

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par le
**Centre international d'études supérieures
en sciences agronomiques
de Montpellier**

Préparée au sein de l'école doctorale **SIBAGHE**
et des unités mixtes de recherche **AGAP** et **BGPI**

Spécialité : **Biologie Intégrative des Plantes (BIP)**

Présentée par **Guy Blaise NOUMBISSIE TOUKO**

**Ségrégation des chromosomes
dans un croisement interspécifique
de bananiers (AAAB x AA) et redistribution
des séquences du *Banana streak virus*
intégrées au génome B**

Soutenue le 26 mars 2014 devant le jury composé de

Mr Michel NICOLE, Directeur de Recherche, IRD, Montpellier **Président du jury**
Mme Sylvie GERMAN-RETANA, Chercheur-HDR, INRA, Bordeaux **Rapporteur**
Mr Pierre SOURDILLE, Directeur de Recherche, INRA, Clermont-Ferrand **Rapporteur**
Mme Angélique D'HONT, Chercheur - HDR, CIRAD, **Directeur de thèse**
Mme Marie-Line CARUANA, Chercheur, CIRAD, **Co-directeur de thèse/invitée**



Instituts et laboratoires d'accueil

Cette thèse rentre dans le cadre du partenariat entre le Centre de coopération international en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) en France et le Centre africain de recherches sur bananiers et plantains (CARBAP) au Cameroun.

L'équipe Amélioration variétale et biotechnologies (AMVB) du CARBAP sous la direction de Sébastien Ricci s'est occupée des travaux de terrains (croisements et sauvetage d'embryons).

Les activités de laboratoire se sont effectuées au sein de trois équipes de recherche du CIRAD :

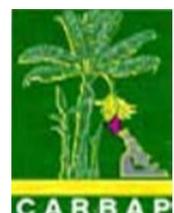
- L'équipe Structure et évolution des génomes (SEG) de la Très grande unité de recherche (TGU) Amélioration génétique et adaptation des plantes (AGAP) dirigée par Angélique D'Hont. J'y ai effectué les activités de génétique,
- L'équipe Biodiversité des badnavirus exogènes et endogènes (2B2E) de l'Unité mixte de recherche (UMR) Biologie et génétique des interactions plantes-parasites (BGPI) dirigée par Marie-Line Iskra-Caruana. J'y ai effectué les activités de virologie,
- L'équipe Amélioration des plantes à multiplication végétative (APMV) de la TGU AGAP dirigée par Marie France Duval. J'y ai effectué les activités de cytogénétique et de biotechnologie.

Sous la Co-direction de Dr Angélique D'Hont et de Dr Marie-Line Iskra-Caruana

et



Grâce au soutien financier du CIRAD



 **ésumé**

De nombreuses bananes cultivées et consommées sont des hybrides interspécifiques triploïdes entre *Musa acuminata* (génome A) et *Musa balbisiana* (génome B). L'amélioration de ces cultivars nécessite de mettre en place des stratégies complexes liées à leur faible fertilité et leur niveau de ploïdie. De plus, le génome *M. balbisiana* porteur de caractères agronomiques intéressants est malheureusement porteur de séquences intégrées de *Banana streak virus* (ou eBSV pour *endogenous* BSV). Ces eBSV sont capables de produire, dans un contexte de croisements interspécifiques et sous conditions de stress abiotiques, des génomes viraux responsables de l'infection systémique du bananier. L'activation spontanée de ces eBSV est la contrainte majeure des programmes d'amélioration du bananier plantain depuis plus de 10 ans. La ségrégation des chromosomes A et B chez les clones polyploïdes interspécifiques de bananiers est encore très peu connue. Nous avons au cours de cette thèse analysé la recombinaison et la ségrégation chromosomique chez 184 plantes issues de la descendance AAAB (CRBP39) x AA (Pahang_CARBAP) au moyen de 38 marqueurs SSR distribués sur les 11 chromosomes *Musa* et de 6 marqueurs PCR spécifiques des deux espèces BSV présentes chez CRBP39 (eBSGFV-7 et eBSOLV-1). Nous avons observé qu'au cours de la formation des gamètes chez l'allotétraploïde CRBP39, la plupart des marqueurs du tétraploïde AAAB CRBP39 ont une ségrégation de type tétrasomique et que les génomes A et B recombinent au niveau de tous les segments de chromosomes pour lesquels nous pouvions suivre les allèles du chromosome B. D'autre part, nous avons montré que 50% des descendants ont reçu, à un ou quelques loci, un ou trois allèles du parent AAAB (CRBP39) au lieu de deux. La composition allélique de ces gamètes aneuploïdes, la cartographie génétique et l'analyse des corrélations entre marqueurs suggèrent que cette particularité résulte d'une variation structurale entre génomes A et B. Un des chromosomes B correspondrait à une partie des chromosomes 1A et 3A. Nous avons également observé une distorsion de ségrégation des loci eBSV avec une surreprésentation d'individus possédant au moins une intégration eBSV (86%). La régulation des eBSV semble très complexe et nécessitera des études complémentaires pour tenter d'identifier le ou les facteurs génétiques impliqués. Finalement, notre travail a montré que des croisements de type AAAB x AA peuvent générer des plantes possédant du génome B sans aucune intégration BSV (13%). Ce résultat est important car il ouvre une voie de contournement à la contrainte eBSV dans les programmes d'amélioration génétique.

Mots clés : Bananier plantain, eBSV, Hybride interspécifique, Polyploïde, Ségrégation chromosomique, SSR



Many cultivated and consumed banana are interspecific triploid hybrids between *Musa acuminata* (A genome) and *Musa balbisiana* (B genome). The genetic improvement of these cultivars requires the implementation of complex breeding strategies due to their low fertility and ploidy level. In addition, the B genome of *M. balbisiana*, which bears interesting agronomic traits unfortunately carries endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSV). Under certain conditions such as interspecific crosses and abiotic stresses, these eBSV are able to produce infectious viral genomes responsible for systemic infection of banana. The spontaneous activation of these eBSV is the major constraint of plantains improvement programs for more than 10 years. The A and B chromosomes recombination and segregation in interspecific polyploids banana are still poorly understood. We here analyzed chromosomes recombination and segregation in 184 offspring from the cross AAAB (CRBP39) x AA (Pahang_CARBAP) using 38 SSR markers distributed on the 11 *Musa* chromosomes and 6 specific PCR markers of both BSV species integrated in CRBP39 (eBSGFV-7 and eBSOLV-1). We noticed that during CRBP39 meiosis most of the SSR markers have tetrasomic segregation and that A and B genomes recombine at all chromosomes segments where we were able to follow chromosome B alleles. Besides, we showed that 50% of the offspring received at one or several loci, one or three alleles of the CRBP39 parent instead of two. The allelic composition of these aneuploid gametes, the genetic map and the analysis of correlations between markers suggest that this peculiar observation is due to a structural variation between A and B genomes. One of the B chromosomes would be part of chromosomes 1A and 3A. We also noticed a distorted segregation of eBSV loci with an overrepresentation of individuals harboring at least one of the eBSV (86%). eBSV regulation seems very complex and requires additional studies to identify the genetic factor(s) involved. Finally, we also showed that AAAB x AA crosses can generate plants with B genome but without eBSV. This is the case for 13% of the offspring. This result is important because it shows that we can overcome eBSV constraint in banana breeding programs.

Keywords: Plantain banana, eBSV, Interspecific hybrid, Polyploid, Chromosome segregation, SSR

Remerciements

En juin 2008, le projet de formation continue que je clôture par le présent manuscrit prit forme. Il ne se serait pas réalisé sans l'appui et le soutien de certaines personnes et institutions. C'est donc avec beaucoup d'émotions et de gratitude que je rédige ces dernières lignes en guise de remerciements.

Frédéric BAKRY, Kodjo TOMEKPE, Sylvie LEWICKI-DHANAUT, Thierry LESCOT ont cru en ce projet et chacune de ces personnes n'a ménagé aucun effort en son pouvoir pour qu'il se concrétise. Trouvez ici toute ma reconnaissance et recevez mes sincères remerciements.

Un grand merci à Dominique ALHINC responsable du Service de validation des acquis de l'expérience (VAE) au Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques de Montpellier (Montpellier SupAgro) qui a cru à mon projet, à ma volonté et à mon engagement et qui n'a cessé de m'encourager et de suivre la progression de ma formation à toutes ses étapes.

Je tiens à remercier tous les membres des trois équipes de recherche au sein desquelles j'ai conduit mes activités (2B2E, APMV et SEG) pour leur accueil, leurs encouragements, leurs conseils et leur soutien sans faille. Je n'oublie pas leurs critiques constructives lors de mes multitudes présentations et la bonne humeur qui a régné pendant tout mon séjour. Un merci à tout ce petit monde.

Je remercie particulièrement les responsables de ces équipes qui ont accepté de m'accueillir ; Angélique D'HONT qui a accepté de diriger mes travaux de thèse, Marie-Line ISKRA-CARUANA co-directrice de thèse avec qui j'ai eu de nombreuses discussions sur mon sujet. Merci Marie-Line pour tes conseils, ton soutien constant, tes encouragements et tes douces pressions. Robert DOMAINGUE et Marie-France DUVAL qui se sont succédés à la tête de l'équipe APMV et qui, chacun à son tour, ont pu trouver un moment de discussion avec moi sur mon sujet de thèse.

Merci à Matthieu CHABANNES, Franc-Christophe BAURENS, Sébastien RICCI et une fois de plus Frédéric BAKRY qui ont encadré mes activités de près et qui m'ont inculqué la démarche méthodologique, le raisonnement critique et de discernement scientifique tout en supportant mes angoisses et caprices de thèse. Merci pour leurs conseils, leurs multiples relectures et corrections des passages de ce document. « Franky » ! « Seb » ! « Mat » ! « Fred » ! Trouvez en ces mots toute ma reconnaissance et mes remerciements. Cette thèse n'aurait pas pris corps sans votre appui !

Un merci particulier à Serge GALZI, Nathalie LABOUREAU, Céline CARDI, Steeve JOSEPH, Romain RIVALAN et Romain FERDINAND qui m'ont fait partager leur expérience par l'appui technique qu'ils ont su chacun m'apporter à la paillasse, dans les serres et dans la lecture des résultats.

Je remercie également Françoise CARREEL qui, plus qu'une « complice », m'a tout le temps encouragé et m'a prodigué de nombreux conseils, tant sur le plan stratégique du déroulement de la thèse que sur le plan scientifique par des explications qui m'ont permis de percevoir et de comprendre certaines nuances de la génétique. Merci Françoise pour tout ce soutien tant moral, scientifique que social.

Je remercie Gaël THEBAUD pour son appui et son aide à l'analyse statistique d'une partie de mes résultats.

Je profite pour saluer mes collègues de thèse avec qui on a passé des moments de « galères » et de soutiens mutuels par le partage de nos expériences de manipes qui marchaient peu ou pas du tout, de l'angoisse du manque de résultats « dignes » pour une thèse,... Je cite ici Pierre-Olivier ! Imène ! Josué ! Virginie ! Adrien ! Christelle ! Habib ! Loup ! Enrique ! Anicet ! Pauline ! Souhir ! Bon courage pour ceux qui sont encore à l'épreuve....

Je dis merci également à mes nombreux amis de l'UMR BGPI et AGAP avec qui on a eu non seulement des relations professionnelles, mais également des relations sociales très poussées. Vous avez su trouver les mots pour m'encourager et à certains moments, vous avez su me faire oublier ma solitude et mes angoisses sur une piste de danse ou alors autour d'un « petit verre » de rhum ou de bière... Merci pour tout....

Je remercie également l'ensemble de mes amis pour leur présence et leur soutien pendant ma thèse. Certains, de l'autre bout du monde, ont su trouver les mots pour m'encourager dans les moments d'angoisse et je leur en suis très reconnaissant. Un merci particulier à tous ceux d'entre vous qui ont fait le déplacement pour vivre cet évènement, je cite ici Etienne, Delphine, Jojo, Marie-Noël, Charles.

Je remercie la famille POUTCHEU de Mulhouse pour ses multiples encouragements...

A cet instant, je n'oublie pas mon épouse Christiane NOUMBISSIE et mes enfants Vivien, Stéphanie et Ulther-Christian qui ont su supporter ma longue absence en famille, « un abandon » presque ! Et qui sont restés sages, optimistes et accrochés à mon projet jusqu'à ce jour. Ils y ont cru et le plaisir est pour moi de leur dédicacer cette thèse... « Chérie ! Que cet esprit de courage, de combativité, de gagnant serve d'exemple à nos enfants. Je vous aime et je vous embrasse très fort... »

J'adresse pour terminer, mes remerciements à tous ceux qui ont fait le déplacement pour être physiquement présents à ma soutenance et à tous ceux que j'aurais pu oublier et qui m'ont soutenu et encouragé à un moment ou à un autre.

Et les sponsors !

« L'argent étant le nerf de la guerre », Je tiens à remercier les amis et les collègues qui se reconnaîtront ici pour leur soutien financier sans lequel ce projet n'aurait pas pris forme.

Je remercie particulièrement ici Mme Hélène Chantal TEMTCHO et Maman Odette DEUWE qui, les premières se sont déployées et ont mis la main à la poche. Trouvez tous et toutes ici ma reconnaissance et sachez que ce travail vous est également dédié.

Je remercie le Service de coopération et d'  ction culturelle (SCAC) de l'ambassade de France au Cameroun et le CIRAD pour avoir soutenu financie  rement mon projet.

Enfin les évaluateurs !

   la fin de ces trois années de thèse et à cet instant de soutenance, je vais remercier les membres extérieurs de mon comité de suivi de thèse ; Mr Philippe LASHERMES et Mr Laurent CRESPEL pour leurs questionnements constructifs autour de mon sujet, leurs conseils et leurs encouragements.

Côté Jury, je remercie Mme Sylvie GERMAN-RETANA et Mr Pierre SOURDILLE d'avoir accepté d'être rapporteurs. Merci pour vos remarques, critiques et suggestions à la lecture du manuscrit. Je remercie Mr Michel NICOLE qui en acceptant de présider ce jury, a abandonné ce jour ses responsabilités à l'  cole doctorale SIBAGHE.

Pour terminer cette liste, merci à Marie-Carmen MARTINEZ, Florence CHAZOT et Florence STOLIAROFF-HAMAI pour s'être occupées avec une très grande efficacité de tout le côté administratif pendant mon séjour au sein de leur différente équipe ainsi que pour leur bonne humeur.

Je remercie tous ceux qui trouveront que j'ai omis de les citer "nomin  ment" et je remercie très grandement Dominique LAGRENÉE pour son aide précieuse à la mise en page finale de ce document... Merci Domi !

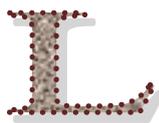


bréviations et acronymes

2B2E :	Biodiversité des badnavirus exogènes et endogènes
ADN:	Acide désoxoribonucléique
AFLP :	Amplified fragment length polymorphism ou Polymorphisme des longueurs de fragments amplifiés
AGAP :	Amélioration génétique et adaptation des plantes
AMVB :	Amélioration variétale et biotechnologies
APMV :	Amélioration des plantes à multiplication végétative
ARN :	Acide ribonucléique
ARNdb :	ARN double brin
ARNi :	ARN interférant
BAC :	Bacterial artificial chromosome - Chromosome artificiel bactérien
BBrMV :	<i>Banana bract mosaic virus (Potyvirus)</i>
BBTV :	<i>Banana bunchy top virus (Babuvirus)</i>
BEL :	BSV expressed locus
BET:	Bromure d'éthidium
BGPI:	Biologie et génétique des interactions plantes-parasites
BSCaV :	<i>Banana streak Cavendish virus (Badnavirus)</i>
BSD :	Banana streak disease
BSGFV :	<i>Banana streak Goldfinger virus (Badnavirus)</i>
BSIMV :	<i>Banana streak Imove virus (Badnavirus)</i>
BSMYV :	<i>Banana streak Mysore virus (Badnavirus)</i>
BSOLV :	<i>Banana streak Obino l'Ewai virus (Badnavirus)</i>
BSPV :	<i>Banana streak Perou virus (Badnavirus)</i>
BSUgAV:	<i>Banana streak Uganda A virus (Badnavirus)</i>
BSV :	<i>Banana streak virus (Badnavirus)</i>
BSVNV :	<i>Banana streak Vietnam virus (Badnavirus)</i>
BSYV :	<i>Banana streak Yunnan virus (Badnavirus)</i>
CaYMV :	<i>Canna yellow mottle virus (Badnavirus)</i>
CARBAP :	Centre africain de recherches sur bananiers et plantains
CATIE :	Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza
CG:	Co-segregation group
CIRAD :	Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement

