

---

## PRESENTATION DU SUJET de thèse – Financement 100% CIRAD.

Equipe 1 UMR BGPI <http://umr-bgpi.cirad.fr/>

Quels sont les enjeux au cours de l'évolution qui ont conduit au maintien de virus dans le génome des plantes ?

What are the deals during the evolution resulting in the preservation of virus in the genome of plants?

### RESUME compréhensible pour les non-initiés (10 lignes maximum) :

Le génome de nombreuses plantes cultivées, tempérées et tropicales, hébergent une multitude de séquences virales. Ces virus, à génome ADN, ne nécessitent cependant aucune obligation d'intégration pour se multiplier. Certaines de ces intégrations, sous l'action de stress, sont capables de restituer un virus fonctionnel à l'origine de l'infection de la plante ; d'autres semblent induire une résistance. Ces dernières années ce phénomène a été à l'origine d'émergence et réémergence spontanées de maladies dommageables, notamment pour les plantes tropicales d'intérêt agronomiques telles que l'igname, le taro et le bananier. Chez le bananier de telles intégrations n'existent que pour l'une des deux espèces *Musa* utilisées, l'espèce *Musa balbisiana* (B), et le virus de la mosaïque en tirets des bananiers ou BSV. Les génotypes diploïdes (BB) sont résistants au virus et semblent des porteurs sains d'intégrations BSV infectieuses. Malheureusement le génome B est non seulement étroitement lié aux bananes à cuire, base de l'alimentation en Afrique, mais également à des caractères de résistance aux cercosporioses, champignon responsable de la maladie la plus économiquement importante sur bananier. Pour ces raisons, le BSV est devenu une des contraintes majeures de la filière bananière. L'étude se propose au travers d'une analyse évolutive de la répartition de telles séquences au sein des *Musacées* de comprendre le pourquoi du maintien de telles séquences afin d'identifier un contexte propice à une expression virale ou à une résistance. L'objectif final est d'identifier et de contrôler les risques d'émergence de maladies pour toute plante d'intérêt agronomique ayant des intégrations virales de ce type.

### Contexte scientifique et questions posées

La compétitivité et la durabilité de l'agriculture dépendent en grande partie des nouvelles technologies d'améliorations des plantes cultivées. Ces 20 dernières années, des découvertes scientifiques majeures au niveau moléculaire telles que la sélection assistée par marqueur pour faciliter l'introgession de gènes de résistance à divers pathogènes et stress, ont régulièrement fait évoluer les stratégies d'amélioration des plantes et favorisé le développement d'une agriculture durable. Par ailleurs, les programmes de séquençage des génomes de plantes permettent maintenant d'avoir accès à l'organisation structurale et fonctionnelle de ces génomes. L'objectif étant de pouvoir créer de nouvelles variétés grâce à une meilleure compréhension et utilisation des gènes de plantes impliqués dans la résistance, le potentiel de croissance ou encore l'adaptation aux stress biotiques et abiotiques, tout en respectant les équilibres des systèmes de culture. Cela a également profondément modifié notre perception et concept des génomes, montrant que ceux-ci sont plus dynamiques qu'initialement envisagé et que des ADN étrangers comme des retro-éléments ou des virus étaient largement présents dans les chromosomes des plantes. Ainsi des données récentes rapportent des invasions massives de pararétrovirus, virus de plante à ADN, issues majoritairement de recombinaisons illégitimes, ces virus ne nécessitant pas d'intégration dans le génome hôte pour se multiplier (Hohn et al., 2008). Ce phénomène est largement répandu pour un grand nombre de familles de plante cultivées de zones tempérées et tropicales telles que le riz, le dahlia, le pétunia, la pomme de terre, le tabac, la tomate, le poivron, l'igname, l'ananas et le bananier. Il témoigne d'évènements anciens d'infestation virale, représentation fossile de l'évènement d'intégration. On peut s'interroger aujourd'hui du maintien de telles séquences dans le génome hôte et des conséquences possibles lors de l'amélioration et la culture de ces plantes. En effet, il a été décrit que certaines de ces intégrations, sous l'action de stress, sont capables de restituer un virus fonctionnel à l'origine de l'infection de la plante (Richer-Poggler et al., 2003 ; Lockhart et al., 2000 ; Ndovora et al., 1999 ; d'autres semblent induire une résistance de type « gene silencing » (Mette et al., 2002 ; Staginnus and Riccher-Poggler, 2006).

