que soit leur origine (endogène ou exogène), présentent une identité de séquence très élevée pour une même espèce BSV. Nous avons comparé lors de la reconstruction de génomes épisomaux issus d'eBSV (présenté dans le chapitre II) la séquence épisomale BSOLV obtenue chez l'hybride synthétique à la séquence eBSOLV, connue puisqu'issue du parent PKW (diploïde BB). Cet alignement a confirmé une haute identité de séquence (>99,9%) entre séquence eBSV et séquence épisomale BSV qui en est issue. Cette haute identité nucléotidique implique des protéines de capsides identiques, quelle que soit leur origine, et donc transmissibles par les mêmes cochenilles vectrices, comme cela a été démontré à partir de l'hybride synthétiques FHIA-21 (avec *P. citri* et *P. ficus*, Meyer et al., 2008a). Cette transmission horizontale représente ainsi un risque avéré supplémentaire de propagation du BSV, notamment au regard de la proximité géographique des cultures de plantains et de bananiers Cavendish, ces derniers étant plus sensibles aux infections BSV que les bananiers hybrides AAB (Chap. 2). Bien que les cochenilles soient des vecteurs à faible mobilité (Daniells et al., 2001; Kubiriba et al., 2006), leur interaction avec certaines espèces de fourmis augmente leur rayon d'action (Sether et al., 2012). Cependant les observations menées dans les zones de cultures bananières reportent de foyers d'infection restreints avec des contaminations limitées.

L'intensification des cultures de bananiers plantains risque de favoriser l'augmentation de l'inoculum viral BSV disponible pour les cochenilles, notamment au regard des stress abiotiques de plus en plus fréquents (stress hydriques, thermiques, etc) et activateurs des eBSV. L'évaluation du risque épidémiologique lié aux infections BSV d'origine endogène chez les bananiers plantains et pour les cultivars de Cavendish avoisinants oblige à étudier la transmission du virus par cochenille entre ces deux types de bananiers.

Ce chapitre présente des tests préliminaires de transmission du BSOLV par deux espèces de cochenilles, *Planococcus citri* et *Dysmicoccus neobrevipes,* à partir de plantains infectés. Une optimisation de la transmission a ensuite été effectuée avec l'espèce *D. neobrevipes,* qui présente de faibles taux de transmission. Enfin, un test d'acquisition du virus chez *Planococcus citri* à partir de bananiers Cavendish et de plantain infectés a permis de comparer le taux d'acquisition ainsi que la quantité d'inoculum viral acquis entre deux génomes de bananiers infectés (AAA et AAB). La Figure 4.3 indique la chronologie de ces différents essais. Les essais présentés dans la première section ont été mené par l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), qui est associée à cette thèse, dans le Laboratoire de la santé des végétaux installé sur la plateforme de Protection des Plantes de Saint Pierre (île de la Réunion). Les élevages, la mise au point ainsi que les premiers tests de transmission ont été réalisés puis analysés par D. Massé, B. Hostachy et C. Lao-Yip-Sein (ANSES). Le test d'acquisition présenté à la fin de cette section a été réalisé par D. Massé, puis j'ai réalisé les analyses qPCR et les tests statistiques. Ces résultats ont donné lieu à une note scientifique soumise dans la revue *Plant Disease* (« First report of *Dysmicoccus neobrevipes* as vector of Banana streak virus »).

Dans la deuxième section de ce chapitre sont présentées les toutes premières données de localisation histologiques du Banana streak virus dans des bananiers infectés (Cavendish et plantains). Bien que la transmission du BSV ait jusque-là été considérée comme non-circulante semi-persistante, aucune information sur la localisation histologique du BSV et notamment sur sa restriction ou non au phloème n'a été rapportée. Connaître la localisation histologique de particules virales transmissibles par insectes apporte une information importante quant à la quantité d'inoculum viral accessible au vecteur et donc potentiellement transmissible. La mise au point de la méthode d'immunolocalisation, utilisée ici pour localiser le virus dans les tissus de bananiers infectés, a été largement avancée par M-S Vernerey (UMR BGPI). J'ai ensuite finalisé cette mise au point sur bananier puis réalisé les essais d'immunolocalisation, régulièrement secondée par M-S Vernerey.

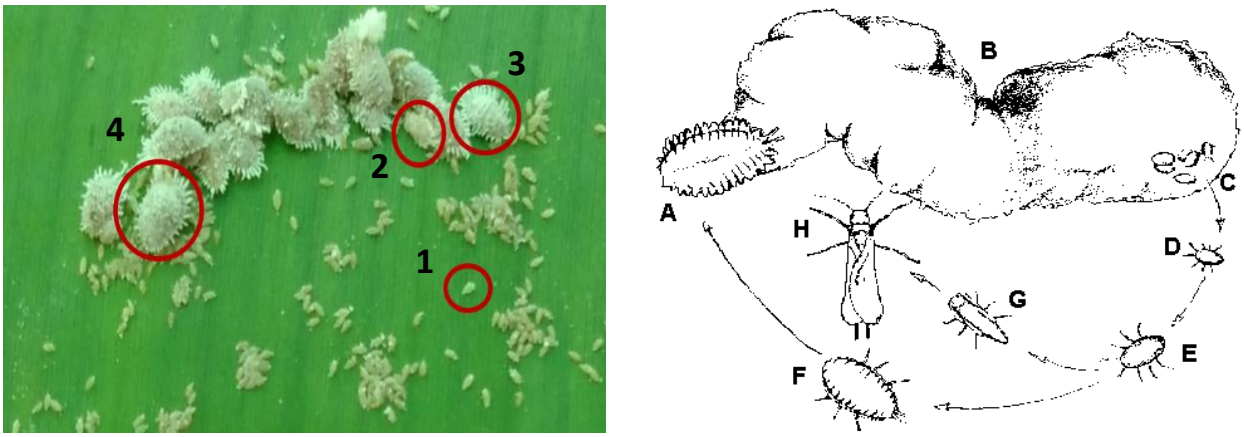



**Figure 4.1 : Estimation visuelle des stades de développement de cochenilles (*Planococcus citri*).** Photographie d'élevage de cochenilles (*P. citri*) sur bananiers avec les différents stades distinguables et estimé visuellement (gauche, encerclés en rouge), et correspondance avec les différents stades de développements décrits par l'UF/IAS (droite). **1**: premier stade larvaire (**D**), **2**: deuxième stade larvaire (**E**), **3**: troisième larvaire femelle (**F**), **4**: femelle adulte (**A**). B et C: œufs, G: pupe; H: adulte mâle.

# II. Matériel et Méthode

## 1) Transmission du BSV par cochenilles

### *a) Matériel végétal et animal*

Les élevages de *Planococcus citri* et de *Dysmicoccus neobrevipes* sont réalisés soit sur des plants de courge butternut (*Cucurbita moschata*), soit sur des bananiers Cavendish (génome AAA) dépourvus de particule virale, et issus de culture *in vitro* (Vitropic). Les cochenilles élevées sur courge butternut sont transférées sur bananier Cavendish plusieurs jours avant le début des essais, afin de les habituer à s'alimenter sur bananier. Les élevages sont réalisés dans des cages en plexiglas hermétiques, à une température de 26°C, un taux d'humidité de 60% et un cycle lumineux de 12h/jour/nuit. La figure 4.1 montre une photographie d'élevage de cochenilles sur bananier, avec une estimation visuelle des différents stades de développement. Les stades L1 et L2 sont préférentiellement sélectionnés pour les tests de transmission et d'acquisition, car rapportés comme étant les plus mobiles (Fargette et al., 2006, Alliaume, 2016, thèse). Les plants utilisés pour l'acquisition de virus sont des bananiers Cavendish (génome AAA) et plantains (génome AAB, cultivar « Big Ebanga ») issus de culture *in vitro* ou du terrain (pour certains plants de Cavendish) et infectés par BSOLV. Les plants sont cultivés en serre, avec une température moyenne de 26°C et un taux d'humidité relatif moyen de 60%. Les infections chez les plantains sont d'origine endogène (par activation des eBSV infectieux présents dans leur génome), celles sur bananiers Cavendish sont soit issues de transmissions par cochenilles (à partir de plantain infectés), soit déjà établies au champ pour les plants issus du terrain.

### *b) Détermination du statut virologique des plants sources et des plants inoculés*

Le statut virologique (absence ou présence de virus, niveau d'infection) des plants infectés et des plants inoculés est réalisé par la méthode officielle d'immuno-capture (IC)-PCR multiplex développées par l'ANSES (référence du protocole : ANSES/LSV MA 044 - Version 2). Le tissu de feuille frais (500mg) est broyé dans 4.5 mL de tampon de broyage (2% w/v PVP, 0.2% w/v ovalbumine, 0.13% w/v $Na_2SO_3$, 0.2% w/v BSA, mélangés dans un tampon phosphate salin enrichi en Tween 20 (PBS-T) à pH 7.4 (1.3 M NaCl, 14 mM $KH_2PO_4$, 47 mM $(Na_2HPO_4)2H_2O$, 26 mM KCl, 0.005x Tween 20) et centrifugé à 6000 *g* pendant 5 min, à 5°C. Le surnageant (25 µL) est transféré dans des tubes ayant préalablement fixés des anticorps polyclonaux anti-BSV (Sediag) dilués à 1:200 dans du tampon carbonate (15 mM $Na_2CO_3$, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9.7)

et incubés pendant 3h à température ambiante. Chaque dépôt est dupliqué. Les tubes sont rincés trois fois avec du tampon PBS et trois fois avec de l'eau distillée. La PCR multiplex est réalisée dans les tubes avec un mélange d'amorces spécifiques pour cinq espèces BSV incluant BSOLV (concentration finale de 0.4 µM) ainsi que des amorces microsatellites (0.8 µM), pour amplifier d'éventuels ADN génomiques de bananier contaminant (Geering et al., 2000, 2011; Lagoda et al., 1998). Le mélange PCR inclut 2U de Go Taq G2 Hot start Polymerase (Promega), et du tampon GoTaq 1x (Promega) enrichi avec 0.2 mM de dNTPs et 1.5 mM de $MgCl_2$. Le programme PCR est le suivant : une dénaturation initiale de 2 min à 95°C, puis 30 cycles de i) dénaturation (20 s à 95°C), ii) hybridation (30 s à 60°C) et iii) élongation (1 min à 72°C) ; et une élongation finale de 1 min à 72°C.

#### *c) Tests de transmission*

Des lots de 5 à 30 cochenilles aux stades larvaires L1 et L2 (Fig. 4.1) sont déposés sur l'avant dernière feuille émise du plant source (plantain ou Cavendish) infecté par BSOLV pendant une durée de 3 à 18 jours (temps d'acquisition), puis transférés sur des bananiers Cavendish sains (génome AAA) pour une durée de 1 à 14 jours (temps d'inoculation). Le statut viral des plants inoculés est réalisé par IC-PCR toutes les semaines après l'inoculation, en utilisant soit la feuille où le dépôt de cochenilles a été effectué (avant-dernière feuille émise), soit la dernière feuille émise depuis le test de transmission.

### 2) Test d'acquisition

Quinze cochenilles aux stades L1 ou L2 sont prélevées sur la plante d'élevage puis déposées sur l'avant-dernière feuille du plant source, dans un « clip-cage ». L'usage de « clip-cage » (pince portant une cage maillée dans laquelle les insectes sont enfermés, et que l'on accroche à la feuille) permet de contrôler la zone d'alimentation des cochenilles. Cinq lots sont déposés sur l'avant-dernière feuille émise de chaque plant pour un temps d'acquisition de 3 jours. Après acquisition sur bananier infecté, 10 individus s'étant déplacés sur la feuille, et donc mobiles, sont prélevés pour chaque clip-cage. Les 10 individus de chaque lot sont mélangés, pour avoir cinq lots (réplicas biologiques) par plant. L'ADN total de chaque lot est extrait, grâce au kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), en suivant les instructions du fournisseur.

### *a) PCR quantitative*

#### *i.* Design des amorces qPCR

Les amorces spécifiques *Banana streak virus* sont les mêmes que celles précédemment décrites dans ce manuscrit, et ciblent l'ORF3 du génome viral. Les amorces sont les mêmes pour détecter la charge virale dans les plants sources et dans les lots de cochenilles, avec toutefois des concentrations différentes (0.25 µM pour les qPCR sur ADN bananier, 0.50 µM pour les qPCR sur ADN cochenilles). La quantification relative de la charge virale dans les plants sources repose sur le gène de référence (RPS2) chez *Musa* et les amorces ciblant ce gène sont les mêmes que celles utilisées pour les suivis d'infection (Article 1). La quantification relative de la charge virale dans les lots de cochenilles a été réalisée en utilisant plusieurs amorces dessinées puis testées sur des gènes conservés dans la famille *Pseudococcidae*. Les gènes ribosomaux ITS2 et 28S, ainsi que le gène EF1α (facteur d'élongation) sont des gènes conservés et utilisés comme marqueurs pour suivre l'évolution des *Pseudococcidae* (Malausa et al., 2011). Cinq couples d'amorces ont été dessinés à partir du génome de *Planococcus citri* puis testés en PCR et qPCR sur une gamme de dilution allant de 200 ng à 0.4 ng (10 points de dilution), à une concentration de 0.30 µM. Le gène EF1α est choisi comme gène de référence dans les analyses présentées ici car il a une efficacité proche de 90% (Fig. 4.2) et forme un produit d'amplification unique. Le tableau 4.1 décrit les différentes amorces utilisées dans ce chapitre.

#### *ii.* Design de la PCR quantitative

L'ADN est dosé au spectrophotomètre Nanodrop™ (ThermoFischer), puis amplifié par qPCR en utilisant le kit de détection SYBR Green et le logiciel Light Cycler 480 (Roche). 2 µL d'ADN (30 à 200 ng) sont mélangés dans un volume final de 10 µL contenant le SYBR Green mix à une concentration de 1x et les amorces des gènes cible et référence, aux concentrations indiquées dans le tableau 4.1. Le programme qPCR comprend i) une pré-incubation de 5min à 95°C ; ii) 40 cycles d'amplification composés de 30s à 95°C, 30s à 60°C, et 10s à 72°C ; iii) une étape de fusion de 1min à 95°C puis 30s à 60°C, suivie d'une élévation progressive de la température (2°C/s) jusqu'à 95°C ; et iv) un refroidissement à 18°C. Chaque échantillon d'ADN est répliqué trois fois sur la plaque, pour chacun des couples d'amorces utilisés (un couple pour le gène cible, un couple pour le gène de référence). La reproductibilité de la qPCR a été testée pour chacun des couples d'amorces avec une courbe standard composée de 8 points de dilutions au 1:10 d'ADN contrôle (génome B de bananier pour les amorces BSV et RPS2, génome de cochenille pour les amorces EF1α). Les données d'amplification brutes sont transformées par

| Organisme | Gène référence | Sens | Séquence | Tm (°C) | Taille amplicon (bp) |
|---|---|---|---|---|---|
| *P. citri* | EF1α | F | 5' GTATGGTCGTCACTTTTGCCCC 3' | 62,1 | 110 |
| | | R | 5' CGTTGAAACCGACGTTGTCT 3' | 57,3 | |
| *P. citri + Musa* | BSOLV | F | 5' CAAGAACCACCACTGCTGAA 3' | 58,3 | 141 |
| | | R | 5' GTCGTCCTACAACCCTTCCA 3' | 59 | |
| *Musa* | Musa - RPS2 | F | 5' TAGGGATTCCGACGATTTGTTT 3' | 57,8 | 84 |
| | | R | 5' TAGCGTCATCATTGGCTGGGA 3' | 61,6 | |

**Tableau 4.1 : Amorces utilisées en qPCR pour l'amplification du gène cible** (BSOLV) **et des gènes de références** (EF1α et RPS2) **chez les cochenilles** (*Planococcus citri*) **et les bananiers** (*Musa*)

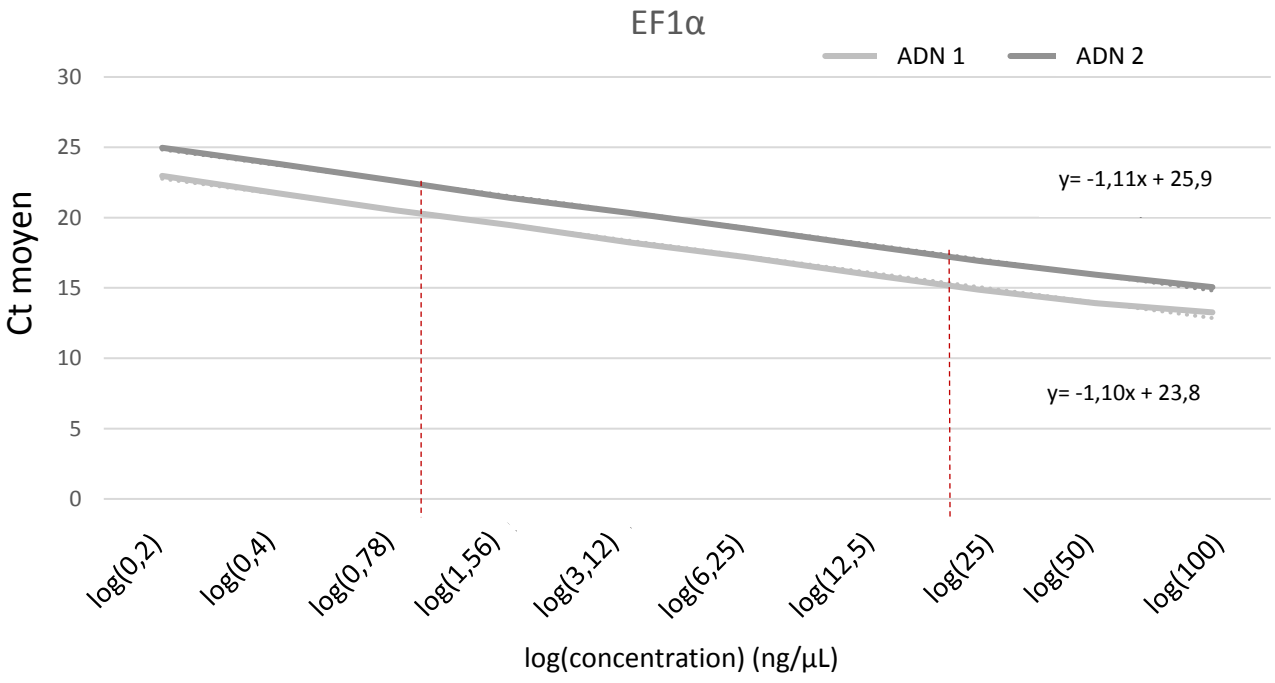



**Figure 4.2 : Evaluation de l'efficacité d'amplification des amorces EF1α pour *Planococcus citri*.** Le cycle seuil de détection (Ct) moyen mesuré par qPCR est indiqué à 10 points de dilutions pour deux ADN témoins de cochenille (ADN 1 et 2). Une courbe standard est calculée pour chaque ADN témoin, avec l'équation de la courbe permettant de calculer l'efficacité d'amplification $E=10^{-1/pente}-1$. Avec une pente de 1.10 en moyenne, l'efficacité d'amplification des amorces EF1α est de 0.87 soit 87%. Les lignes pointillées rouges indiquent la gamme de concentrations entre lesquelles l'efficacité d'amplification est constante : entre 1 et 25ng/µL, ce qui permet de définir une gamme de concentration d'ADN matrice pour laquelle une efficacité de 87% d'amplification est assurée.

le logiciel « LC480 Converter » puis par le logiciel « LinReg » afin de recalculer l'efficacité d'amplification de chaque puit. Un score de qualité est assigné à chaque réaction d'amplification, et utilisé pour écarter les échantillons à faible efficacité d'amplification de l'analyse.

### *b) Analyses des données qPCR*

La charge virale dans les cochenilles est mesurée par quantification relative, grâce à l'usage d'un gène de référence. Pour chaque lot de cochenilles, l'ADN total est amplifié par un couple d'amorce spécifique du BSV (gène cible) et par un couple d'amorce ciblant un gène de normalisation (ici, le gène EF1α). Le cycle seuil (Ct) indique le cycle à partir duquel le nombre d'amplicons résultants de la PCR produit un signal fluorescent détectable. La valeur ΔCt, qui correspond à la différence $Ct_{norm} - Ct_{cible}$, permet de normaliser la quantité d'amplicons BSV détectés par la quantité d'amplicons EF1α, qui reflète la quantité initiale de matrice dans la réaction. Les valeurs de ΔCt permettent de comparer l'amplification de séquences BSV entre plusieurs lots de cochenilles. La quantification de la charge virale dans les bananiers Cavendish est réalisée selon la même méthode, en utilisant le gène de référence RPS2 pour calculer le ΔCt. La quantification de la charge virale dans les bananiers hybrides AAB repose sur la méthode présentée dans l'article 1, et est indiquée par la valeur ΔΔCt, grâce à l'usage d'un calibrateur (hybride AAB sain).

### *c) Analyses statistiques*

Un modèle linéaire mixte est utilisé pour prendre en compte les facteurs connus du test, tels que le plant utilisé (considéré comme facteur aléatoire), l'indice d'infection mesuré par qPCR dans les plants et dans les lots de cochenilles, et le génome (AAA ou AAB). Le modèle utilisé explique 68% de la variation observée. Une analyse de variance (anova) est appliquée au modèle pour identifier les facteurs ayant un effet significatif sur la charge virale mesurée dans la cochenille (ΔCt).

### 3) Immunolocalisation du BSV chez le bananier

#### *a) Matériel végétal :*

L'immunolocalisation des particules de BSV est effectuée sur deux types de bananiers infectés : Cavendish (AAA) et hybride synthétique (AAB). Le bananier du sous-groupe « Cavendish » (cultivar « Williams », génome AAA), a été prélevé en bananeraie et est cultivé en serre depuis un an. Les conditions en serre tropicale « insect–proof » sont une température de 22 à 24°C la nuit, 28° le jour, et un taux d'humidité de 75%. L'hybride AAB est issu d'un croisement artificiel entre les parents Pisang Klutuk Wulung (PKW, diploïde BB) et IDN110 T (tétraploïde AAAA). Il est porteur des allèles infectieux eBSGFV-7 et eBSOLV-1. Il a été cultivé exclusivement en serre, et en absence de cochenilles vectrices. Il est infecté systémiquement par l'espèce BSOLV, suite à l'activation de l'intégration eBSOLV-1, et présente des symptômes de mosaïque en tirets. Un bananier Cavendish sain est également utilisé comme contrôle négatif d'immunomarquage selon le même protocole (décrit ci-dessous). Ce Cavendish est issu de culture *in vitro*, et cultivé en serre. La présence ou absence de particules BSV dans chacun des échantillons est validée par immunocapture-PCR (Harper, 1999).

L'immunolocalisation de particules virales de Banana bunchy top virus (BBTV) est effectuée sur un bananier Cavendish (AAA) issus de CIV et cultivé en serre. Le plant a été inoculé avec le BBTV grâce à des pucerons (*Pentalonia nigronervosa*) porteurs du BBTV et prélevés en République démocratique du Congo, et montre des symptômes de l'infection (nanisme, bouquet foliaire apical).

#### *b) Immunomarquage*

##### *i.* Préparation des échantillons

Les échantillons de plantes (nervure centrale, racine) sont prélevés au scalpel puis trempés dans du PBS-T 1x (tampon phosphate salin enrichi en tween 20 : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM $Na_2HPO_4$, 1.76 mM $KH_2PO_4$). Les tissus sont ensuite fixés dans du PFA (paraformaldéhyde) à 4%, durant une nuit à 4°C. Le lendemain, les tissus sont rincés dans un bain de PBS + glycine 0,1 M, durant 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite stockés dans de l'éthanol à 70° jusqu'à plusieurs semaines. Pour le marquage, les échantillons sont inclus dans de l'agarose 3%, pendant un temps d'incubation supérieur à 4h, à 4°C. Les coupes sont réalisées au vibratome (fréquence 40Hz), avec une épaisseur comprise

entre 70 et 100 µm. Les échantillons sont désolidarisés de l'agarose à l'aide d'un pinceau, puis trempés dans du PBS-T 1x.