CIV :	Culture <i>in vitro</i>
CMV :	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>
dCAPs :	Derived cleaved amplified polymorphic sequences
DMV :	<i>Dhalia mosaic virus (Caulimovirus)</i>
eBSGFV:	Endogenous <i>banana streak Goldfinger virus</i>
eBSIMV:	Endogenous <i>banana streak Imove virus</i>
eBSMYV:	Endogenous <i>banana streak Mysore virus</i>
eBSOLV:	Endogenous <i>banana streak Obino l'Ewai virus</i>
eBSV :	Endogenous <i>banana streak virus</i>
EDTA :	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EMBRAPA :	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPRV :	Endogenous pararetrovirus
ePVCV :	Endogenous <i>petunia vein clearing virus</i>
ET:	Elément transposable
eTVCV :	Endogenous <i>tobacco vein clearing virus</i>
FHIA :	Fundación Hondureña de Investigación Agrícola
FISH :	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
GBS :	Genotyping by sequencing
GISH :	Genome <i>in situ</i> hybridisation
GLM :	General linear model (Modèle linéaire général)
GPTR-Génotypage :	Grand plateau technique régional de génotypage
ICTV :	International committee on taxonomy of viruses
IC-PCR:	Immunocapture polymerase chain reaction
IC-PCR DNase:	Immunocapture polymerase chain reaction avec une étape de digestion enzymatique de l'ADN
IITA :	International Institute of Tropical Agriculture
IP :	Iodure de propidium
IPGRI :	International plant genetic resources institute
ITC :	<i>Musa</i> international transit center
LTR :	Longue région terminale répétée
Mb :	Mégabase (million de bases)
MGIS :	<i>Musa</i> germplasm information system
mMaCIR X	Marqueur microsatellite <i>Musa acuminata</i> CIRAD numéro X
Montpellier SupAgro :	Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques de Montpellier
ODEADOM :	Office de développement de l'économie agricole d'outre-mer
ORF :	Open Reading Frames

pb:	Paire de base
PBV :	<i>Pineapple bacilliform virus (Badnavirus)</i>
PBS-T:	Phosphate Buffer Saline with Tween 20 (Tampon phosphate salin avec du tween20)
PCR :	Polymérase chain reaction
PKW :	Pisang klutuk wulung
ppm :	partie par million
PTGS :	Post transcriptional gene silencing
PVCV :	<i>Petunia vein clearing virus (Petuvirus)</i>
PVPP :	Polyvinylpolypyrrolidone
RE :	Rétro élément
RFLP :	Restriction Fragment Length Polymorphism ou Polymorphisme de longueur des Fragments de Restriction
RH :	Recombinaison homologue
RTBV :	<i>Rice tungro bacilliform virus (Tungrovirus)</i>
SAM :	Sélection assistée par marqueur
sARN :	Small RNA - petits ARN
SCBV :	<i>Sugarcane bacilliform virus (Badnavirus)</i>
SEG :	Sélection et évolution des génomes
siRNA :	Small interfering RNA
SSR :	Simple sequence repeats
TBE :	Tris – Borate - EDTA
TBRI :	Taiwan banana research institute
TGMV:	<i>Tomato golden mosaic virus (Begomovirus)</i>
TGS :	Transcriptional gene silencing
TGU :	Très grande unité de recherche
TVCV :	<i>Tobacco vein clearing virus (Cavemovirus)</i>
UMR :	Unité mixte de recherche
UV:	Ultra-violet



iste des figures

Chapitre I

Figure I-1 : Représentation schématique de organisation du bananier et de ces rejets	6
Figure I - 2 : Photos et dessins de fleurs de bananier	8
Figure I - 3 : Photos de régimes des trois sous groupes de plantain	10
Figure I - 4 : Taxonomie du bananier.....	10
Figure I - 5 : Répartition géographique ancestrale des deux principales espèces de bananier et des sous espèces associées en Asie du Sud-Est	14
Figure I – 6 : Schémas de polyploïdisation.....	18
Figure I - 7 : La stratégie d'amélioration 4x/2x développée par le CIRAD	22
Figure I - 8 : Stratégie 3x/2x d'amélioration des plantains	24
Figure I - 9 : Les différentes étapes de la méiose	24
Figure I - 10 : Schéma d'une recombinaison intra-chromosomique entre deux chromosomes homologues	31
Figure I - 11 : Symptômes de la maladie de mosaïque en tirets des bananiers	36
Figure I - 12 : Organisation génomique du BSV	36
Figure I - 13 : Arbre phylogénétique des différentes souches de BSV basé sur les séquences RT/RNase H.	38
Figure I - 14 : Diversité des modes de transmission des virus végétaux	40
Figure I - 15 : Distribution des gènes et éléments transposables au voisinage des intégrations de trois espèces d'eBSV dans le génome <i>Musa</i> à partir de clone BAC de PKW.....	44
Figure I - 16 : Synténie entre loci eBSV et le génome <i>Musa acuminata</i> de référence	44
Figure I-17 : Localisation de trois eBSV sur les chromosomes de PKW	46
Figure I - 18 : Structure génomique des intégrations BSV présents dans le génome de PKW.....	46
Figure I - 19 : Modèles théorique de base pour expliquer la production de virus libre BSGFV (A) et BSOLV (B) à partir du génome de leur homologue intégré	50
Figure I - 20 : Contrôle épigénétique des EPRV.....	53

Figure I - 21 : Représentation des principales voies de l'ARN interférant (ARNi).....	56
--	----

Chapitre II

Figure II - 1 : Position des loci PCR et dCAPs sur les intégrations BSGFV, BSOLV et BSIMV chez PKW	64
---	----

Figure II - 2 : Plan expérimental de production de la population d'étude	66
---	----

Figure II - 3 : Schéma des croisements effectués pour la création de la population d'étude.....	72
--	----

Chapitre III

Figure 1 : Genetic map of the tetraploid breeding accession CRBP39	96
---	----

Figure 2 : Pearson's correlation between single dose markers of chromosome class 1 and 3.	98
---	----

Supplementary Figure 1 : Localization of the 38 SSR markers on the <i>M. acuminata</i> reference sequence	112
--	-----

Figure 3 : Illustration schématique de la variation structurelle entre groupes de co-ségrégations de classes de chromosomes 1 et 3 et de la formation des gamètes chez CRBP39.....	114
---	-----

Chapitre IV

Figure IV-1 : Position des marqueurs PCR et dCAPs sur les intégrations BSGFV, BSOLV et BSIMV chez PKW.....	121
---	-----

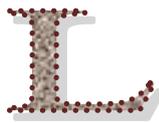
Figure IV-2 : Position des marqueurs PCR et dCAPs sur les allèles infectieux eBSGFV-7 et eBSOLV-1 chez PKW.....	123
--	-----

Figure IV-3 : Génotypage eBSGFV-7 et eBSOLV-1 chez neuf individus de la population CRBP39 x Pahang_CARBAP à l'aide des marqueurs spécifiques	126
---	-----

Figure IV-4 : Phénotypage BSV par IC- DNase-PCR pour 19 individus de la population CRBP39 x Pahang_CARBAP	128
--	-----

Figure IV-5 : Analyse de la corrélation entre marqueurs SSR/eBSV et les infections par BSGFV ou BSOLV	132
--	-----

Figure IV-6 : Carte génétique des groupes de liaison 1 (A) et 4 (B) de l'allotétraploïde CRBP39 (AAAB).....	134
--	-----



iste des tableaux

Chapitre I

Tableau I - 1 : Présentation des 15 descripteurs morphologiques définis pour la classification des Eumusa	12
Tableau I - 2 : Marqueurs PCR et dCAPs spécifiques des intégrations de trois espèces eBSV du génome <i>Musa</i>	48

Chapitre II

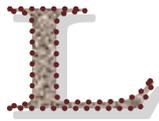
Tableau II - 1 : Liste des loci SSR sélectionnés et des amorces forward et reverse correspondantes ayant servi à caractériser la population issue du croisement CRBP39xPahang_CARBAP.	73
Tableau II - 2 : Liste des marqueurs eBSV utilisés, description des amorces et taille des séquences amplifiées	74
Tableau II-3 : Distribution attendue des allèles dans la population en fonction du nombre d'allèles visibles chez CRBP39	78
Tableau II-4 : Tableau des gamètes produits à la méiose chez CRBP39 suivant une recombinaison chromosomique de type tétrasomique.	79
Tableau II-5 : Fréquences gamétiques attendues dans la population en fonction du nombre d'allèles observés chez CRBP39 suivant une ségrégation allélique de type tétrasomique sans double réduction	79

Chapitre III

Table 1: Number, origin, and segregation behavior of alleles from 38 SSR and 2 eBSV loci in the tetraploid breeding accession CRBP39	90
Table 2: Aneuploid gamete transmission in CRBP39	91
Table 3: Allelic composition of aneuploidy maternal gametes	94
Supplementary Table 1: Sequence and origin of 38 SSR primers.....	106
Supplementary Table 2: DNA content of the progenies measured by flow cytometry	107
Supplementary Table 3: Allelic segregation type in the progeny.....	110

Chapitre IV

Tableau IV - 1 : Profil et génotype eBSV des parents et grands parents de la population	123
Tableau IV - 2 : Tableau synthétique des résultats de génotypage eBSV de la population.....	124
Tableau IV – 3 : Détermination du type de ségrégation eBSV suivant un test de χ^2	127
Tableau IV - 4 : Tableau synthétique du diagnostic BSV de la population CRBP 39 x Pahang	131



iste des annexes

Annexe 1: Composition de base des différents milieux de culture pour <i>Musa sp</i>	170
A: Milieu de germination pour embryons zygotiques (EMB)	170
B: Milieu de prolifération ou multiplication (Proli B)	170
C: Milieu de croissance (MS de base)	170
Annexe 2: Protocole d'extraction d'ADN	173
Annexe 3: Résultat du génotypage des 184 plantes de la population pour les 6 marqueurs eBSV	174
Annexe 4: Diagnostic de l'infection BSOLV et BSGFV pour les 136 individus de la population à trois temps distincts de leur culture	178

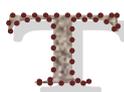


Table des matières

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Chapitre I : Bibliographie et objectifs de l'étude	7
---	----------

I – 1 – Le bananier	7
----------------------------------	----------

I – 1 – 1. Description de la plante	7
---	---

I – 1 – 1. 1. L'appareil végétatif	7
--	---

I – 1 – 1. 2. L'appareil reproducteur	7
---	---

I – 1 – 2 - Taxonomie et Origine des espèces cultivées.....	11
---	----

I – 1 – 2. 1. Les outils de caractérisation et classification des <i>Eumusa</i>	11
---	----

I – 1 – 2. 2. Les espèces sauvages : caractéristiques, structuration, distribution.	15
--	----

I – 1 – 2. 3. Des espèces sauvages aux variétés diploïdes comestibles	16
---	----

I – 1 – 2. 4. Des variétés diploïdes aux variétés triploïdes et tétraploïdes.....	17
---	----

I – 2 - Amélioration génétique du bananier	20
---	-----------

I – 2 - 1. Historique de l'amélioration génétique des bananiers	20
---	----

I – 2 - 2. Les objectifs de la création	21
---	----

I – 2 - 3. Les stratégies d'amélioration du bananier	23
--	----

I – 2 – 4. Les contraintes et les limites de l'amélioration du bananier.....	26
--	----

I – 3 – La recombinaison dans les systèmes polyplloïdes	27
--	-----------

I – 3 – 1. Méiose chez les diploïdes et les polyplloïdes	27
--	----

I – 3 – 2. Les recombinaisons génétiques.....	30
---	----

I – 4 - Le Banana streak virus (BSV)	35
---	-----------

I – 4 – 1. Découverte du BSV et gamme d'hôtes	35
---	----

I – 4 – 2. Classification, description et diversité du BSV.....	37
---	----

I – 4 – 3. Transmission du BSV	39
--------------------------------------	----

I – 4 – 3. 1. La transmission horizontale	39
---	----

I – 4 – 3. 2. La transmission verticale.....	41
--	----

I – 4 – 4. Les intégrations virales	41
---	----

I – 4 – 4. 1. Découverte des intégrations virales chez les plantes	41
--	----

I – 4 – 4. 2. Localisation des eBSV.....	43
I – 4 – 4. 3. Structure des intégrations BSV chez PKW	45
I – 4 – 4. 4. Organisation des intégrations BSV dans le génome de Pisang Klutuk Wulung (PKW – BBs).....	47
I – 4 – 4. 5. Activation des eBSVs.....	49
I -4 – 4. 6. Régulation épigénétique des EPRV.....	52
I – 5 - Objectifs de la présente étude.....	58

Chapitre II : Matériels et méthodes63

II – 1 - Matériels	63
II – 1 - 1. Le matériel végétal	63
II – 1 - 2. Les marqueurs moléculaires.....	63
II – 1 - 2. 1. Les marqueurs microsatellites.....	63
II – 1 - 2. 2. Les marqueurs eBSV	65
II – 2 - Méthodes	65
II – 2 - 1. La production du matériel végétal	65
II – 2 - 1. 1. Le repiquage des plantules	67
II – 2 - 1. 2. La duplication du matériel végétal	67
II – 2 - 2. Détermination du niveau de ploïdie de la descendance par cytométrie en flux	67
II – 2 - 2. 1. Préparation des échantillons : extraction et coloration des noyaux.....	68
II - 2 - 2. 2. Dosage de la teneur des plantes en ADN par cytométrie en flux	68
II – 2 - 3. La préparation des ADNs pour la caractérisation moléculaire.....	68
II – 2 - 3. 1. Le prélèvement et le broyage du matériel végétal	68
II – 2 – 3. 2. L’extraction de l’ADN	69
II – 2 - 3. 3. Le dosage de l’ADN et la vérification de la qualité d’ADN.....	69
II – 2 - 4. Analyse de la conformité des parents	70
II – 2 - 5. Identification et suivi du génome B dans la descendance	70
II – 2 - 6. Tri des marqueurs SSR et génotypage.....	71
II – 2 - 7. Génotypage eBSV des individus de la population	74
II – 2 - 7. 1. Réactions de polymérisation en chaîne.....	74
II – 2 - 7. 2. Détection de l’activation des eBSVs chez les individus de la population	75

II – 3 - Méthodes statistiques d’analyse des données	77
II – 3 - 1. Distribution des quantités d’ADN chez les descendants suite à l’analyse en cytométrie de flux	77
II – 3 - 1. 1. Détermination de la distribution attendue des allèles et de la fréquence des gamètes en fonction de la constitution allélique du CRBP39 aux loci SSR	77
II – 3 - 2. Test χ^2 de distribution des allèles et des gamètes du CRBP39 à chaque loci SSR	80
II-3-3. Analyses des corrélations entre marqueurs SSR et l’infection par BSGFV ou BSOLV	80

Chapitre III - Article: Chromosome segregation and e-BSV elimination in offsprings from a *Musa* interspecific tetraploid AAAB83

Préambule à l’article	83
Abstract	84
Introduction	85
Materials and methods	87
Results	89
Discussion	99
ACKNOWLEDGMENTS:.....	102
Supplementary Material.....	102
References	103
Résumé des résultats décrits dans l’article.....	113

Chapitre IV : Caractérisation et activation des eBSVs119

IV – 1 – Contexte et objectifs de l’étude	119
IV – 2 – Génotypage eBSV	120
IV – 2 - 1- Génotypage eBSV chez les parents et grands parents de la population	120
IV – 2 – 2. Génotypage eBSV de la descendance et analyse statistique de leur ségrégation	124
IV – 3 - Activation eBSV	127
IV – 4 - Analyse de corrélations entre la ségrégation des marqueurs SSR/eBSV et l’infection virale	133
IV – 5 – Discussion	135

IV – 5 – 1. Ségrégation des eBSV chez la population d'étude	135
IV – 5 – 2. Infection des plantes par le BSV	137
IV – 6 - Conclusion	139
Chapitre V : Discussion générale, Perspectives et Conclusion	144
Ségrégation des chromosomes dans un croisement AAAB x AA.....	144
Ségrégation et régulation des eBSV infectieux chez la descendance	147
Conclusion générale	150
Références bibliographiques	154
Annexes	170

Introduction générale

Introduction générale

Les bananes et les bananes plantains sont une ressource alimentaire vitale pour plus de 400 millions d'habitants des zones intertropicales (Lassois *et al.*, 2009) et concourent à la sécurité alimentaire en raison de leur haute valeur énergétique (carbohydrates) et nutritionnelle (richesse en minéraux et vitamines notamment) . Elles contribuent également au développement économique local et régional en garantissant des revenus réguliers aux producteurs du fait de leur production continue toute l'année. Enfin, la banane est le fruit le plus exporté au monde avec 18 millions de tonnes par an (ODEADOM, 2012).

La culture de la banane est soumise à la contrainte de plusieurs facteurs abiotiques et biotiques, qui ont un impact direct sur toutes les productions pouvant entraîner des baisses de rendement voire des pertes économiques graves. Les programmes d'amélioration variétale des bananiers qui se sont développés à travers le monde cherchent donc à créer en priorité de nouvelles variétés qui combinent des résistances à différents stress, un bon rendement et une qualité des fruits (gustative et fonctionnelle) acceptable pour les différentes filières tout en répondant aux attentes et goûts diversifiés des consommateurs. Plusieurs stratégies de création variétale ont été développées par les différents programmes mais tous cherchent à exploiter la diversité génétique naturelle disponible au sein des deux principales espèces à l'origine de la quasi-totalité des variétés de banane actuellement cultivées, *Musa acuminata* et *Musa balbisiana*.

L'espèce *M. acuminata* (génome A), présente dans tous les cultivars de bananier, est suspectée d'être à l'origine de la parthénocarpie (Carreel, 1994; Stover et Simmonds, 1987). L'espèce *M. balbisiana* (génome B), est porteuse de nombreux caractères d'intérêt, notamment de rusticité de la plante (résistance aux maladies, au froid et au manque d'eau), ayant un impact direct sur les rendements et l'adaptation à différents environnements agro-écologiques (Dessauw, 1988). Elle contribue également au renforcement de l'hétérosis dans les variétés interspécifiques. Malheureusement, toutes les accessions connues de cette espèce sont porteuses de séquences virales infectieuses du virus de la mosaïque en tiret des bananiers ou *Banana streak virus* (BSV) présentes dans le génome de la plante. Ces séquences (encore appelées eBSV pour « endogenous BSV ») sont transmises aux descendance issues de croisements interspécifiques, et, dans ce contexte, sont capables de produire spontanément des particules virales à l'origine de la maladie. Cette présence d'eBSV

Introduction générale

infectieux a freiné le recours au génome B en croisement par les programmes d'amélioration (de banane à cuire de type plantain notamment) depuis une quinzaine d'années car, dès 1995, une recrudescence de la maladie due au BSV chez les hybrides interspécifiques nouvellement synthétisés avait été observée. Ceci a amené le CIRAD en 2000 à suspendre l'utilisation de variétés de l'espèce *M. balbisiana* comme géniteur pour ses activités de création variétales notamment les programmes d'amélioration de la banane plantain réalisés en collaboration avec le CARBAP.

Les travaux de caractérisation de tels eBSV conduits par Chabannes, Baurens *et al.* (2013) ont montré que trois espèces de BSV (Obino l'Ewai - OL, Goldfinger – GF et Imové - IM) sont intégrées dans le génome B de l'accession séminifère diploïde *M. balbisiana* Pisang Klutuk Wulung (PKW), souvent utilisée en croisement dans le passé pour ses performances agronomiques. Dans ce clone, chaque espèce de BSV est intégrée à un seul locus en deux copies alléliques dont une seule est infectieuse. De plus, il est également apparu que certains hybrides triploïdes nouvellement créés - issus de croisements entre hybrides allotétraploïdes (AAAB 4x) porteurs d'eBSV infectieux, et des variétés diploïdes sans eBSV (AA 2x) ne manifestent aucun symptôme de maladie (Tenkouano, IITA, 2007 : com. pers.). Ces observations ont soulevé de nombreuses questions car elles suggèrent la possibilité d'obtenir des descendances de constitution interspécifique sans risque avéré d'infection virale d'origine eBSV, à partir de parents à risque, porteurs d'eBSV potentiellement infectieux. Compte tenu du faible nombre de sites d'intégration de ces eBSV dans le génome B et des données préexistantes de la littérature sur les possibilités d'appariement et de recombinaison entre les chromosomes A et B des variétés de constitution interspécifique (Shepherd, 1999), il est apparu envisageable de produire des variétés améliorées sans eBSV (ou incapable de l'exprimer) en exploitant la recombinaison méiotique.