Ces observations ne sont pas sans conséquence sur les dynamiques d'émergence d'épidémies en zones tempérées et tropicales telles que rapportées ces dernières années (Fargette et al., 2006). C'est le cas du *Banana streak virus* (BSV), responsable de la maladie de la mosaïque en tirets des bananiers, pour lequel des explosions inexplicables de la maladie ont été rapportées ces 20 dernières années dans toute la zone de culture bananière ; la maladie n'étant jusqu'alors restreinte qu'à certains pays d'Afrique et d'Asie. Ces explosions ont concerné des hybrides bananiers interspécifiques

nouvellement créées. L'explication réside dans l'existence d'intégrations virales infectieuses (eBSV) dans l'une des deux espèces *Musa* utilisées, l'espèce *Musa balbisiana* (B). Ces intégrations participent à la restitution d'un génome viral infectieux sous l'action de stress (Dallot et al., 2001 ; Lheureux et al., 2003 ; Gayral et al., 2008). Le génome B est malheureusement non seulement étroitement lié aux bananes à cuire, base de l'alimentation en Afrique, mais également à des caractères de résistance aux cercosporioses, champignon responsable de la maladie la plus économiquement importante sur bananier. Pour ces raisons, le BSV est devenu une des contraintes majeures de la filière bananière. Les génotypes *M. balbisiana* diploïdes (BB) semblent cependant résistants au virus et porteurs sains d'intégrations BSV infectieuses.

L'étude que nous proposons utilise comme support modèle le bananier et le BSV du fait de l'existence pour cette plante d'intégrations virales induisant expression et résistance. Elle vise au travers d'une analyse évolutive de la répartition et du maintien de telles séquences au sein des *Musacées*, de comprendre les différents contextes évolutifs favorisant une expression virale ou une résistance. Un modèle d'évolution des intégrations aboutissant à une expression ou une résistance sera proposé. L'objectif final de la thèse est d'identifier plus généralement le contexte d'intégration favorable à l'une ou l'autre des issues afin de proposer des stratégies pour contrôler les émergences de maladies pour toute plante d'intérêt agronomique ayant des intégrations virales.

#### *Publications citées dans le texte:*

- Dallot S., P. Acuna, C. Rivera, P. Ramirez, B. Lochkart, M.L. Caruana (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). Archives of Virology 146:11, pp.2179-2190
- Fargette D., G. Konate, C. Fauquet, E. Muller, M. Peterschmitt and JM. Thresh (2006) molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. Annual review of phytopathology 44:235-260
- Gayral P. J-C Noa-Carrazana, M. Lescot, F. Lheureux, B.E. L. Lockhart, T. Matsumoto, P. Piffanelli and M-I. Iskra-Caruana. A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus (EPRV) Journal of Virology vol 82 N°13 pp 6697-6710
- Hohn T., Richert-Pöggeler KR, Harper G, Schwarzacher T, Teo CH, Techeney P-Y, Iskra-Caruana M-L, Hull R (2008) Evolution of integrated plant viruses. In Virus Evolution. Springer, Heidelberg,
- Lheureux F., F. Carreel, C. Jenny, B.E.L. Lockhart, M.L. Iskra-Caruana (2003) Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific *Musa* hybrids. Theoretical Applied Genetic 106:594-598.
- 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
- 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. Embo J 21, 461-469.
- 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.
- 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.
- Staginnus, C. & Richert-Pöggeler, K. R. (2006). Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. Trends Plant Sci 11, 485-491.