### *ii.* Marquage des échantillons

Le marquage est réalisé dans des piluliers en verre, pour éviter l'adhésion des anticorps sur une surface en plastique. Les échantillons sont d'abord saturés avec un 1mL de PBS-T avec 5% de BSA (sérum d'albumine bovin), pendant 1h30 à température ambiante. L'anticorps primaire (1:200) est incubé avec le tissu pendant une nuit à 4°C. Le tissu marqué est rincé le lendemain dans trois bains successifs de PBS-T pendant 10min. L'anticorps secondaire (1:200) couplé au fluorochrome est incubé 1h à 37°C avec le tissu marqué, pour fixer l'anticorps primaire. Le tissu est ensuite rincé dans trois bains successifs de PBS-T pendant 10min. Lors du deuxième rinçage, une goutte de DAPI est ajoutée pour colorer en bleu les noyaux de cellules. Les tissus marqués sont montés sur lames et observés en microscopie à fluorescence.

### *iii.* Anticorps primaires et secondaires :

Les anticorps primaires dirigés contre le Banana streak virus et le contre le Banana bunchy top virus sont des anticorps polyclonaux produits chez le lapin, commercialisés par les sociétés Sediag et Agdia, respectivement. L'anticorps secondaire est dirigé contre le fragment Fc des anticorps produits par le lapin. Il est couplé à un fluorochrome de la gamme Alexa Fluor (Molecular Probes) qui a une longueur d'onde d'émission de 488 nm (vert). Le choix de cette longueur d'onde permet d'éviter une superposition de signal avec la chlorophylle, qui fluoresce naturellement en rouge, ou avec les noyaux marqués au DAPI, un intercalant qui fluoresce en bleu.

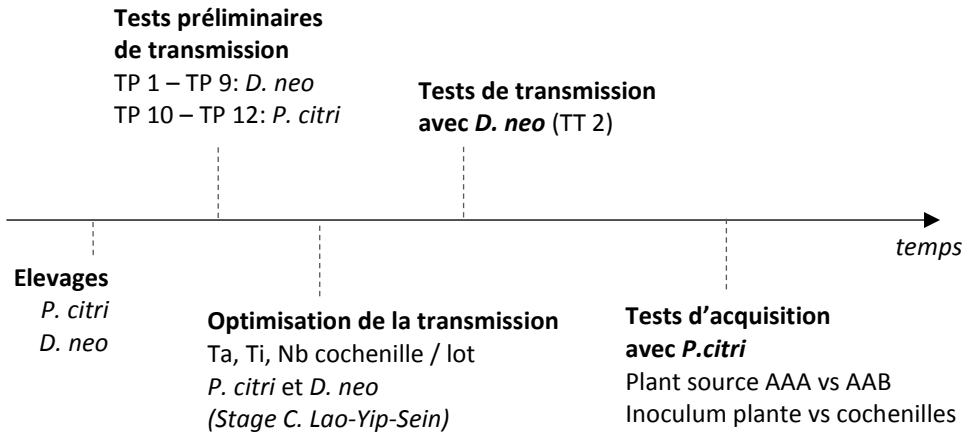



**Figure 4.3 : Chronologie des essais associés à la transmission du BSV par cochenilles**. *P. citri: Planococcus citri. D.neo: Dysmicoccus neobrevipes*. T*a* : temps d'acquisition. T*i* : temps d'inoculation.

| | Date | ID test | T*a* (j) | T*i* (j) | Nb coch. / lot | Taux transmission | T*lat* | Espèce | Taille |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Tests transmission préliminaires | Mai 2017 | TP 1 | 7 | 7 | ~6 | 0/3 | - | *D. neo* | Mix |
| | Juin 2017 | TP 2 | 7 | 7 | 30 | 1/1 | 1,5-2,5 mois | *D. neo* | Mix |
| | Juillet 2017 | TP 3 | 7 | 7 | 10-15 | 0/1 | - | *D. neo* | Mix |
| | Sept. 2017 | TP 4 | 3 | 7 | 10 | 0/2 | - | *D. neo* | Mix |
| | | TP 5 | 4 | 7 | 5 | 0/2 | - | *D. neo* | Mix |
| | | TP 6 | 7 | 7 | ~5 | 0/2 | - | *D. neo* | Mix |
| | | TP 7 | 14 | 2 | 5 et 10 | 0/2 | - | *D. neo* | Mix |
| | | TP 8 | 15 | 2 | ~10 | 0/2 | - | *D. neo* | Mix |
| | | TP 9 | 17 | 1 | 5 | 0/2 | - | *D. neo* | Mix |
| | Dec 2017 | TP 10 | 18 | 7 | 10 | 1/1 | 1,5 mois | *P. citri* | petite |
| | | TP 11 | 18 | 7 | 10 | 1/2 | 3 mois | *P. citri* | moyenne |
| | | TP 12 | 18 | 7 | 10 | 1/2 | 1 mois | *P. citri* | grande |
| | Juin 2018 | TT 2 | 3 | 7 | 15 | 1/15 | 2,5 mois | *D. neo* | Mix |

**Tableau 4.2 : Descriptif des tests de transmission du Banana streak virus par cochenille**. Les différents tests de transmission sont reportés ici avec les modalités de chacun d'entre eux : date de l'essai, temps d'acquisition (T*a,* en jours), temps d'inoculation (T*i,* en jour), le nombre de cochenilles par lot, les taux de transmission (nombre de lot(s) ayant transmis sur nombre de lot(s) total), le temps de latence avant détection du virus chez le plant inoculé avec succès (T*lat,* en jours), l'espèce et la taille des cochenilles de chaque lot (mix : mélange d'individus de taille différente ; petite : stade larvaire 1 ou 2 ; moyenne : stade larvaire 2 ou 3 ; grande : stade adulte femelle). Les tests de transmission avec un lot ayant transmis BSOLV sont indiqués en vert.

# III. Résultats

## 1) Caractérisation de l'acquisition et de la transmission du BSV par cochenilles

### *a) Tests préliminaires de transmission*

Deux élevages de cochenilles ont été mis en place pour les espèces *Planococcus citri*, décrite comme vecteur du BSV (Meyer et al., 2008, Jones, 2018), et *Dysmicoccus neobrevipes*, non décrite comme vecteur du BSV à ce jour. Entre juin et décembre 2017 (Fig. 4.3), douze tests préliminaires de transmissions sont menés à partir des espèces *P. citri* et *D. neobrevipes*, avec une à deux répétitions par modalité (et donc un à deux lots, TP 1 à 12 sur Tableau 4.2). Les modalités variant entre les différents tests concernent le génome (AAA ou AAB) du plant source, l'espèce de cochenille utilisée, le stade de développement des individus et le nombre utilisé pour un lot, le temps d'acquisition et le temps d'inoculation. Neuf essai (TP 1 à 9) sont réalisés avec l'espèce *Dysmicoccus neobrevipes*, retrouvée sur bananier mais jusque-là non reportée comme espèce vectrice du BSV. Un de ces tests est positif (TP 2), avec une transmission du BSV à partir d'un plant de Cavendish infecté. Les faibles nombres de cochenilles utilisés pour la plupart de ces neuf tests peuvent expliquer l'absence de transmission dans les huit autres tests. Trois essais (TP 10 à 12) sont réalisés avec l'espèce *Planococcus citri*, connue pour être vectrice du BSV. Un lot dans chacun des essais parvient à transmettre l'infection à partir du plantain (cv. « Big Ebanga ») infecté.

### *b) Optimisation de la transmission BSV par D. neobrevipes*

Afin d'optimiser la transmission du BSV par l'espèce *D. neobrevipes*, plusieurs temps d'acquisition (T*a*, temps d'alimentation sur le plant source infecté) et d'inoculation (T*i*, temps d'alimentation sur le plant sain à inoculer) sont testés dans le cadre d'un projet de stage (Christophe Lao-Yip-Sein, 2ème année de DUT « génie biologique »). Quatre temps d'acquisition sont comparés : 1, 2, 3 et 7 jours. A l'issue de chaque T*a*, des lots de trois cochenilles sont testés en PCR pour déterminer l'absence ou la présence de particules virales. Au bout d'un T*a* de 3 jours, 11 lots de cochenilles sur 37 ont acquis le virus, tandis qu'aucune particule virale n'est détectée à des T*a* de 1 ou 2 jours. Au bout de 7 jours, seulement 1 lot sur 16 contient encore du BSV (données non montrées). Le T*a* optimal est donc déterminé 3 jours. Suite à cette optimisation, un deuxième test de transmission (TT 2, Tableau 4) est réalisé avec *D. neobrevipes* à partir de plantains (cv. « Big Ebanga ») infectés par BSOLV. Un seul de des 15 lots testés transmet l'infection, détectée 2.5 mois plus tard.

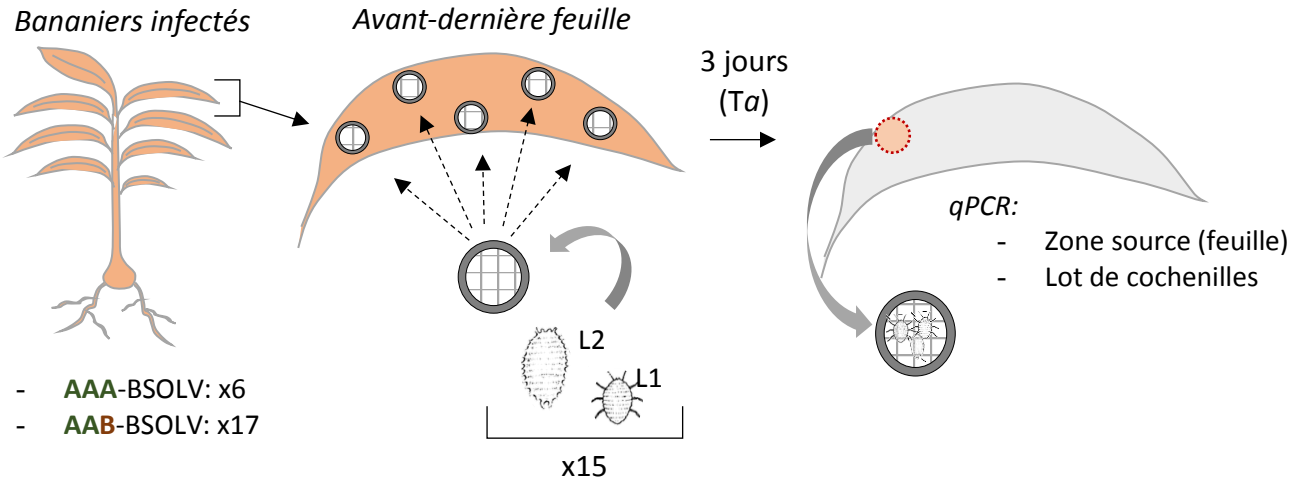



**Figure 4.4 : Schématisation du test d'acquisition réalisé avec *P. citri***. Des lots de 15 cochenilles (P. citri) aux stades larvaires estimés L1 et L2 sont déposés dans des clip-cages sur 5 zones de l'avant-dernière feuille des plants infectés par BSOLV (6 bananiers Cavendish AAA, 17 plantains AAB). Au bout de 3 jours, les lots sont retirés et la charge virale BSOLV est mesurée par qPCR dans chaque lot ainsi que dans les tissus de feuille source où le lot a été déposé.

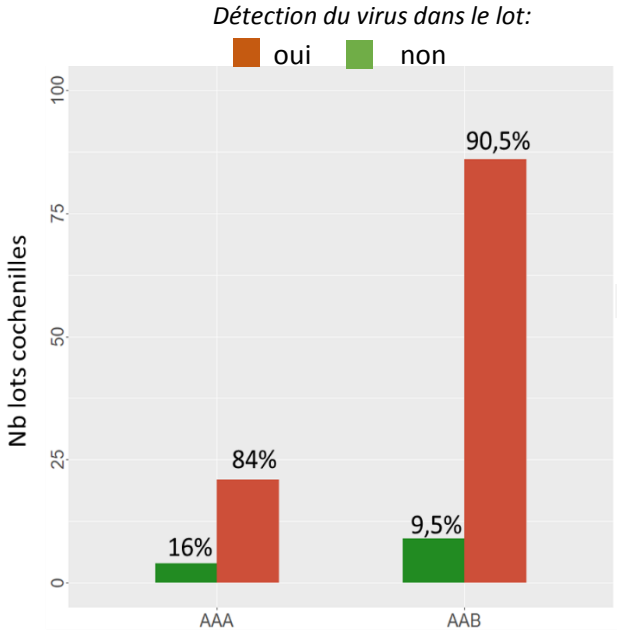



**Figure 4.5 : Taux d'acquisition du virus dans les lots de cochenilles *P. citri* après acquisition sur bananiers Cavendish (AAA) et plantains (AAB) infectés**. Le nombre de lots de cochenilles diagnostiqués négatifs (vert) et positifs (rouge) pour la présence de particules virales après alimentation sur bananier infecté est calculé pour le groupe des bananiers Cavendish (AAA) et plantains (AAB), avec le pourcentage de lots négatifs et positifs.

### *c) Test d'acquisition*

Le taux d'acquisition du virus chez l'espèce *Planococcus citri* est ensuite mesuré lors d'un essai distinct, afin d'évaluer l'inoculum viral acquis par les cochenilles et de compléter les données préliminaires de transmission. Des lots de cochenilles aux stades L1 et L2 sont déposés sur bananiers Cavendish (AAA, 6 plants) et plantains (AAB, cv. « Big Ebanga », 17 plants) infectés par l'espèce BSOLV, dans des clip-cages (Fig. 4.4). Après trois jours d'acquisition, 10 des 15 individus, les plus mobiles, sont prélevés puis mélangés pour en extraire l'ADN total. L'ADN de chaque lot est testé en qPCR pour mesurer la charge virale acquise. L'ADN de cochenilles ne s'étant pas alimentées sur bananier infecté est utilisé comme témoin négatif, et permet de définir un pallier au-dessus duquel l'amplification de séquences virales par qPCR est aspécifique du BSOLV. Des produits d'amplification sont détectés au-delà du 34$^{ème}$ cycle dans les cochenilles saines, et le 34$^{ème}$ cycle est donc défini comme « cycle seuil » de spécificité de l'amplification. La figure 4.5 indique le taux d'acquisition parmi les lots de cochenilles testés pour chacun des deux génotypes. Parmi 30 lots prélevés sur des bananiers Cavendish infectés, 26 sont porteurs de séquences virales, soit 84%. Ce pourcentage s'élève à 90,5% (81 lots sur 90) pour le groupe de plantains.

La charge virale est ensuite mesurée par quantification relative en utilisant les gènes de normalisation EF1α pour l'ADN de cochenille et RPS2 pour l'ADN de plante. La charge virale pour chaque lot de cochenilles est mesurée dans l'ADN du lot ainsi que dans la zone de feuille infectée où le lot a été déposé. Les charges virales mesurées dans les lots de cochenille ($\Delta Ct_{coch}$) et dans les feuilles sources ($(\Delta)\Delta Ct_{feuille}$) sont indiquées pour chaque plant (5 zones par plant, Fig. 4.6, **A**) ainsi que l'un en fonction de l'autre, pour chaque lot (Fig. 4.6, **B**). Aucune corrélation n'est visible entre ces deux variables. Cette absence de corrélation indique que d'autres facteurs influent probablement l'acquisition du virus par le vecteur, comme le stade de développement et la taille des individus, l'âge du plant hôte et son état physiologique, la saison, ou encore les flux en réponse à l'alimentation d'un insecte.

Un modèle linéaire mixte est construit afin de tester si le génome du plant source, AAA ou AAB, influe l'acquisition de charge virale dans les cochenilles, indépendamment de la charge virale dans le plant. Aucun effet significatif n'est mesuré, indiquant que l'acquisition de particules virales semble être la même quelle que soit le génome du plant source. Cela est cohérent avec les forts taux d'acquisition mesurés pour chacun des deux génomes testés (AAA et AAB).

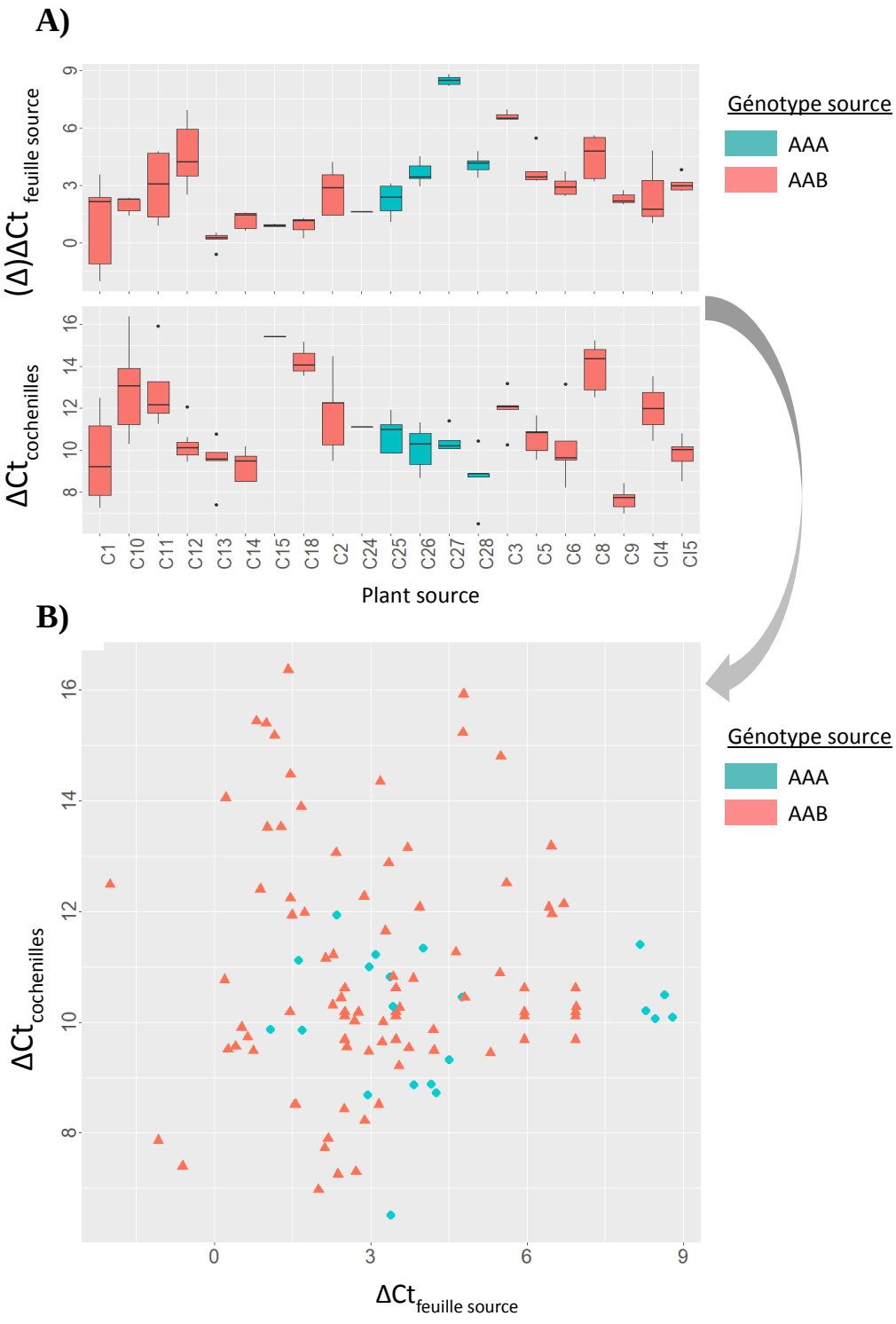



**Figure 4.6 : Charge virale mesurée dans les lots de cochenilles *P. citri* et dans les feuilles du plants source (infecté). A)** Les valeurs $\Delta Ct_{cochenille}$ (graphe du haut) et $\Delta Ct_{bananier}$ (graphe du bas) indiquent les charges virales mesurées par quantification relative dans les lots de cochenilles et dans le plant source, respectivement, pour chaque plant (5 mesures par plant). **B)** La charge virale mesurée dans chaque lot de cochenille est indiquée en fonction de la charge virale mesurée dans la zone de feuille où le lot a été déposé. Les plants cavendish (AAA) sont indiqués en bleu, les plantains (AAB) en rouge.

Il est important de rappeler que ce modèle représente 68% de la variabilité de la charge virale mesurée, ce qui renforce l'hypothèse que d'autres facteurs non contrôlés dans notre essai influent sur le taux d'acquisition du BSOLV par *P. citri*.

Par ailleurs, les valeurs de charge virale mesurées dans les lots de cochenilles sont largement inférieures ($6<\Delta Ct<17$) à celles mesurées dans les feuilles sources ($1<\Delta Ct<9$), en rappelant qu'une différence d'un cycle correspond à deux fois plus/moins de particules virales. De plus, les lots de cochenilles correspondent à des ensemble de 10 individus, abaissant la quantité de particules virales acquise dans chaque individu. Néanmoins, les cas de transmission réussis avec l'espèce *P. citri* suggèrent que cette faible charge virale est suffisante pour transmettre une infection (à partir de lots de 10 cochenilles). Il serait nécessaire de mesurer le taux d'acquisition du BSV par l'espèce *Dysmicoccus neobrevipes*, décrite pour la première fois comme vectrice du BSV, afin de déterminer si le taux d'acquisition ainsi que la quantité de particules virales acquises diffèrent selon l'espèce. Cela permettrait notamment de mieux comprendre les faibles taux de transmission obtenus avec *Dysmicoccus neobrevipes*. Afin d'estimer la distribution et l'accessibilité de l'inoculum viral pour les cochenilles vectrices au niveau cellulaire, des essais d'immunolocalisation des particules virales ont été menés sur des bananiers infectés, Cavendish et plantains.

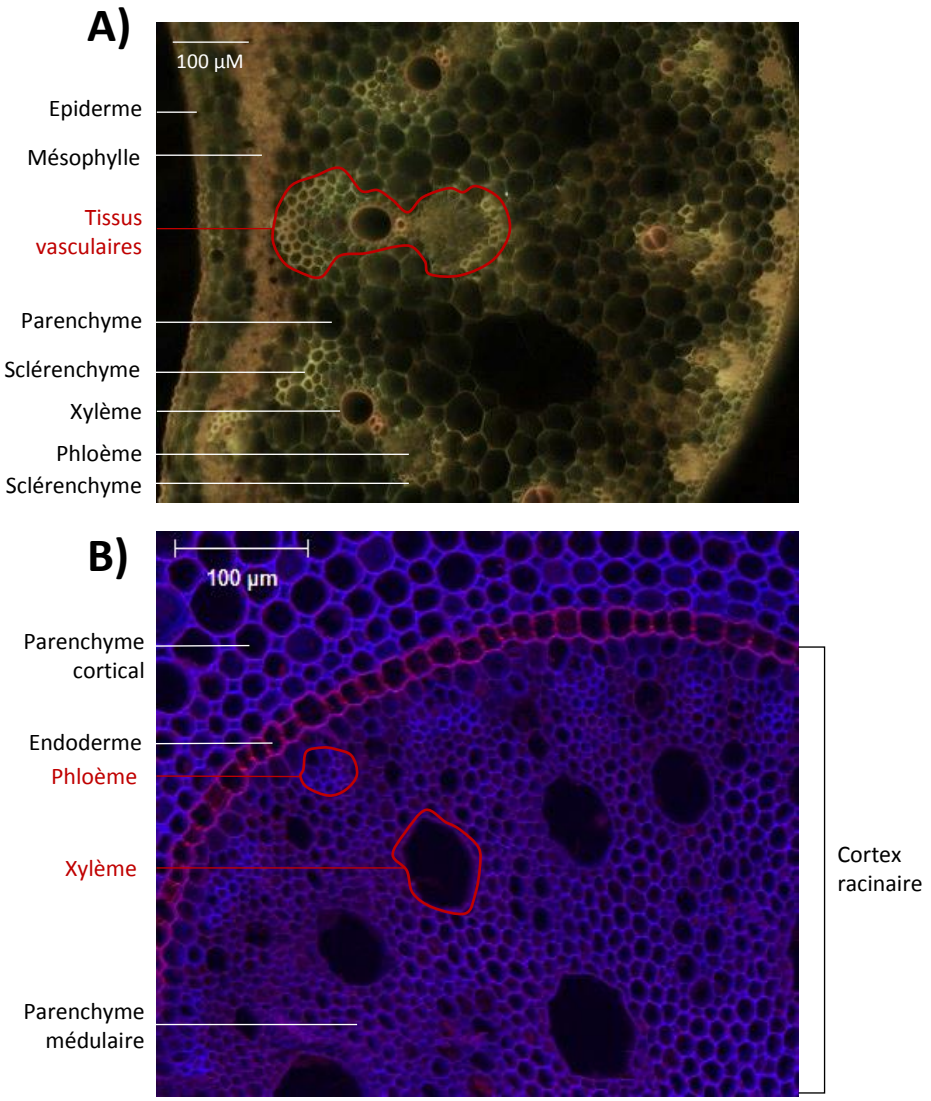



**Figure 4.7 : Description histologique de (A) nervure et de (B) racine de bananier**. Coupes transversales de nervure (A, microscopie à épifluorescence) et racine (B, microscopie confocale) de bananier sain et indication des principaux tissus observables.