Partant de cette problématique, l'objectif global des recherches effectuées dans le cadre de cette thèse a été d'étudier les modalités d'appariement et de recombinaison entre chromosomes issus des deux génomes A et B à la méiose chez un hybride synthétique allotétraploïde utilisé par le CARBAP en croisement (CRBP39 - AAAB) ainsi que les conséquences de ces appariements sur le mode de ségrégation des eBSV, l'impact du contexte chromosomique sur la régulation de leur expression et, enfin, la constitution génomique des gamètes produits. Pour cela nous avons produit et génotypé à l'aide de marqueurs de type microsatellite et de marqueurs PCR spécifiques des eBSV, une descendance issue du croisement CRBP39 (AAAB) x Pahang_CARBAP (AA).

Introduction générale

Les objectifs spécifiques de ce travail se regroupent autour des trois questions ci-dessous :

- 1- Comment ségrégent les chromosomes issus du génome B du tétraploïde interspécifique CRBP39 (AAAB) dans les gamètes ? et donc comment s'apparient-ils à la méiose ?
- 2- Comment ségrégent les eBSV infectieux dans la descendance de CRBP39 ?
- 3- Existe-t-il des contextes chromosomiques/génomiques favorables à l'expression des eBSV ?

Le manuscrit est structuré en cinq chapitres :

- ✚ **Chapitre I** : Bibliographie
- ✚ **Chapitre II** : Matériels et méthodes
- ✚ **Chapitre III** : Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAAB x AA.
- ✚ **Chapitre IV** : Caractérisation et activation des eBSV
- ✚ **Chapitre V** : Discussion générale, perspectives et conclusion

CHAPITRE I

Bibliographie

et objectifs

de l'étude

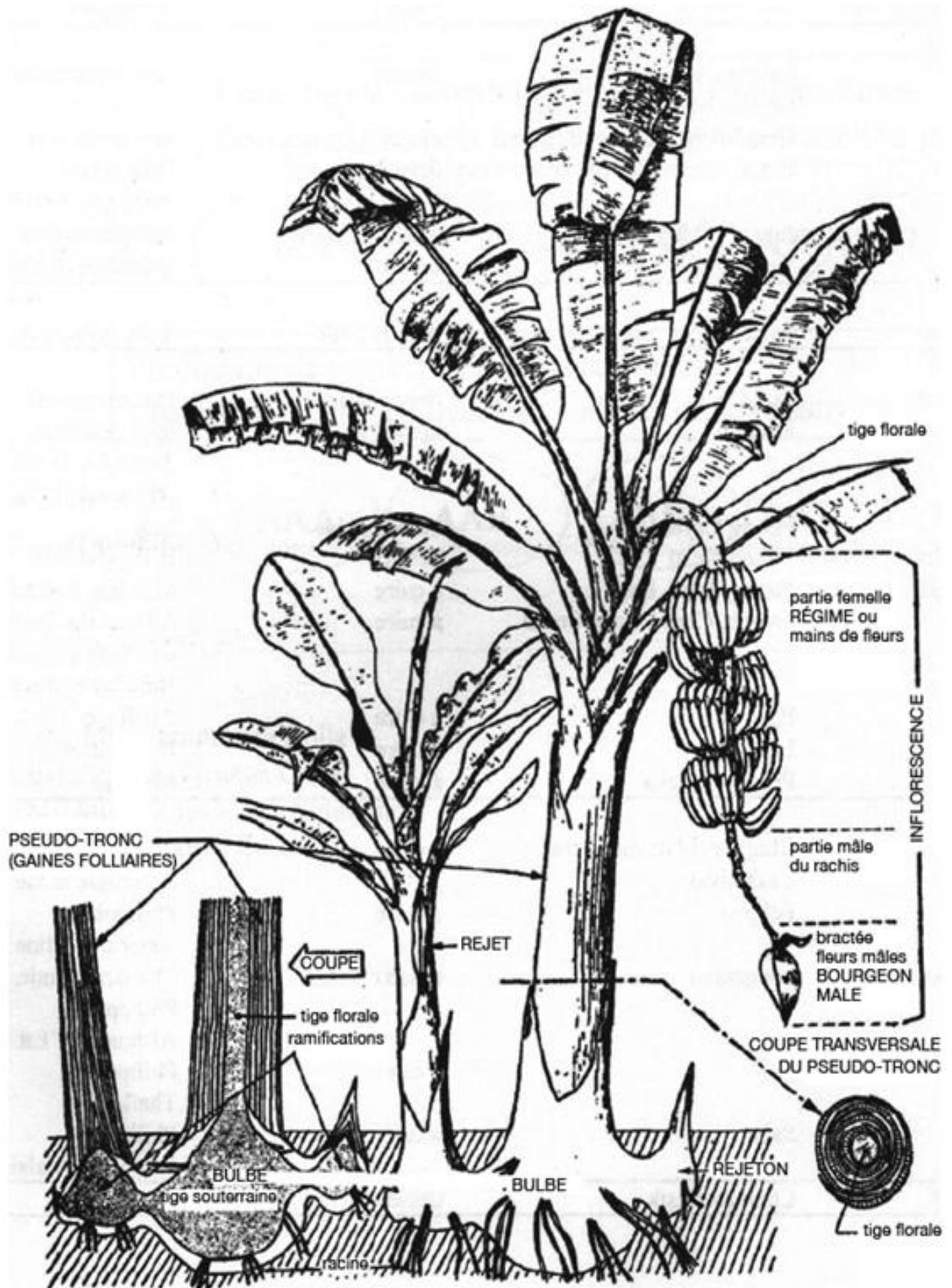


Figure I-1 : Représentation schématique de organisation du bananier et de ces rejets (d'après Champion, 1963)

I – 1 – Le bananier

I – 1 – 1. Description de la plante

I – 1 – 1. 1. L'appareil végétatif

Le bananier est une plante herbacée des zones tropicales et subtropicales du globe. En conditions de culture, cette plante mesure en général 1.80 à 3.5m de hauteur. Pour certaines espèces sauvages, son pseudo-tronc atteint 9 m (Jenuwein, 1988). La tige vraie souterraine encore appelée bulbe ou rhizome émet de nombreux bourgeons latéraux qui assurent le mode asexué de reproduction et la pérennité de la plante. La reproduction sexuée est également connue chez les bananiers séminifères dits « sauvages ». Le « faux-tronc » ou « pseudo-tronc » est formé par l'emboîtement des gaines foliaires, fortement imbriquées les unes dans les autres (Champion, 1963; Lassoudière, 2010) (**Figure I-1**). La partie supérieure de la gaine se modifie en un pétiole robuste prolongé par une nervure centrale qui sépare le large limbe en deux parties presque symétriques. Le limbe de la dernière feuille émise est enroulé autour de la nervure principale centrale en « cigare » et se déroule ensuite pour constituer le bouquet foliaire. A maturité, le méristème terminal qui avait un fonctionnement végétatif évolue en méristème floral à l'intérieur du pseudo-tronc. Le méristème apical qui était aplati au cours de la phase végétative, formant des ébauches foliaires, devient alors convexe et l'activation des divisions cellulaires entraîne une différenciation des spathes et des étages florifères ainsi qu'une croissance de l'axe (Kerbellec, 1996). Cette transition de l'état végétatif vers l'état floral s'opère en général trois mois environ avant l'émergence de l'inflorescence hors de la couronne foliaire. Chaque rejet produit une seule inflorescence dont la partie femelle donne naissance (soit après fécondation, soit par parthénocarpie - développement du fruit sans fécondation préalable de la fleur) au régime de banane.

I – 1 – 1. 2. L'appareil reproducteur

a - L'inflorescence femelle

L'inflorescence complexe, est un épi de cymes (**Figure I-1**). Le long de son axe (appelé aussi rachis ou hampe florale) sont disposées, suivant une hélice analogue à celle du

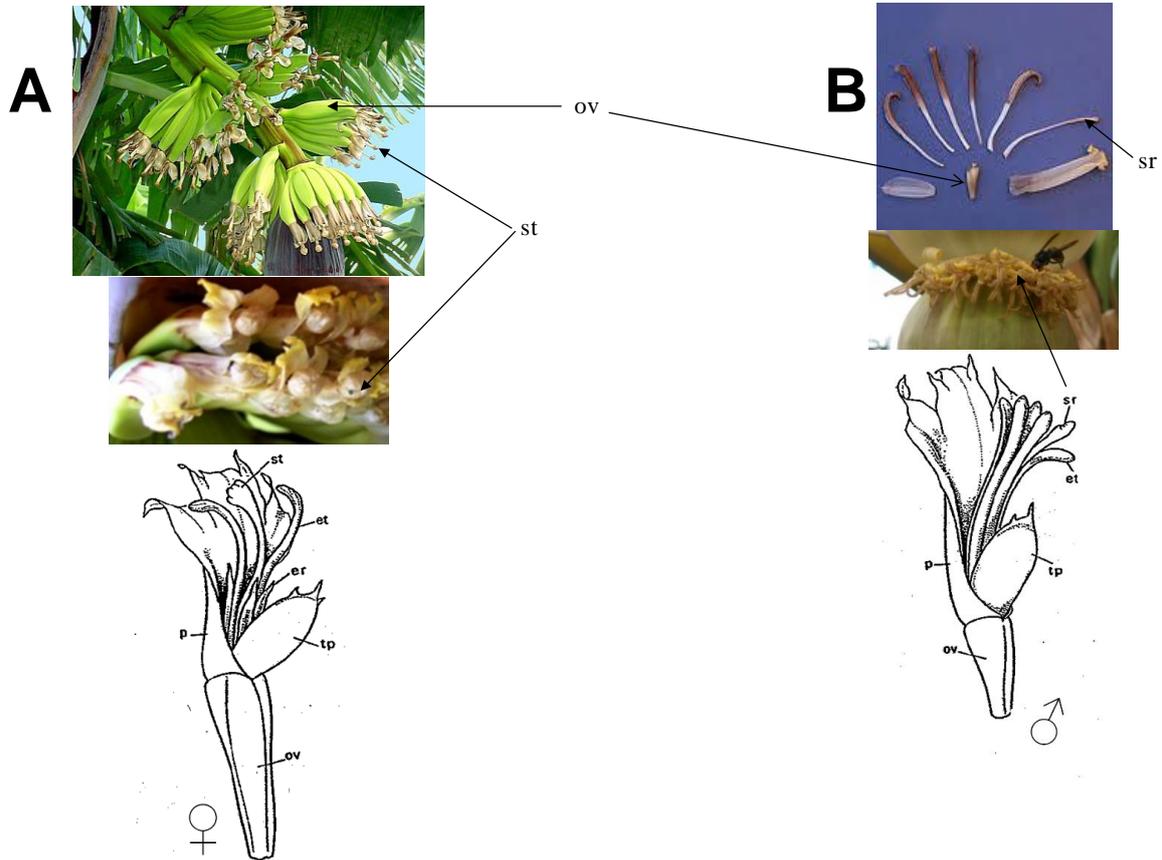


Figure I - 2 : Photos et dessins de fleurs de bananier (adapté de (Bakry, 1984))

A - Fleur « femelle », st = stigmate, et = étamine normale, er = étamine réduite, p = périgone, tp = tépale libre, ov = ovaire,
B - Fleur « mâle », sr : stigmate réduit

système foliaire, des spathes (ou bractées) qui couvrent chacune un groupe de fleurs (la cyme), dépourvues de bractée individuelle et placées le plus souvent en deux rangées serrées et imbriquées (Bakry, 1984). Dès la sortie hors du pseudo-tronc (floraison), l'inflorescence chez la plupart des cultivars ainsi que chez quelques espèces sauvages se recourbe vers le sol pour pendre verticalement. Les spathes larges et acuminées se soulèvent de la plus ancienne à la plus récente, puis elles se replient avant de tomber. A l'anthèse, les apex des fleurs (**Figure I-2**) pointent vers le bas (puis se redresseront en l'espace de quelques jours) ; c'est le moment propice de la pollinisation. Elle s'effectue à l'état naturel par les chauves-souris, les oiseaux et les insectes pollinisateurs. Au sein des programmes d'amélioration, le pollen prélevé sur des fleurs mâles est déposé manuellement sur les stigmates des fleurs femelles. Ces fleurs femelles sont constituées d'un ovaire représentant les deux tiers de la hauteur totale de la fleur, les styles et stigmates sont bien développés alors que les étamines sont réduites à des staminodes non fonctionnels (**Figure I-2 A**). Chez les bananiers cultivés, les premiers groupes de fleurs différenciés (cymes) sont constitués uniquement de fleurs femelles dont l'ovaire se développera pour former une banane. Les ovaires se remplissent de pulpe pour former le fruit (ou doigt de banane) sans pollinisation (parthénocarpie), ni formation de graines (aspermie). L'ovaire persiste et se développe alors que le périanthe et le stigmate se détachent, laissant une cicatrice à l'extrémité libre du fruit mature. Ces groupes de fleurs femelles, appelés le plus souvent « mains » (ou pattes) de bananes se développent et l'ensemble des « mains » constituent le régime. Le nombre de « mains » et de « doigts » par régime varie selon les variétés et les conditions de culture mais en général, il se forme 5 à 15 rangées de fleurs femelles possédant 15 à 22 fleurs chacune. Le poids du régime peut atteindre 40 à 80 kg dans le sous groupe des Cavendish (Lassoudière, 2010). Après les fleurs femelles, apparaissent 2 à 3 mains de fleurs neutres avec toutes les pièces florales avortées, suivies par les mains de fleurs mâles constituées d'ovaires réduits, de styles et stigmates abortifs et d'étamines bien développées (**Figure I-2 - B**).

b - L'inflorescence mâle (encore appelé « popote »)

La croissance de l'inflorescence se poursuit indéfiniment pour former à son extrémité le bourgeon mâle ou « popote ». Il est constitué de la superposition des bractées et produit des mains de fleurs mâles qui, généralement, tombent quelques heures après avoir été découvertes en dénudant ainsi la partie inférieure de la hampe (Lassois *et al.*, 2009 ; Lassoudière, 2010). Contrairement aux fleurs femelles, les spathes des fleurs mâles possèdent une zone d'abscission. Chaque jour, une à deux spathes (selon les clones) se soulèvent avant

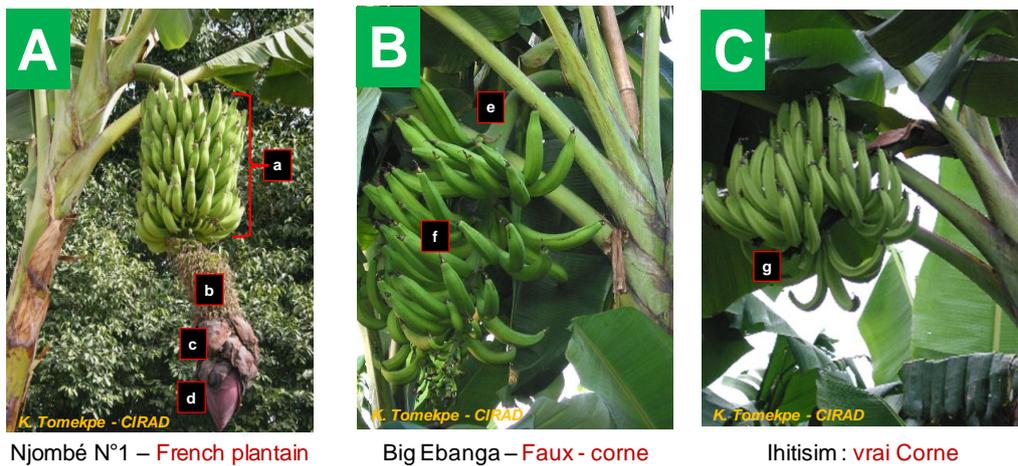


Figure I - 3 : Photos de régimes des trois sous groupes de plantain

A : « **French plantain** » inflorescence complète (à croissance indéfinie) et persistance du bourgeon mâle à la maturité du régime.

B : « **Faux-cornes** » avec une inflorescence incomplète (à croissance finie) et disparition du bourgeon mâle à maturité.

C : « **Vraie cornes** » avec une inflorescence incomplète. L'axe inflorescentiel sans bourgeon mâle se termine par un mince filet après la dernière main femelle.

Légende : **a** = régime, **b** = fleurs hermaphrodites, **c** = bractée, **d** = bourgeon mâle, **e** = hampe, **f** = doigts de banane, **g** = filet.

Monocotylédone

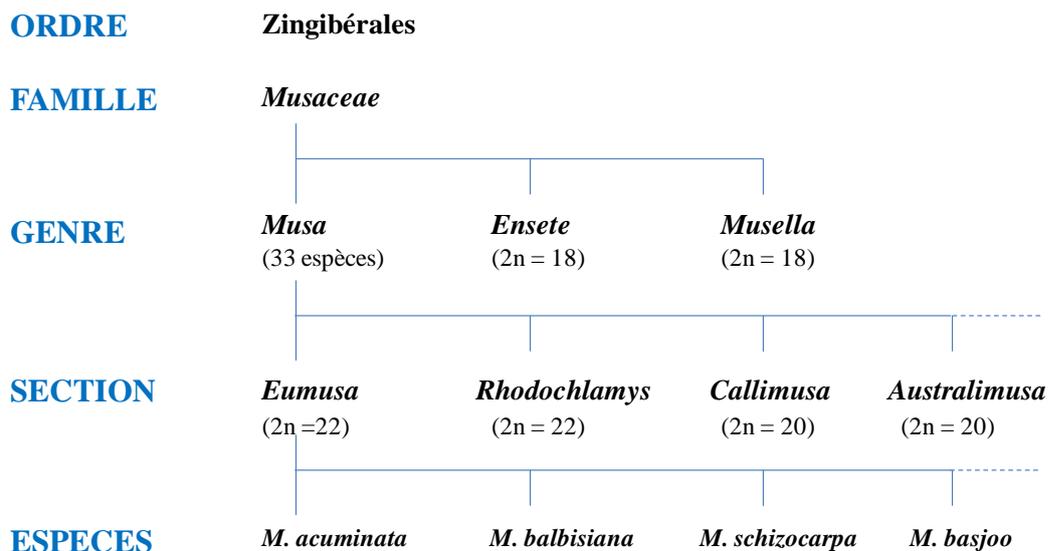


Figure I - 4 : Taxonomie du bananier

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

de tomber. Chez les bananiers à cuire du groupe des plantains, la dégénérescence de l'inflorescence mâle permet de classer les cultivars en 3 sous groupes (Tezenas du Montcel *et al.*, 1993) (**Figure I-3**) :

- les « **French plantains** » avec une inflorescence complète (à croissance indéfinie) et le bourgeon mâle persistant à la maturité du régime (**Figure I-3 A**) ;

- les « **Faux cornes** » avec une inflorescence incomplète (à croissance finie) et le bourgeon mâle qui disparaît à maturité (**Figure I-3 B**) ;

- les « **Vrais cornes** » avec une inflorescence incomplète. L'axe inflorescentiel sans bourgeon mâle se termine par un mince filet après la dernière main femelle (**Figure I-3 C**).