**Avancées significatives de l'équipe sur le sujet:** Les travaux entrepris ont mis en évidence des polymorphismes d'intégrations BSV importants tant au niveau germplasm bananier (Collection de bananiers de NeufChâteau CIRAD station Guadeloupe-200 génotypes *Musa* sp. différents) qu'au niveau espèces virales intégrées (6 espèces virales recherchées - DEA AS. Dielen-2005) souvent pour un même génotype *Musa*. Face à une telle complexité, une étude systématique des structures des intégrations BSV infectieuses (eBSV) des principales espèces de BSV a été initiée sur la base des données générées par l'exploitation de la banque BAC réalisée à partir du génome du bananier Pisang Klutuk Wulung – PKW, diploïde naturel (BB) (Safar et al., 2004 – projet Génoscope 2006 - en interaction avec l'UMR DAP). PKW contient des eBSV pour les 4 principales espèces BSV (BSGFV, BSImV, BSOLV et BSMysV) et est porteur sain. La thèse de Philippe Gayral (2005-2008), s'est intéressée à retracer l'histoire évolutive de l'EPRV BSGFV et a abordé celle de BSImV (Master Pro O. Guidolin-2008). BSGFV forme deux allèles à un même locus chez PKW; un seul étant pathogène. L'intégration montre une structure complexe, très similaire entre allèle, contenant au moins une fois le génome viral en totalité mais pas en continuité. BSImV est également inséré à un seul locus (homozygote) bien qu'une seule séquence ait été identifiée à ce jour.

Au sein des *Musa*, leur distribution est restreinte au génome B et est soit très conservée (BSGFV), soit moins bien conservée (BSImV) chez les diploïdes *M. balbisiana*, suggérant un événement d'intégration récent (Gayral et al., 2008 Journal of Virology ; Gayral et al., 2009 soumis à Journal of Molecular Evolution). Les premières analyses semblent indiquer une évolution neutre alors que le caractère résistant de PKW est en faveur d'une évolution sous contrainte. Plusieurs étapes de recombinaison homologue au niveau de l'ADN du bananier sont nécessaires pour restituer un génome viral mais pas suffisant (Gayral et al., 2008 en cours de rédaction). Les insertions chez PKW pour les deux autres espèces BSV ont été séquencées et sont en cours d'analyse.

Récemment nous avons abordé les aspects de mécanismes d'interaction avec l'arrivée d'un chercheur au sein de l'équipe. Il a d'ores et déjà sous cloné trois des eBSV chez PKW à partir des clones BAC de BSGFV (les deux intégrations) et de BSI<sub>m</sub>V afin de pouvoir vérifier in planta leur caractère infectieux.

## Objectifs

Les intégrations infectieuses sont restreintes à l'espèce *Musa balbisiana*, cependant, les génotypes diploïdes *M. balbisiana* tel que le bananier Pisang Klutuk Wulung ou PKW, semblent des porteurs sains d'intégrations infectieuses des virus de BSV. La question est de déterminer la signification évolutive de cette distribution au sein des *Musacées* et des effets observés pour le bananier : infection ou résistance à la multiplication virale. Pour cela nous nous interrogerons sur l'origine de ces insertions au sein des génomes *M. balbisiana* :-ancienne, récente ?- ainsi que sur l'origine de leur fixation - dérive génétique facilitée par des goulots d'étranglement lors de la domestication ou sélection naturelle sous contrainte sélective -. Afin de répondre nous tenterons d'établir un modèle d'évolution des insertions BSV infectieuses en étudiant (i) la fréquence relative des intégrations pour les quatre espèces BSV présentes chez PKW, (ii) nous préciserons leur histoire évolutive par rapport à l'hôte, plus largement par rapports aux BSV et entre elles ainsi que (iii) les contraintes sélectives présentes au cours de leur évolution (rôle sélectif du bananier) ayant pu aboutir à l'acquisition d'une résistance.