## 2) Localisation histologique des particules virales de BSV chez le bananier

### *a) Immunomarquage du BSV sous microscope à épifluorescence*

L'immunomarquage du BSV a été réalisé sur deux parties du bananier riches en tissus vasculaires : les racines et les nervures centrales de feuille. La figure 4.7 indique les principaux tissus observables sur chacun de ces deux organes. L'interprétation d'un échantillon immunomarqué n'est possible que par comparaisons du signal entre un échantillon infecté, un témoin négatif non infecté (dans notre cas, un bananier Cavendish (AAA) sain), et un témoin négatif infecté mais non marqué avec l'anticorps primaire (afin de déterminer la spécificité du signal observé).

La figure 4.8 montre le signal obtenu en microscopie à épifluorescence dans une coupe de racine et une coupe de nervure centrale, chez un plantain infecté par le BSV (AAB-BSV) comparé à un plant de Cavendish sain (AAA). Pour le plantain infecté, un deuxième témoin négatif « non marqué » est utilisé pour vérifier la spécificité du signal. Cet échantillon saturé en BSA n'est pas marqué avec un anticorps primaire mais est incubé avec l'anticorps secondaire. Si un signal est observé après marquage à l'anticorps secondaire uniquement, cela indique une fluorescence non spécifique des tissus infectés. On observe chez le plant sain ainsi que chez le plant infecté une fluorescence de l'endoderme entourant le cortex racinaire (jaune foncé, Fig. 4.8). Ce signal étant présent chez le témoin négatif, on peut la qualifier d'autofluorescence naturelle de l'endoderme. Chez le plant infecté, on observe également un autre signal fluorescent à l'intérieur de cortex racinaire, concentré en périphérie des cellules et dans le parenchyme médullaire (Fig. 4.8, panel du milieu). Cependant, ce signal étant aussi observé chez le témoin non marqué, il ne résulte pas spécifiquement de l'interaction entre l'anticorps primaire et les protéines de capsides du BSV (Fig. 4.8, panel du bas). Dans les coupes de nervure centrale, aucun signal de fluorescence spécifique du virus ou d'autofluorescence n'est observé.

Ces images d'immunomarquage en microscopie à épifluorescence ne permettent pas d'observer un signal spécifique du virus, les observations suivantes ont donc été faites en microscopie confocale, afin d'observer les coupes dans un plan unique et d'accroître la précision du signal. Une partie de l'autofluorescence observée semble néanmoins être spécifique des tissus infectés et restreinte à l'espace laminaire du cortex racinaire. On peut suspecter des modifications de structure des tissus lors d'infections par le BSV, à l'instar de ce qui a été reporté chez des bananiers infectés par le Banana bunchy top virus (BBTV, Wardlaw, 1961).

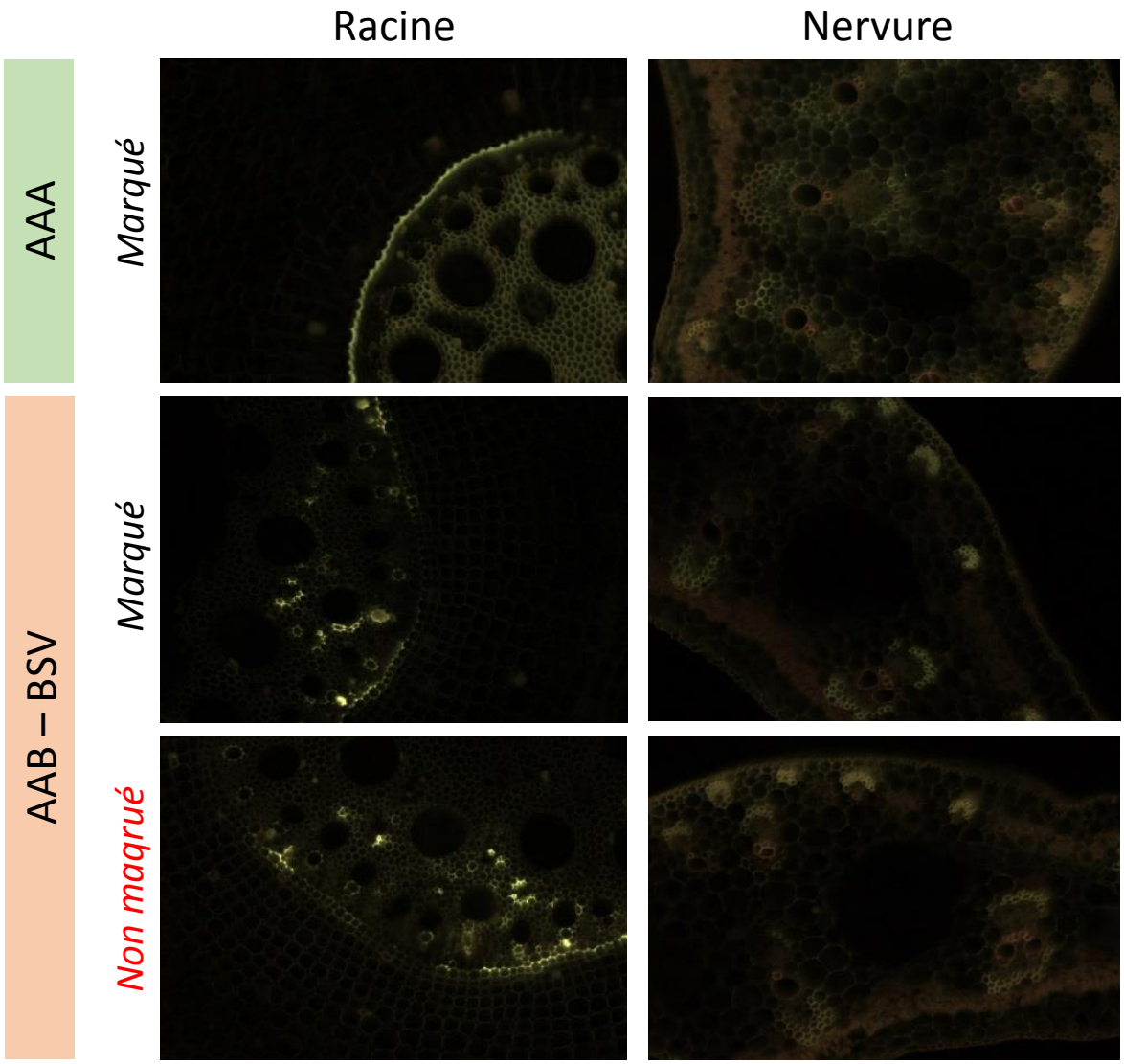



**Figure 4.8 : Immunomarquage du Banana streak virus en microscopie à épifluorescence**. Des coupes de racine et de nervure centrale de feuille prélevées sur un bananier Cavendish sain (AAA, témoin négatif, en vert) et sur un bananier plantain infecté (AAB, en rouge) sont observées en microscopie à épifluorescence après un immunomarquage dirigé contre le BSV. Un contrôle négatif de tissus infecté non immunomarqué est présenté pour le bananier plantain. Grossissement 40x. Images: E. Ricciuti

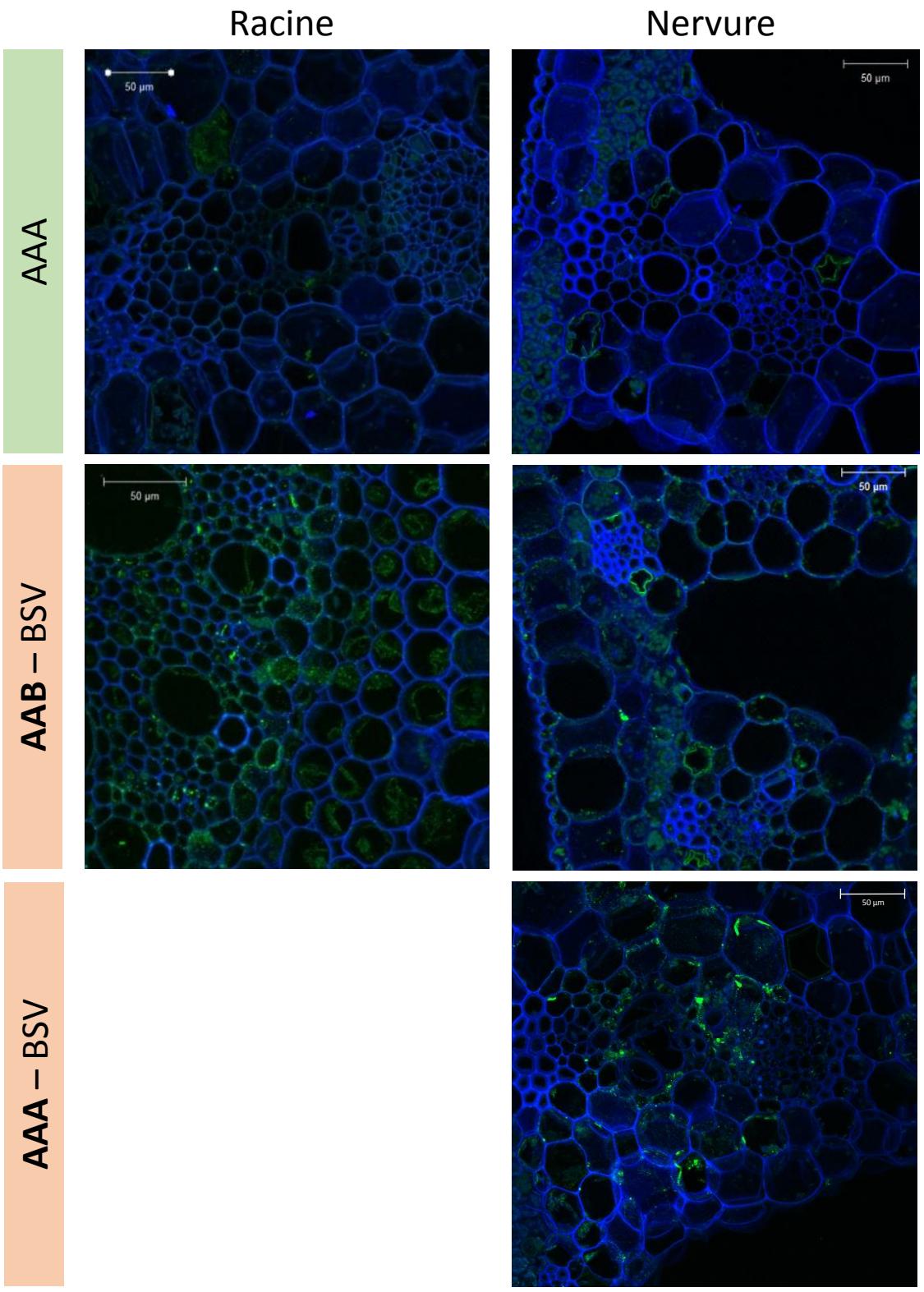



**Figure 4.9 : Immunomarquage du Banana streak virus en microscopie confocale**. Coupes de racine et de nervure de feuille de bananier Cavendish sain (AAA), bananier plantain infecté (AAB-BSV) et bananier Cavendish infecté (AAA-BSV), immunomarquée pour le BSV et observées en microscopie. Le signal en vert correspond à l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 488. Echelle indiquée en haut de l'image. Images: M-S Vernerey et E. Ricciuti

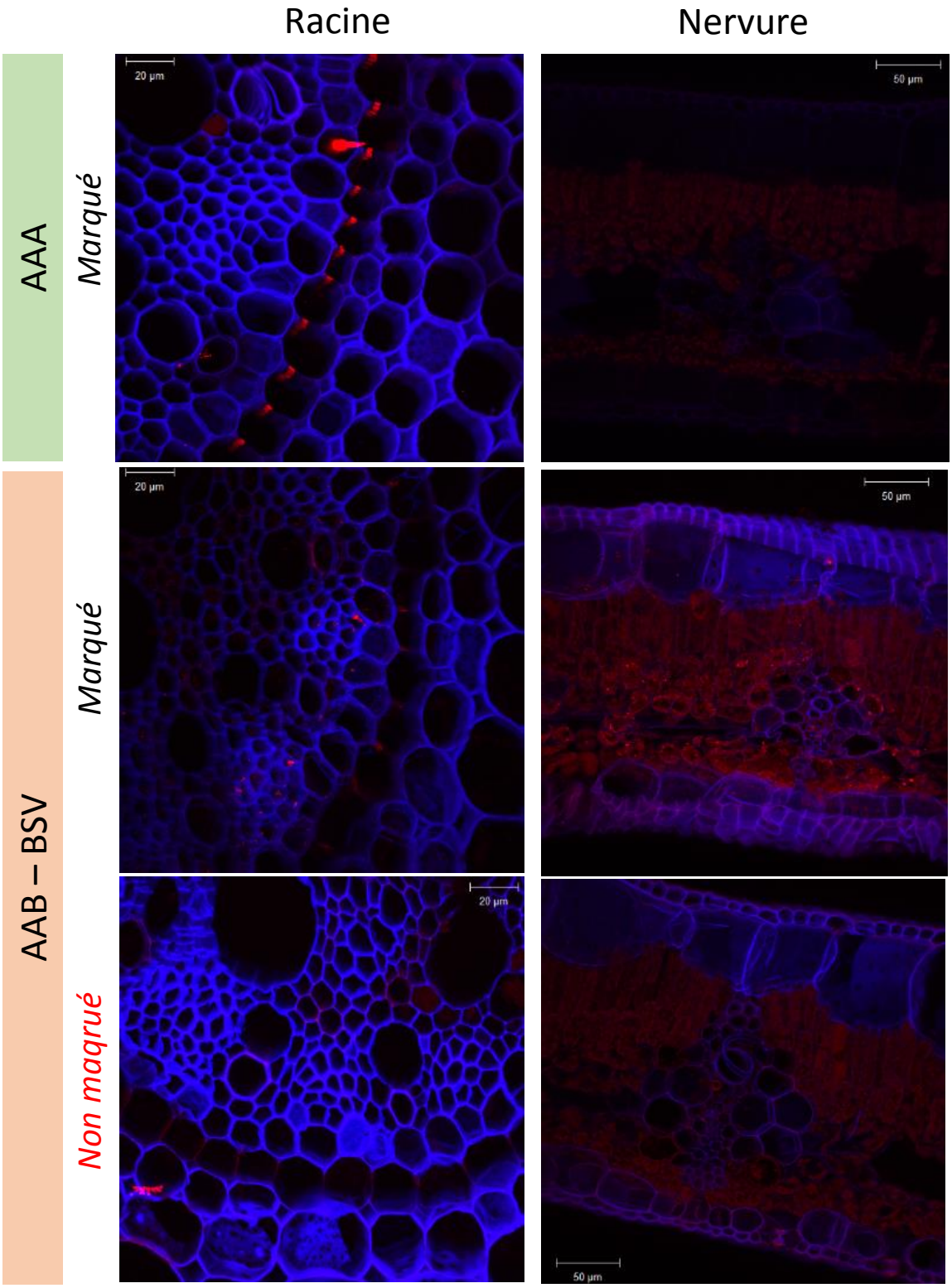



**Figure 4.10 : Immunomarquage contrôle du Banana streak virus en microscopie confocale, au fluorochrome Alexa Fluor594 (rouge)**. Des coupes de racine et de nervure centrale de feuille prélevées sur bananier Cavendish sain (AAA, témoin négatif), sur plantain infecté (AAB, en rouge) marqué et non marqué avec l'anticorps primaire sont observées en microscopie à confocale après un immunomarquage dirigé contre le BSV, avec un anticorps secondaire couple au fluorochrome Alexa Fluor 594 (émission dans le rouge). Echelle indiquée en haut de l'image. Images: M-S Vernerey.

### *b) Immunomarquage du BSV sous microscope confocal*

Un deuxième immunomarquage sur les mêmes tissus du bananier plantain infecté et du Cavendish sain, ainsi que sur un bananier Cavendish infecté par le BSV, a été observé sous microscope confocal. L'avantage de cette technique d'observation réside dans la sélection d'un plan focal unique pour la détection du signal, qui permet de s'affranchir d'un signal ou « bruit » de fond dû à la profondeur de l'échantillon (notamment dans des coupes mesurant 60 à 100 µm). L'observation au microscope confocal permet également une meilleure résolution du signal. La comparaison entre les tissus infectés (Fig. 4.9, AAB-BSV et AAA-BSV) et sains (Fig. 4.9, AAA) met en évidence une fluorescence plus importante dans les tissus infectés, et localisée cette fois à l'intérieur des cellules. Les points fluorescents (en vert) semblent être concentrés en périphérie des vacuoles, qui occupent la majeure partie de l'espace cellulaire. De plus, le signal lié au virus est retrouvé dans différents types cellulaires tels que le parenchyme, le phloème et l'épiderme (Fig. 4.7). Cette diffusion du signal d'immunomarquage distingue le Banana streak virus du Banana bunchy top virus (BBTV), un nanovirus du bananier, restreint au phloème (Magee, 1939). En effet, un contrôle de l'immunomarquage sur un Cavendish (AAA) infecté par le BBTV révèle une restriction nette du signal fluorescent aux cellules du phloème (Fig. 4.11).

Le signal observé sous microscope confocal est spécifique de l'interaction entre l'anticorps primaire et le BSV. En effet les images obtenues avec le témoin infecté mais non marqué avec l'anticorps primaire (Fig. 4.10, anticorps secondaire couplé à un fluorochrome rouge) montrent en enrichissement du signal uniquement dans les échantillons infecté et marqué par les anticorps primaire **et** secondaire. L'échantillon de bananier plantain infecté non marqué ne montre pas de signal fluorescent supérieur à l'autofluorescence naturelle de la chlorophylle (nettement visible dans les coupes de nervure, Fig. 4.10, panel de droite).

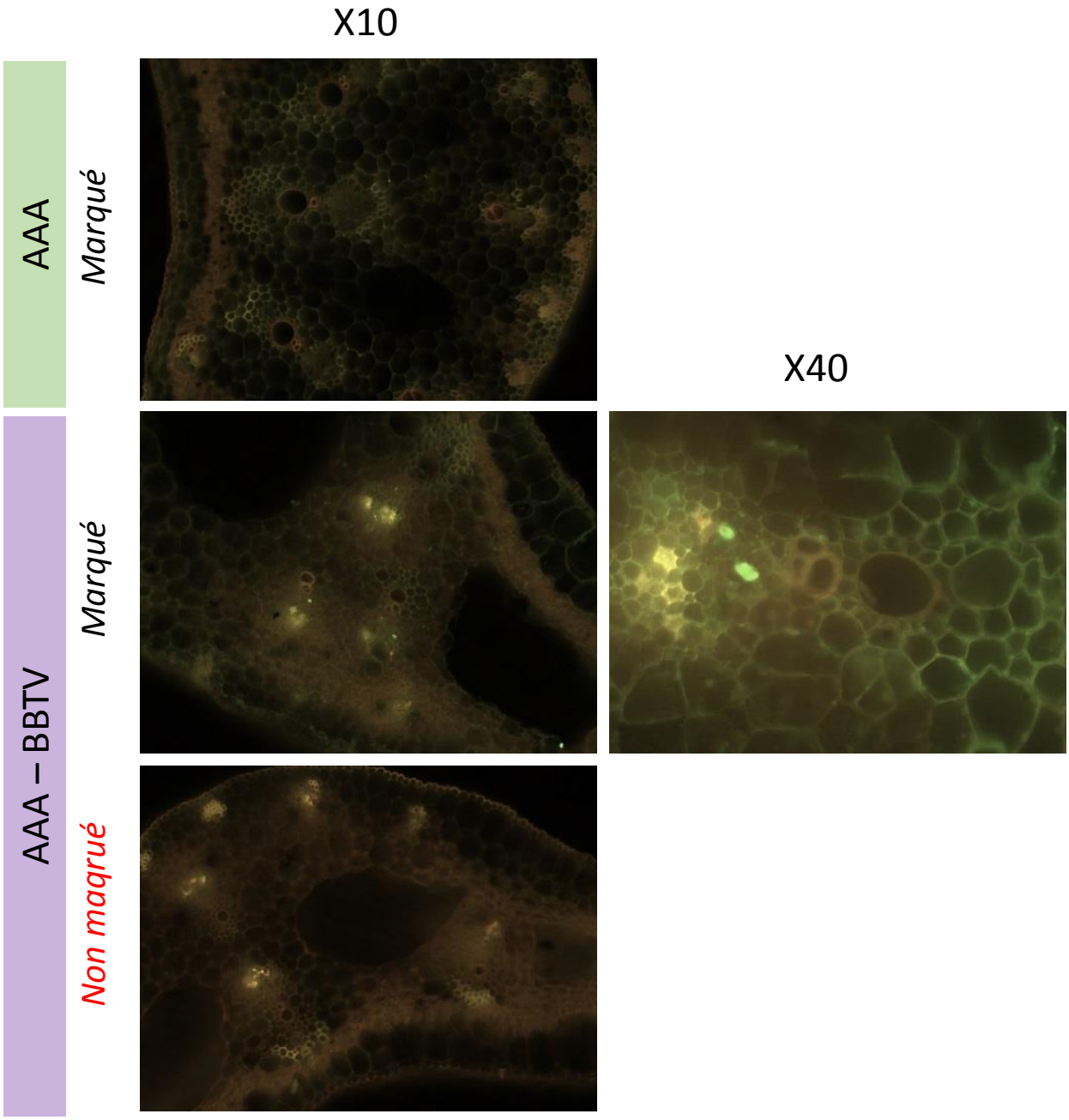



**Figure 4.11 : Immunomarquage du Banana bunchy top virus en microscopie à épifluorescence.** Des coupes de nervure centrale de feuille prélevées sur bananier Cavendish sain (AAA, témoin négatif), et infecté par le BBTV (AAA-BBTV, en violet) marqué et non marqué avec l'anticorps primaire sont observées en microscopie à épifluorescence après immunomarquage. Grossissements indiqués au-dessus des clichés.