I – 1 - 2 - Taxonomie et Origine des espèces cultivées

Le bananier est une monocotylédone classée dans le phylum des *Magnoliophytae*, la classe des *Liliopsidae*, l'ordre des *Zingiberales* et la famille des *Musaceae*. Cette famille comprend trois genres : le genre *Musella*, le genre *Ensete* et le genre *Musa* qui comprend les bananiers à fruits comestibles. Le genre *Musa* se structure en quatre sections : *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys* et *Eumusa* (**Figure I-4**). A cause des synonymies observées entre les quatre sections du genre *Musa*, Häkkinen (2013) a récemment regroupé les sections *Australimusa* et *Callimusa* et les sections *Rhodochlamys* et *Eumusa* en deux sections distinctes : la section *Callimusa* (x=n=10) et la section *Musa* (x=n=11). Mais ce regroupement fait encore débat et n'est pas accepté par toute la communauté scientifique. C'est pourquoi, nous avons choisi de présenter dans ce document, la classification la plus reconnue des bananiers. La section *Eumusa* compte une dizaine d'espèces dont les plus importantes sont *M. acuminata* (génomé A), *M. balbisiana* (génomé B) et dans une moindre mesure, *M. schizocarpa* (génomé S).

I – 1 – 2. 1. Les outils de caractérisation et classification des *Eumusa*

a - Les caractères agro-morphologiques

Les deux principales espèces à l'origine des bananiers cultivés sont *M. acuminata* et *M. balbisiana* (Cheesman, 1948; Simmonds et Shepherd, 1955; Stover et Simmonds, 1987). A l'origine, la classification des bananiers cultivés s'est faite sur la base de 15 descripteurs morphologiques en association avec la détermination des niveaux de ploïdie par comptage de chromosomes (Cheesman, 1948; Simmonds et Shepherd, 1955). Parmi ces descripteurs, nous pouvons citer la couleur du pseudo-tronc, les caractéristiques de la fleur mâle (couleur, forme,

Tableau I - 1 : Présentation des 15 descripteurs morphologiques définis pour la classification des Eumusa (Simmonds et Shepherd, 1955).

<http://www.promusa.org/tiki-index.php?page=Nomenclature+of+cultivated+bananas> (visité le 15 avril 2013)

Descripteurs morphologiques	<i>Musa acuminata</i>	<i>Musa balbisiana</i>
Couleur du pseudo tronc	Plus ou moins fortement marqué de taches brunes ou noir	Taches très faibles ou absent
Canal du pétiole	Marge dressées ou étalées, avec des ailes scarieuses ci-dessous, ne serrant	Marge renfermé, pas ailé mais en joignant pseudo
Hampe	Habituellement duveteux ou poilu	Glabre
Pédoncules	Court	Long
Ovules	Deux rangées régulières dans chaque loge	Quatre rangées irrégulières dans chaque loge
Aspect de la bractée	Habituellement élevé (ratio <0,28)	Habituellement faible (ratio > 0,30)
Incurvation de la bractée	Bractées réflexe et roule en arrière après soulèvement	Ouverture en reflex
Forme de la bractée	Lancéolées ou étroitement ovales, se rétrécissant brusquement	Largement ovales, se rétrécit brusquement
Sommet de la bractée	Aigu	Obtus
Couleur de la bractée	Rouge, terne extérieur violet ou jaune, rose, terne intérieur	Brun-pourpre distinctif à l'extérieur; lumineux à l'intérieur cramoisi
La décoloration interne de la bractée	Décoloration interne de la bractée généralement en jaune vers la base	Décoloration de la bractée généralement continue à la base
Cicatrice de la bractée	Proéminent	A peine proéminent
Tépale libre de fleur mâle	Variable ; ondulée ou Pointe	Rarement ondulé
Couleur de la fleur mâle	Blanc crème	Façon variable teinté avec du rose
La couleur du stigmate	Orange ou jaune - crème	Jaune pâle ou rose pâle

Thèse Guy Blaise Noubissié – 26 mars

r SupA...

Ségrégation des chromosomes dans un croisement inter-spécifique de bananes (AAA-B-BB)

analyse de l'impact de la diversité génétique

Score de la variété

1

5

aspect, incurvation, sommet, décoloration interne de la bractée, cicatrice et comportement de la bractée après son soulèvement), la couleur du stigmate, le nombre de tépales libres et la couleur de la fleur mâle (voir **Tableau I-1** ci-contre). Ces descripteurs ont été définis par Simmonds et Shepherd (1955) à cause de leur stabilité et de leur capacité à discriminer les différents bananiers cultivés et à déterminer leur ressemblance avec *M. acuminata* ou *M. balbisiana*.

b - Nombre de chromosomes, études de cytogénétique et marqueurs moléculaires

Le nombre de chromosomes de base chez les bananiers de la section *Eumusa* est $n=x=11$. Une variété peut être diploïde ($2n=2x=22$), triploïde ($2n=3x=33$) ou tétraploïde ($2n=4x=44$). Les cultivars triploïdes sont les plus nombreux et les tétraploïdes sont rares (Simmonds, 1962). Les comptages de chromosomes, la cytométrie en flux (Doležel *et al.*, 1989 ; Jenny *et al.*, 1997 ; Shepherd, 1999 ; Kamate *et al.*, 2001 ; Doležel et Bartoš, 2005) ainsi que les techniques isoenzymatiques (Rivera, 1981) et moléculaires telles que la technique RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Gawel et Jarret, 1991 ; Carreel, 1994 ; Carreel *et al.*, 1994), la technique AFLP (Amplification fragment length polymorphism) (Jarret *et al.*, 1993 ; Howell *et al.*, 1994 ; Ude *et al.*, 2002) les marqueurs microsatellites (SSR) (Grapin *et al.*, 1998 ; Hippolyte *et al.*, 2010), les études de cytogénétique (Shepherd, 1999) et la GISH (Genome in situ hybridisation) (Osuji *et al.*, 1997 ; D'Hont *et al.*, 2000 ; D'Hont, 2005 ; Jeridi *et al.*, 2011) ont fortement contribué à l'étude de la diversité chez les *Musa* (De Langhe, 1990 ; Carreel *et al.*, 2002 ; Noyer *et al.*, 2005 ; Phothipan *et al.*, 2005 ; Ruangsuttapha *et al.*, 2007). La GISH, en particulier, a été utilisée pour préciser la nature des génomes constituant les bananiers polyplœides. Toutes ces techniques ont permis de confirmer la répartition des *Musa* en cinq groupes génomiques (AA, AAA, AB, AAB ou ABB). L'étude de leur structuration montre que les cultivars proviennent bien de certaines sous-espèces de *M. acuminata* associées ou non à des génotypes de *M. balbisiana* particuliers. Dans le cadre de cette étude, les marqueurs SSR ont été utilisés. Ces marqueurs, définis suite au séquençage complet du génome (A) *M. acuminata malaccensis* Pahang (D'Hont *et al.*, 2012) nous ont permis d'identifier dans le génome (B) *M. balbisiana*, des allèles candidats pouvant nous permettre de suivre la ségrégation des chromosomes B chez notre population d'étude.

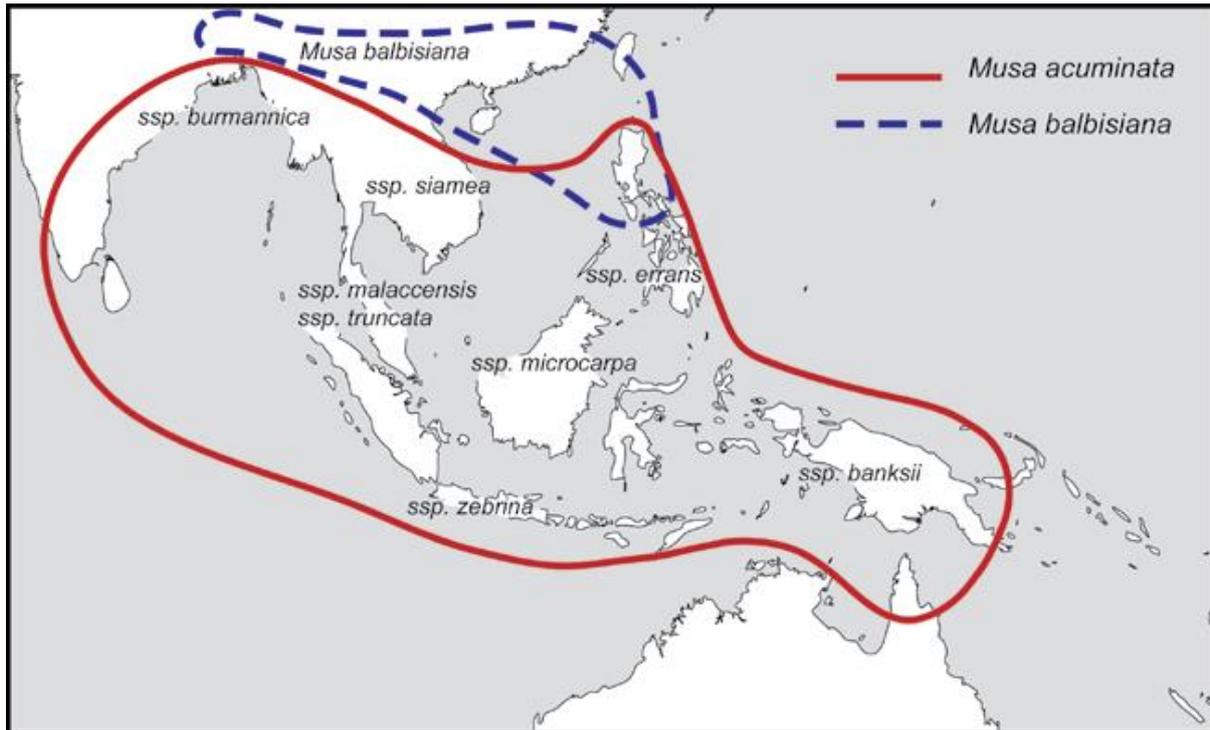


Figure I - 5 : Répartition géographique ancestrale des deux principales espèces de bananier et des sous espèces associées en Asie du Sud-Est (d'après De Langhe *et al.*, 2009)

I – 1 – 2. 2. Les espèces sauvages : caractéristiques, structuration, distribution.

Les espèces sauvages sont des populations naturelles endémiques. Comme la plupart des autres espèces du genre, *M. acuminata* et *M. balbisiana* (**Figure I-5**) sont originaires des forêts tropicales au Sud et au Sud-Est de l'Asie et du Pacifique, de la péninsule Indienne aux îles Samoa (De Langhe *et al.*, 2009). Les bananiers sauvages sont tous diploïdes et séminifères. Cette abondance de graines rend les fruits non comestibles. Chez ces diploïdes sauvages, le système de reproduction sexuée se situe entre l'autogamie et l'allogamie. En effet, la fécondation est croisée chez la plupart. Mais pour certaines sous espèces (*M. acuminata banksii*, *M. acuminata siamea* et *M. acuminata errans*), l'autogamie est favorisée par la présence de fleurs hermaphrodites (contenant gynécée et androcée fonctionnels) à la place des fleurs femelles. Les sous espèces autogames présentent des taux d'hétérozygotie faibles, proches de 0% alors que la plupart des autres clones connus ont un taux d'hétérozygotie variant de 10 à 50% (Carreel, 1994). Simmonds (1962) remarque qu'une pollinisation par des clones apparentés semble donner plus de graines que par autofécondation chez les deux espèces *M. acuminata* et *M. balbisiana*. C'est cette capacité à produire les graines chez les bananiers à l'issue de croisements intra- ou interspécifiques qui est exploitée par les programmes d'amélioration pour définir les schémas de croisement en vue de la production d'hybrides améliorés.

Neuf sous espèces majeures ont été décrites chez *M. acuminata*. Ceci reflète la grande diversité morphologique et génétique de l'espèce. On distingue les espèces *M. a. banksii* (Mueller) de Papouasie Nouvelle Guinée, *M. a. errans* (Blanco) des Philippines, *M. a. burmannica* (Simmonds) et *M. a. burmanicoides* (De Langhe) du Bangladesh et de l'Est de l'Inde à Myanmar, *M. a. malaccensis* (Ridley) principalement de la Malaisie et du Sud de la Thaïlande, *M. a. microcarpa* (Beccari) de la région de Bornéo, *M. ac. siamea* du Nord de la Thaïlande et du Laos (Simmonds), *M. a. zebrina* (Van Houtte) de la zone Sud de l'Indonésie et *M. a. truncata* (Ridley) originaire des montagnes malaysiennes qui est très distincte des autres sous-espèces (Carreel *et al.*, 1994 ; Perrier *et al.*, 2011).

Les études de cytogénétique ont révélé que l'évolution au sein du complexe *acuminata* s'est accompagnée de réarrangements de structure des chromosomes tels que des duplications, inversions et transferts ou échanges de segments de chromosomes. Ces évolutions ont pu être mises en évidence par l'observation des figures d'appariements chromosomiques à la méiose. Ainsi, Shepherd (1999) a rapporté que les accessions sauvages de *M. acuminata* ne présentaient pas d'hétérozygotie structurale au sein d'une même sous-

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

espèce signifiant que les paires de chromosomes (s'appariant en bivalents) avaient les mêmes séquences d'alignement. A l'inverse, des hybrides entre deux sous-espèces se sont avérés hétérozygotes de structure avec des réarrangements (translocations, principalement) entre paires de chromosomes homologues.

Le regroupement des neuf sous-espèces de *M. acuminata* en cinq pools génétiques montre que cette espèce (*M. acuminata*) constitue un groupe à part, bien structuré parmi les espèces de la section *Eumusa* (Jenny *et al.*, 1999). Les études sur l'espèce *M. balbisiana* ont montré une diversité beaucoup plus réduite (Horry, comm. perso., Gayral, 2008). Cette espèce est très homogène et aucune sous espèce n'a été décrite à cette date.

I – 1 – 2. 3. Des espèces sauvages aux variétés diploïdes comestibles

Les bananiers cultivés sont des clones (quasi) stériles et parthénocarpiques. Ils sont issus de croisements intra-spécifiques au sein du complexe *M. acuminata* Colla (génom A) mais aussi de croisements interspécifiques avec l'espèce *M. balbisiana* Colla (génom B), et beaucoup plus rarement avec *M. schizocarpa* (génom S) ou avec des représentants de la section *Australimusa* (Baurens, 1997 ; Thonnalak *et al.*, 2010). Carreel (1994 ; 2002) grâce à l'étude des génomes cytoplasmiques et nucléaires, suggère que la parthénocarpie est apparue chez *M. acuminata* au sein des sous espèces *banksii* et/ou *errans*. Plus globalement, *M. acuminata* est suspectée d'être à l'origine de la parthénocarpie (Stover et Simmonds, 1987 ; Carreel, 1994). De fait, il n'existe pas de variétés cultivées naturelles qui ne contiennent pas du génom A dans leur constitution génomique.

Les résultats obtenus ces dix dernières années ont conduit à préciser le processus historique de l'évolution des bananiers qui a mené à la diversité actuelle. Ces travaux soulignent notamment le rôle fondamental des sociétés humaines dans le processus de domestication (Perrier *et al.*, 2009). Un scénario bien admis maintenant décrit le processus d'évolution des *M. acuminata* séminifères aux variétés diploïdes comestibles.

L'émergence d'une proto-agriculture aurait favorisé l'initiation d'un long processus de sélection faisant progressivement passer des formes sauvages vers des formes sauvages cultivées puis des formes cultivées primitives. Ce processus a probablement eu lieu en parallèle et de façon indépendante dans les différentes aires de dispersion des sous espèces d'*acuminata*. Plus tard, ces proto-formes cultivées ont été dispersées par les migrations humaines et ont permis des hybridations entre clones appartenant à des sous espèces

différentes générant de nouvelles variétés, plus stériles, alimentant le processus de sélection et conduisant à la structuration des variétés diploïdes comestibles observée aujourd'hui. Un résultat très important de ces travaux est d'avoir montré que pratiquement toutes les variétés diploïdes comestibles actuelles résultent d'hybridations entre sous espèces d'*acuminata* ; elles sont toujours très hétérozygotes (gènes et structure) et leur distribution ne recouvre jamais la structuration des sous espèces sauvages suggérant de multiples hybridations entre formes génétiquement très distantes.

I – 1 – 2. 4. Des variétés diploïdes aux variétés triploïdes et tétraploïdes

La polyploïdisation (**Figure I-6**) est une force majeure d'évolution et de diversification dans le règne végétal. Les polyploïdes sont particulièrement représentés chez les espèces cultivées et sont plus vigoureux (Otto, 2007 ; Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2013). On distingue deux groupes de polyploïdes : les **autopolyploïdes** sont composés de multiples jeux de chromosomes provenant d'une même espèce (**Figure I-6-A**) et les **allopolyploïdes** sont issus de croisements entre espèces voisines étroitement apparentées (**Figure I-6-B**).