## Perspectives

L'existence et le maintien d'intégrations virales dans le génome des plantes interrogent sur leur utilité et les risques réels d'explosions soudaines d'infections virales. En effet, et contrairement aux rétrovirus animaux, rien du génome viral n'oblige à une intégration dans le génome hôte pour une multiplication. La description du contexte d'intégration, du maintien et du rôle de ces séquences dans l'évolution des génomes de plante va contribuer à comprendre leur régulation tant dans un environnement génétique nouvellement créé (nouvelles variétés hybrides) favorisant une expression virale, que dans un environnement de résistance (silencing) tel que celui observé chez le porteur sain PKW. Les données générées vont informer sur les différents contextes d'intégration et seront utiles par la suite pour consolider les stratégies d'ingénieries génétiques (si ARN, RNA interférant etc...) afin de contrôler les explosions d'infestation de plantes ayant des intégrations de pararétrovirus. Plus largement, ce travail va contribuer au développement de concepts nouveaux concernant les interactions plantes-pathogènes. Il va ainsi participer à améliorer les connaissances tant sur la biologie des génomes de plantes que sur leur évolution et permettre de préciser la nature de la dynamique existante.

## Méthodes et techniques

L'objectif de la thèse est de déterminer la signification évolutive de la distribution de 4 BSV au sein des *Musacées* et des effets observés pour le bananier : infection ou résistance à la multiplication virale. La thèse proposée s'intéressera aux intégrations BSV décrites chez PKW : BSI<sub>m</sub>V et BSOLV comme eBSV et BSM<sub>y</sub>V comme intégration non infectieuse. La séquence totale des espèces virales et les séquences des BAC portant ces différents intégrants sont disponibles pour chacun d'entre eux. Une première analyse de la banque BAC montre que l'intégration de chacune des espèces BSV chez PKW semble issue d'un seul événement à un même locus comme pour BSGfV. L'étude utilisera une population d'hybrides interspécifique triploïde (AAB) pour laquelle l'expression virale a pour origine les eBSV du chromosome B issu du parent femelle PKW. Les études d'évolution utiliseront la phylogénie *Musa* construite au cours de la précédente thèse sur la base d'un échantillon des espèces *Musa* représentatif de la diversité existante, et constitué d'une 30<sup>ème</sup> d'individus. L'espèce *M. balbisiana* y est représentée en totalité. Par la suite l'étude pourra être étendue à d'autres génotypes. Trois étapes sont proposées, elles reposent toutes sur la caractérisation des intégrations de PKW.

### 1. Fréquence relative des intégrations

La caractérisation de chaque intégration permettra de dégager une signature moléculaire propre à chacune. Le suivi de chaque signature au sein du croisement génétique de la population hybride haploïde pour le génome B précisera la génétique de l'insertion et sa fréquence. Une analyse comparative de leur organisation au sein d'un même génome informera sur les contextes d'intégrations des 4 espèces BSV.

### 2. Chronologie relative / Histoire évolutive.

Le polymorphisme d'insertion et la conservation de la structure seront réalisés pour chacune des intégrations sur la phylogénie *Musa* restreinte. Une analyse comparative des contextes d'intégrations et des parcours relatif à chaque espèce BSV au sein des *Musa* permettra d'éclairer l'histoire évolutive de chacune d'entre elles, les unes par rapport aux autres et globale des insertions BSV dans le génome *M. balbisiana* (intégrations paralogues, mono ou polyphylétique etc... ?).