# IV. Discussion:

## 1) Acquisition et transmission des particules virales de BSV

Parmi les 12 tests préliminaires de transmissions menés en 2017, 1 lot avec l'espèce *Dysmicoccus neobrevipes* transmet BSOLV à partir de Cavendish (AAA) infectés, et 3 lots avec l'espèce *Planococcus citri* transmettent BSOLV à partir de plantains (AAB) infectés. Les 8 tests résultant en l'absence de transmission ont été réalisés avec l'espèce *D. neobrevipes*, traduisant la difficulté de transmission avec cette espèce de cochenille, bien que décrite pour la première fois vectrice d'une espèce BSV. Un deuxième test de transmission avec *D. neobrevipes*, sur un plus grand nombre de plants (15 bananiers Cavendish sains inoculés), et faisant suite à une optimisation de la transmission, résulte en un très faible taux de transmission (1/15). Parallèlement, les trois tests de transmissions réalisés avec l'espèce *P. citri* sont positifs, bien que la quantification de la charge virale acquise lors du tests d'acquisition indique un faible inoculum viral acquis. Les analyses statistiques menées sur les taux d'acquisition de *P. citri* indiquent que le génotype (AAA ou AAB) du plant source n'affecte pas la charge virale acquise. En revanche, on ne peut pas exclure que d'autres paramètres non contrôlés dans ces essais puissent affecter l'acquisition ou la transmission du BSV par cochenilles, tels que l'âge des plants sources et des plants inoculés, la saison ou le stade de développement des cochenilles (estimé visuellement dans les essais présentés ici mais non caractérisé morphologiquement).

Bien que les tests de transmission effectués lors de ces travaux aient été réalisés dans un cadre préliminaire de mise au point de la transmission, les résultats obtenus soutiennent deux conclusions majeures: **1)** Les particules de BSV d'origine endogène et issues de l'activation des séquences eBSOLV sont transmissibles, ce qui confirme l'étude de Meyer et al. (2008) ; et **2)** l'espèce *Dysmicoccus neobrevipes* est capable de transmettre des particules virales de BSV et s'ajoute donc à la liste des espèces vectrices du BSV. Cette espèce de cochenille a été identifiée sur bananiers en Côte d'Ivoire lors de prospections menées pendant ma thèse, sur des parcelles de plantains. Aucune infection n'a été reportée lors de nos prospections sur ces parcelles, cependant elles étaient infectées par le BSV lors des prospections précédentes, en 2008 (communication personnelle). La présence d'une nouvelle espèce vectrice sur des parcelles sporadiquement affectées par la maladie de la mosaïque en tirets constitue un nouvel argument pour évaluer le risque épidémique lié aux infections BSV. Il serait intéressant de répéter le test d'acquisition avec *D. neobrevipes* afin de comparer les taux d'acquisition à ceux de *P. citri*, et à terme de comparer les taux de transmission entre ces deux espèces.

### 2) Les particules virales de BSV ne semblent pas être restreintes au phloème

Les résultats d'immunomarquage présentés dans ce chapitre sont les premièrs concernant le pathosystème bananier / Banana streak virus. Les résultats obtenus révèlent une présence diffuse dans les tissus infectés, et indiquent que les particules virales ne sont pas restreintes au phloème, mais également présentes dans le parenchyme et le mésophylle. Cette localisation histologique est cohérente avec le mode de transmission non-circulant semi-persistant décrit jusqu'à ce jour pour le BSV, puisque rendant les particules virales accessibles aux cochenilles vectrices dès les piqûres d'essai, et nécessitant donc un temps d'acquisition relativement court (quelques minutes, voir Tableau 1.3). La localisation diffuse des particules de BSV dans les deux types de plants source, plantain (AAB) et Cavendish (AAA) est elle aussi cohérente avec l'absence d'effet du génotype bananier sur le taux d'acquisition chez *P. citri*. Les cochenilles se nourrissant préférentiellement dans le phloème (Cid and Fereres, 2010), on peut suggérer que les piqûres d'essais effectuées dans le mésophylle et le parenchyme par les cochenilles ne contribuent que faiblement à l'acquisition du BSV. De plus, il a été montré chez le puceron (*Brevycorine brassicae* et *Myzus persicae*) que l'acquisition du virus augmentait largement lorsque le vecteur atteint le phloème (Palacios, 2002). Hors, seule une partie de la charge virale BSV mesurée dans un bananier infecté est localisée dans le phloème, et donc accessible de manière optimale à la cochenille vectrice. Cette hypothèse est renforcée par la différence relative de charge virale mesurée lors du test d'acquisition dans les lots de cochenilles par rapport à celle mesurée dans le plant source.

### 3) Des taux de transmission qui restent à déterminer pour évaluer le risque épidémique

Les tests de transmission réalisés lors de ces travaux indiquent qu'une transmission de particules virales de BSV est possible entre des plantains infectés et des bananiers Cavendish sains, et semble être plus efficace avec l'espèce *Planococcus citri* qu'avec *Dysmicoccus neobrevipes*. Néanmoins, l'ajout de cette dernière à la liste des espèces vectrices du BSV indique qu'une vigilance doit être maintenue quant au risque épidémique liés au BSV pour la culture du plantain, et surtout pour celle de la banane Cavendish, intensive et quasi-exclusivement issue de culture *in vitro*. Bien que les cochenilles soient considérées comme des vecteurs peu efficaces car peu mobiles, des études portant sur la dispersion du virus de l'enroulement de la vigne (GLRaV, *Grapevine Leafroll associated virus*) par différentes espèces de cochenilles (incluant *P. citri*) indiquent que ces vecteurs peuvent être à l'origine

d'épidémies virales importantes dans des vignobles (Cid et al., 2010). Le caractère spontané de l'activation de séquences intégrées eBSV chez des bananiers hybrides ne permet pas la mise en place d'un contrôle épidémiologique au niveau de la population virale (ici, le BSV). Seules les populations de cochenilles vectrices peuvent être la cible de stratégies de contrôles, chimiques ou biologiques. Des tests de transmission supplémentaires sont nécessaires sur un plus grand nombre de bananiers pour caractériser le risque épidémique lors d'infections chez des plantains. Les forts taux d'acquisition reportés dans cette étude, ainsi que les quelques cas de transmissions à des bananiers Cavendish, supportent la nécessité d'approfondir ce type d'essais pour réaliser une véritable évaluation du risque épidémique.

## V. Points clés du chapitre 3

- Les particules virales de BSOLV issues de l'activation eBSOLV-1 sont **transmissibles par les cochenilles** *Planococcus citri* et ***Dysmicoccus neobrevipes*** à des bananiers Cavendish
- Le **taux d'acquisition** de BSOLV par *P. citri* à partir de plantains et de Cavendish infectés est élevé, de **90% et 84%,** respectivement
- Le **génotype du bananier hôte** (AAA ou AAB) **ne modifie pas l'acquisition** ni la quantité de virus acquise par *P. citri*
- Les particules virales de BSV ne sont **pas restreintes au phloème**, mais présentes également dans le parenchyme et mésophylle des bananiers infectés

# Disease note :

## First report of *Dysmicoccus neobrevipes* as vector of Banana streak virus

**D. Massé[2], E. Ricciuti[1], M-L Iskra-Caruana[1], B. Hostachy[2]**

[1] BGPI, CIRAD, Univ Montpellier, INRA, Montpellier SupAgro, Montpellier, 34984, France.
[2] ANSES, Laboratoire de la santé des végétaux, Station de la Réunion, Pôle de Protection des Plantes, 97410 Saint-Pierre
[*]Corresponding author: bruno.hostachy@anses.fr

Banana streak virus (BSV) is responsible of banana streak disease, a widespread viral infection impacting growth and fruit yield of banana (Lassoudière, 2007). BSV is a complex of dsDNA viruses belonging to *Caulimoviridae* family, badnavirus genus. Some BSV species have endogenous counterparts (eBSV) integrated in banana genome, also involved in infections (Iskra-Caruana et al., 2010). Episomal BSV infections are mealybug-transmitted by at least six species described so far, including *Planococcus citri, Planococcus ficus, Paracoccus burnerae, Pseudococcus comstiki, Saccharicoccus sacchari* and *Dysmicoccus brevipes* (Jones, 1999; Kubiriba et al., 2001; Lockhart and Olszewski, 1993; Meyer et al., 2008b; Muturi et al., 2013). *Dysmicoccus neobrevipes* (order: *Hemiptera*, family: *Pseudococcidae*), has a pantropical distribution and has been found on banana fields in Côte d'Ivoire and in La Réunion (France, personal communication). *D. neobrevipes* has been reported to transmit *Pineapple mealybug-associated virus* (PMWaV, *Closteroviridae* family) in a semi-persistent manner (Sether et al., 1998). Its ability to transmit BSV in banana was then tested to assess whether epidemic risk exist in banana producing regions.

*D. neobrevipes* colonies fed on banana (plantain, cv. Big Ebanga, AAB genome or Cavendish, AAA genome) undergoing eBSOLV-derived infections, in clip-cages containing 10 to 30 individuals. After three to seven days feeding (acquisition time) on infected source plants, they were transferred to virus-free banana (cv. Cavendish, AAA genome). After seven days of inoculation, clip-cages were removed and inoculated plants were tested for BSV infection weekly for three months. Diagnostic of infection was done using multiplex immunocapture-PCR adapted from Le Provost et al. (2006, method's reference: ANSES/LSV MA044, v2). This method combines both serological and molecular tools for detection of episomal viral genomes

only, by capturing BSV particles with specific polyclonal antibodies (1:200, Sediag), and by processing PCR on captured DNA. Multiplex PCR is processed in the tube, using five BSV-specific primers including BSOLV primers (0.6 µM) and microsatellite primers (0.8 µM) as control (Geering et al., 2000, 2011; Lagoda et al., 1998).

Five pools with different numbers of individuals were tested for 7 days acquisition and 7 days inoculation. One pool (30 individuals) succeed to transmit BSOLV from infected Cavendish plant to virus-free Cavendish plant. Infection was detected between 6 and 10 weeks post-inoculation. In a second transmission test, with 3 days acquisition and 7 days inoculation, one pool (15 individuals) over 15 succeed to transmit BSOLV from infected plantain to virus-free Cavendish plant. Infection was detected 10 weeks post-inoculation. These two cases of BSOLV transmission are the first reported for *D. neobrevipes*. This is a major importance regarding the widespread distribution of this mealybug species in banana producing regions (as in Côte d'Ivoire), and has to be considered when evaluating the epidemic risk of banana streak disease.

**Funding:** E. Ricciuti PhD grant was funded by both the CIRAD and the ANSES (50/50%)

**Acknowledgments**: We thank Vitropic for funding prospection on banana field in Côte d'Ivoire, and V. Balmes (LSV, ANSES) for *Dysmicoccus neobrevipes* identification.

The author(s) declare no conflict of interest.

**References**:

**References**:

Geering, A.D., McMichael, L.A., Dietzgen, R.G., Thomas, J.E., 2000. Genetic Diversity Among Banana streak virus Isolates from Australia. Phytopathology 90, 921–927. https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.8.921

Geering, A.D.W., Parry, J.N., Thomas, J.E., 2011. Complete genome sequence of a novel badnavirus, banana streak IM virus. Arch. Virol. 156, 733–737. https://doi.org/10.1007/s00705-011-0946-7

Iskra-Caruana, M.-L., Baurens, F.-C., Gayral, P., Chabannes, M., 2010. A four-partner plant–virus interaction: enemies can also come from within. Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI 23, 1394–1402. https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0107

Jones, D.R., 1999. Diseases of banana, abacá, and enset. Wallingford, Oxon, UK ; New York : CABI Pub.

Kubiriba, J., Legg, J., W, T., E, A., 2001. Vector transmission of Banana streak virus in the screenhouse in Uganda. Ann. Appl. Biol. 139, 37–43. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00128.x

Lagoda, P., Noyer, J., Dambier, D., Baurens, F., Grapin, A., Lanaud, C., 1998. Sequence tagged microsatellite sites (STMS) markers in the Musaceae. Mol. Ecol. 659–666.

Lassoudière, A., 2007. Le bananier et sa culture. Ed. Quae.

Le Provost, G., Iskra-Caruana, M.-L., Acina, I., Teycheney, P.-Y., 2006. Improved detection of episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. J. Virol. Methods 137, 7–13. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.021

Lockhart, B.E.L. (University of M., Olszewski, N.E., 1993. Serological and genomic heterogeneity of Banana Streak Badnavirus : implications for virus detection in Musa germplasm. Presented at the International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests, Montpellier (France), 7-9 Sep 1992, CIRAD-FLHOR.

Meyer, J.B., Kasdorf, G.G.F., Nel, L.H., Pietersen, G., 2008. Transmission of Activated-Episomal Banana streak OL (badna)virus (BSOLV) to cv. Williams Banana (Musa sp.) by Three Mealybug Species. Plant Dis. 92, 1158–1163. https://doi.org/10.1094/PDIS-92-8-1158

Muturi, S., Wachira, F., Karanja, L., Wambulwa, M., E, M., 2013. Paracoccus burnerae (Homoptera; Planococcidae) as a vector of banana streak virus. J. Exp. Biol. Agric. Sci. 1.

Sether, D.M., Ullman, D.E., Hu, J.S., 1998. Transmission of Pineapple Mealybug Wilt-Associated Virus by Two Species of Mealybug (Dysmicoccus spp.). Phytopathology 88, 1224–1230. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.11.1224

# DISCUSSION GENERALE

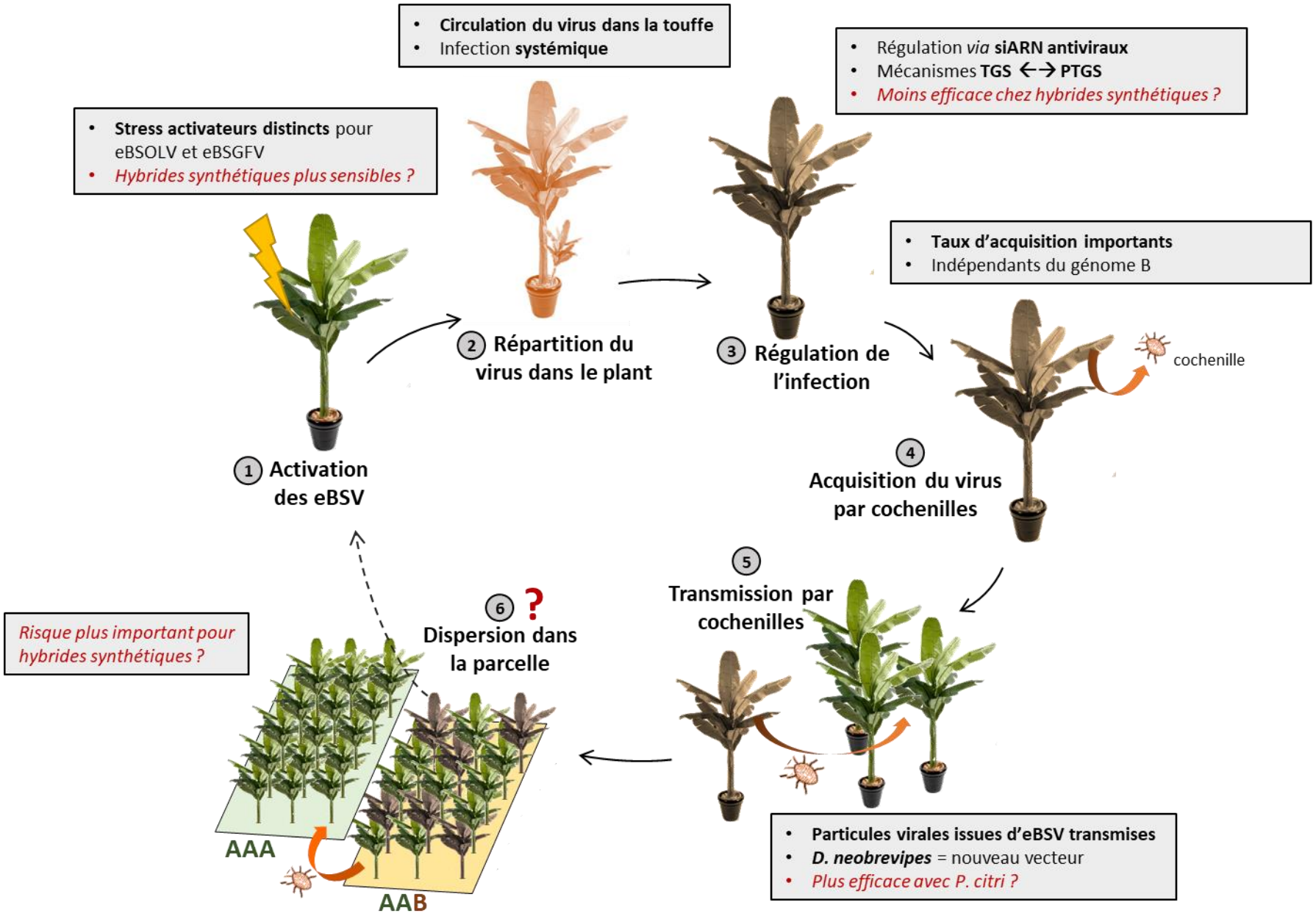



**Figure 5.1: Schéma récapitulatif des différentes étapes du cycle infectieux du BSV chez un bananier au champ.** Les principales conclusions de mes travaux de thèse et les hypothèses qui en découlent sont indiquées en noir et rouge, respectivement.

Les travaux réalisés durant ma thèse avaient pour objectif d'appréhender le risque épidémique lié aux infections de Banana streak virus issues des eBSV dans un contexte de production intensive de bananiers hybrides AAB. Pour cela, je me suis intéressée à la biologie des interactions entre les deux formes du virus (endogène et épisomale), les bananiers plantains et les cochenilles vectrices. J'ai suivi sur plusieurs mois différentes populations de bananiers hybrides soumis à des infections BSV d'origine endogène (primo-infections et infections systémiques) pour caractériser d'une part la mise en place d'une primo-infection en suivant la dynamique du virus au cours du temps, et pour caractériser d'autre part les mécanismes de régulation mis en place par les bananiers hybrides contre ces infections et expliquant le phénomène de réversion permettant au bananier de revenir à un phénotype sain. En parallèle et en collaboration avec l'ANSES, nous avons testé la capacité de transmission du virus à partir d'un inoculum de primo-infection issu d'eBSV chez des bananiers plantains, afin d'évaluer le risque de dispersion une fois l'infection déclarée.

Ces travaux nous ont fournis des informations nouvelles sur le pathosystème bananier hybride AAB – Banana streak virus au niveau d'un plant et au niveau de la touffe de bananier, éclairant différentes étapes du cycle infectieux du BSV et apportant des éléments clés pour évaluer le risque épidémique lié aux infections issues d'eBSV. Les trois étapes majeures identifiées dans un cycle infectieux viral sont discutées dans les sections suivantes au regard des résultats obtenus lors des travaux que j'ai conduits et des éléments connus dans la littérature scientifique **: i) L'établissement de l'infection** issue d'eBSV chez un bananier hybride AAB, depuis l'activation des eBSV jusqu'à la répartition du virus dans la touffe ; **ii) La régulation de l'infection**, et l'impact de la coévolution génome hôte – eBSV sur cette régulation ; et enfin **iii) La transmission de l'infection par le vecteur** à un plant sain, depuis l'acquisition du virus jusqu'au risque de dispersion sur une parcelle de culture. Un schéma général (Fig. 5.1) illustre et résume les conclusions issues de mes travaux et les hypothèses qui en découlent concernant chacun de ces aspects.

## Etablissements d'infections BSV d'origine endogènes

### Déclenchements d'infections BSV

Les intégrations virales eBSV présentes dans le génome B des bananiers plantains, et dans celui des certains des hybrides interspécifiques synthétiques ayant un parent diploïde *M. balbisiana* (BB) sont infectieuses, car capables de restituer un génome viral fonctionnel. L'activation de ces séquences est associée à des stress génomiques et environnementaux, comme ceux induits par la propagation de masse clonale par culture *in vitro* (Côte et al., 2010b; Dahal et al., 1998; Dallot et al., 2001b), les croisements génétiques (Lheureux et al., 2003) ou encore des stress thermiques et hydriques (communications personnelles). Les analyses des conséquences du réchauffement climatique prévoient une augmentation de la fréquence d'évènements climatiques extrêmes laissant entrevoir des stress abiotiques plus fréquents dans les décennies à venir qui activeront de plus en plus régulièrement les eBSV de ces bananiers hybrides.

#### *La prévalence BSOLV*

Lors des travaux présentés dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous avons observé un fort taux d'activation des bananiers plantains cultivés en serre, avec l'apparition de plus de 90% de plants infectés au cours de l'essai (57/63 plants). La grande majorité des plants infectés en serre lors de nos essais le sont par l'espèce BSOLV, avec seulement 3 plants infectés par BSGFV et 2 plants co-infectés par les deux espèces virales. Des études de prévalence BSV dans des bananeraies de plantains en République Dominicaine et en République Démocratique du Congo reportaient à l'inverse une prévalence plus importante de l'espèce BSGFV par rapport à BSOLV pour les hybrides natifs de type plantains Macho x Hembra (AAB) et l'hybride synthétique FHIA 21 (AAAB) (Martinez, 2015, thèse) et pour des hybrides natifs (AAB et AB) (Mukwa, 2016, thèse) respectivement. Ces études ont permis l'identification de foyers d'infections sur plus de 30 parcelles d'échantillonnage en République Dominicaine réparties dans différentes provinces, et confirmé le caractère généralisé des infections BSV à partir d'eBSV. Ces résultats indiquent une prépondérance au champ des infections BSGFV plutôt que BSOLV.

Les stress auxquels sont soumis les bananiers sont différents entre une culture sous serre (ressources limitées au pot, stress hydrique) et une culture en conditions naturelles, au champ (stress biotiques, thermiques, hydriques). Il apparaît donc que les intégrations eBSOLV et eBSGFV présentent une sensibilité différente selon les stress activateurs, ce qui laisse supposer des niveaux de contrôle des eBSV différents et/ou des voies d'activation différentes. Par

ailleurs, lors d'une prospection menée lors de ma thèse en Côte d'Ivoire, nous avons échantillonné et analysé des plantains (cv. Big Ebanga) issus de culture *in vitro* (fournis par Vitropic), maintenus en pépinière depuis plusieurs mois et ayant subi de forts stress hydriques. Une infection BSOLV a été reportée sur 85% de ces plants, où aucune cochenille n'a été détectée (données personnelles), et aucune infection BSGFV. Cette forte prévalence de l'espèce BSOLV chez des plantains subissant les mêmes types de stress que ceux appliqués lors de mes essais en serre (culture en pot, stress hydrique), et pourtant cultivés en région tropicale, supporte l'idée de susceptibilités différentes des intégrations eBSGFV et eBSOLV selon les types de stress abiotiques. Cela peut être lié à des environnements génomiques différents pour chacune des intégrations (Chabannes et al., 2013), puisque eBSOLV se trouve dans l'hétérochromatine riche en rétro-éléments et entre deux rétro-transposons tandis que eBSGFV se trouve à l'intérieur d'un rétro-transposon de type *Ty3/*gypsy lui-même situé dans le gène *mom*, dans une région riche en gènes. Une étude chez le maïs a notamment montré que de nombreux éléments transposables étaient activés par des stress abiotiques (thermique, osmotique, exposition aux UV) et stimulaient l'activation de gènes de réponse au stress (Makarevitch et al., 2015). L'activation d'éléments transposables peut résulter d'une baisse de méthylation des résidus cytosine associés à leur séquence lors de stress génomiques. On suppose que les éléments transposables retrouvés dans les régions proches des eBSV jouent un rôle clé dans leur réactivation lors de stress environnementaux, et entraînent dans notre pathosystème une augmentation de la transcription des séquences eBSV dépassant le seuil basal et induisant une infection (voir le mécanisme de régulation proposé dans la section suivante).