Le génome d'un allopolyploïde contient donc deux ou plusieurs génomes différenciés (dits **homéologues**) dupliqués. Les données récentes montrent que les génomes allopolyploïdes sont particulièrement plastiques suite au choc génomique résultant de l'hybridation et à la redondance d'information résultant de la polyploïdie (Adams, 2007 ; Chen *et al.*, 2007 ; Doyle *et al.*, 2008). Des progrès importants ont été accomplis dans la compréhension de cette dynamique, à travers les données de la génomique comparative et les données issues de modèles expérimentaux (allopolyploïdes synthétiques) qui ont montré comment les génomes réagissent à court-terme à l'hybridation et à la polyploïdisation (Adams et Wendel, 2005 ; Comai, 2005 ; Chen, 2007). Les événements de polyploïdie peuvent entraîner d'importantes modifications génétiques et épigénétiques, comme des réarrangements de chromosomes, des pertes de gènes, l'activation d'éléments transposables, la méthylation de l'ADN et des modifications de l'expression des gènes (Buggs *et al.*, 2012). Cependant, le type et l'intensité des changements induits par la polyploïdie varient de façon assez importante selon les espèces étudiées, et selon que l'on regarde à court ou à long-terme après l'évènement de polyploïdisation (Weiss-Schneeweiss *et al.*, 2013 ; Garsmeur *et al.*, 2014). Des changements de structure rapides ont été observés chez plusieurs allopolyploïdes récents, tels que *Brassica* (Song *et al.*, 1995) et *Tragopogon* (Lim *et al.*, 2008), mais pas chez les cotons allopolyploïdes (Liu *et al.*, 2001), *Spartina anglica* (Baumel *et al.*, 2002) et *Coffea arabica* (Lashermes *et al.*, 1999) où des changements dans les profils d'expression des gènes

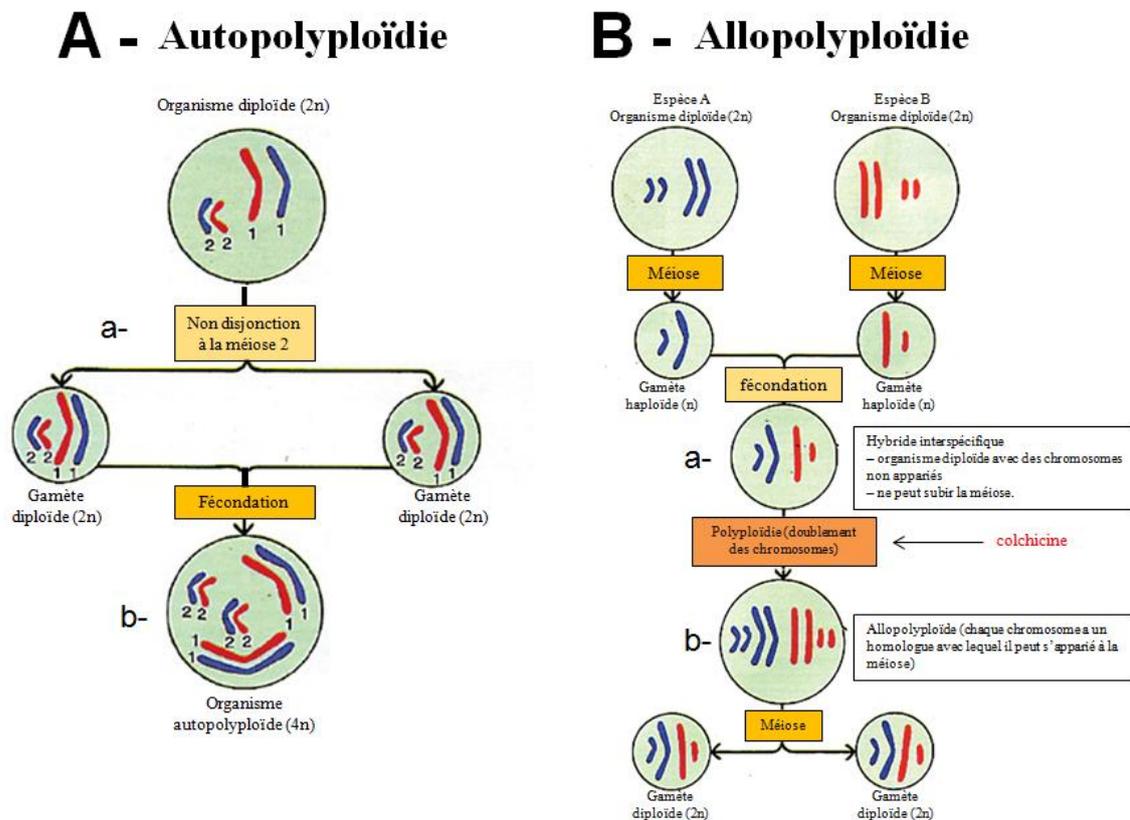


Figure I – 6 : Schémas de polypléidisation (adapté du cours – Génome http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p189/cours_g_ome_L.pdf consulté le 23 septembre 2012)

A: L'autopolyploïdie. La polypléidie à l'intérieur d'organismes individuels peut aboutir à la formation de nouvelles espèces.

(a)- Si les chromosomes d'un organisme diploïde ne se séparent pas à la méiose (non-disjonction), l'individu peut donner des gamètes diploïdes (2n)

(b)- l'union des deux gamètes provenant du même individu ou d'individus différents de la même espèce, produit un individu autopolyploïde ou tétraploïde (4n).

B: L'allopolyploïdie (a)- un hybride entre deux espèces différentes – un hybride interspécifique – provenant de deux gamètes haploïdes (n) peut se développer normalement parce que la méiose est normale. Il ne peut cependant se reproduire par voie sexuée, parce que les chromosomes sont incapables de s'apparier à la méiose. (b)- si le nombre de chromosomes est ensuite doublé, les chromosomes s'apparient à la méiose. Par conséquent, l'hybride –un allopolyploïde –peut donner des gamètes diploïdes (2n) viables: c'est une nouvelle espèce capable de se reproduire.

semblent dominer (Chelaifa *et al.*, 2010 ; Bardil *et al.*, 2011 ; Yoo *et al.*, 2012).

Conséquences de la polyploïdisation chez le bananier

Les polyploïdes viables chez les bananiers sont triploïdes (AAA, AAB ou ABB) ou tétraploïdes (AAAA, AAAB ou AABB). Ils sont plus vigoureux et leurs fruits sont plus gros que ceux des diploïdes. La triploïdie est le niveau de ploïdie optimal sur le plan agronomique pour les cultivars actuels. De fait, les pentaploïdes et heptaploïdes obtenus au sein des programmes d'amélioration génétique sont chétifs et n'arrivent jamais à floraison (Simmonds, 1962). Le bananier hybride allotétraploïde CRBP39 de constitution génomique AAAB utilisé comme parent femelle pour générer la population de cette étude est de fait issu de l'union d'un gamète triploïde non réduit à la méiose 2 du plantain French clair (AAB) par le gamète haploïde du diploïde *M. acuminata* amélioré M 53 (AA).

Les variétés triploïdes sont cultivées aujourd'hui partout dans le monde. Leur succès tel que les Cavendish ou Plantains, par exemple, est dû à leur forte vigueur, la production de gros fruits et leur stérilité gamétique. Pour les AAB et ABB, le génome *balbisiana* apporte aussi, outre un renforcement de l'hétérozygotie, des caractères de tolérance aux stress abiotiques. Ces caractéristiques favorables ont mené à l'expansion de ces variétés, loin de leur centre d'origine, comme cela a été le cas des Plantains en Afrique.

Il est parfaitement acquis aujourd'hui que les variétés triploïdes proviennent majoritairement de la fusion d'un gamète diploïde non réduit à la méiose 2 produit par une variété diploïde avec un gamète haploïde. Les gamètes diploïdes résultent souvent de restitutions mitotiques à la méiose qui ont lieu quand les deux génomes constitutifs d'une plante diploïde sont très différents comme c'est le cas dans les diploïdes interspécifiques *M. acuminata*/*M. balbisiana* AB mais également dans les hybrides inter-sous-spécifiques au sein de *M. acuminata*.

C'est ainsi que l'inter sous-spécificité qui est à l'origine des diploïdes AA cultivés est également à l'origine des triploïdes à travers la production des gamètes restitués. De façon similaire, les rares variétés tétraploïdes existantes à l'état naturel dans le monde, proviennent très probablement, de la rencontre d'un gamète non réduit à la méiose 2 ($n=3x=33$) de variété triploïde avec un gamète haploïde d'une variété ou clone diploïde.

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

La comparaison de la distribution des triploïdes par rapport aux diploïdes par marqueurs moléculaires s'est avérée cohérente avec la structuration en groupes préalablement établie sur la base des critères agro-morphologiques (Jenny *et al.*, 2003). Une analyse factorielle basée sur 22 marqueurs SSR a notamment montré que le premier axe révèle les nombres respectifs de génome *M. acuminata* et *M. balbisiana* de AAA à ABB. Le second axe, indépendant du premier, révèle pour sa part la contribution respective de chacune des sous-espèces de *M. acuminata* de *banksii* à *burmannica/burmannicoides/siamea*, en passant par *zébrina* et *malaccensis*. Ces contributions ont également été confirmées par les fréquences alléliques et les types cytoplasmiques.

Enfin, l'utilisation par l'homme de la multiplication végétative de clones stériles a conduit, dans une dernière étape de la domestication (et encore pratiquée aujourd'hui), à la sélection de nombreux mutants (de taille, de couleur, de conformation des régimes) contribuant à l'élargissement de la variabilité phénotypique des bananiers. Ainsi, il a été bien montré maintenant par marqueurs moléculaires que tous les clones de Plantain décrits à ce jour (\pm 200 clones), dérivent tous les uns des autres par rejets à partir d'un événement sexué ancien, unique et, fondateur. Il en est de même que pour les autres sous-groupes de bananier tel que les Cavendish ou les Mlalis.

I – 2 - Amélioration génétique du bananier

I – 2 - 1. Historique de l'amélioration génétique des bananiers

L'amélioration génétique des bananiers a débuté dans les années 1920 en Amérique Centrale suite aux attaques du cultivar « Gros Michel » (AAA sous groupe Gros Michel) par la maladie de Panama (*Fusarium oxysporum*) (Bakry *et al.*, 2001). Dans les années 30, le premier hybride tétraploïde (AAAA) a été créé à partir d'un croisement entre le triploïde « Gros Michel » (de constitution génomique AAA) parent femelle et le diploïde *M. acuminata* ssp *malaccensis* (AA) parent mâle (Shepherd, 1994). Ce n'est cependant que depuis une vingtaine d'années que des variétés améliorées sont cultivées par des producteurs (Horry *et al.*, 2000). Cinq instituts de recherche travaillent actuellement dans le monde sur l'amélioration génétique dite classique du bananier : le CIRAD aux Antilles françaises, l'IITA (International Institute of Tropical Agriculture) au Nigéria, l'EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) au Brésil, le CARBAP au Cameroun, la FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola) au Honduras. Les collections de germoplasme sont la base de ces programmes de sélection et d'amélioration. La plus grande collection de

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

génotypes *Musa* « *in vitro* » est maintenue par Bioversity International dans son centre de transit (*Musa* International Transit Center - ITC) à l'Université catholique de Louvain en Belgique. Elle compte plus de 1000 accessions et est partiellement dupliquée à Taiwan au Taiwan banana research institute (TBRI), et au Costa Rica au « Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza » (CATIE). Des collections conservées au champ sont installées dans 33 pays à travers le monde. Les principales sont au Honduras, au Cameroun, au Brésil, en France (Guadeloupe), en Inde, en Colombie, en Jamaïque et aux Philippines (Vilarinhos, 2004).

La publication depuis peu de la séquence complète du génome du bananier *M. acuminata* ssp *malaccensis* cv Pahang par (D'Hont *et al.*, 2012) offre un accès à de nouvelles ressources génomiques. Cette avancée est d'un intérêt capital pour l'étude des gènes et l'évolution des génomes ; études qui devraient apporter une avancée significative dans l'amélioration des bananiers.

I – 2 - 2. Les objectifs de la création

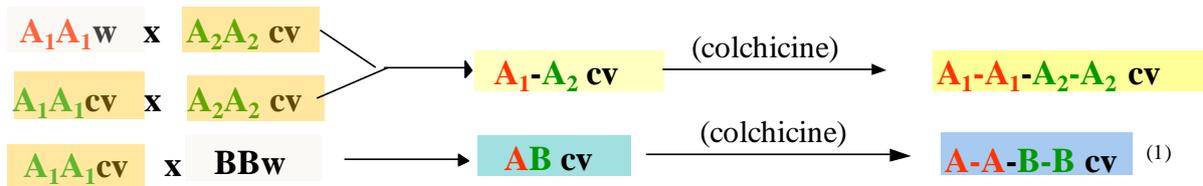
Les programmes d'amélioration génétique ont pour objectif la création de variétés améliorées à partir de la diversité naturelle *Musa* existante en réponse aux contraintes majeures que connaît la culture bananière, la résistance aux maladies étant le principal objectif des différents programmes d'amélioration (Silva *et al.*, 2001).

Dans les collections de bananiers, la variabilité entre les accessions de diploïdes sauvages semble en adéquation avec les besoins de l'amélioration génétique. Il existe une forte variabilité pour la taille des plantes, la vigueur des rejets, le nombre de mains par régime, la taille des fruits et les résistances/tolérances aux principaux ravageurs et maladies. Ceci constitue donc un point de départ favorable pour les programmes d'amélioration (Silva *et al.*, 2001).

La culture du bananier est soumise à quatre grands groupes de maladies (Robinson, 1993).

- **Les maladies fongiques** que sont la fusariose (ou maladie de Panama) et les cercosporioses.
- **Les maladies telluriques** dues aux nématodes et aux charançons
- **Les maladies bactériennes** sont également rencontrées chez les bananiers. Elles sont essentiellement causées par *Ralstonia solonacearum*, *Xanthomonas campestris* pv. *celebensis*

A Développement de tétraploïdes



B Développement de triploïdes



Figure I - 7 : La stratégie d'amélioration 4x/2x développée par le CIRAD (d'après Tomekpe *et al.*, 2004).

A - Des cultivars (cv) diploïdes sont traités à la colchicine pour produire des cv tétraploïdes.

B - Ceux-ci sont croisés par des diploïdes cultivés ou sauvages pour la production des triploïdes recherchés.

Légende : cv = cultivar ; w = espèce sauvage; (1) et (2) = Arrêté en raison du problème BSV.

Musacearum et *Pseudomonas* responsables respectivement de la maladie de Moko, du flétrissement bactérien et du *banana blood disease*.

- **Les maladies virales** sont une contrainte majeure à la culture des bananes et des plantains à travers le monde de nos jours (Ramírez et Rivera, 1998). Parmi les principales espèces virales qui attaquent ces plantes, sont recensés : le *Banana bunchy top virus* (BBTV) (Dale *et al.*, 1986), le *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Johnson, 1927), le *Banana bract mosaic virus* (BBrMV) (Brunt, 1991) et le *Banana streak virus* (BSV) (Lockhart, 1986).

✚ Le BSV est responsable de la mosaïque en tirets des bananiers (Banana streak disease – BSD). Le BSD est le fait d'un complexe d'espèces de BSV. Ces virus dont l'hôte principal est le bananier présentent entre eux une diversité importante les structurant en espèces distinctes bien que responsables d'une seule et même maladie. Quatre espèces de cochenilles (*Hemiptera*, *Coccoidea*, *Pseudicoccidae*) infectant les bananiers sont capables de transmettre le virus : la cochenille des agrumes (*Planococcus citri*), la cochenille de la vigne (*P. ficus*), la cochenille rose de la canne à sucre (*Saccharicoccus sacchari*) et la cochenille de l'ananas (*Dysmicoccus brevipes*) (Kubiriba *et al.*, 2001 ; Meyer *et al.*, 2008). Les cochenilles sont sédentaires et certains stades larvaires mobiles peuvent assurer une transmission de plante à plante (Lockhart, 1995). Mais les mouvements de cochenilles sont très lents, sur de courtes distances pouvant être augmentées par l'aide des fourmis. Ceci fait que la propagation de la maladie due au BSV peut être contrôlée en condition de culture par la destruction des plantes infectées et le contrôle des vecteurs. Le BSV a une incidence relativement faible sur la culture du bananier par rapport à d'autres virus (BBTV par exemple). Toutefois, le BSV peut causer des pertes allant de 6 à 90% (Lassoudiere, 1974 ; Dahal *et al.*, 2000 ; Daniells *et al.*, 2001). Les épidémies de BSV sont circonscrites aujourd'hui en Afrique, plus précisément en Ouganda et au Nigéria (Kubiriba *et al.*, 2001 ; Harper *et al.*, 2005).

En complément à la lutte chimique et biologique contre ces maladies, l'obtention de plantes tolérantes ou résistantes aux principaux pathogènes (ainsi que déjà mentionné) reste une des priorités de tous les programmes d'amélioration génétique du bananier. C'est dans cet objectif global que s'inscrit mon sujet de thèse.