### 3. Rôle lié à leur fixation/avantage pour l'hôte

Deux hypothèses expliquant le maintien dans le génome hôte existent selon la ploïdie du génome B et peuvent sembler s'opposer : diploïde/résistant faisant appel à des mécanismes de type « gene silencing » et résultant d'une évolution sous contrainte contre haploïde/sensible résultant d'une évolution neutre. L'utilisation de tests statistiques d'analyse phylogénétiques incluant les tests classiques (dN/dS) mais aussi des tests basés sur des mutations influant sur la structure secondaire de l'ADN et/ou de l'ARN, nous permettra de tester ces hypothèses et d'identifier celle mise en place pour chacune des insertions

### **Publications de l'équipe sur le sujet**

#### **En cours de Soumission**

Côte F.X., S. Galzi, M. Folliot, Y. Lamagnère, P.-Y. Teycheney, M.-L. Iskra-Caruana. (2009) 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 soumise à *Molecular Plant Pathology*

Muller E., Dupuy V, Blondin L., Bauffe F., Daugrois J.-H., Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L. (2009)

The high molecular variability of sugarcane bacilliform viruses in Guadeloupe reveals existence of at least three new species. Soumise à *Journal of General Virology*

Gayral P., L. Blondin, O. Guidolin, F. Carrel, I. Hippolyte, X. Perrier, M.-L. Iskra-Caruana (2009) - Evolutionary history of infectious endogenous *Banana streak virus* and their host banana (*Musa* spp.).

Gayral P., M. Royer, M.-L. Iskra-Caruana (2009) - Evidence for activation of infectious endogenous pararetrovirus in banana (*Musa* sp.) by homologous recombination.

#### **Acceptées**

Staginnus C., M.L. Iskra-Caruana, B. Lockhart, T. Hohn, K. R. Richert-Pöggeler (21009) Suggestions for a nomenclature of endogenous pararetroviral (EPRV) sequences in plants. *Archives of Virology* -IF: 1.839

Gayral P., M.-L. Iskra-Caruana (2009) - Phylogeny of *Banana streak virus* reveals a recent burst of integration in the genome of banana (*Musa* sp.) acceptée *Journal of Molecular Evolution*. – IF: 3.23

Gayral P., J.-C. Noa-Carrazana, M. Lescot, F. Lheureux, B. E. L. Lockhart, T. Matsumoto, P. Piffanelli, M.-L. Iskra-Caruana. (2008) A single *Banana streak virus* integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus (EPRV) *Journal of Virology* 82 N°13 pp 6697-6710 – IF: 5.33

Hohn T., Richert-Pöggeler KR, Harper G, Schwarzacher T, Teo CH, Teycheney P-Y, Iskra-Caruana M-L, Hull R (2008) Evolution of integrated plant viruses. In *Virus Evolution*. Springer, Heidelberg,

F. Lheureux, N. Laboureau, E. Muller, B.E.L. Lockhart, M.-L. Iskra-Caruana (2007) - Molecular characterization of *Banana streak virus acuminata vietnam* isolated from *Musa acuminata siamea* (banana cultivar). *Archives of Virology* 152: 1409-1416 – IF: 1.839

G. Le Provost\*, M.-L. Iskra-Caruana\*, I. Acina, P.-Y. Teycheney (2006) (\*contribution équivalente des auteurs) - Improved detection of episomal *Banana Streak Virus* by multiplex immunocapture PCR. *Journal of Virological Methods* 137:7-13 – IF: 1.933

Fargette D., G. Konate, C. Fauquet, E. Muller, M. Peterschmitt and JM. Thresh (2006) molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annual review of phytopathology* 44:235-260

J. Safar, J.C. Noa-Carrazana, J. Vrana, J. Bartos, O. Alkhimova, F. Lheureux, H. Simkova, M.-L. Iskra-Caruana, J. Dolezel, P. Piffanelli. (2004) Creation of a BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musa balbisiana*) genome. *Genome* 47, pp.1182-1191 – IF: 1.785

Lheureux F., F. Carreel, C. Jenny, B.E.L. Lockhart, M.L. Iskra-Caruana (2003) Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific *Musa* hybrids. *Theoretical Applied Genetic* 106:594-598.

Dallot S., P. Acuna, C. Rivera, P. Ramirez, B. Lockhart, M.L. Caruana (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). *Archives of Virology* 146:11, pp.2179-2190