### *Quelles différences entre hybrides AAB natifs et synthétiques?*

Dans la même étude de prévalence du BSV mené en République Dominicaine, les bananiers hybrides synthétiques FHIA-21 (AAAB) ont montré des taux d'infection plus élevés que les hybrides natifs Macho x Hembra (AAB) (Martinez, 2015, thèse). Néanmoins, la différence de ploïdie pour le génome A entre FHIA-21 et des hybrides AAB natifs ne permet pas une comparaison stricte. En effet, on sait que la ploïdie du génome B est déterminante pour la résistance au Banana streak virus. Le géniteur diploïde BB « Pisang Klutuk Wulung » (PKW) utilisé dans les croisements interspécifiques est porteur sain d'eBSV infectieux (Lheureux et al., 2003) car il ne déclenche pas d'infection d'origine endogène (par activation des eBSV) et est résistant aux infections d'origine exogène, transmises par cochenilles (Lheureux, 2002, thèse). De même, aucune infection n'a été reportée chez des hybrides interspécifiques ABB

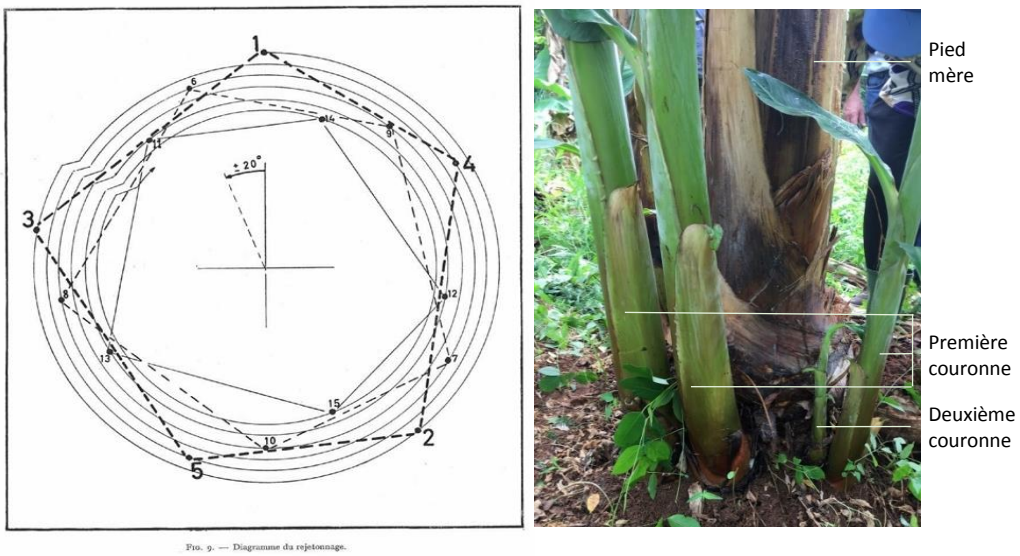



Fig. 9. — Diagramme du rejetonnage.

**Figure 5.2: Organisation des rejets autour du pied mère, en conditions naturelles**. **Gauche)** Diagramme de rejetonnage (De Langhe, 1961). Les numéros indiquent les rejets et leur ordre d'apparition (1: premier rejet) autour du pied mère. Les rejets 1 à 5 forment la première "couronne", les rejets 6 à 10 la deuxième, etc. **Droite)** Photo d'une touffe de bananier au champ, indiquant le pied mère, 3 rejets de la première couronne, et un rejet de la deuxième couronne. Photo: E. Ricciuti

diploïdes pour le génome B, issus de CIV et suivis en serre pendant plusieurs années (Duroy, 2012, thèse). Ainsi, il semble clair que la ploïdie joue un rôle dans l'activation des eBSV pour une infection et que l'haploïdie pour le génome B chez les hybrides interspécifiques AAB est un facteur clé du déclenchement d'infections BSV issues des eBSV. Cependant on ne peut pas exclure que le nombre de copie de génome A ou la présence de génomes A différents de ceux habituels lors d'amélioration génétique aient également un rôle dans la modulation de la résistance au BSV. On peut en effet suspecter un effet de « dilution » du génome B dans les génomes tri- ou tétraploïde des hybrides interspécifiques, affaiblissant la régulation des eBSV destinée à les maintenir silencieux. Ce type d'effet pourrait expliquer la prévalence de BSV plus importante observée chez les hybrides FHIA-21 (AAAB) par rapport aux plantains (AAB), au-delà de la différence de coévolution entre génome et eBSV.

Lors de nos essais suivis en serre, six des 63 hybrides natifs (cv. Big Ebanga) n'ont pas déclenché d'infection BSV, après deux ans de suivi. Le maintien d'un phénotype sain dans ces plants indique une régulation efficace des eBSV pour en empêcher l'activation. Il serait intéressant de suivre une population d'hybrides synthétiques sous les mêmes conditions, en partant de jeunes plants issus de croisements artificiels et porteurs d'un génome AAB, pour déterminer si ce type de régulation efficace existe également chez des hybrides synthétiques.

## Répartition du virus dans le bananier et ses rejets

### *Une organisation des rejets connue et anticipée*

Les infections découlant de l'activation des séquences eBSV chez les hybrides AAB synthétiques étaient systémiques avant la mise en place du suivi des infections. En effet la présence de symptômes de mosaïque en tirets sur plusieurs niveaux foliaires ainsi que la détection du virus dans les feuilles émergentes (feuille de référence pour le diagnostic des plants) indiquent un mouvement systémique du virus dans la plante. L'essai mené sur les hybrides AAB natifs, issus de culture *in vitro*, a permis de suivre la mise en place de primo-infections BSV d'origine endogène. La présence de virus dans les feuilles émergentes, ainsi que dans les quelques rejets apparaissant au cours de l'essai, confirme la répartition systémique du virus dans le plant, puis dans la touffe pour les quelques plants produisant des rejets. Ce mouvement des particules virales dans les différents rejets permet au virus de persister dans une touffe de bananier infectée lors de la sélection d'un nouveau rejet, à l'issue de chaque cycle de

culture, ce qui augmente ainsi le risque de dispersion du BSV dans des bananeraies remplacées en moyenne tous les 10 à 15 ans.

En conditions naturelles, l'apparition de rejets suit un schéma précis (De Langhe, 1961), avec une organisation des rejets en couronnes autour du pied principal (Fig. 5.2). Les rejets émergents peuvent alors être de deux types, « choux » ou « baïonnette ». Les rejets choux sont proches du bulbe et de petite taille tandis que les rejets baïonnette sont plus éloignés du pied principal et plus élancés. Ces derniers sont préférentiellement choisis lors de la sélection d'un nouveau rejet. Les touffes de bananiers étant cultivées en pots lors de nos essais, l'émergence des rejets n'a pas suivi le même schéma que celui observé au champ. De plus, nous n'avons pas pu dans nos essais distinguer morphologiquement les rejets choux des rejets baïonnettes. Néanmoins, l'hypothèse d'une répartition du virus dépendante du type de rejets ou de l'ordre d'apparition reste à étudier. Une mesure du titre viral à intervalles de temps réguliers et dans chacun des rejets, comme ce qui a été fait lors de mes travaux, serait intéressante à effectuer en conditions naturelles sur des touffes de bananiers. Si le type de rejet est lié au titre viral, de telles informations pourraient aider à la sélection du rejet le plus « sûr » lors du passage d'un cycle de culture au suivant.

Notamment, les observations au champ ont suggéré des connexions plus importantes entre pied mère et rejet « choux » qu'avec les rejets « baïonnette », et une des hypothèses proposait que l'activation des eBSV ne concerne qu'une partie des cellules du pied principal. Les cellules distantes réguleraient alors mieux l'infection provenant du pied mère, à l'inverse des cellules proches, et notamment celles des rejets « choux ». Un tel essai a été initié pendant ma thèse, sur des parcelles de plantains du cv. « Big Ebanga » en Côte d'Ivoire (district de Tiassalé), en mars 2018. Une prospection sur quatre parcelles distinctes a abouti au marquage d'une vingtaine de touffes ainsi qu'à l'identification de tous les rejets de chacune des touffes, afin de réaliser plusieurs échantillonnages à des dates successives. Cependant, au temps $T_0$ (premier échantillonnage), aucun des échantillons analysés n'était infecté, et les plants marqués au champ n'ont pas montré d'émergence de symptômes au cours de l'année suivante. L'essai n'a pas abouti à d'autres échantillonnages pour des raisons techniques liées à la Côte d'Ivoire. Ces parcelles prospectées ont pourtant été la source de foyers infectieux plusieurs années auparavant lors de leur mise en place en 2007 et 2008 (M.L. Caruana, communication personnelle). Cette expérimentation de suivi en plein champ reste primordiale lors d'émergence de nouvelles infections afin de caractériser la répartition du virus dans la touffe en conditions naturelles de culture.

La répartition de la charge virale peut également être étudiée au niveau du bulbe, organe central d'où émergent les différents méristèmes formant ensuite les différents rejets (Fig. 1.1). Il serait pertinent de mesurer la charge virale dans les différentes zones méristématiques d'un bulbe afin de voir si certaines zones et donc futurs rejets déclenchent préférentiellement des infections par rapport à d'autres. Une telle caractérisation de la répartition des particules virales dans le bulbe pourrait aider à identifier d'éventuelles régions à haut risque de transmission d'infection notamment lors de propagation clonale par les techniques de PIF (plantes issues de fragments) ou de CIV (culture *in vitro*), où quelques cellules méristématiques seulement sont prélevées pour émettre un nouveau plant. De tels essais ont été envisagés au début de mon projet de thèse, en couplant mesure de la charge virale et immunomarquage dans différentes coupes de bulbes. Cependant, le manque de matériel végétal riche en rejets pour réaliser ces mesures destructives ne nous a pas permis de mettre en place ce type d'essai.

***Un effet de saisonnalité***

Le mouvement des particules virales dans le plant hôte peut être impacté par un effet de saison, comme cela a été montré pour le virus d'enroulement de la vigne, dont le titre viral augmente au printemps pendant la croissance des plants (GLRaV-3, Tsai et al., 2012). Lors de nos essais en serre, la charge virale dans les bananiers hybrides s'est avérée plus importante en hiver / printemps qu'en été / automne. Bien que les conditions en serre soient contrôlées lors de nos essais, certains facteurs varient néanmoins au cours de l'année, comme le cycle de lumière, le taux relatif d'humidité ou la température effective en serre, variable de quelques degrés en fonction du climat extérieur. Nous avons observé des modifications physiologiques des plants cultivés en serre en fonction des saisons, avec une production foliaire plus rapide à la fin de l'hiver et au printemps, et qui ralentit pendant l'été. Si l'on suppose que des flux de sève élaborée sont plus importants lors de cette période, cela peut entraîner une réallocation des particules virales préférentiellement dans les feuilles systémiques à cette période, comme observé pour le GLRaV3 chez la vigne. Les charges virales mesurées dans nos essais ne reflètent cependant pas d'augmentation à la fin de l'hiver, lors de la « reprise » de croissance des plants. D'autres effets liés à la saison peuvent alors affecter les charges virales que nous avons mesuré. Chez *A. thaliana*, des recouvrements d'infection ORMV (oilseed rape mosaic virus) ont été associés à un mouvement systémique de siARN antiviraux principalement impliqués dans la régulation PTGS, depuis les organes sources vers les organes puits (Kørner et al., 2018). Il serait intéressant de caractériser les profils de siARN antiviraux chez le bananier

lors d'infection à différents niveaux foliaires et à différentes saisons pour voir si de tels mouvements de siARN peuvent être liés à un effet de la saison sur la charge virale.

Par ailleurs, bien que les mesures de charges virales aient été effectuées sur les feuilles, les essais d'immunolocalisation des particules virales dans les tissus infectés ont été réalisés sur des nervures centrales de feuilles ainsi que des racines, organes riches en tissus vasculaires. Les tissus sélectionnés pour ces essais (Chap. 3, section II) ont été prélevés sur le même plant et à la même période (printemps 2017). Une quantité importante de particules virales avait alors été détectée dans les racines (Fig. 4.9), avec un signal plus fort que dans les nervures centrales de feuille. Ce marquage supporte l'hypothèse d'une répartition du virus dans le bulbe, potentiellement liée à la saison ou à d'autres facteurs affectant la physiologie du bananier.

Ces mouvements de charge virale liés à la saison supportent la nécessité de réitérer des suivis d'infections en conditions de culture naturelles, où les saisons diffèrent du climat continental et peuvent impacter le mouvement des particules virales dans les plants.

## Régulation des infections BSV chez les bananiers hybrides

Les suivis de populations de bananiers hybrides natifs et synthétiques infectés suite à l'activation des intégrations eBSV, et principalement l'espèce eBSOLV, a permis de caractériser qualitativement (statut infectieux) et quantitativement (charge virale) les dynamiques d'infections au cours de temps. Une des observations majeures et partagée par les deux types d'hybrides concerne la fluctuation de la charge virale au cours du temps. Ces fluctuation d'infection chez les hybrides natifs aboutissent à une récupération au cours de l'essai pour 40% des plants. De tels retours à un phénotype sain après une infection ne sont en revanche pas observé parmi les six hybrides synthétiques suivis.

La résistance des bananiers diploïdes pour le génome B (BB, ABB) aux infections BSV ainsi que la production de siARN à partir des eBSV chez PKW (Duroy, 2012; Lheureux, 2002) supportait l'hypothèse d'un mécanisme de défense antivirale majeur chez les plantes : l'interférence par ARN. L'hypothèse que les régulations que nous avons observé sont basées sur l'interférence par ARN est fortement supportée par nos résultats. Ce mécanisme est le mécanisme majeur décrit à ce jour pour la défense antivirale, parmi les nombreux mécanismes de défense développés par les espèces végétales contre leurs pathogènes, tels que la modulation de la signalisation hormonale, la reconnaissance de motifs PAMP (Pathogen-Associated

Molecular Pattern) ou d'effecteurs viraux par les domaines NB-LRR (nucleotide-binding leucine rich repeat) de protéines de résistance, activant des réactions immunitaires via l'expression de gènes de défenses (Calil and Fontes, 2017).

**Un mécanisme de régulation réversible entre TGS et PTGS**

Les comparaisons entre charge virale et profil de petits ARN antiviraux à différentes étapes de la régulation d'infection ont permis de mettre en évidence un mécanisme de régulation réversible basé sur l'interférence par ARN. Lorsque les plants sont sains, nous avons détecté la production d'ARN antiviraux principalement de 24-nt qui témoignent généralement d'une régulation transcriptionnelle (**TGS**). Ce niveau de régulation des eBSV permet de maintenir un phénotype sain, en l'absence de stress environnementaux activateurs. La production d'ARN antiviraux chez des hybrides AAB sains se rapproche de celle caractérisée chez le géniteur diploïde BB (PKW), avec des petits ARN de 24-nt principalement, et issus des eBSV (Duroy, 2012, thèse). Hors, ce diploïde BB est résistant aux infections BSV, quels que soient les stress appliqués et l'origine, endogène (eBSV) ou exogène (virus épisomal transmis par cochenille), de l'infection (Lheureux, 2002, thèse). Ces résultats supportent l'hypothèse d'une régulation des infections BSV médiée par les eBSV hébergés dans le génome B.

Le mécanisme que nous proposons pour expliquer la régulation des eBSV et BSV chez les hybrides AAB natifs est le suivant (Fig. 5.3) :

***Régulation basale des eBSV en conditions optimales de croissance : Cas A (Fig.5.3)***

En conditions de croissance optimale, le plant hôte produit des ARN de 24-nt à partir des eBSV, probablement *via* la Pol IV qui synthétise les précurseurs des **hetsiRNA** (heterochromatin-associated siRNA, voir Introduction, Fig. 1.18). Les légers taux d'ARN antiviraux de 21- et 22-nt peuvent également résulter d'un faible niveau de transcription dans certaines cellules par la Pol II, synthétisant des transcrits issus de séquences inversées-répétées et formant donc des structures en tige-boucle, susceptibles d'être clivées par différentes DCL pour former des **hp-siRNA** (hairpin-derived siRNA, Fig. 1.18) de 21-, 22- et 24-nt (Pooggin, 2018). La production supposée de séquences BSV extra-chromosomiques chez des plantains sains (*Article 1*) supporte également l'hypothèse d'un taux basal de transcription des eBSV en conditions optimales variant selon la physiologie du plant.

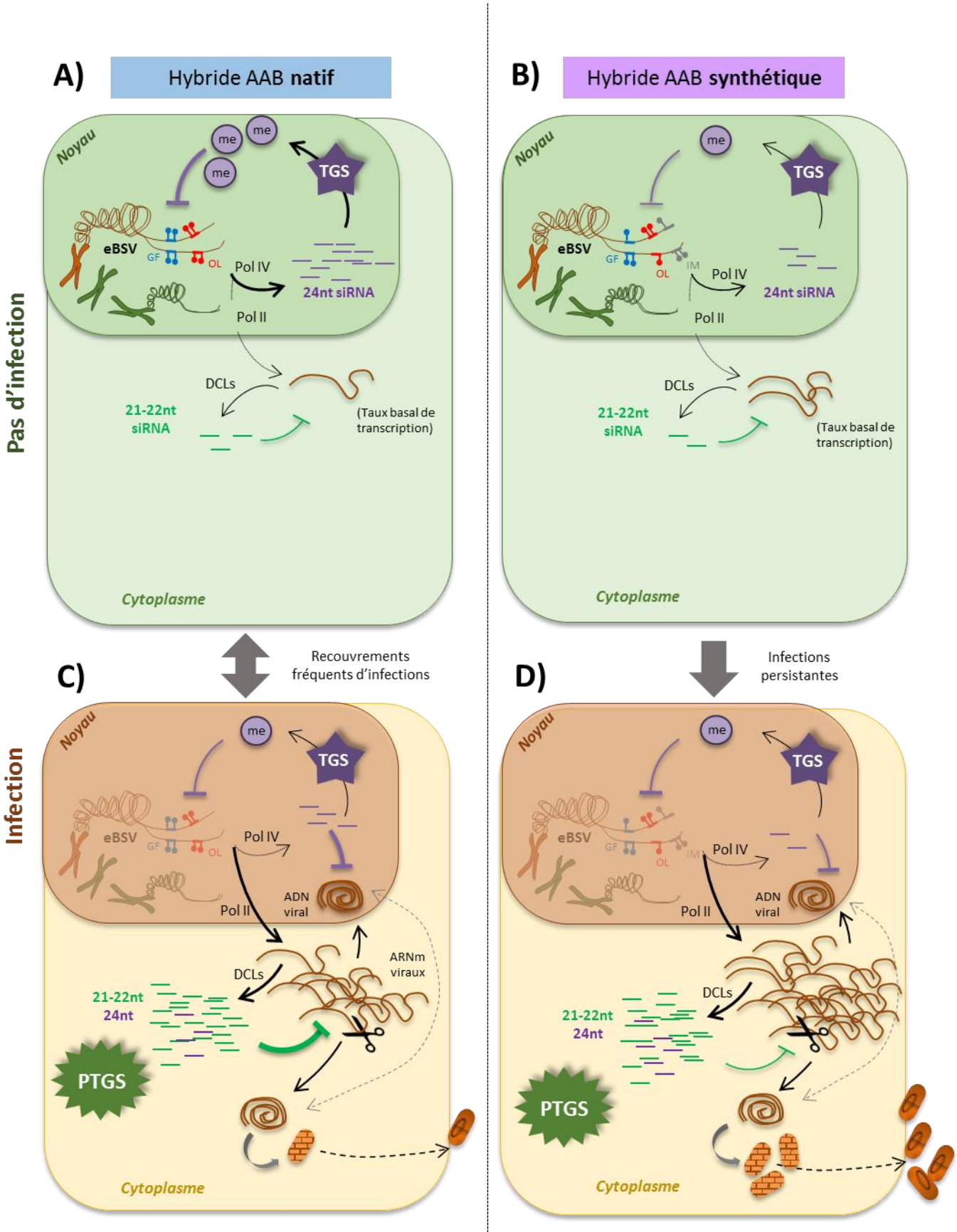



**Figure 5.3: Modèle général de régulation des eBSV et BSV chez des bananiers hybrides AAB natifs et synthétiques.** L'épaisseur des traits est proportionnelle à l'intensité de l'action illustrée.

Ainsi, chez les hybrides AAB, la régulation basale reposant principalement sur le TGS peut induire un phénotype sain en conditions optimales, mais n'est pas suffisante pour maintenir la répression des séquences eBSV lors de stress environnementaux (multiplication végétative, stress abiotiques et biotiques) dans toutes les cellules de la plante. Le relâchement de méthylation au niveau des eBSV lors de ces stress, et potentiellement lié à l'activation des éléments transposables environnants, permettrait alors un plus haut niveau de transcription des eBSV, menant à la restitution d'un génome viral complet et déclenchant une infection dans les cellules les plus exposées aux stress. On peut émettre ici l'hypothèse d'un « **seuil de transcription basale** » permettant la régulation des eBSV. La passage d'un phénotype sain à un phénotype infecté résulterait d'un niveau de transcription surpassant ce seuil, et contournant la régulation basale TGS.

L'étude détaillée des régions productrices de siARN antiviraux sur les séquences eBSV, et la comparaison de ces régions entre des hybrides AAB sains et le diploïde BB PKW, révèle des différences entre les mécanismes de production basale de siARN antiviraux (Ricciuti and Pooggin, 2019, article en préparation). En effet, les siARN impliqués dans le TGS chez les hybrides AAB sont produits exclusivement à partir des régions en répétition directe. Chez le diploïde BB PKW en revanche, les siARN antiviraux sont majoritairement produits à partir des régions inversées-répétées, en supplément des régions en répétition directe. La présence des eBSV à l'état hétérozygote (deux allèles différents) chez le diploïde BB peut en partie expliquer ces différences, bien que cela reste à démontrer (Duroy et Chabannes, en cours). Néanmoins, ces observations révèlent que les différences de régulation entre AAB et BB ne résultent peut-être pas uniquement d'un effet « dose-dépendant » du génome B (lié à la ploïdie) mais également de mécanismes structure-dépendants et distincts entre les génomes AAB et BB.

***Déclenchement d'infection et régulation PTGS : Cas C (Fig. 5.3)***

Lors d'infections issues d'eBSV, les profils d'ARN antiviraux indiquent une augmentation de la production de siARN antiviraux, dérivant probablement du génome épisomal qui est la cible d'un autre niveau de régulation, post-transcriptionnel (PTGS). La régulation de la multiplication des virus à ADN implique plusieurs enzymes DCL qui clivent les précurseurs ARN (issus des transcrits viraux) en siARN de 21- , 22- et 24-nt (Ding and Voinnet, 2007; Dunoyer, 2009; Pooggin, 2018). Les siARN antiviraux de 21- et 22-nt guident alors la régulation PTGS vers les autres copies de génomes viraux tandis que les siARN de 24-nt guident la méthylation de l'ADN viral pour limiter sa transcription (TGS). Chez les hybrides AAB natifs, cette régulation PTGS semble parvenir à contrôler les infections BSV et abouti à

des modulations de l'état infectieux des plants au cours de temps, avec une partie des plantains récupérant un phénotype sain après une infection. La caractérisation des profils de siARN lors de tels recouvrements chez des hybrides natifs indique un retour à une régulation TGS prédominante, avec des siARN de 24-nt principalement (retour au cas **A**).

**Une régulation moins efficace chez les hybrides synthétiques**

Le suivi d'infections BSV chez des hybrides synthétiques indique également des fluctuations de la charge virale au cours du temps, comme reporté pour les hybrides natifs. Néanmoins, ces fluctuations ne modulent pas l'état infectieux des plants, qui restent pour la quasi-totalité infectés tout au long de l'essai. Seuls quelques rejets (comme le rejet 3 du plant HS-15, étudié dans le chapitre 2) présentent une récupération d'infection, bien que transitoire (sur une date seulement). Ces observations supportent l'hypothèse d'une régulation de même type mais moins efficace chez les hybrides synthétiques. Le mécanisme de régulation que nous proposons chez des hybrides synthétiques est le suivant (Fig. 5.3) :

***Une régulation basale des eBSV moins efficace que les hybrides natifs : Cas** B*

Nous n'avions pour cet essai aucun hybride synthétique porteur des allèles infectieux eBSOLV-1 et eBSGFV-7 et dépourvus de particules virales, et nos hypothèses quant à la régulation basale (TGS) des eBSV chez les hybrides AAB synthétiques reposent donc uniquement sur le cas de récupération d'infection étudié chez un des rejets (rejet 3 du plant HS-15). Néanmoins lors de cette récupération, le profil d'ARNs antiviraux ressemble à ceux observés chez les hybrides natifs sains, avec une majorité de siARN de 24-nt et probablement impliqués dans le TGS. Cela supporte l'hypothèse d'une régulation basale TGS chez les hybrides synthétiques, issue du même mécanisme structure-dépendant que les hybrides natifs. Il est intéressant de noter que l'abondance de ces siARN de 24-nt chez cet hybride synthétique après récupération d'infection est inférieure à celle observée chez les hybrides natifs sains ou ayant récupérés d'une infection. Une production plus faible de siARN pour le TGS pourrait faciliter le relargage de particules virales suite à des stress environnementaux, résultant en un taux d'activation des eBSV plus important que chez les hybrides natifs. Pour reprendre l'hypothèse d'un seuil de transcription basale, celui-ci serait chez les hybrides synthétiques plus bas que chez les hybrides natifs. Néanmoins cette hypothèse nécessite d'être vérifiée avec des hybrides synthétiques porteurs sains d'eBSV infectieux, si de tels individus existent.