I – 2 - 3. Les stratégies d'amélioration du bananier

Le croisement génétique, technique d'amélioration classique la plus ancienne, est la stratégie utilisée pour l'amélioration du bananier. On croise pour cela deux plantes ayant des

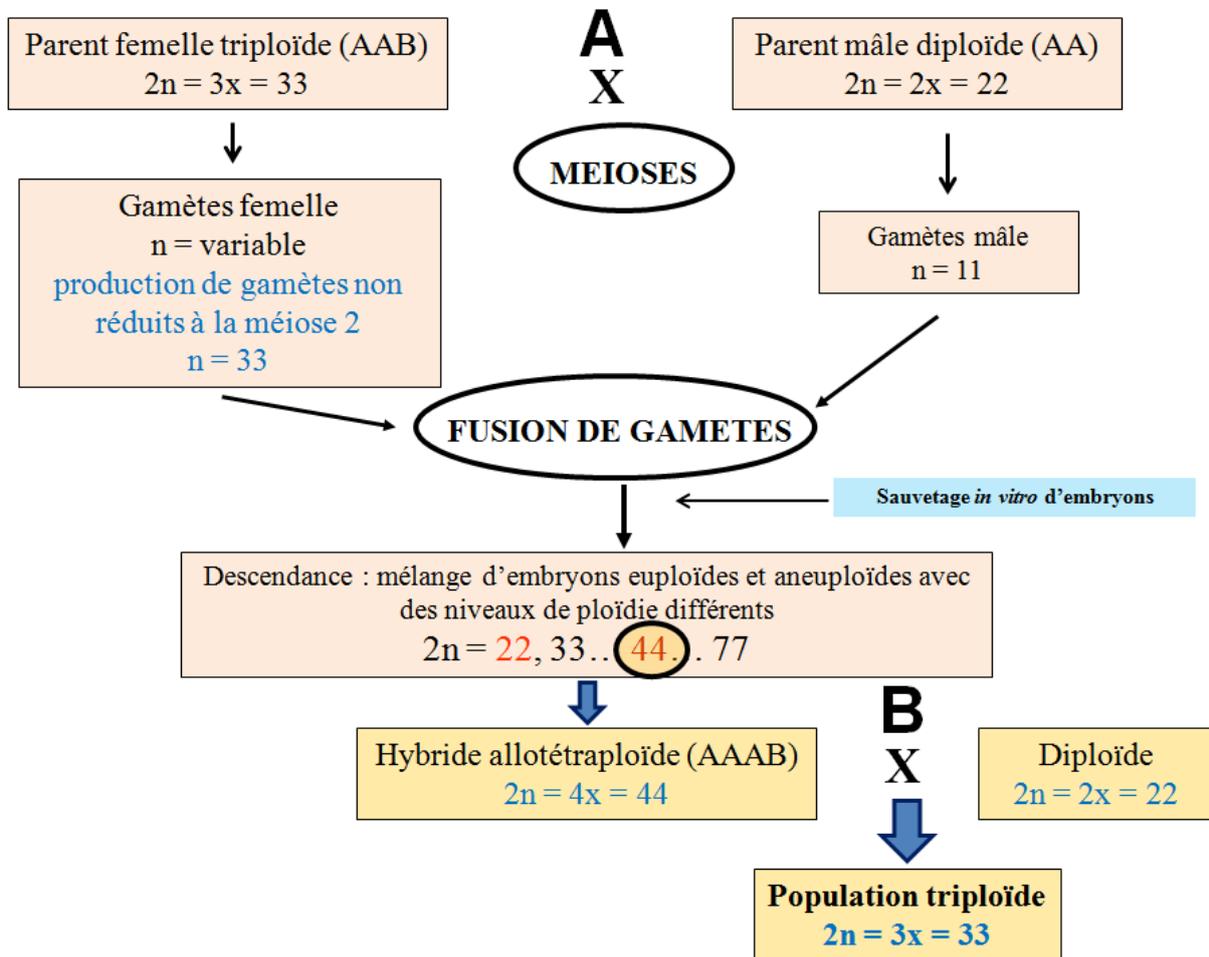


Figure I - 8 : Stratégie 3x/2x d'amélioration des plantains (d'après Tomekpe *et al.*, 2004)

(A) - Le triploïde plantain (AAB) à améliorer est croisé par un diploïdes *M. acuminata* (AA) sauvage ou amélioré. La population issue de ce croisement n'est pas homogène. Les individus possèdent des niveaux de ploïdie variables ($2x, 3x, 4x, 5x, \dots 7x$).

(B) - Un tétraploïde issu de l'union d'un gamète non réduit ($n = 3x$) du triploïde et d'un gamète normal ($n = x$) du diploïde sera à son tour croisé par un second diploïde pour obtenir le triploïde amélioré recherché.

caractères agronomiques intéressants et complémentaires pour le trait recherché. Par le choix des meilleurs hybrides dans la descendance, les sélectionneurs aboutissent après un long travail d'élimination successive à la création d'une nouvelle variété.

Il faut garder à l'esprit que les croisements génétiques classiques chez le bananier comportent quelques spécificités. En effet, tout schéma de croisement doit aboutir à la production de plantes stériles (triploïdes) mais nécessairement à partir de géniteurs fertiles. Or la majorité des bananiers cultivés ne sont que faiblement fertiles. Il faut aussi prendre en compte le niveau de ploïdie des géniteurs dans les différentes stratégies d'amélioration.

Deux stratégies de création variétale radicalement différentes mais complémentaires ont été développées chez le bananier en s'appuyant sur les deux espèces *Musa* (*M. acuminata* et *M. balbisiana*) (Bakry *et al.*, 1990 ; Bakry *et al.*, 2001 ; Tomekpe *et al.*, 2004). Celles-ci sont décrites ci-après.

- La première dite 4x/2x (**Figure I-7**), développée principalement par le CIRAD et intitulée aujourd'hui « *reconstructive breeding* », vise l'amélioration des bananes desserts par la création des hybrides triploïdes à partir de diploïdes naturels ou améliorés. Cette stratégie repose sur une bonne connaissance préalable des ressources génétiques et des liens de parenté entre diploïdes et triploïdes. Cette stratégie (plus longue et plus fiable) conserve mieux les structures génétiques. Plus souple, elle permet d'utiliser des parents sauvages très fertiles, donnant un grand effectif de descendants.

- La deuxième stratégie d'amélioration dite 3x/2x (**Figure I-8**), vise à créer des variétés triploïdes avec une étape intermédiaire impliquant la production d'hybrides tétraploïdes améliorés issus de croisements entre variétés triploïdes (plantains AAB à améliorer - parent femelle, par exemple) et variétés diploïdes naturelles ou améliorées porteuses de gènes de résistance utilisées comme parent mâle (Tomekpe *et al.*, 2004). Ce schéma vise essentiellement l'amélioration des bananiers d'autoconsommation ou destinés aux marchés locaux. Cette stratégie offre peu de variabilité génétique du fait du nombre réduit de géniteurs et repose sur la production de gamètes femelles non réduits fixés ou faiblement variables en raison d'éventuelles recombinaisons (Tomekpe *et al.*, 1996). Typiquement, il y a « addition » dans les tétraploïdes intermédiaires des caractéristiques du parent femelle (sans grande modification) avec celles du parent mâle (Menendez et Shepherd, 1975 ; Vilarinhos, 2004; Tomekpe *et al.*, 1996). Ces tétraploïdes intermédiaires ont, toutefois, des caractéristiques indésirables pour la culture et la consommation des fruits telles que le port retombant et la

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

fragilité des pétioles foliaires, une faible qualité post-récolte des productions et une fertilité résiduelle gamétique avec la possibilité de trouver des graines dans les fruits. De plus, dans le cas d'hybrides de plantains, ils sont tous porteurs de séquences endogènes activables de BSV (cf paragraphe I-4-4.5). C'est pourquoi ces tétraploïdes intermédiaires sont souvent à leur tour hybridés comme parent femelle, par un diploïde naturel ou amélioré (parent mâle) pour obtenir les triploïdes améliorés recherchés. Cependant les recombinaisons qui ont lieu lors de la méiose des tétraploïdes mènent à « casser » la valeur de la combinaison génétique du parent triploïde de départ (résultat d'une longue sélection humaine et « préservée dans le tétraploïde »); elles génèrent une très grande variabilité des populations gamétiques (Menendez et Shepherd, 1975) nécessitant une sélection sur de très grandes descendance au champ. Il faut souligner ici que ces rétrocroisements peuvent mener aussi à la formation de diploïdes améliorés qui peuvent ensuite être utilisés comme géniteurs diploïdes tant dans la première que la seconde stratégie de croisement (Vuylsteke *et al.*, 1992 ; Tomekpe *et al.*, 1996 ; Silva *et al.*, 2001). Cette seconde stratégie d'amélioration est celle qui est appliquée conjointement aujourd'hui par le CARBAP et le CIRAD pour l'amélioration des plantains. La population d'hybrides interspécifiques qui constitue l'objet de mon étude a été obtenue suivant ce schéma de croisement (cf **Chapitre II**, paragraphe **II-2-1.**).

I – 2 – 4. Les contraintes et les limites de l'amélioration du bananier

Chez les clones de bananiers triploïdes (AAA, AAB et ABB), les croisements sont difficiles à cause de leur caractère interspécifique, de la parthénocarpie, de la polyploïdie, du niveau élevé d'hétérozygotie et d'une faible (voire très faible) production de gamètes fonctionnels (Bakry *et al.*, 2009 ; Hippolyte *et al.*, 2010). Souvent, certains cultivars (ou pré-cultivars) parthénocarpiques diploïdes et triploïdes complètement stériles ne peuvent pas être croisés (Bakry et Horry, 1992). Chez les autres, pour lesquels une fertilité résiduelle existe, il faut entreprendre de nombreuses pollinisations pour obtenir des descendance de taille significative permettant de faire des études de génétique ainsi que des sélections efficaces. Dans le cadre de cette thèse, c'est ce qui a dû être fait pour l'obtention de la population d'étude (cf **Chapitre II**, paragraphe **II-2-1.**).

Un autre frein au développement de nouvelles variétés de bananier a été l'apparition systématique de plantes infectées par le BSV dans les descendance interspécifiques. Ces infections sont apparues d'abord en ségrégation à l'issue des croisements et par la suite, sur des plantes hybrides saines ayant subi des stress de culture ou des passages par la culture *in*

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

vitro (CIV). Ces problèmes se sont traduits pour le CIRAD par la mise en place d'un moratoire sur la création d'hybrides interspécifiques diploïdes et triploïdes.

De nombreuses recherches ont alors été engagées pour comprendre l'origine de ces infections virales. On sait aujourd'hui qu'elles proviennent de l'activation spontanée de séquences virales intégrées (eBSV) dans le génome *M. balbisiana* de toutes les espèces sauvages et variétés cultivées connues à ce jour (Gayral, 2008 ; Gayral *et al.*, 2008 ; Côte *et al.*, 2010 ; Iskra-Caruana *et al.*, 2010 ; Duroy, 2012). Il a été montré, par exemple, que l'accession Pisang Klutuk Wulung (PKW) de génotype BB possède dans son génome des intégrations de trois espèces de BSV qui ne s'activent pas dans un contexte monospécifique alors qu'elles s'activent et mènent à la formation de particules épisomales pathogènes chez les hybrides issus de croisements avec un parent *M. acuminata* (Lheureux *et al.*, 2003 ; Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Les recombinaisons chromosomiques qui ont lieu dans les cellules germinales au cours de la formation des gamètes sont à l'origine de cette activation (Gayral, 2008 ; Gayral *et al.*, 2008 ; Iskra-Caruana *et al.*, 2010 ; Chabannes et Iskra-Caruana, 2013). Les programmes d'amélioration qui utilisaient pour beaucoup des ressources génétiques *M. balbisiana* (puisque porteur de nombreux caractères d'intérêt agronomiques) ont dû être réorientés vers la création d'hybrides mono-spécifiques triploïdes *M. acuminata*, dans l'attente de nouvelles données que ce soit pour des types « dessert » ou des types « à cuire ».

Cette problématique eBSV, objet de mon étude, sera développée en détail dans la partie **I.4** de ce chapitre.

I – 3 – La recombinaison dans les systèmes polyplœïdes

Dans cette partie, le terme gène sera utilisé pour indiquer une séquence (codante ou non codante) du génome.

I – 3 – 1. Méiose chez les diploïdes et les polyplœïdes

Quelques définitions

La méiose (**Figure I-9**) est une série de deux divisions cellulaires successives du **méiocyte** (cellule diploïde à la base de toute division cellulaire sexuée) ; la méiose 1 ou division réductionnelle et la méiose 2 ou division équationnelle avec une seule duplication du matériel génétique (ADN). Chacune de ces divisions comprend les quatre étapes d'une division cellulaire classique (la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase). La méiose

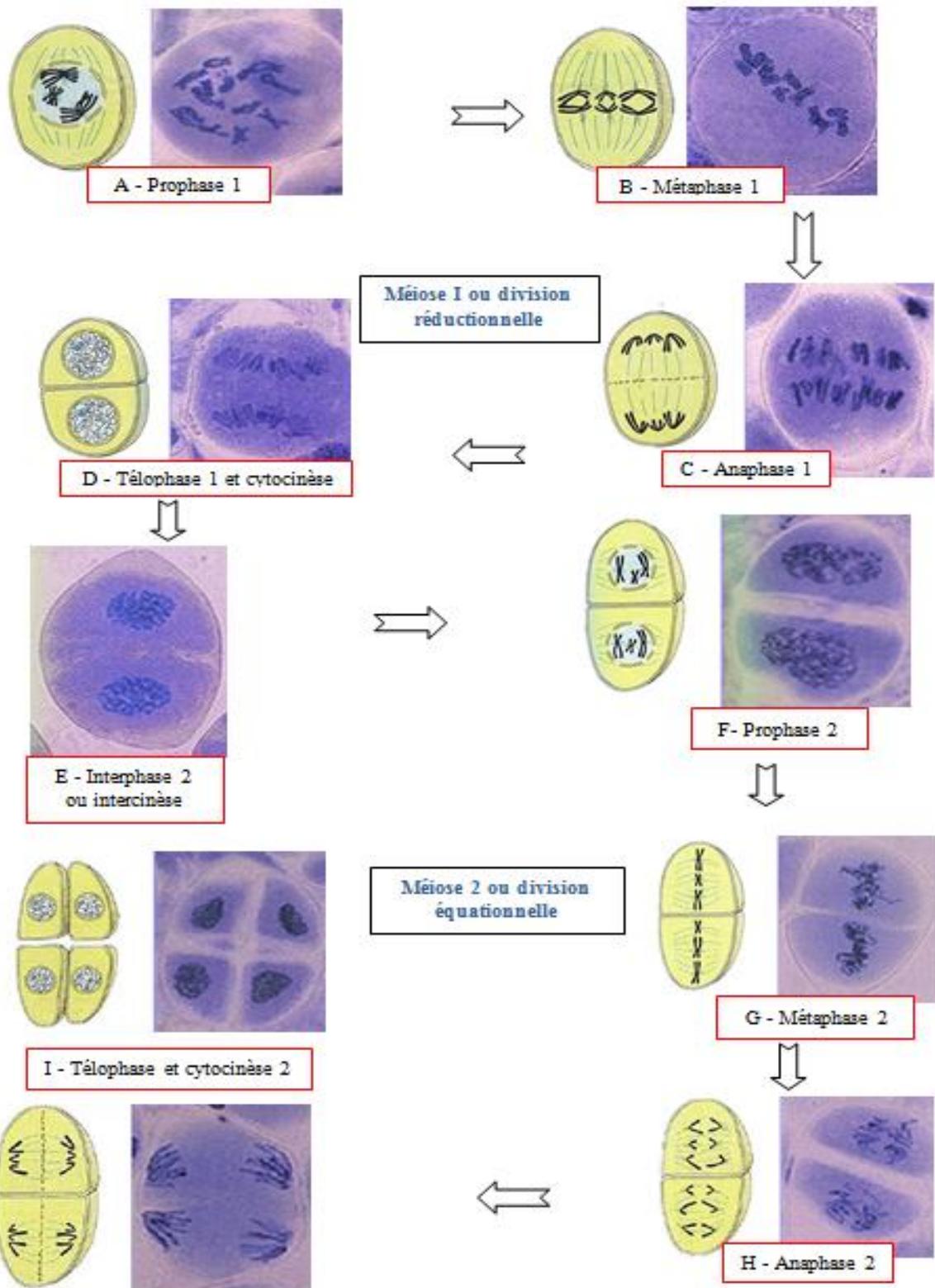


Figure I - 9: Les différentes étapes de la méiose (Adaptée de Louise Boulet, 2007)

(<http://www.er.uqam.ca/nobel/m313745/phasesmeiose.htm>)

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

est un phénomène bien conservé chez toutes les espèces à reproduction sexuée, aussi bien chez les organismes animaux que chez les végétaux. Au contraire de la **mitose** qui est une division conservatrice du génotype, la méiose est source de diversité génotypique via des recombinaisons chromosomiques. A partir d'une cellule diploïde ($2n$), une méiose normale aboutit à la production de quatre cellules reproductrices haploïdes (n) encore appelées gamètes.

Dans toute cellule, chaque chromosome possède un ou plusieurs partenaires en fonction de la ploïdie de l'organisme (1 chez un diploïde, 2 chez un triploïde et 3 chez un tétraploïde) qui lui est (sont) homologue(s) ou homéologue (s). Lorsque les paires (chez les diploïdes), les triplets (chez les triploïdes) ou les quadruplets (chez les tétraploïdes) de chromosomes sont homologues, ils ont une même taille et le même alignement des **gènes** qu'ils portent. Toute fois, ces gènes n'ont pas obligatoirement les mêmes **allèles** (différentes « formes » d'un gène) aux différents **loci** (localisation ou emplacement d'un gène sur le chromosome). Il est à noter ici qu'on a des cas où l'allèle à un locus ne peut être détecté par marquage moléculaire à cause d'une mutation ou d'un accident chromosomique de type insertion/délétion ou translocation. On parlera d'**allèle nul** à ce locus.

Les chromosomes d'une même paire, d'un même triplet ou d'un même quadruplet sont des **autosomes**. Si les paires, les triplets ou les quadruplets d'allèles d'autosomes présents au même locus sont identiques, ils sont **homozygotes** à ce locus. Ils sont **hétérozygotes** au locus si les allèles ont des formes différentes. L'hétérozygotie est dans ce cas de niveau variable chez les polyploïdes. On parlera d'un locus plus ou moins **polymorphe** selon le niveau de différence entre les allèles (un seul ou tous les allèles différents entre eux).

Chez les organismes diploïdes, l'un des autosomes provient du parent maternel et l'autre du parent paternel. Après fécondation, les deux autosomes sont présents chez le **zygote** (produit de la fécondation des gamètes mâle et femelle). À la prophase de la première division de la méiose (**Figure I-9-A**), les autosomes s'apparient deux à deux pour former des **bivalents**. Les **multivalents** sont souvent observés chez les polyploïdes.

Chez les diploïdes, les gamètes produits sont le plus souvent équilibrés et à n chromosomes. Dans le cas d'anomalie de la méiose (non disjonction des autosomes à l'anaphase des méioses 1 ou 2), on peut observer des gamètes **aneuploïdes** (avec un ou quelques chromosomes en plus ou en moins). Chez les triploïdes, en raison du nombre impair de chromosomes homologues (3), il est possible d'observer la formation de **monovalents**,

bivalents ou **trivalents**. Ce déséquilibre entre monovalents, bivalents et trivalents conduit à la production de plusieurs types de gamètes : les gamètes haploïdes, diploïdes ou triploïdes pour des classes de chromosomes différents.

Chez les tétraploïdes, on observe essentiellement des bivalents avec la production de gamètes diploïdes. Des trivalents et des tétravalents peuvent également se former chez les tétraploïdes, avec pour conséquence la production des gamètes aneuploïdes (pour revue voir Ramsey et Schemske, 2002). L'appariement des chromosomes se poursuit par la formation de chiasmas entraînant un brassage génétique entre chromosomes homologues à travers des recombinaisons.