### *Une régulation des infections BSV moins efficace que les hybrides natifs: Cas D*

Les profils de siARN antiviraux chez les hybrides interspécifiques subissant une infection BSOLV d'origine endogène ressemblent à ceux obtenus chez les hybrides natifs, avec une abondance plus importante de siARN, de 21-, 22- et 24-nt et recouvrant l'intégralité du génome épisomal. Cela indique que le mécanisme de régulation PTGS mis en place lors d'une infection est le même entre hybrides natifs et synthétiques. Cependant les dynamiques d'infections diffèrent entre les deux types d'hybrides, et peu de rejets ou plants récupèrent d'une infection malgré une production importante de siARN antiviraux. Hors, on sait que la multiplication du BSV lors d'infections chez des bananiers Cavendish (AAA) contourne la régulation PTGS et induit des infections persistantes (Rajeswaran et al., 2014b). Ce contournement ne semble pas reposer sur le mécanisme de « leurre » proposé pour d'autres virus de la famille des *Caulimoviridae* (Pooggin and Ryabova, 2018b), et pourrait être lié à l'expression d'un suppresseur viral de « silencing » (VSR), bien que cela n'ait jamais été étudié pour le BSV. On peut donc supposer que malgré la présence d'un génome B chez les hybrides synthétiques, la régulation PTGS ne soit pas suffisante pour récupérer de l'infection, bien qu'elle parvienne à réguler la charge virale au cours du temps. Par ailleurs, cette charge virale chez les hybrides synthétiques est légèrement mais significativement plus importante que celle mesurée chez les hybrides natifs (Chap. 1), ce qui supporte l'hypothèse d'une régulation PTGS moins efficace et d'une multiplication virale plus persistante.

## Hybrides AAB – eBSV : une histoire de coévolution

### *Les eBSV, marqueurs d'un avantage sélectif*

La présence d'intégrations eBSV est considérée comme le résultat d'un avantage évolutif conféré à leur hôte. Leur fixation dans les génomes B des bananiers diploïdes est supposée avoir été sélectionnée dans un contexte épidémique fort, pour renforcer les défenses antivirales lors d'infections BSV il y a 0,6 Millions d'années (Duroy et al., 2016; Iskra-Caruana et al., 2014b). Une fois cette pression de sélection passée, les intégrations eBSV ont été largement réarrangées et ont subi des points de mutations, reflétant un processus de pseudogénisation aboutissant pour certains allèles eBSV à une inactivation complète des séquences virales chez ces mêmes bananiers diploïdes tout en développant un mécanisme de régulation basé sur l'interférence par ARN. Une hypothèse pour leur maintien est que le coût évolutif d'une élimination totale ait été trop important voire létal pour le bananier. Ces allèles inactivés sont aujourd'hui largement

retrouvés dans la diversité de génome B observée au niveau des hybrides interspécifiques (AB, ABB et AAB) (Duroy et al., 2016), et semblent avoir été détournés par l'hôte bananier pour conférer une résistance complète aux infections BSV même médiée par cochenilles, à l'instar du génome BB de PKW (Lheureux, 2002). Néanmoins, les génomes du sous-groupe des plantains hébergent encore des intégrations infectieuses, tout en ayant un phénotype sain en conditions optimales de culture et en ayant un mécanisme de défense leur permettant de récupérer des infections d'origine endogène. Le maintien de ces allèles infectieux dans les populations d'hybrides natifs confère une régulation efficace contre les infections BSV comme celles reportées dans mes travaux. Un moyen de confirmer l'apport des eBSV dans la régulation antivirale serait d'inclure, dans des suivis d'infections, des bananiers dépourvus de génome B (tels que le sous-groupe Cavendish, AAA) soumis à une infection BSV. En effet, bien qu'une régulation basée sur l'interférence par ARN ait été mise en évidence chez des triploïdes AAA infectés par six espèces BSV, elle n'est pas suffisante pour réguler ces infections (Rajeswaran et al., 2014b). En comparant ainsi des hybrides natifs, hybrides synthétiques et non hybrides (AAA), il serait possible d'estimer la contribution relative des eBSV et de l'historique de coévolution lors de régulations d'infections. Pour nos essais, le faible nombre de bananiers Cavendish infectés ainsi que leur état physiologique affaibli par l'infection ne nous ont pas permis de les intégrer aux suivis d'infections.

***Une interaction hôte – pathogène mutualiste***

Nos résultats tendent à montrer que les intégrations eBSV confèrent une défense antivirale renforcée lors d'infections BSV grâce à la production de siARN antiviraux associée aux eBSV, justifiant ainsi leur maintien dans les génomes hybrides AAB de bananiers. Ce type d'interaction est cohérent avec les hypothèses qui ont émergé suite à la caractérisation de nombreux éléments viraux endogènes (EVEs) dans les génomes de plantes et parfois de production de siARN antiviraux en dérivant (voir Introduction, section III.3). De telles relations mutualistes entre séquences virales intégrées et génomes hôtes sont largement décrites dans le règne animal, où les intégrations virales de rétrovirus (ERV pour « endogenous retrovirus ») ont contribué au développement du système immunitaire *via* différents mécanismes de coévolution (Blanco-Melo et al., 2017; Chuong et al., 2016; Frank and Feschotte, 2017; Magiorkinis and Hurst, 2015). Au-delà de l'aspect immunitaire, les ERV représentent chez les mammifères entre 5 et 15% du génome (Frank and Feschotte, 2017) et on peut considérer ces éléments génétiques comme une source majeure de diversité génétique au sein des génomes

hôtes, au même titre que les éléments transposables (Gilbert and Feschotte, 2018). Leur origine est d'ailleurs probablement commune, les virus codant pour une RT étant suspectés d'avoir dérivé d'éléments rétro-transposables après acquisition de gènes de capsides (Krupovic et al., 2018b).

Du point de vue évolutif, la fixation des eBSV dans les génomes de bananiers au cours de leur évolution a apporté un avantage immunitaire contre des infections environnantes, tout en offrant au virus un double mode de transmission. En effet, la fixation du virus dans le génome hôte lui permet une transmission verticale, notamment *via* la propagation clonale de masse, probablement responsable de la prévalence mondiale du BSV. De plus, le relargage sporadique de particules virales à partir des eBSV, et désormais démontrées comme transmissibles par cochenilles, ajoute une seconde route de transmission pour le virus. Si la fluctuation de la charge virale au cours d'une infection peut être regardée comme un facteur limitant de la dispersion du virus ; elle reflète parfaitement le compromis nécessaire au virus pour persister dans une population. En effet, la fluctuation de la charge virale et de la sévérité de l'infection permet de diminuer l'impact sur la « fitness » de l'hôte et augmente ainsi les chances de transmission par son vecteur (ici, les cochenilles).

### *Un équilibre en péril avec la création de nouveaux hybrides*

La découverte des intégrations eBSV dans les génomes B de bananier a suivi les observations d'infections spontanées dans des parcelles d'hybrides synthétiques (AAAB, FHIA-21 et CRBP39) testés au champ. Lors de l'étude génétique de ces intégrations, et de leur caractère allélique, les bananiers issus de croisement interspécifiques (BBxAAAA, triploïdes AAB) et porteurs de l'allèle infectieux eBSOLV-1 ont tous déclenché une infection BSOLV (Lheureux, 2002). Ces observations nous ont poussé à comparer la régulation d'infections chez des hybrides synthétiques à celle mise en place chez des hybrides natifs au cours de leur coévolution avec les eBSV. Les résultats obtenus dans mes travaux, reportant chez les hybrides synthétiques de très rares cas de recouvrement d'infection qui s'avèrent rapidement instables dans le temps ; ainsi qu'une production basale (TGS) de siARN plus faible, supportent l'hypothèse d'une régulation antivirale moins efficace chez les hybrides synthétiques. Cela indiquerait que la culture intensive de tels hybrides, récemment créés au sein de programmes de sélection, représente un risque épidémique plus important qu'avec des hybrides natifs tels que les plantains.

Parallèlement, deux autres EPRV infectieux reportés chez d'autres espèces végétales déclenchent des infections uniquement chez des hybrides interspécifiques récents. L'activation des eTVCV chez le tabac a été reportée chez l'espère *Nicotiana edwardsonii* (Lockhart et al., 2000), un hybride interspécifique de *N. glutinosa* et *N. clevelandii*, créé en 1979 pour servir de modèle pour diverses infections virales (Christie and Hall, 1979). Chez le pétunia, l'activation des ePVCV induisant une infection a été reportée chez *Petunia hybrida*, une espèce commerciale d'ornement et issue d'un croisement interspécifique datant du début de XIX$^{ème}$ siècle entre les espèces *P. axillaris* et *P. integrifolia* (Richert-Pöggeler et al., 2003). Pour chacun de ces deux cas, le parent duquel sont hérités les EPRV infectieux ne montre pas d'infection, à l'instar de PKW dans notre pathosystème bananier – eBSV. De plus, ces EPRV sont également intégrés dans des régions riches en rétro-éléments (Gregor et al., 2004 ; Richert-Pöggeler et al., 2003), facilitant ainsi leur activation à l'issue de stress. Le caractère récent de ces deux hybrides interspécifiques supporte l'hypothèse d'une régulation fragilisée par l'hybridation récente et artificielle d'espèces dans le cadre de programmes de recherche ou de sélection variétale, comme pour le bananier. Ainsi, les mécanismes mutualistes développés entre virus et hôte lors de leur coévolution pourraient être mis en péril avec la création de nouveaux hybrides interspécifiques.

## Transmission du virus par cochenilles vectrices

Les tests de transmission présentés dans le troisième chapitre de ce manuscrit ont permis de reporter la transmission de particules virales BSV d'origine endogène, issues de l'intégration eBSOLV-1, à un plant sain *via* deux espèces de cochenilles. De telles infections ne sont pas contrôlables, et leur déclenchement est susceptible d'être de plus en plus fréquent dans les décennies à venir, notamment à cause de cultures intensives d'hybrides natifs avec du génome B (tels que les plantains AAB). Le caractère transmissible de ces infections est un argument clé en faveur d'un risque épidémique avéré. De plus, si *Planococcus citri* avait déjà été reportée comme espèce vectrice du BSV, l'espèce *Dysmicoccus neobrevipes* est quant à elle une nouvelle espèce vectrice (voir la « *Disease Note »* présentée à la fin du Chapitre 3) portant à sept le nombre d'espèces vectrices du BSV décrites à ce jour (avec *Planococcus citri, Planococcus ficus, Paracoccus burnerae, Pseudococcus comstiki, Saccharicoccus sacchari* et *Dysmicoccus brevipes*) (Jones, 1999; Kubiriba et al., 2001; Lockhart and Olszewski, 1993; Meyer et al., 2008b; Muturi et al., 2013). Il est possible que d'autres espèces de cochenilles s'ajoutent à cette liste puisque au moins vingt espèces de cochenilles appartenant à 14 genres distincts sont capables de coloniser les bananiers (Watson and Kubiriba, 2005).

### Des tests de transmission à répéter et améliorer

L'hypothèse développée en amont des tests de transmission proposait que la régulation des infections chez les hybrides natifs, permettant parfois une récupération des infections, limitait l'inoculum viral accessible aux cochenilles vectrices pour une transmission. Les essais présentés dans le chapitre 3 ne nous permettent pas de tester cette hypothèse, mais apportent néanmoins des informations intéressantes quant à la transmission de BSV à partir d'hybrides AAB natifs. Les tests de transmission réalisés reportent de faibles taux de transmission avec l'espèce *Dysmicoccus neobrevipes.* Parallèlement, seuls trois tests ont été réalisés avec *P. citri*, mais le succès de la transmission avec un des lots testés pour chacun des tests semble indiquer une meilleure efficacité de transmission. L'absence d'un nombre suffisant de répétitions ne nous permet pas de conclure sur le risque de transmission du BSV par les deux espèces testées. Néanmoins, les informations relatives à la mise en place de l'infection et de sa régulation chez des bananiers hybrides nous permettent de connaître les paramètres clés à étudier pour répéter un test de transmission plus intégratif :

i. **La diversité des dynamiques d'infection** parmi les plants étudiés lors de nos essais indique qu'il est nécessaire de réaliser un test de transmission sur un nombre important de plants, pour couvrir la diversité de réaction à une infection. Une population de bananiers issus de culture *in vitro*, sevrés simultanément et cultivés dans les mêmes conditions de culture permettrait de s'affranchir de biais majeurs comme l'âge du plant.
ii. **La fluctuation de la charge virale dans le temps** implique qu'un test de transmission devrait être réalisé sur un cycle de culture complet, à intervalles de temps réguliers et idéalement à partir des mêmes plants. Le suivi en parallèle du titre viral dans le plant permettrait d'associer la dynamique d'infection avec le taux de transmission, et de repérer les pics d'infection (dates où le titre viral est le plus fort) pour voir si la transmission est plus efficace à ces périodes.

D'autres paramètres peuvent également être étudiés, tels que l'espèce BSV infectant le plant. Les études de transmission reportées pour le BSV ont été faites pour l'espèce BSOLV (Meyer et al., 2008a) ou sans reporter l'espèce infectieuse (Kubiriba et al., 2001). Pourtant, la prévalence en conditions naturelles de l'espèce BSGFV semble plus importante que celle de BSOLV, et il serait donc pertinent de mener des tests de transmission sur des bananiers infectés par l'espèce BSGFV. De plus, l'espèce de cochenille vectrice peut influer sur l'efficacité de transmission, comme cela a été montré pour le BSOLV (Meyer et al., 2008a) ou pour le GLRaV-3 (Almeida et al., 2013), et il donc pertinent de comparer plusieurs espèces pour la transmission de ce virus.

**Un inoculum viral acquis faible mais suffisant pour transmettre l'infection**

Par ailleurs, le test d'acquisition présenté dans le chapitre 3 indique un fort taux d'acquisition du BSV par l'espèce *P. citri*, bien qu'indépendante du titre viral dans la plante hôte et du génome de celle-ci (avec ou sans génome B). L'absence de corrélation entre génotype du plant source et taux d'acquisition semble indiquer que la régulation de l'infection mise en place par le bananier source n'affecte pas l'acquisition de particules virales par les cochenilles. Ainsi, on peut suggérer que l'acquisition du virus sera la même à partir d'un hybride natif ou synthétique. La localisation diffuse des particules virales dans les tissus de soutien et les tissus vasculaires des plants infectés accroît les chances d'acquisition par la cochenille lors des piqûres d'essais préalables à son alimentation sur bananier. Cependant la faible concentration de particules virales dans le phloème peut limiter la quantité d'inoculum viral acquis une fois la phase de ponction dans le phloème initiée.

Les trois transmissions réalisées avec *P. citri* (Chap. 3) laissent pourtant supposer qu'un faible inoculum viral de BSV acquis sur bananier infecté suffit à transmettre l'infection, bien que cet inoculum n'ait pas été mesuré dans les trois cas de transmission réussies. Si l'on considère cette hypothèse, l'acquisition du virus par 80 à 90% des lots de cochenille représente un risque pour la dispersion du virus dans une population de bananiers. Bien que nos travaux ne nous permettent pas de conclure sur le risque de transmission, ces forts taux d'acquisition représentent un inoculum viral mobile qui, au regard des changements climatiques à venir, risque d'augmenter. Dans ces conditions, l'évaluation du risque de dispersion du BSV reste une nécessité.

## Perspectives : quels contrôles de la dispersion du BSV dans une bananeraie ?

### Etat sanitaire du matériel végétal d'origine

Le premier niveau de contrôle du risque épidémique lié à une maladie de plante repose sur la vérification de l'état sanitaire du matériel végétal d'origine. Dans le cas de la culture bananière, ce contrôle est largement appliqué aux bananiers échangés internationalement, d'une part *via* l'échange de vitroplants, matériel végétal à faible risque sanitaire ; et d'autre part par la mise en place du diagnostic systématique des vitroplants pour les virus de bananiers connus, incluant le complexe d'espèce des Banana streak virus (Thomas et al., 2015). Ce processus d'échange de bananiers reste insuffisant pour contrôler le risque lié aux infections BSV d'origine endogène, et résultant de l'activation des intégrations eBSV hébergées dans les génomes B de bananier. En effet, bien que les facteurs activateurs des séquences virales eBSV soient connus, tels que la propagation clonale ou les stress thermiques (Côte et al., 2010b; Dahal et al., 1998; Dallot et al., 2001b), les activations restent toujours à ce jour spontanées et difficilement contrôlables. Ainsi, tout bananier hybride interspécifique AAB ou AAAB et porteur d'intégrations eBSV avec au moins un allèle infectieux présente un risque d'infection, une fois planté.

Face au caractère difficilement contrôlable d'infections BSV d'origine endogènes, deux stratégies de gestion durables du risque épidémique de mosaïque en tirets sont aujourd'hui en cours de développement, et concernent le matériel végétal de base. La première stratégie s'appuie sur l'obtention par amélioration et sélection variétale d'hybrides AAB à partir d'une diversité de géniteurs diploïdes BB « désarmés », parmi lesquels certains sont porteurs d'allèles eBSV non infectieux ou sans eBSV pour certaines espèces BSV et permettent donc de

s'affranchir du risque d'infections BSV spontanées (Umber et al., 2016). La deuxième stratégie s'appuie sur l'édition génique du génome B d'hybrides interspécifiques pour retirer partiellement ou intégralement les séquences eBSV *via* la méthode CRISPR-Cas9 (Tripathi et al., 2019; M. Chabannes, communication personnelle). Néanmoins, la stratégie d'élimination totale des intégrations eBSV présente un inconvénient non négligeable lié à l'avantage évolutif que confèrent ces intégrations virales pour leur hôte (discuté dans la section précédente). On peut en effet penser que des hybrides (A)AAB totalement dépourvus d'intégrations virales eBSV retrouvent une sensibilité à la mosaïque en tirets proche de celle des bananiers Cavendish, AAA. D'autre part, il est important de rappeler ici que la politique européenne actuelle ne permet pas le déploiement de variétés modifiées génétiquement telles que celles développées par la méthode CRIPSR-Cas9, et que cette stratégie de gestion de la maladie ne pourra pas s'appliquer aux culture bananières européennes, telles que celles déployées aux Antilles françaises.

**Contrôle des populations de vecteurs**

Le contrôle des populations de vecteurs de maladies repose initialement sur la connaissance des espèces vectrices. Les particules virales de Banana streak virus sont transmises horizontalement par diverses espèces de cochenilles (Kubiriba et al., 2001; Meyer et al., 2008a), dont la liste est probablement incomplète. En effet, une nouvelle espèce de cochenille, *Dysmicoccus neobrevipes,* a été reportée comme vectrice du BSV lors de nos travaux, et il serait pertinent de tester pour la transmission du BSV toutes les espèces de cochenilles retrouvées sur bananiers, et dans diverses régions du monde, pour tenter de construire une liste des vecteurs de BSV la plus exhaustive possible. De plus, une grande diversité d'espèces de cochenilles sont retrouvées sur bananiers (Watson and Kubiriba, 2005), et pourraient inclure des espèces vectrices non identifiés comme telles. Lorsque les vecteurs d'une maladie sont connus, une des stratégies de gestion de maladie repose sur le contrôle de leur population. L'observation régulière de la zone de culture permet tout d'abord de détecter la présence des vecteurs majoritaires. Dans le cas de virus transmis par cochenilles, comme le Banana streak virus, les stades de développement les plus mobiles, et donc plus aptes à transmettre le virus, sont les premiers stades larvaires (Daane et al., 2012). Les campagnes d'observation pour détecter des cochenilles doivent donc être organisées avant que des individus adultes (les femelles étant les plus visibles) infestent la parcelle, indiquant la présence potentielle de nombreuses larves.

Lorsqu'une population de cochenille est identifiée sur une parcelle, différents moyens de lutte existent. Il existe sur le marché des insecticides efficaces contre les cochenilles

(néonicotinoïdes, inhibiteurs synthétiques) et déjà utilisés pour contrôler la dispersion par cochenilles des virus causant la maladie de l'enroulement de la vigne dans les vignobles (Daane et al., 2012). Dans un contexte de limitation de l'usage de pesticides et insecticides, des approches de lutte biologique sont également développées, avec notamment l'identification d'un parasitoïde de cochenilles, *Anagyrus pseudococci*, efficace contre l'espèce *Planococcus citri*. Des pièges à phéromone ont également été développés pour l'espèce *Planococcus ficus* (Walton et al., 2004) mais ne sont pas encore développés à ce jour pour les espèces décrites comme vectrices du BSV.

**Organisation spatiale des cultures**

Dans le cas des infections BSV d'origine endogènes, le risque d'épidémie de mosaïque en tirets est à considérer non seulement pour les bananiers plantains, sources naturelles d'inoculum viral, mais également et surtout pour les bananiers Cavendish, suspectés d'après les observations au champs d'être plus sensibles à la maladie de la mosaïque en tirets. C'est pourquoi les tests de transmission réalisés lors de ces travaux ont été faits à partir de plantains infectés vers des bananiers Cavendish sains. La transmission horizontale du BSV fait intervenir différentes espèces de cochenilles, et bien que l'efficacité de transmission puisse varier selon l'espèce, elles sont caractérisées par une faible mobilité. Des études de dispersion du BSV sur des parcelles de bananiers Cavendish AAA en Ouganda montrent que cette dispersion est caractérisée par des « effets de bords » (en anglais : « edge effect »), reflétant la transmission du virus de plant à plant, probablement par le passage de cochenille par la canopée des bananiers (Kubiriba et al., 2001). Cette dispersion semble néanmoins limitée dans l'espace, puisque des plants infectés ont été détecté jusqu'à 10 lignes (rangées de bananiers) au-delà du point focal d'infection (premier plant infecté). Des études de la transmission du GLRaV-3 (*Grapevine leafroll associated virus 3*) par cochenilles dans des vignobles ont également conclu à des effets de bords de la dispersion (Cabaleiro and Segura, 1997). Pour la culture de la vigne, la gestion de la maladie de l'enroulement de la vigne, causée par un complexe d'espèces virales (incluant le GLRaV3) transmis par cochenilles, repose en partie sur l'espacement des vignobles par un « cordon sanitaire », c'est-à-dire un espace sans vignes (avec une largeur de 10 à 25 mètres selon le risque évalué dans chacune des parcelles, Almeida et al., 2013). On peut envisager des pratiques culturales similaires quant à la culture bananière, en espaçant les parcelles d'hybrides AAB de celles de Cavendish AAA, et en définissant la largeur d'un cordon sanitaire en fonction des espèces de cochenilles présentes dans la région et de leur rayon de mobilité (à mesurer préalablement). L'association de cultures peut également représenter une barrière à la

dispersion du virus à l'intérieur même d'une parcelle. La gamme d'hôte du BSV est restreinte aux genres *Musa* et *Ensete*, et une récente prospection dans la région d'origine de diversité du bananier n'a pas permis d'identifier des hôtes alternatifs (communication personnelle). L'association de bananiers avec d'autres plantes d'intérêts agronomiques (cacaoyer, légumineuses) peut s'avérer être un avantage dans le contrôle d'épidémies de mosaïque en tirets. Il est aujourd'hui nécessaire de repenser les cultures intensives telles que celle du bananier au regard des risques épidémiques, et d'avoir un regard intégratif sur les différents facteurs de ces risques, afin de ne pas répéter certaines erreurs agronomiques du passé.