1 – 3 – 2. Les recombinaisons génétiques

La recombinaison génétique est le phénomène conduisant à l'apparition dans une cellule ou chez un individu de gènes dans une association différente de celle observée chez les cellules ou individus parentaux. La recombinaison génétique est un phénomène naturel et universel dans le monde du vivant. Ce sont des facteurs essentiels qui fournissent une source importante de diversité et qui permettent aux populations eucaryotes de maintenir la diversité génétique et de s'adapter aux conditions environnementales fluctuantes et différentes. La recombinaison est donc l'un des processus essentiels de l'évolution des espèces. Chaque chromosome subit une étape de réplication pré-méiotique et est répliqué en une paire de chromatides sœurs (ou **dyades**) lorsque commence la méiose. Un bon appariement des chromosomes homologues est un préalable à la recombinaison. Des appariements chromosomiques pré-méiotiques sont décrits chez certaines plantes. Ceux-ci facilitent l'appariement des chromosomes homologues. Des études montrent que dans des noyaux d'*Arabidopsis* à l'interphase, des régions chromosomiques répétées ont tendance à s'apparier (Zickler, 2006 ; Loidl, 1990). Maguire (1967) a également montré que chez le maïs, les régions riches en hétérochromatine des chromosomes homologues s'apparient étroitement avant la méiose. Chez le blé, polyploïde contenant le gène *Ph1* (Pairing homologue 1), l'association somatique des centromères a été rapportée (Martinez-Perez *et al.*, 2001). Toutefois, ces appariements pré-méiotiques restent partiels. Il existe deux principaux types de recombinaisons qui ont lieu au cours de la méiose : la recombinaison inter-chromosomique et la recombinaison intra-chromosomique.

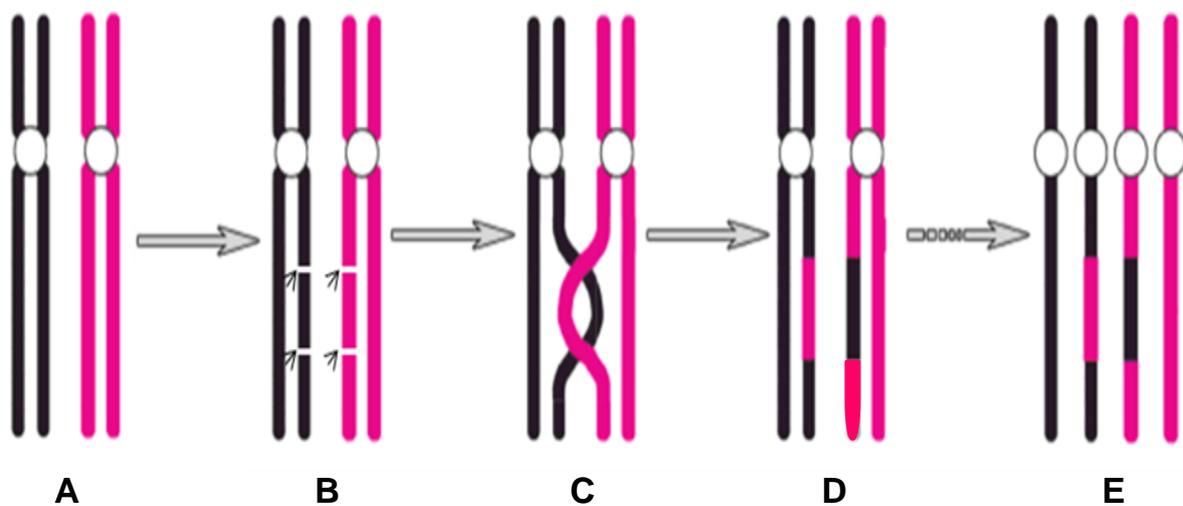


Figure I - 10 : Schéma d'une recombinaison intra-chromosomique entre deux chromosomes homologues

La recombinaison se fait exactement au même point

A - ADN double brin des deux chromosomes parentaux (chromosomes homologues)

B - Ouverture simple brin et dégradation locale des séquences ADN

C - Appariement des extrémités libres par complémentarité de bases

D - Ligation et réparation enzymatique des simples brins

E - Les deux ADN double brins (chromosomes) recombinants

La recombinaison inter-chromosomique

La recombinaison inter-chromosomique est la répartition aléatoire des chromosomes homologues dans les cellules filles à l'anaphase 1 de la méiose. Les centromères homologues migrent vers les pôles opposés de la cellule. De fait, les fibres du fuseau achromatique s'attachent au hasard à l'un ou l'autre des chromosomes d'une paire d'homologues (par leur centromère).

Les centromères hétérologues et les chromosomes dont ils font partie se combinent aléatoirement. Cette répartition indépendante produit de nombreux génotypes différents et est l'une des sources de la diversité produite par la méiose (Griffiths *et al.*, 1999). Si par exemple il y a deux paires de chromosomes homologues noté A et B et 1 et 2 il existe 4 possibilités (2^2) ; soit A avec 1, B et 1, B et 2 ou A et 2. Chez un bananier diploïde par exemple, il y a 11 paires de chromosomes, ce qui fait 2^{11} soit 2048 possibilités de combinaisons inter-chromosomiques pour un gamète.

La recombinaison intra chromosomique

Cette recombinaison s'opère entre chromosomes homologues ou homéologues (**Figure I-10**). Chez un individu, les chromosomes homologues portent des **allèles** différents à un certain nombre de **loci**. À la prophase de la première division de la méiose (prophase 1), le **complexe synaptonémal** (structure protéique particulière qui apparaît au stade zygotène et disparaît au stade diplotène) établie une connexion entre les chromosomes homologues qui s'apparient deux à deux sur toute leur longueur et s'enchevêtrent au niveau des chiasmas. La formation et la disposition des chiasmas sur un bras de chromosome se fait de façon aléatoire. A chaque méiose, leur nombre et leur position varient. Il se produit au niveau de ces « ponts » (chiasmas) des échanges de matériel génétique entre chromosomes appariés par l'existence de cassures double-brin (DSBs ou *double strand breaks*), mais surtout par la réparation de celles-ci. Chez les eucaryotes, la protéine *Spo11* est responsable de la formation des cassures double-brin nécessaires à la mise en place de la recombinaison homologue tandis que la protéine *Dmc1* est spécifiquement impliquée dans l'orientation de la recombinaison réparatrice vers le chromosome homologue (et non la chromatide-sœur). Les mutations des gènes *AtSPO11* et *AtDMC1* entraînent une stérilité partielle chez *Arabidopsis*, confirmant le rôle de la recombinaison homologue pour la formation des bivalents chez cette plante (Horlow et Doutriaux, 2003 ; Mézard, 2006 ; Mézard *et al.*, 2007 ; Schubert *et al.*, 2007). Tous les gènes situés sur une paire de chromosomes homologues peuvent être « brassés »

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

grâce à « l'enjambement » ou « crossing-over » ce qui modifie l'association des allèles portés par chacun des chromosomes. De fait, ces échanges de matériel génétique entre chromosomes homologues au travers des « crossing-overs » garantissent la ségrégation correcte des chromosomes et empêchent la formation de produits de méiose comportant un nombre anormal de chromosomes (Griffiths *et al.*, 1999). La formation d'au moins un « crossing-over » entre bivalents est un préalable au bon déroulement de la méiose (Gerton et Hawley, 2005 ; Hamant *et al.*, 2006).

Chez les polyploïdes, l'appariement entre chromosomes d'un même triplet ou d'un même quadruplet à la prophase 1 définit le type de ségrégation observée à la méiose. La ségrégation peut être de type **disomique** ou de type **tétrasonique** (pour revue voir Stift *et al.*, 2008).

La ségrégation est de type **disomique** lorsque l'on observe une affinité entre deux génomes. A titre d'exemple, chez un bananier tétraploïde de génotype $X_1X_2X_3X_4$ nous avons 11 chromosomes (C_1 à C_{11}) de chaque génome X_1 , X_2 , X_3 et X_4 (soit 44 chromosomes). Si au cours de la méiose on observe une affinité constante de formation de **bivalents** entre chromosomes des génomes X_1X_3 et X_2X_4 c'est-à-dire les chromosomes du génome X_1 (C_1X_1 à $C_{11}X_1$) toujours appariés aux chromosomes du génome X_3 (C_1X_3 à $C_{11}X_3$) et ceux du génome X_2 (C_1X_2 à $C_{11}X_2$) toujours appariés aux chromosomes du génome X_4 (C_1X_4 à $C_{11}X_4$). Ces appariements permettent une ségrégation de type disomique qui donnera naissance à quatre types de gamètes (X_1X_2 , X_1X_4 , X_3X_2 et X_3X_4) chez le tétraploïde. La ségrégation de type disomique a été observée chez plusieurs espèces allopolyploïdes. De fait l'allopolyploïdie résulte de la combinaison de génomes de deux ou plusieurs espèces (par exemple, AABB - chez le bananier-, BBAADD -chez le blé-). On observe alors un appariement préférentiel entre chromosomes homologues à l'intérieur de chaque sous-génome parental (Stift *et al.*, 2008 ; Mertten *et al.*, 2012).

Dans un contexte de ségrégation de type **tétrasonique**, il n'y a pas d'affinité préférentielle entre les différents génomes présents. Le jeu de chromosome de l'individu est le résultat de duplications ou de croisements intra spécifiques (par exemple, AAAA) (Stift *et al.*, 2008 ; Mertten *et al.*, 2012). Chaque chromosome d'un génome s'apparie de façon aléatoire à un de ses homologues d'autres génomes pour former un bivalent. Pour revenir à l'exemple précédent, on observera dans ce cas six types de gamètes (X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 et X_3X_4). Comme nous pouvons le voir dans le cas de notre exemple, en plus des

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

recombinaisons chromosomiques qui ont lieu entre bivalents, la ségrégation de type tétrasomique est source de plus de diversité.

Cependant, la majorité des polyploïdes présentent des situations beaucoup plus complexes. Les espèces allopolyploïdes possèdent souvent, par exemple, des jeux de chromosomes homéologues qui, du fait de leur origine commune, ont conservé suffisamment de similarité pour s'apparier et recombiner entre eux. Ce type de comportement est dit intermédiaire ou segmentaire (Stebbins, 1947). Ce type d'hérédité est trouvé par exemple chez des allotétraploïdes issus du doublement chromosomique d'un diploïde hybride entre deux espèces relativement proches (Sybenga, 1996). Dans ce cas, il est possible d'observer des appariements homéologues entre chromosomes des deux espèces dans l'hybride diploïde mais l'appariement se fera préférentiellement entre chromosomes homologues dans le tétraploïde se traduisant par une fréquence très élevée de bivalents par rapport aux multivalents qui reflètent les appariements homéologues en métaphase I.

Les chromosomes homéologues présentant des séquences similaires entraînent des appariements à la méiose qui induisent des recombinaisons inter-génomiques et des réarrangements chromosomiques (Gaeta et Pires, 2010). Concernant le contrôle génétique de la méiose chez les allopolyploïdes, des loci majeurs ayant un rôle dans la stabilisation de la méiose n'ont été identifiés que chez deux espèces allopolyploïdes, le blé et le colza. Des études moléculaires et cytogénétiques indiquent que l'absence du locus *Ph1* (*Pairing Homeologous 1*) chez le blé se traduit par une altération de la chromatine dans les premiers stades de la méiose, et ce changement est corrélé à une augmentation d'appariements de chromosomes homéologues et de recombinaisons (Mikhailova *et al.*, 1998 ; Greer *et al.*, 2012).

Le modèle proposé par Greer *et al.* (2012) suggère donc que *Ph1* aurait un rôle dans la reconnaissance initiale des homologues. Le locus *PrBn* (*Pairing Regulator Brassica napus*) a été identifié chez le colza comme étant le déterminant majeur impliqué dans la suppression des crossing-overs entre homéologues (Cifuentes *et al.*, 2010). Malgré les avancées récentes, les bases moléculaires du contrôle de la suppression des crossing-overs entre chromosomes homéologues chez les allopolyploïdes restent largement à élucider. Chez le bananier, les données sur les appariements chez les polyploïdes entre chromosomes A et B sont abondants dans la littérature. De nombreuses publications rapportent la formation de trivalents soulignant que des échanges entre les chromosomes des deux espèces sont possibles. Ainsi que le rapporte Shepherd (1999), de façon générale, on n'observe pas de grandes différences

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

d'associations méiotiques entre auto- et allotriploïdes mais, en moyenne, dans un contexte de choix pour le partenaire d'appariement, les multivalents sont moins nombreux chez les AAB et ABB que chez les AAA. La formation de multivalents a aussi été rapportée pour quelques hybrides AABB dans quelques publications anciennes sans que la proportion de chromosomes impliqués dans ces associations ne soit indiquée. Plus récemment, Jeridi *et al.* (2012) ont montré qu'un clone néoallotétraploïde synthétique, « Kunnan 4x » (AABB) issu du doublement chromosomique (par traitement de colchicine) du diploïde interspécifique Kunnan (ABcv), présentait un comportement de type segmentaire: trois jeux de chromosomes avaient une hérédité de type disomique, trois jeux, à l'opposé, avaient une hérédité de type tétrasomique et finalement, les cinq jeux de chromosomes restaient dans un modèle intermédiaire d'hérédité. Finalement, chez *Musa*, dans un contexte de choix pour le partenaire d'appariement, tous ces résultats confirment la forte capacité des chromosomes A et B à s'apparier, recombiner entre eux et échanger de l'information génétique sans que, pour l'instant, les chromosomes mis en jeu dans ces échanges n'aient été précisés.

I – 4 - Le Banana streak virus (BSV)

I – 4 – 1. Découverte du BSV et gamme d'hôtes

La maladie de la mosaïque en tirets des bananiers ou BSD a été décrite pour la première fois en Côte d'Ivoire en 1966 (Yot-Dauthy et Bové, 1966 ; Lassoudiere, 1974 ; Gauhl et Pasberg-Gauhl, 1995 ; Jones, 1999). Les symptômes de la maladie sont diversifiés (**Figure I-11**). Elle se manifeste principalement par des chloroses discontinues sur les feuilles qui se transforment progressivement en nécroses (mosaïques), une distorsion du régime et des fruits, un éclatement du pseudo-tronc avec une émergence précoce de la fleur, et dans des cas sévères, une pourriture du bourgeon apical conduisant à la mort de la plante (Gauhl et Pasberg-Gauhl, 1995 ; Lockhart et Jones, 2000). Cependant certaines plantes infectées ne présentent pas de symptômes externes de la maladie à cause de plusieurs facteurs tels que le génotype de la souche BSV (les génotypes de BSV ayant des niveaux de virulence différents), le génotype de l'hôte et les facteurs environnementaux comme la température et la teneur en eau (Lockhart, 1986 ; Dahal *et al.*, 1998a ; Lockhart et Jones, 2000 ; Gauhl *et al.*, 1999). De fait, les symptômes dus au BSV sont plus sévères en saison de pluies qu'en saison sèche et on note généralement une baisse de la croissance et de la vigueur des plantes infectées (Ortiz, 1996 ; Dahal *et al.*, 1998a). Ceci entraîne une baisse de rendement due à l'absence de régime ou à la réduction de leur taille. Cette baisse de rendement varie de 6 à 90% chez les hybrides interspécifiques naturels (Lassoudiere, 1974 ; Dahal *et al.*, 2000 ; Daniells *et al.*, 2001). Des



Figure I - 11 : Symptômes de la maladie de mosaïque en tirets des bananiers (*Banana streak disease -BSD*)

- A - Éclatement du pseudo-tronc avec une émergence précoce de la fleur.
- B - Éclatement du pseudo tronc à sa base, entraînant la mort de la plante.
- C - Chloroses en tirets discontinues jaunes sur le limbe des feuilles.

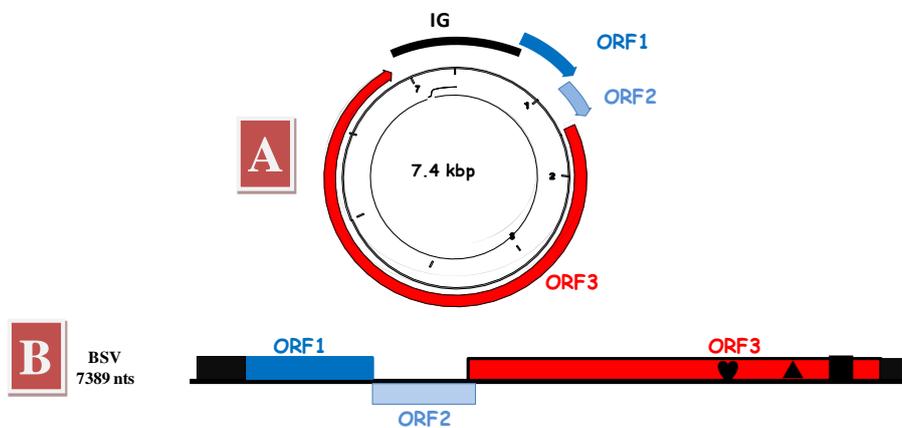


Figure I - 12 : Organisation génomique du BSV (d'après Gayral, 2008).

A- La forme circulaire du BSV (infectieux)

B- Le BSV linéaire. La position des motifs typiques des Caulimoviridae est indiquée par les symboles : Aspartate protéase (♥), Reverse transcriptase (▲) et Ribonucléase H (■)

Les rectangles représentent les ORF, chacun avec un code couleur particulier (le bleu pour l'ORF1, le bleu clair pour l'ORF2 et le rouge pour l'ORF3). Les extrémités noires représentent la zone intergénique (IR).

(nts) = nucléotides

études sont actuellement menées au CIRAD-Guadeloupe par P.Y. Techoney pour estimer l'incidence du BSV sur le rendement des hybrides tétraploïdes nouvellement créés au travers du projet Cabaret.

Plusieurs badnavirus colonisent les plantes à multiplication végétative. Cependant chaque espèce virale a une gamme d'hôte réduite à quelques espèces d'un même genre (Pillay et Tenkouano, 2011). Le BSV possède une gamme naturelle et expérimentale d'hôte très réduite. Ces virus infectent naturellement les bananiers *M. acuminata* et les hybrides interspécifiques ne contenant qu'un génome *M. balbisiana* (génotypes AA, AAA, AB, AAB, AAAB). Il a été expérimentalement transmis par cochenille au genre *Ensete* (*E. ventricosum*) (Lockhart, 1995). Les essais d'inoculations du BSV via des cochenilles sur d'autres espèces du genre *Musa* comme *M. textilis* (Lockhart et Jones, 2000) ou aux diploïdes *M. balbisiana* (BB) (Gayral, 2008) n'ont pas abouti à une infection virale. Du fait de la gamme d'hôte très réduite, la transmission du BSV ne peut s'effectuer que de bananier à bananier. Les plantes adventistes n'ont pas un rôle direct dans l'épidémiologie du BSV, au contraire de ce qui est observé pour des virus infectant de nombreuses espèces végétales comme le *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Lockhart et Jones, 2000).