# REFERENCES

Aiewsakun, P., Katzourakis, A., 2015. Endogenous viruses: Connecting recent and ancient viral evolution. Virology 479–480, 26–37. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.011

Alliaume, A., 2016. Biologie de la vection de l'ampélovirus GLRaV-1 et du vitivirus GVA par la cochenille Phenacoccus aceris (thesis). Strasbourg.

Almeida, R.P.P., Daane, K.M., Bell, V.A., Blaisdell, G.K., Cooper, M.L., Herrbach, E., Pietersen, G., 2013. Ecology and management of grapevine leafroll disease. Front Microbiol 4. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00094

Ambros, V., 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. Cell 107, 823–826. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00616-x

Argent, G.C.G., 1976. The wild bananas of Papua New Guinea Notes Roy.Bot. Garden Edinburgh, 77–114.

Astier, S., 2001. Principes de virologie végétale. Génome, pouvoir pathogène, écologie des virus, 1ère édition. ed. INRA.

Bakry, F., Carreel, F., Jenny, C., Horry, J.-P., 2009. Genetic Improvement of Banana, in: Jain, S.M., Priyadarshan, P.M. (Eds.), Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species. Springer New York, New York, NY, pp. 3–50. https://doi.org/10.1007/978-0-387-71201-7_1

Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. Bacteriol Rev 35, 235–241.

Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 116, 281–297. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5

Becher, H., Ma, L., Kelly, L.J., Kovarik, A., Leitch, I.J., Leitch, A.R., 2014. Endogenous pararetrovirus sequences associated with 24 nt small RNAs at the centromeres of *Fritillaria imperialis* L. (Liliaceae), a species with a giant genome. The Plant Journal 80, 823–833. https://doi.org/10.1111/tpj.12673

Bejarano, E.R., Lichtenstein, C.P., 1994. Expression of TGMV antisense RNA in transgenic tobacco inhibits replication of BCTV but not ACMV geminiviruses. Plant Mol. Biol. 24, 241–248. https://doi.org/10.1007/bf00040592

Bertsch, C., Beuve, M., Dolja, V.V., Wirth, M., Pelsy, F., Herrbach, E., Lemaire, O., 2009. Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. Biology Direct 4, 21. https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-21

Bhat, A., Hohn, T., Selvarajan, R., 2016. Badnaviruses: The Current Global Scenario. Viruses 8, 177. https://doi.org/10.3390/v8060177

Blanco-Melo, D., Gifford, R.J., Bieniasz, P.D., 2017. Co-option of an endogenous retrovirus envelope for host defense in hominid ancestors. eLife 6. https://doi.org/10.7554/eLife.22519

Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P.V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.-S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Hohn, T., Pooggin, M.M., 2006. Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. Nucleic Acids Res. 34, 6233–6246. https://doi.org/10.1093/nar/gkl886

Bombarely, A., Moser, M., Amrad, A., Bao, M., Bapaume, L., Barry, C.S., Bliek, M., Boersma, M.R., Borghi, L., Bruggmann, R., Bucher, M., D'Agostino, N., Davies, K., Druege, U., Dudareva, N., Egea-Cortines, M., Delledonne, M., Fernandez-Pozo, N., Franken, P., Grandont, L., Heslop-Harrison, J.S., Hintzsche, J., Johns, M., Koes, R., Lv, X., Lyons, E., Malla, D., Martinoia, E., Mattson, N.S., Morel, P., Mueller, L.A., Muhlemann, J., Nouri, E., Passeri, V., Pezzotti, M., Qi, Q., Reinhardt, D., Rich, M., Richert-Pöggeler, K.R., Robbins, T.P., Schatz, M.C., Schranz, M.E., Schuurink, R.C., Schwarzacher, T., Spelt, K., Tang, H., Urbanus, S.L., Vandenbussche, M., Vijverberg, K., Villarino, G.H., Warner, R.M., Weiss, J., Yue, Z., Zethof, J., Quattrocchio, F., Sims, T.L., Kuhlemeier, C., 2016. Insight into the evolution of the Solanaceae from the parental genomes of Petunia hybrida. Nature Plants 2, 16074. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.74

Borges, F., Martienssen, R.A., 2015. The expanding world of small RNAs in plants. Nat Rev Mol Cell Biol 16, 727–741. https://doi.org/10.1038/nrm4085

Brodersen, P., Voinnet, O., 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. Trends Genet. 22, 268–280. https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.03.003

Cabaleiro, C., Segura, A., 1997. Field Transmission of Grapevine Leafroll Associated Virus 3 (GLRaV-3) by the Mealybug Planococcus citri. Plant Disease 81, 283–287. https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.3.283

Calil, I.P., Fontes, E.P.B., 2017. Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. Ann. Bot. 119, 711–723. https://doi.org/10.1093/aob/mcw200

Carbonell, A., Carrington, J.C., 2015. Antiviral roles of plant ARGONAUTES. Curr. Opin. Plant Biol. 27, 111–117. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.06.013

Cerutti, H., Casas-Mollano, J.A., 2006. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. Curr. Genet. 50, 81–99. https://doi.org/10.1007/s00294-006-0078-x

Chabannes, M., Baurens, F.-C., Duroy, P.-O., Bocs, S., Vernerey, M.-S., Rodier-Goud, M., Barbe, V., Gayral, P., Iskra-Caruana, M.-L., 2013. Three Infectious Viral Species Lying in Wait in the Banana Genome. Journal of Virology 87, 8624–8637. https://doi.org/10.1128/JVI.00899-13

Chabannes, M., Iskra-Caruana, M.-L., 2013. Endogenous pararetroviruses—a reservoir of virus infection in plants. Current Opinion in Virology 3, 615–620. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.012

Champion, J., 1963. Le bananier, G.P. Maisonneuve & Larose. ed. Paris, France.

Chen, S., Liu, R., Koyanagi, K.O., Kishima, Y., 2014. Rice genomes recorded ancient pararetrovirus activities: Virus genealogy and multiple origins of endogenization during rice speciation. Virology 471–473, 141–152. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.014

Chen, S., Zheng, H., Kishima, Y., 2017. Genomic fossils reveal adaptation of non-autonomous pararetroviruses driven by concerted evolution of noncoding regulatory sequences. PLOS Pathogens 13, e1006413. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006413

Chen, X., 2008. MicroRNA Metabolism in Plants. Curr Top Microbiol Immunol 320, 117–136.

Chiba, S., Kondo, H., Tani, A., Saisho, D., Sakamoto, W., Kanematsu, S., Suzuki, N., 2011. Widespread Endogenization of Genome Sequences of Non-Retroviral RNA Viruses into Plant Genomes. PLoS Pathog 7. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002146

Christie, S., Hall, D., 1979. A new hybrid species of Nicotiana (Solanaceae). Baileya 133–136.

Chuong, E.B., Elde, N.C., Feschotte, C., 2016. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. Science 351, 1083–1087. https://doi.org/10.1126/science.aad5497

Cid, M., Fereres, A., 2010. Characterization of the Probing and Feeding Behavior of Planococcus citri (Hemiptera: Pseudococcidae) on Grapevine. Ann Entomol Soc Am 103, 404–417. https://doi.org/10.1603/AN09079

Cid, M., Pereira, S., Cabaleiro, C., Segura, A., 2010. Citrus Mealybug (Hemiptera: Pseudococcidae) Movement and Population Dynamics in an Arbor-Trained Vineyard. J Econ Entomol 103, 619–630. https://doi.org/10.1603/EC09234

Cogoni, C., Irelan, J.T., Schumacher, M., Schmidhauser, T.J., Selker, E.U., Macino, G., 1996. Transgene silencing of the al-1 gene in vegetative cells of Neurospora is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. EMBO J. 15, 3153–3163.

Côte, F.X., Galzi, S., Folliot, M., Lamagnère, Y., Teycheney, P.-Y., Iskra-Caruana, M.-L., 2010. Micropropagation by tissue culture triggers differential expression of infectious endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSV) present in the B genome of natural and synthetic interspecific banana plantains. Molecular Plant Pathology 11, 137–144. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00583.x

Creasey, K.M., Zhai, J., Borges, F., Van Ex, F., Regulski, M., Meyers, B.C., Martienssen, R.A., 2014. miRNAs trigger widespread epigenetically-activated siRNAs from transposons in Arabidopsis. Nature 508, 411–415. https://doi.org/10.1038/nature13069

Culver, J.N., Padmanabhan, M.S., 2007. Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. Annu Rev Phytopathol 45, 221–243. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094422

da Fonseca, G.C., de Oliveira, L.F.V., de Morais, G.L., Abdelnor, R.V., Nepomuceno, A.L., Waterhouse, P.M., Farinelli, L., Margis, R., 2016. Unusual RNA plant virus integration in the soybean genome leads to the production of small RNAs. Plant Science 246, 62–69. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.01.011

Daane, K., Almeida, bullet, Bell, V., Walker, bullet, Botton, M., Mani, M., Daane, K., Almeida, R., Bell, V., Walker, J., Botton, M., Fallahzadeh, M., Miano, J., Sforza, R., Walton, V., Zaviezo, T., 2012. Biology and Management of Mealybugs in Vineyards, in: Arthropod Management in Vineyards: Pests, Approaches, and Future Directions. pp. 271–307. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4032-7_12

Dahal, G., Hughes, J. d'A., Thottappilly, G., Lockhart, B.E.L., 1998. Effect of Temperature on Symptom Expression and Reliability of Banana Streak Badnavirus Detection in Naturally Infected Plantain and Banana ( *Musa* spp.). Plant Disease 82, 16–21. https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.1.16

Daniells, J.W., Geering, A.D.W., Bryde, N.J., 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, 51–60. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00130.x

De Langhe, E., 1961. La taxonomie du bananier plantain en Afrique Équatoriale. Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée 8, 417–449. https://doi.org/10.3406/jatba.1961.6820

Deeshma, K.P., Bhat, A.I., 2017. Occurrence of endogenous Piper yellow mottle virus in black pepper. VirusDisease 28, 213–217. https://doi.org/10.1007/s13337-017-0369-5

Ding, S.-W., Voinnet, O., 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell 130, 413–426. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.039

Diop, S.I., Geering, A.D.W., Alfama-Depauw, F., Loaec, M., Teycheney, P.-Y., Maumus, F., 2018. Tracheophyte genomes keep track of the deep evolution of the Caulimoviridae. Sci Rep 8. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16399-x

Dunoyer, P., 2009a. La bataille du silence: Mécanisme et inhibition du "RNA silencing" au cours des interactions plante/virus. Med Sci (Paris) 25, 505–512. https://doi.org/10.1051/medsci/2009255505

Dunoyer, P., 2009b. The battle of Silence : action and inhibition of RNA silencing during plant/virus interactions. Med Sci (Paris) 25, 505–511. https://doi.org/10.1051/medsci/2009255505

Dupressoir, A., Lavialle, C., Heidmann, T., 2012. From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: Role of the captured syncytins in placentation. Placenta 33, 663–671. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.005

Duroy, P.-O., 2012. Quels sont les enjeux au cours de l'évolution du bananier (Musa sp.) qui ont conduit au maintien de séquences virales de Banana Streak Virus dans son génome ? (thesis). Montpellier 2.

Duroy, P.-O., Perrier, X., Laboureau, N., Jacquemoud-Collet, J.-P., Iskra-Caruana, M.-L., 2016. How endogenous plant pararetroviruses shed light on Musa evolution. Annals of Botany 117, 625–641. https://doi.org/10.1093/aob/mcw011

Eid, S., Pappu, H.R., 2014. Expression of endogenous para-retroviral genes and molecular analysis of the integration events in its plant host Dahlia variabilis. Virus Genes 48, 153–159. https://doi.org/10.1007/s11262-013-0998-8

Fang, X., Qi, Y., 2016. RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. Plant Cell 28, 272–285. https://doi.org/10.1105/tpc.15.00920

Fargette, D., Konaté, G., Fauquet, C., Muller, E., Peterschmitt, M., Thresh, J.M., 2006. Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. Annu Rev Phytopathol 44, 235–260. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.120705.104644

Fei, Q., Xia, R., Meyers, B.C., 2013. Phased, Secondary, Small Interfering RNAs in Posttranscriptional Regulatory Networks. Plant Cell 25, 2400–2415. https://doi.org/10.1105/tpc.113.114652

Filloux, D., Murrell, S., Koohapitagtam, M., Golden, M., Julian, C., Galzi, S., Uzest, M., Rodier-Goud, M., D'Hont, A., Vernerey, M.S., Wilkin, P., Peterschmitt, M., Winter, S., Murrell, B., Martin, D.P., Roumagnac, P., 2015. The genomes of many yam species contain transcriptionally active endogenous geminiviral sequences that may be functionally expressed. Virus Evol 1, vev002. https://doi.org/10.1093/ve/vev002

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature 391, 806–811. https://doi.org/10.1038/35888

Frank, J.A., Feschotte, C., 2017. Co-option of endogenous viral sequences for host cell function. Curr Opin Virol 25, 81–89. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.07.021

Gambley, C.F., Geering, A.D.W., Steele, V., Thomas, J.E., 2008. Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (Ananas comosus), including members of two new badnavirus species. Arch. Virol. 153, 1599–1604. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0160-4

Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C., Hughes, J. d'A, 1997. First Report of Banana Streak Badnavirus in Plantain Landraces in Southern Cameroon, Central Africa. Plant Dis. 81, 1335. https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1335B

Gawel, N.J., Jarret, R.L., 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure forMusa andIpomoea. Plant Mol Biol Rep 9, 262–266. https://doi.org/10.1007/BF02672076

Gayral, P., Blondin, L., Guidolin, O., Carreel, F., Hippolyte, I., Perrier, X., Iskra-Caruana, M.-L., 2010. Evolution of endogenous sequences of banana streak virus: what can we learn from banana (Musa sp.) evolution? J. Virol. 84, 7346–7359. https://doi.org/10.1128/JVI.00401-10

Gayral, P., Iskra-Caruana, M.-L., 2009. Phylogeny of Banana Streak Virus Reveals Recent and Repetitive Endogenization in the Genome of Its Banana Host (Musa sp.). Journal of Molecular Evolution 69, 65–80. https://doi.org/10.1007/s00239-009-9253-2

Gayral, P., Noa-Carrazana, J.-C., Lescot, M., Lheureux, F., Lockhart, B.E.L., Matsumoto, T., Piffanelli, P., Iskra-Caruana, M.-L., 2008. A Single Banana Streak Virus Integration Event in the Banana Genome as the Origin of Infectious Endogenous Pararetrovirus. Journal of Virology 82, 6697–6710. https://doi.org/10.1128/JVI.00212-08

Geering, A.D., Olszewski, N.E., Dahal, G., Thomas, J.E., Lockhart, B.E., 2001. Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of Musa cultivars. Mol. Plant Pathol. 2, 207–213. https://doi.org/10.1046/j.1464-6722.2001.00071.x

Geering, A.D.W., 2005. Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. Journal of General Virology 86, 511–520. https://doi.org/10.1099/vir.0.80261-0

Geering, A.D.W., Maumus, F., Copetti, D., Choisne, N., Zwickl, D.J., Zytnicki, M., McTaggart, A.R., Scalabrin, S., Vezzulli, S., Wing, R.A., Quesneville, H., Teycheney, P.-Y., 2014. Endogenous florendoviruses are major components of plant genomes and hallmarks of virus evolution. Nature Communications 5. https://doi.org/10.1038/ncomms6269

Geering, A.D.W., Pooggin, M.M., Olszewski, N.E., Lockhart, B.E.L., Thomas, J.E., 2005. Characterisation of Banana streak Mysore virus and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated Musa. Arch. Virol. 150, 787–796. https://doi.org/10.1007/s00705-004-0471-z

Geering, A.D.W., Scharaschkin, T., Teycheney, P.-Y., 2010. The classification and nomenclature of endogenous viruses of the family Caulimoviridae. Arch Virol 155, 123–131. https://doi.org/10.1007/s00705-009-0488-4

Gilbert, C., Feschotte, C., 2018. Horizontal acquisition of transposable elements and viral sequences: patterns and consequences. Current Opinion in Genetics & Development 49, 15–24. https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.02.007

Gilbert, C., Feschotte, C., 2016. Virus et gènes viraux endogènes : évolution et impact. Virologie 20, 158–173.

Gregor, W., Mette, M.F., Staginnus, C., Matzke, M.A., Matzke, A.J.M., 2004. A distinct endogenous pararetrovirus family in Nicotiana tomentosiformis, a diploid progenitor of polyploid tobacco. Plant Physiol. 134, 1191–1199. https://doi.org/10.1104/pp.103.031112

Guo, S., Kemphues, K.J., 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. Cell 81, 611–620. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90082-9

Häkkinen, M., 2013. Reappraisal of sectional taxonomy in Musa (Musaceae). taxon 62, 809–813. https://doi.org/10.12705/624.3

Hamilton, A.J., Baulcombe, D.C., 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science 286, 950–952. https://doi.org/10.1126/science.286.5441.950

Hannon, G.J., Rossi, J.J., 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. Nature 431, 371–378. https://doi.org/10.1038/nature02870

Hansen, C., Heslop-Harrison, J.S., 2004. Sequences and Phylogenies of Plant Pararetroviruses, Viruses, and Transposable Elements, in: Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology. Academic Press, pp. 165–193. https://doi.org/10.1016/S0065-2296(04)41004-0

Hansen, C.N., Harper, G., Heslop-Harrison, J.S., 2005. Characterisation of pararetrovirus-like sequences in the genome of potato (Solanum tuberosum). Cytogenet. Genome Res. 110, 559–565. https://doi.org/10.1159/000084989

Harper, G., Dahal, G., Thottappilly, G., Hull, R., 1999. Detection of episomal banana streak badnavirus by IC-PCR. J. Virol. Methods 79, 1–8.

Harper, G., Hart, D., Moult, S., Hull, R., Geering, A., Thomas, J., 2005. The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. Arch. Virol. 150, 2407–2420. https://doi.org/10.1007/s00705-005-0610-1

Harper, G., Hull, R., 1998. Cloning and Sequence Analysis of Banana Streak Virus DNA. Virus Genes 17, 271–278. https://doi.org/10.1023/A:1008021921849

Harper, Glyn, Osuji, J.O., Heslop-Harrison, J.S. (Pat), Hull, R., 1999. Integration of Banana Streak Badnavirus into the Musa Genome: Molecular and Cytogenetic Evidence. Virology 255, 207–213. https://doi.org/10.1006/viro.1998.9581

Helliot, B., Panis, B., Poumay, Y., Swennen, R., Lepoivre, P., Frison, E., 2002. Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (Musa spp.). Plant Cell Rep 20, 1117–1122. https://doi.org/10.1007/s00299-002-0458-8

Heslop-Harrison, J.S., Schwarzacher, T., 2007. Domestication, Genomics and the Future for Banana. Ann Bot 100, 1073–1084. https://doi.org/10.1093/aob/mcm191

Hohn, T., Richert-Pöggeler, K.R., Staginnus, C., Harper, G., Schwarzacher, T., Teo, C.H., Teycheney, P.-Y., Iskra-Caruana, M.-L., Hull, R., 2008. Evolution of Integrated Plant Viruses, in: Roossinck, M.J. (Ed.), Plant Virus Evolution. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 53–81. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75763-4_4

Hull, R. (Ed.), 2014. Plant virology, Fifth edition. ed. Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston.

Iskra-Caruana, M., Chabannes, M., Duroy, P.-O., Muller, E., 2014a. A possible scenario for the evolution of Banana streak virus in banana. Virus Research 186, 155–162. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.005

Iskra-Caruana, M., Duroy, P.-O., Chabannes, M., Muller, E., 2014b. The common evolutionary history of badnaviruses and banana. Infection, Genetics and Evolution 21, 83–89. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.013

Iskra-Caruana, M.-L., Baurens, F.-C., Gayral, P., Chabannes, M., 2010. A four-partner plant–virus interaction: enemies can also come from within. Mol. Plant Microbe Interact. 23, 1394–1402. https://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0107

Jakowitsch, J., Mette, M.F., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J.M., 1999. Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 13241–13246.

James, A.P., Geijskes, R.J., Dale, J.L., Harding, R.M., 2011. Development of a Novel Rolling-Circle Amplification Technique to Detect *Banana streak virus* that also Discriminates Between Integrated and Episomal Virus Sequences. Plant Disease 95, 57–62. https://doi.org/10.1094/PDIS-07-10-0519

Jones, D.R. (Ed.), 2018. Handbook of diseases of banana, abacá and enset. CABI, Boston, MA.

Jones, D.R., 1999. Diseases of banana, abacá, and enset. Wallingford, Oxon, UK ; New York : CABI Pub.

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, 346–350.

King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B., 2011. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier.

Kørner, C.J., Pitzalis, N., Peña, E.J., Erhardt, M., Vazquez, F., Heinlein, M., 2018. Crosstalk between PTGS and TGS pathways in natural antiviral immunity and disease recovery. Nature Plants 4, 157–164. https://doi.org/10.1038/s41477-018-0117-x

Krupovic, M., Blomberg, J., Coffin, J.M., Dasgupta, I., Fan, H., Geering, A.D., Gifford, R., Harrach, B., Hull, R., Johnson, W., Kreuze, J.F., Lindemann, D., Llorens, C., Lockhart, B., Mayer, J., Muller, E., Olszewski, N.E., Pappu, H.R., Pooggin, M.M., Richert-Pöggeler, K.R., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Schoelz, J.E., Seal, S., Stavolone, L., Stoye, J.P., Teycheney, P.-Y., Tristem, M., Koonin, E.V., Kuhn, J.H., 2018. Ortervirales: New Virus Order Unifying Five Families of Reverse-Transcribing Viruses. J Virol 92. https://doi.org/10.1128/JVI.00515-18

Krupovic, M., Koonin, E.V., 2017. Homologous Capsid Proteins Testify to the Common Ancestry of Retroviruses, Caulimoviruses, Pseudoviruses, and Metaviruses. J Virol 91. https://doi.org/10.1128/JVI.00210-17

Kubiriba, J., Legg, J., Tushemereirwe, W., ADIPALA, E., 2006. Disease spread patterns of Banana streak virus in farmers, fields in Uganda. Annals of Applied Biology 139, 31–36. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00127.x

Kubiriba, J., Legg, J., W, T., E, A., 2001. Vector transmission of Banana streak virus in the screenhouse in Uganda. Annals of Applied Biology 139, 37–43. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2001.tb00128.x

Kumar, P.L., Selvarajan, R., Iskra-Caruana, M.-L., Chabannes, M., Hanna, R., 2015. Biology, Etiology, and Control of Virus Diseases of Banana and Plantain, in: Advances in Virus Research. Elsevier, pp. 229–269. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2014.10.006

Kunii, M., Kanda, M., Nagano, H., Uyeda, I., Kishima, Y., Sano, Y., 2004. Reconstruction of putative DNA virus from endogenous rice tungro bacilliform virus-like sequences in the rice genome: implications for integration and evolution. BMC Genomics 14.

Kurihara, Y., Watanabe, Y., 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101, 12753–12758. https://doi.org/10.1073/pnas.0403115101

Kwa, M., Temple, L., 2019. Importance des bananiers et des plantains [WWW Document]. Le bananier plantain. Enjeux socio-économiques et techniques, expériences en Afrique intertropicale. URL http://agritrop.cirad.fr/592763/ (accessed 7.2.19).

Lassoudière, A., 2007. Le bananier et sa culture. Ed. Quae.

Leisner, S.M., Turgeon, R., Howell, S.H., 1992. Long distance movement of cauliflower mosaic virus in infected turnip plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 5, 41–47.

Lemoine, R., Camera, S.L., Atanassova, R., Dédaldéchamp, F., Allario, T., Pourtau, N., Bonnemain, J.-L., Laloi, M., Coutos-Thévenot, P., Maurousset, L., Faucher, M., Girousse, C., Lemonnier, P., Parrilla, J., Durand, M., 2013. Source-to-sink transport of sugar and regulation by environmental factors. Front Plant Sci 4. https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00272

Lheureux, F., 2002. Etude des mécanismes génétiques impliqués dans l'expression des séquences EPRVs pathogènes des bananiers au cours des croisements génétiques interspécifiques (thesis). Montpellier, ENSA.

Lheureux, F., Carreel, F., Jenny, C., Lockhart, B.E.L., Iskra-Caruana, M.L., 2003. Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific Musa hybrids. Theor. Appl. Genet. 106, 594–598. https://doi.org/10.1007/s00122-002-1077-z

Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., Chen, X., 2005. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. Curr. Biol. 15, 1501–1507. https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.029

Li, Y.-C., Shen, J.-G., Zhao, G.-H., Yao, Q., Li, W.-M., 2018. A novel endogenous badnavirus exists in Alhagi sparsifolia. J Zhejiang Univ Sci B 19, 274–284. https://doi.org/10.1631/jzus.B1700171

Lim, S., Baek, D., Igori, D., Moon, J.S., 2017. Complete genome sequence of a putative new caulimovirus which exists as endogenous pararetroviral sequences in Angelica dahurica. Archives of Virology 162, 3837–3842. https://doi.org/10.1007/s00705-017-3517-8

Liu, J.-J., Goh, C.-J., Loh, C.-S., Liu, P., Pua, E.-C., 1998. A Method for Isolation of Total RNA from Fruit Tissues of Banana. Plant Molecular Biology Reporter 16, 87–87. https://doi.org/10.1023/A:1007492421119

Lockhart, B.E., 1992. Partial Purification and Serology of Sugarcane Mild Mosaic Virus, A Mealybug-Transmitted Closterolike Virus. Phytopathology 82, 691. https://doi.org/10.1094/Phyto-82-691

Lockhart, B.E., 1986. Purification and Serology of a Bacilliform Virus Associated with Banana Streak Disease. Phytopathology 76, 995. https://doi.org/10.1094/Phyto-76-995

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, 1579–1585. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-6-1579

Lockhart, B.E.L. (University of M., Olszewski, N.E., 1993. Serological and genomic heterogeneity of Banana Streak Badnavirus : implications for virus detection in Musa germplasm. Presented

at the International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests, Montpellier (France), 7-9 Sep 1992, CIRAD-FLHOR.

Magee, C.J.P., 1939. Pathological changes in the phloem and neighbouring tissues of the banana (Musa Cavendishii Lamb.) caused by the bunchy-top virus. Science Bulletin of the Department of Agriculture, New South Wales 67, 4–32.

Magiorkinis, G., Hurst, T.P., 2015. Activation of the innate immune response by endogenous retroviruses. Journal of General Virology 96, 1207–1218. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000017

Makarevitch, I., Waters, A.J., West, P.T., Stitzer, M., Hirsch, C.N., Ross-Ibarra, J., Springer, N.M., 2015. Transposable elements contribute to activation of maize genes in response to abiotic stress. PLoS Genet. 11, e1004915. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004915

Malausa, T., Fenis, A., Warot, S., Germain, J.-F., Ris, N., Prado, E., Botton, M., Vanlerberghe-Masutti, F., Sforza, R., Cruaud, C., Couloux, A., Kreiter, P., 2011. DNA markers to disentangle complexes of cryptic taxa in mealybugs (Hemiptera: Pseudococcidae). Journal of Applied Entomology 135, 142–155. https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01495.x

Marcon, H.S., Costa-Silva, J., Lorenzetti, A.P.R., Marino, C.L., Domingues, D.S., 2017. Genome-wide analysis of EgEVE_1, a transcriptionally active endogenous viral element associated to small RNAs in Eucalyptus genomes. Genet. Mol. Biol. 40, 217–225. https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0086

Martinez, R.T., 2015. Contribution to the assessment of the risk of spreading banana streak viruses (bsvs) in the Dominican Republic through the cultivation of banana interspecific hybrids harbouring infectious endogenous bsv sequences (thesis). Antilles.

Matsumura, E.E., Coletta-Filho, H.D., Nouri, S., Falk, B.W., Nerva, L., Oliveira, T.S., Dorta, S.O., Machado, M.A., 2017. Deep Sequencing Analysis of RNAs from Citrus Plants Grown in a Citrus Sudden Death-Affected Area Reveals Diverse Known and Putative Novel Viruses. Viruses 9. https://doi.org/10.3390/v9040092

Matzke, M.A., Mosher, R.A., 2014. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. Nature Reviews Genetics 15, 394–408. https://doi.org/10.1038/nrg3683

McLean, D.L., Kinsey, M.G., 1964. A Technique for Electronically Recording Aphid Feeding and Salivation. Nature 202, 1358–1359. https://doi.org/10.1038/2021358a0

Mette, M.F., Kanno, T., Aufsatz, W., Jakowitsch, J., van der Winden, J., Matzke, M.A., Matzke, A.J.M., 2002. Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. The EMBO Journal 21, 461–469. https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.461

Meyer, J.B., Kasdorf, G.G.F., Nel, L.H., Pietersen, G., 2008. Transmission of Activated-Episomal Banana streak OL (badna)virus (BSOLV) to cv. Williams Banana (Musa sp.) by Three Mealybug Species. Plant Disease 92, 1158–1163. https://doi.org/10.1094/PDIS-92-8-1158

Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J., Qi, Y., 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. Cell 133, 116–127. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.034

Mi, S., Lee, X., Li, X., Veldman, G.M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X.Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J.C., McCoy, J.M., 2000. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. Nature 403, 785–789. https://doi.org/10.1038/35001608

Murad, L., Bielawski, J.P., Matyasek, R., Kovarík, A., Nichols, R.A., Leitch, A.R., Lichtenstein, C.P., 2004. The origin and evolution of geminivirus-related DNA sequences in Nicotiana. Heredity (Edinb) 92, 352–358. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800431

Mushegian, A.R., Elena, S.F., 2015. Evolution of plant virus movement proteins from the 30K superfamily and of their homologs integrated in plant genomes. Virology 476, 304–315. https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.012

Muturi, S., Wachira, F., Karanja, L., Njeru, L., 2016. The Mode of Transmission of Banana streak virus by Paracoccus burnerae (Homiptera\mathsemicolon Planococcidae) Vector is Non-circulative. British Microbiology Research Journal 12, 1–10. https://doi.org/10.9734/bmrj/2016/21574

Muturi, S., Wachira, F., Karanja, L., Wambulwa, M., E, M., 2013. Paracoccus burnerae (Homoptera; Planococcidae) as a vector of banana streak virus. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 1.

Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. Plant Cell 2, 279–289. https://doi.org/10.1105/tpc.2.4.279

Ndowora, T., 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, 214–220. https://doi.org/10.1006/viro.1998.9582

Ndowora, T.C.R., Lockhart, B.E.L., 2000. Development of a serological assay for detecting serologically diverse banana streak virus isolates. Acta Hortic. 377–388. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2000.540.43

Noreen, F., Akbergenov, R., Hohn, T., Richert-Pöggeler, K.R., 2007. Distinct expression of endogenous Petunia vein clearing virus and the DNA transposon dTph1 in two Petunia hybrida lines is correlated with differences in histone modification and siRNA production: Epigenomes of endogenous PVCV. The Plant Journal 50, 219–229. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03040.x

Noumbissie Touko, G.B., 2014. Ségrégation des chromosomes dans un croisement interspécifique de bananiers (AAAB x AA) et redistribution des séquences de Banana streak virus intégrées au génome B (thesis). Montpellier SupAgro.

Pahalawatta, V., Druffel, K., Pappu, H., 2008. A new and distinct species in the genus Caulimovirus exists as an endogenous plant pararetroviral sequence in its host, Dahlia variabilis. Virology 376, 253–257. https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.03.003

Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A., Fereres, A., 2002. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. J. Gen. Virol. 83, 3163–3171. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-12-3163

Pasberg-Gauhl, C., Lockhart, B.E., Duran, S., 2000. First Outbreak of Banana Streak Badnavirus Infection in Commercial Export Bananas in Costa Rica. Plant Dis. 84, 1152. https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.10.1152C

Pasberg-Gauhl, C., Lockhart, B.E.L., Castro-Mendivil Dibos, F., Rojas Llanque, J.C., 2007. Banana streak virus Identified for the First Time in Peru in Cavendish Banana (Musa AAA). Plant Dis. 91, 906. https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0906B

Peng, J., Fan, Z., Huang, J., 2012a. Rapid Detection of Banana Streak Virus by Loop-mediated Isothermal Amplification Assay in South China. Journal of Phytopathology 160, 248–250. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2012.01885.x

Peng, J., Zhang, J., Xia, Z., Li, Y., Huang, J., Fan, Z., 2012b. Rapid and sensitive detection of Banana bunchy top virus by loop-mediated isothermal amplification. J. Virol. Methods 185, 254–258. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.026

Perrier, X., Bakry, F., Carreel, F., Jenny, C., Horry, J.-P., Lebot, V., Hippolyte, I., 2009. Combining biological approaches to shed light on the evolution of edible bananas. Ethnobotany Research and Applications.

Pooggin, M.M., 2018a. Small RNA-Omics for Plant Virus Identification, Virome Reconstruction, and Antiviral Defense Characterization. Front Microbiol 9, 2779. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02779

Pooggin, M.M., 2018b. Small RNA-Omics for Plant Virus Identification, Virome Reconstruction, and Antiviral Defense Characterization. Front Microbiol 9, 2779. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02779

Pooggin, M.M., 2013. How Can Plant DNA Viruses Evade siRNA-Directed DNA Methylation and Silencing? Int J Mol Sci 14, 15233–15259. https://doi.org/10.3390/ijms140815233

Pooggin, M.M., Ryabova, L.A., 2018. Ribosome Shunting, Polycistronic Translation, and Evasion of Antiviral Defenses in Plant Pararetroviruses and Beyond. Front. Microbiol. 9, 644. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00644

Pressat, G., 2019. Multi-site survey of the activation of eBSV OL1 and GF7 infectious alleles in a population of French Clair plantains derived from vitroplants. Livre des résumés des 17 ème Rencontres de virologie végétale. INRA, CIRAD, CNRS, SFP, SFV. Aussois : INRA, Résumé, 102. Rencontres de Virologie Végétale (RVV 2019) 43.

Rajeswaran, R., Seguin, J., Chabannes, M., Duroy, P.-O., Laboureau, N., Farinelli, L., Iskra-Caruana, M.-L., Pooggin, M.M., 2014. Evasion of Short Interfering RNA-Directed Antiviral Silencing in Musa acuminata Persistently Infected with Six Distinct Banana Streak Pararetroviruses. Journal of Virology 88, 11516–11528. https://doi.org/10.1128/JVI.01496-14

Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., Bartel, D.P., 2002. MicroRNAs in plants. Genes Dev. 16, 1616–1626. https://doi.org/10.1101/gad.1004402

Richert-Pöggeler, K.R., Noreen, F., Schwarzacher, T., Harper, G., Hohn, T., 2003. Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia. EMBO J. 22, 4836–4845. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg443

Roberts, K., Love, A.J., Laval, V., Laird, J., Tomos, A.D., Hooks, M.A., Milner, J.J., 2007. Long-distance movement of Cauliflower mosaic virus and host defence responses in Arabidopsis follow a predictable pattern that is determined by the leaf orthostichy. New Phytol. 175, 707–717. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02136.x

Rougvie, A.E., 2001. Control of developmental timing in animals. Nat. Rev. Genet. 2, 690–701. https://doi.org/10.1038/35088566

Roy, A., Shao, J., Schneider, W.L., Hartung, J.S., Brlansky, R.H., 2014. Population of Endogenous Pararetrovirus Genomes in Carrizo Citrange. Genome Announcements 2. https://doi.org/10.1128/genomeA.01063-13

Samuel, G., 1934. The Movement of Tobacco Mosaic Virus Within the Plant. Annals of Applied Biology 21, 90–111. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1934.tb06891.x

Seal, S., Turaki, A., Muller, E., Kumar, P.L., Kenyon, L., Filloux, D., Galzi, S., Lopez-Montes, A., Iskra-Caruana, M.-L., 2014. The prevalence of badnaviruses in West African yams (Dioscorea

cayenensis-rotundata) and evidence of endogenous pararetrovirus sequences in their genomes. Virus Research 186, 144–154. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.01.007

Seguin, J., Otten, P., Baerlocher, L., Farinelli, L., Pooggin, M.M., 2014. MISIS: A bioinformatics tool to view and analyze maps of small RNAs derived from viruses and genomic loci generating multiple small RNAs. Journal of Virological Methods 195, 120–122. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.10.013

Sether, D.M., Melzer, M.J., Borth, W.B., Hu, J.S., 2012. Pineapple bacilliform CO virus: Diversity, Detection, Distribution, and Transmission. Plant Disease 96, 1798–1804. https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0718-RE

Shahid, M.S., Aboughanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Tzanetakis, I.E., 2017. Genomic Characterization and Population Structure of a Badnavirus Infecting Blackberry. Plant Disease 101, 110–115. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0527-RE

Siddell, S.G., Walker, P.J., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adams, M.J., Dutilh, B.E., Gorbalenya, A.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Junglen, S., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Nibert, M., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Davison, A.J., 2019. Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). Arch. Virol. 164, 943–946. https://doi.org/10.1007/s00705-018-04136-2

Simmonds, N.W., Shepherd, K., 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. Journal of the Linnean Society of London, Botany 55, 302–312. https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1955.tb00015.x

Staginnus, C., Gregor, W., Mette, M.F., Teo, C., Borroto-Fernández, E., Machado, M.L., Matzke, M., Schwarzacher, T., 2007. Endogenous pararetroviral sequences in tomato (Solanum lycopersicum) and related species. BMC Plant Biology 7, 24. https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-24

Staginnus, C., Iskra-Caruana, M.L., Lockhart, B., Hohn, T., Richert-Pöggeler, K.R., 2009. Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral sequences in plants. Archives of Virology 154, 1189–1193. https://doi.org/10.1007/s00705-009-0412-y

Su, H.-J., 1998. First occurrence of banana streak badnavirus and studies on its vectorship in Taiwan. Banana streak virus: a unique virus - Musa interaction? Proceedings of a workshop of the PROMUSA Virology Working Group, Montpellier, France, 19-21 January 1998. pp. 20-25 20–25.

Su, H.-J., Hung, T.-H., Wu, M.-L., 1997. First Report of Banana Streak Virus Infecting Banana Cultivars (Musa spp.) in Taiwan. Plant Disease 81, 550–550. https://doi.org/10.1094/pdis.1997.81.5.550a

Su, L., Gao, S., Huang, Y., Ji, C., Wang, D., Ma, Y., Fang, R., Chen, X., 2007. Complete genomic sequence of Dracaena mottle virus, a distinct badnavirus. Virus Genes 35, 423–429. https://doi.org/10.1007/s11262-007-0102-3

Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., Watanabe, Y., 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. Plant Cell Physiol. 49, 493–500. https://doi.org/10.1093/pcp/pcn043

Tanne, E., Sela, I., 2005. Occurrence of a DNA sequence of a non-retro RNA virus in a host plant genome and its expression: evidence for recombination between viral and host RNAs. Virology 332, 614–622. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.007

Thomas, J., Sharman, M., Lassois, L., Massart, S., Clerck, C.D., Caruana, M.L., Chabannes, M., Teycheney, P.Y., Kumar, P.L., Houwe, I.V.D., Roux, N., 2015. Technical guidelines for the safe movement of #Musa# germplasm. Bioversity International, Milan.

Tjallingii, W.F., 1978. Electronic Recording of Penetration Behaviour by Aphids. Entomologia Experimentalis et Applicata 24, 721–730. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1978.tb02836.x

Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., 2007. Slicer and the argonautes. Nat. Chem. Biol. 3, 36–43. https://doi.org/10.1038/nchembio848

Tripathi, J.N., Ntui, V.O., Ron, M., Muiruri, S.K., Britt, A., Tripathi, L., 2019. CRISPR/Cas9 editing of endogenous banana streak virus in the B genome of Musa spp. overcomes a major challenge in banana breeding. Commun Biol 2, 46. https://doi.org/10.1038/s42003-019-0288-7

Tsai, C.W., Daugherty, M.P., Almeida, R.P.P., 2012. Seasonal dynamics and virus translocation of Grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. Plant Pathology 61, 977–985. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02571.x

Turaki, A., Bömer, M., Silva, G., Kumar, P., Seal, S., 2017. PCR-DGGE Analysis: Unravelling Complex Mixtures of Badnavirus Sequences Present in Yam Germplasm. Viruses 9, 181. https://doi.org/10.3390/v9070181

Turco, S., Golyaev, V., Seguin, J., Gilli, C., Farinelli, L., Boller, T., Schumpp, O., Pooggin, M.M., 2018. Small RNA-Omics for Virome Reconstruction and Antiviral Defense Characterization in Mixed Infections of Cultivated Solanum Plants. Mol. Plant Microbe Interact. 31, 707–723. https://doi.org/10.1094/MPMI-12-17-0301-R

Umber, M., Gomez, R.-M., Gélabale, S., Bonheur, L., Pavis, C., Teycheney, P.-Y., 2017. The genome sequence of Dioscorea bacilliform TR virus, a member of the genus Badnavirus

infecting Dioscorea spp., sheds light on the possible function of endogenous Dioscorea bacilliform viruses. Archives of Virology 162, 517–521. https://doi.org/10.1007/s00705-016-3113-3

Umber, M., Pichaut, J.-P., Farinas, B., Laboureau, N., Janzac, B., Plaisir-Pineau, K., Pressat, G., Baurens, F.-C., Chabannes, M., Duroy, P.-O., Guiougou, C., Delos, J.-M., Jenny, C., Iskra-Caruana, M.-L., Salmon, F., Teycheney, P.-Y., 2016. Marker-assisted breeding of Musa balbisiana genitors devoid of infectious endogenous Banana streak virus sequences. Mol Breeding 36, 74. https://doi.org/10.1007/s11032-016-0493-8

Van den Planck, 1963. Plant Diseases. Elsevier. https://doi.org/10.1016/C2013-0-11642-X

Villacreses, J., Rojas-Herrera, M., Sánchez, C., Hewstone, N., Undurraga, S., Alzate, J., Manque, P., Maracaja-Coutinho, V., Polanco, V., 2015. Deep Sequencing Reveals the Complete Genome and Evidence for Transcriptional Activity of the First Virus-Like Sequences Identified in Aristotelia chilensis (Maqui Berry). Viruses 7, 1685–1699. https://doi.org/10.3390/v7041685

Vo, J.N., Campbell, P.R., Mahfuz, N.N., Ramli, R., Pagendam, D., Barnard, R., Geering, A.D.W., 2016. Characterization of the banana streak virus capsid protein and mapping of the immunodominant continuous B-cell epitopes to the surface-exposed N terminus. Journal of General Virology 97, 3446–3457. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000643

Vuylsteke, D.R., Hughes, J. d'A, Rajab, K., 1998. Banana Streak Badnavirus and Cucumber Mosaic Cucumovirus in Farmers' Fields in Zanzibar. Plant Dis. 82, 1403. https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1403B

Walton, V.M., Daane, K.M., Pringle, K.L., 2004. Monitoring Planococcus ficus in South African vineyards with sex pheromone-baited traps. Crop Protection 23, 1089–1096. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.03.016

Wardlaw, C.W., 1961. Banana diseases, including plantains and abaca. Banana diseases, including plantains and abaca.

Watson, G.W., Kubiriba, J., 2005. Identification of mealybugs (Hemiptera : Pseudococcidae) on banana and plantain in Africa.

Willkomm, S., Restle, T., 2015. Conformational Dynamics of Ago-Mediated Silencing Processes. Int J Mol Sci 16, 14769–14785. https://doi.org/10.3390/ijms160714769

Yoshikawa, M., 2013. Biogenesis of trans-acting siRNAs, endogenous secondary siRNAs in plants. Genes Genet. Syst. 88, 77–84.

Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R., Chen, X., 2005. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. Science 307, 932–935. https://doi.org/10.1126/science.1107130

Yu, H., Wang, X., Lu, Z., Xu, Y., Deng, X., Xu, Q., 2018. Endogenous pararetrovirus sequences are widely present in Citrinae genomes. Virus Research. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.05.018

Zeidan, M., Sikron, N., Cohen, J., Gera, A., 2000. Improved Detection of Petunia Vein Clearing Caulimovirus. HortScience 35, 1279–1282. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.7.1279

# Résumé / Abstract

Les bananiers cultivés sont constitués de deux espèces majeures : *Musa acuminata* (génome A) et *Musa balbisiana* (génome B). Le bananier plantain est un hybride triploïde naturel de ces deux espèces, AAB. Le génome B contient naturellement des intégrations du Banana streak virus (BSV), responsable de la mosaïque en tiret du bananier qui affecte habituellement la croissance et la production fruitière. Suite à des stress, ces séquences endogènes appelées « eBSV » peuvent déclencher une infection. Le plant spontanément infecté devient alors un réservoir d'inoculum viral disponible pour les cochenilles, vectrices de la maladie. A ce jour, aucune épidémie n'a été décrite dans les parcelles de plantain où des pieds de bananiers sont pourtant infectés. L'hypothèse testée durant cette thèse propose la mise en place par le bananier plantain d'un contrôle de l'infection virale hérité au cours de la coévolution avec ces séquences virales endogènes, et basé sur un mécanisme de type ARN interférent. Mes travaux de thèse visent à comprendre le fonctionnement du pathosystème en **1)** suivant la distribution du virus dans la plante et la dynamique de la charge virale lors d'une infection d'origine endogène grâce à des outils moléculaires (IC-PCR, qPCR), puis en **2)** caractérisant les ARN antiviraux impliqués dans la régulation de ces infections (TGS, PTGS) *via* leur séquençage profond. Par ailleurs, l'intensification des cultures de plantains dans un contexte de changement climatique multipliant les stress abiotiques, pose la question du risque épidémiologique pour les cultures environnantes de bananiers Cavendish, sans génome B et plus sensibles aux infections BSV. Une partie de mes travaux de thèse visent également à **3)** définir la localisation histologique des particules virales BSV pour estimer leur accessibilité pour les cochenilles vectrices de l'infection, puis à tester leur transmission à partir de plantains infectés vers des bananiers Cavendish sains, afin d'évaluer le risque que représentent ces infections d'origine endogène chez le plantain pour les cultures environnantes.

---

Cultivated bananas include two major species: *Musa acuminata* (A genome) and *Musa balbisiana* (B genome). Plantain is a natural hybrid of these two species, with a triploid AAB genome. B genome naturally contains integrations of Banana streak virus (BSV), responsible for Banana streak disease, usually affecting plant growth and fruit yield. Following stresses, endogenous viral sequences, reported as "eBSV", can trigger an infection. The infected plant then become a reservoir of viral inoculum available for mealybugs, vectors of the disease. So far, no epidemic was reported on plantain fields, though infected plants were detected. The tested hypothesis proposes that an infection control mechanism was developed in plantain during the coevolution with endogenous viral sequences, and that this defence mechanism rely on RNA silencing. This PhD project aims to understand this mechanism by **1)** following the virus distribution and viral titre dynamic following eBSV-derived infections, using molecular tools (IC-PCR, qPCR), and by **2)** characterizing antiviral sRNA involved in the regulation of these infections (TGS, PTGS) *via* sRNA deep sequencing. Beside this, the intensification of plantain culture, along with global warming and a growing frequency of abiotic stresses, raises the question of the epidemic risk for surrounding Cavendish banana cultures, without B genome and more susceptible to BSV infections. A part of my PhD results aim to **3)** define the histological localization of BSV particles to estimate their accessibility for mealybugs, and further to test their transmission from infected plantains to virus-free Cavendish banana, in order to evaluate the risk emerging from eBSV-derived infections in plantain for surrounding banana cultures.