I – 4 – 2. Classification, description et diversité du BSV

La classification des virus est basée sur la nature, la structure et la forme de l'acide nucléique qu'ils possèdent. Le BSV est un **Pararetrovirus** appartenant à la famille *Caulimoviridae* et au genre *Badnavirus*. Les *Caulimoviridae* ont pour caractéristique principale l'utilisation d'une **réverse transcriptase** pour la réplication de leur génome. Le BSV est un virus non-enveloppé (Hull, 1999) bacilliforme. Il mesure de 130 à 150nm de long sur 30 nm de diamètre. Son génome est constitué d'un ADN double brin circulaire (Lockhart, 1990) d'environ 7.4 Kpb ayant trois cadres ouverts de lecture ou ORF (*Open Reading Frames*) (**Figure I-12**). Les ORF I et II codent deux petites protéines d'environ 22 et 14 kDa respectivement. Ces protéines ont une fonction inconnue. L'ORF III code une polyprotéine de 208 kDa qui possède plusieurs motifs conservés et connus. Cette polyprotéine code au moins quatre protéines ; une **protéine de capsid** (CP), une **reverse transcriptase** (RT), une **ribonucléase H** (RNase H) et une **aspartate protéase** (AP) ainsi qu'une protéine putative de mouvement de cellule à cellule (Harper et Hull, 1998) La multiplication virale se fait par l'intermédiaire de la reverse transcriptase.

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

L'étude de différents isolats de BSV révèle une forte hétérogénéité que ce soit d'un point de vue sérologique, moléculaire et même biologique car ils peuvent induire des symptômes différents sur les mêmes plantes (Lockhart et Olszewski, 1993). Des études de diversité des RT/RNase H de l'ORF 3 lors d'épidémies de BSV en Ouganda, en Australie et à l'Île Maurice (Harper *et al.*, 2004 ; Geering *et al.*, 2005a ; Jaufeerally-Fakim *et al.*, 2006). Ces études ont révélé des divergences nucléotidiques pouvant atteindre 40% entre différents isolats de BSV. D'après l'ICTV, deux souches virales représentent deux espèces distinctes quand la divergence entre leurs séquences nucléotidiques est supérieure à 20% dans la zone de la polymérase (RT et RNase H). (Knowles *et al.*, 2012). Une hypothèse émise pour expliquer cette diversité est que ces virus utilisent la reverse transcriptase (RT) pour la réplication du génome viral. Cette ADN polymérase ARN dépendante ne possède pas d'activité "proof-reading" et fait plus d'erreurs que les ADN polymérases ADN dépendantes (Duffy *et al.*, 2008). Il est à noter que les autres virus de ce genre et de cette famille utilisent la RT pour se multiplier et ne présentent pas une telle diversité d'espèces sur un même hôte à l'exception des badnavirus de l'igname (Bousalem *et al.*, 2008).

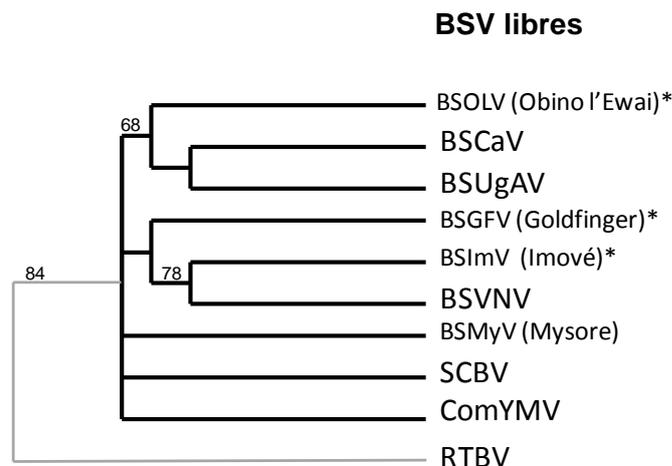


Figure I - 13 : Arbre phylogénétique des différentes souches de BSV basé sur les séquences RT/RNase H.

Phylogénie obtenue lors de l'étude de Gayral et Iskra-Caruana (2009), les valeurs bootstraps supérieures à 60% sont présentées sur les branches de l'arbre. Les virus libres totalement séquencés et décrits chez PKW sont présentés avec une astérisque. Les séquences BSUgAV correspondent aux séquences de BSV décrites par Harper *et al.* (2002) sur des échantillons de bananiers lors d'épidémies en Ouganda. L'arbre est enraciné avec la séquence du *Rice tungro bacilliform virus*.

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

D'après cette définition de l'ICTV, les différentes prospections lors de foyers d'épidémies BSV ont permis de décrire à ce jour 7 espèces BSV distinctes et de séquencer leur génome complet : *Banana Streak Obino l'Ewai Virus* (BSOLV) (Harper et Hull, 1998), *Banana Streak Mysore Virus* (BSMYV) (Geering *et al.*, 2005a), *Banana Streak Vietnam Virus* (BSVNV) (Lheureux *et al.*, 2007), *Banana Streak Goldfinger Virus* (BSGFV) (Gayral *et al.*, 2008), *Banana Streak Imové Virus* (BSImV) (Geering *et al.*, 2011), *Banana Streak Yunnan Virus* (BSYV) (Muller E., communication personnelle), *Banana Streak Perou Virus* (BSPV) (Muller E., communication personnelle) et *Banana Streak Cavendish Virus* (BSCaV) (James *et al.*, 2011) (**Figure I-13**).

Le BSV a la particularité d'exister sous deux formes : une forme libre responsable de la maladie et une forme intégrée au génome de la plante hôte encore appelée eBSV pour *endogenous* BSV. Sous cette forme, le virus est dit "silencieux" car la plante ne développe pas la maladie. Toute fois, il a été démontré que ces eBSV sont capables sous certaines conditions de se réveiller (ou de s'activer) chez des hybrides interspécifiques et de produire une infection (Ndowora *et al.*, 1999 ; Geering *et al.*, 2001 ; Iskra-Caruana *et al.*, 2003 ; Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Cette activation spontanée et non contrôlée des eBSV fait du BSV le virus le plus répandu aujourd'hui dans toutes les zones de culture bananière (Fargette *et al.*, 2006 ; Lockhart et Jones, 2000). Cette résurgence de foyers BSV depuis une vingtaine d'année vient du fait que l'on assiste à une explosion de la maladie liée à la diffusion d'hybrides issus de croisements génétiques interspécifiques et micro propagés *in vitro* dans toutes les zones de production.

I – 4 – 3. Transmission du BSV

Deux modes de transmission sont connus chez le BSV, une transmission verticale par la graine et une transmission horizontale par un vecteur (**Figure I-14**).

I – 4 – 3. 1. La transmission horizontale

Elle est assurée généralement par des cochenilles dont l'espèce *Planococcus citri* est la plus répandue. Elle se fait suivant le mode semi persistant ou non circulant (Meyer *et al.*, 2008 ; Lheureux, 2002 ; Kubiriba *et al.*, 2001 ; Lockhart et Jones, 2000). Meyer *et al.* (2008) a identifié d'autres agents vecteurs du BSV : puceron, thrips, cicadelles, aleurode, cochenille, nématode ou champignon. Cette forme de propagation de la maladie par le vecteur est très lente à cause de sa faible mobilité. Ceci facilite le contrôle et la gestion de la maladie

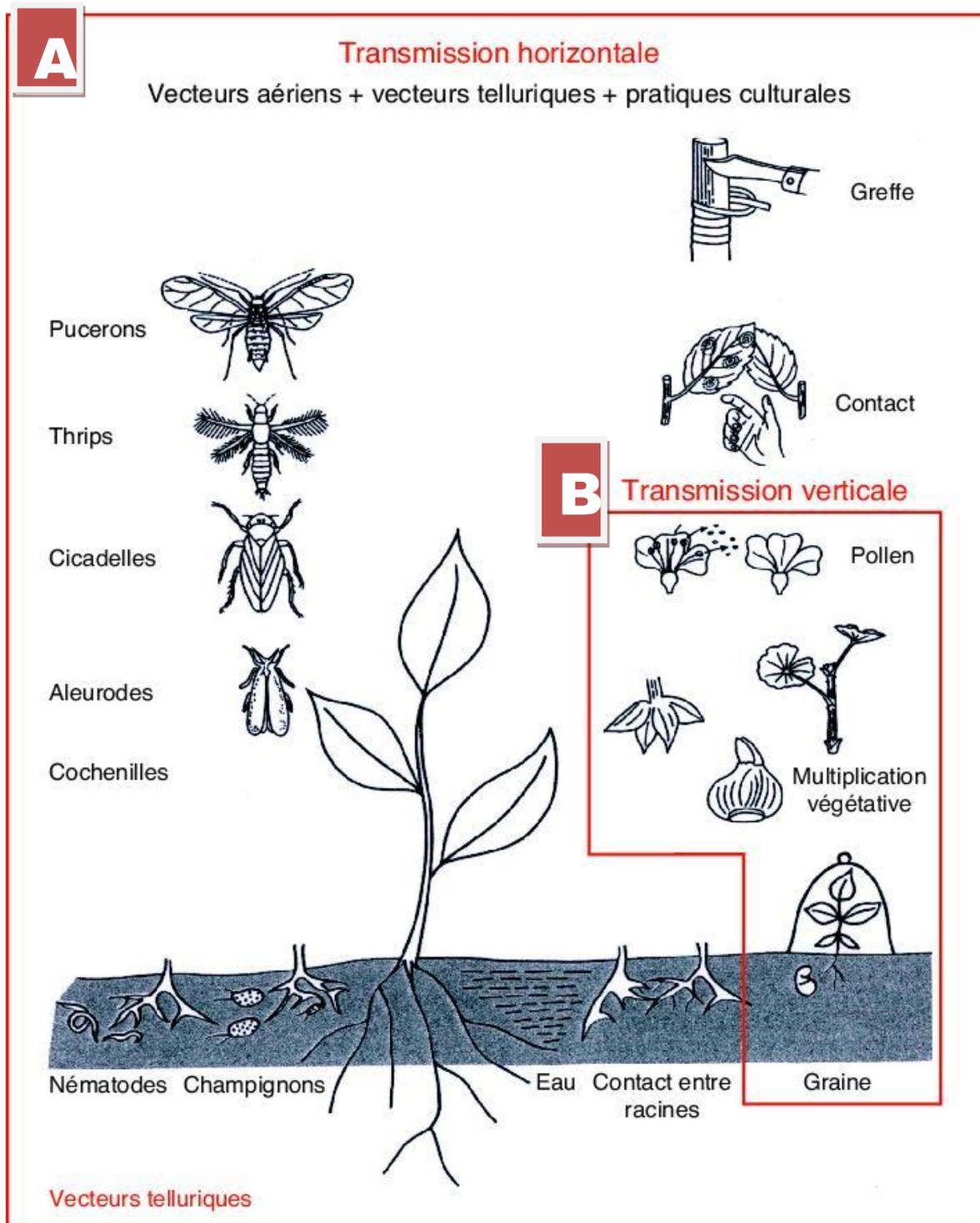


Figure I - 14 : Diversité des modes de transmission des virus végétaux (adapté de Iskra-Caruana *et al.*, 2003).

A - La transmission horizontale ou voie externe : elle nécessite un intermédiaire appelé vecteur dont la nature est très variée : arthropodes le plus souvent, nématodes, champignons ou même souvent l'homme au travers des pratiques culturales (greffage, contact, etc...)

B - La transmission verticale ou voie interne : elle permet au virus de contaminer les organes de multiplication et d'être transmis sans changement de patrimoine génétique, de génération en génération, par la semence de la plante infectée ou par les organes de réserves capables de générer de nouvelles plantes (rhizomes, bulbes, tubercules, rejets, etc...)

(destruction des plantes infectées et gestion de la population des vecteurs) (Iskra-Caruana *et al.*, 2010). Il est à noter que le virus transmis suivant ce mode de transmission a une structure complète et est infectieux (cf **Figure I-14 A**). Il se multiplie dans la cellule de la plante hôte et colonise de façon systémique toute la plante.

I – 4 – 3. 2. La transmission verticale

Ce mode de transmission (**Figure I-14 B**) est lié à la présence de séquences BSV infectieuses intégrées au génome de l'espèce *M. balbisiana*. Ces séquences intégrées doivent s'exciser du génome de l'hôte, se circulariser et s'encapsider pour pouvoir induire la maladie. Ce processus appelé "activation" ou "réveil" sera développé au paragraphe **I-4-4-5.** de ce chapitre. Certaines conditions de stress dits activateurs favorisent le réveil des eBSV. Parmi ceux-ci, citons les croisements génétiques interspécifiques (Lockhart *et al.*, 2000 ; Richert-Poggeler *et al.*, 2003 ; Lheureux *et al.* 2003). De fait, chez les descendances hybrides de croisements génétiques interspécifiques entre parents sains porteurs d'intégrations eBSV, on a observé une expression mendélienne du BSV. Outre ce stress génétique, des stress activateurs abiotiques sont également connus tels que : les blessures et le rabattage des plants (Richert-Poggeler *et al.*, 2003), les stress hydriques ou thermiques (Noreen *et al.*, 2007) et la mise en culture *in vitro*. De fait Dallot *et al.* (2001) a constaté que la micro propagation *in vitro* d'hybrides interspécifiques *M. acuminata* (génomme A) et *M. balbisiana* (génomme B) était un facteur propice à l'activation des eBSV. Ce résultat a été confirmé plus tard par Côte *et al.* (2010). Ce mode de transmission verticale peut s'opérer sur de très longues distances et même entre plusieurs continents lors de l'échange de matériel possédant des intégrations (rejets ou vitroplants) (Lockhart et Jones, 2000). Une étude détaillée de ces intégrations BSV sera présentée au paragraphe **I-4-4.3** de ce chapitre.

I – 4 – 4. Les intégrations virales

I – 4 – 4. 1. Découverte des intégrations virales chez les plantes

Parmi les virus intégrés au génome des plantes, il est trouvé quelques virus à ADN simple brin de la famille *Geminiviridae* (Ashby *et al.*, 1997 ; Bejarano *et al.*, 1996 ; Kenton *et al.*, 1995) mais surtout les virus à ADN double brin de la famille *Caulimoviridae* (Budiman *et al.*, 2000 ; Gambley *et al.*, 2008 ; Gayral *et al.*, 2008 ; Harper *et al.*, 1999a ; Harper *et al.*, 2002 ; Jakowitsch *et al.*, 1999 ; Pahalawatta *et al.*, 2008 ; Staginnus et Richert-Poggeler 2006). Les premières séquences découvertes intégrées dans le génome des plantes correspondent à des séquences de bégomovirus. Elles ont été découvertes de manière fortuite

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

lors d'études sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) pour identifier des résistances au *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Les intégrations découvertes par la suite ont toutes correspondu à des virus de la famille *Caulimoviridae*. Elles ont également été découvertes suite au séquençage du génome de plantes ; tabac – *Nicotiana sp.*- (Jakowitsch *et al.*, 1999 ; Gregor *et al.*, 2004 ; Lockhart *et al.*, 2000) ; pétunia – *Petunia sp.*- (Richert-Pöggeler *et al.*, 2003) ; riz – *Oryza sativa* – (Kunii *et al.*, 2004) ; vigne – *Vitis vinifera* – (Murad *et al.*, 2004 ; Tanne et Sela 2005) ; pomme de terre – *Solanum sp.*- (Harper, et Heslop-Harrison, 2005 ; Staginnus *et al.*, 2007) ; tomate – *Solanum lycopersicum* – (Staginnus *et al.*, 2007) ; ananas – *Ananas comosus* – (Gambley *et al.*, 2008) ; peuplier – *Populus sp* – (Bertsch *et al.*, 2009) et/ou au développement de diagnostics viraux par PCR utilisant des amorces spécifiques du génome viral et par Southern blots, bananier – (La Fleur *et al.*, 1996 ; Kunii *et al.*, 2004 ; Geering *et al.* 2005b ; Bousalem *et al.*, 2008 ; Bertsch *et al.*, 2009 ; Duroy, 2012). Ces intégrations aussi appelées EPRV pour *endogenous pararetroviruses* sont présentes chez une très large gamme d'hôtes regroupant à la fois des monocotylédones et les dicotylédones (Leitch, 2006). On note également une diversité du nombre d'intégrations par espèce virale allant de plusieurs milliers de copies à quelques copies voire une copie par génome (Jakowitsch *et al.*, 1999 ; Lockhart *et al.*, 2000). Le nombre d'espèces végétales possédant des séquences virales intégrées de type pararetrovirus a significativement augmenté au cours de cette dernière décennie (Hull *et al.*, 2000 ; Harper *et al.*, 2002 ; Hohn *et al.*, 2008). Toute fois, l'intégration dans le génome des plantes de virus à ADN double brins (*Caulimoviridae*) reste un évènement accidentel et illégitime car non seulement ces virus ne codent pas l'intégrase indispensable à leur intégration, mais l'étape d'intégration n'est pas nécessaire pour l'accomplissement du cycle viral contrairement aux rétrovirus animaux (Hull et Covey, 1995 ; Bejarano *et al.*, 1996).

A l'exception du genre *Soymovirus*, des EPRV ont été rapportés pour les 5 autres genres de la famille *Caulimoviridae* (Chabannes et Iskra-Carua, 2013). On retrouve notamment le - BSV chez le bananier (Ndowora *et al.*, 1999 ; Geering *et al.*, 2001 ; Safár *et al.*, 2004 ; Gayral *et al.*, 2008) et le *Pineapple bacilliform virus* (PBV) chez l'ananas (Gambley *et al.*, 2008) qui appartiennent au genre *Badnavirus* –, le *Tobacco vein clearing virus* (TVCV) chez le tabac (Jakowitsch *et al.*, 1999 ; Lockhart *et al.*, 2000 ; Mette *et al.*, 2002 ; Gregor *et al.*, 2004), le TVCV-like chez la tomate (Staginnus *et al.*, 2007) et des séquences *pararetrovirus-like* de la pomme de terre (Hansen *et al.*, 2005) du genre *Cavemovirus*, le *Petunia vein clearing virus* (PVCV) chez le pétunia du genre *Petuvirus* (Richert-Pöggeler et Shepherd, 1997 ; Harper *et al.*, 2003 ; Richert-Pöggeler *et al.*, 2003 ;

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

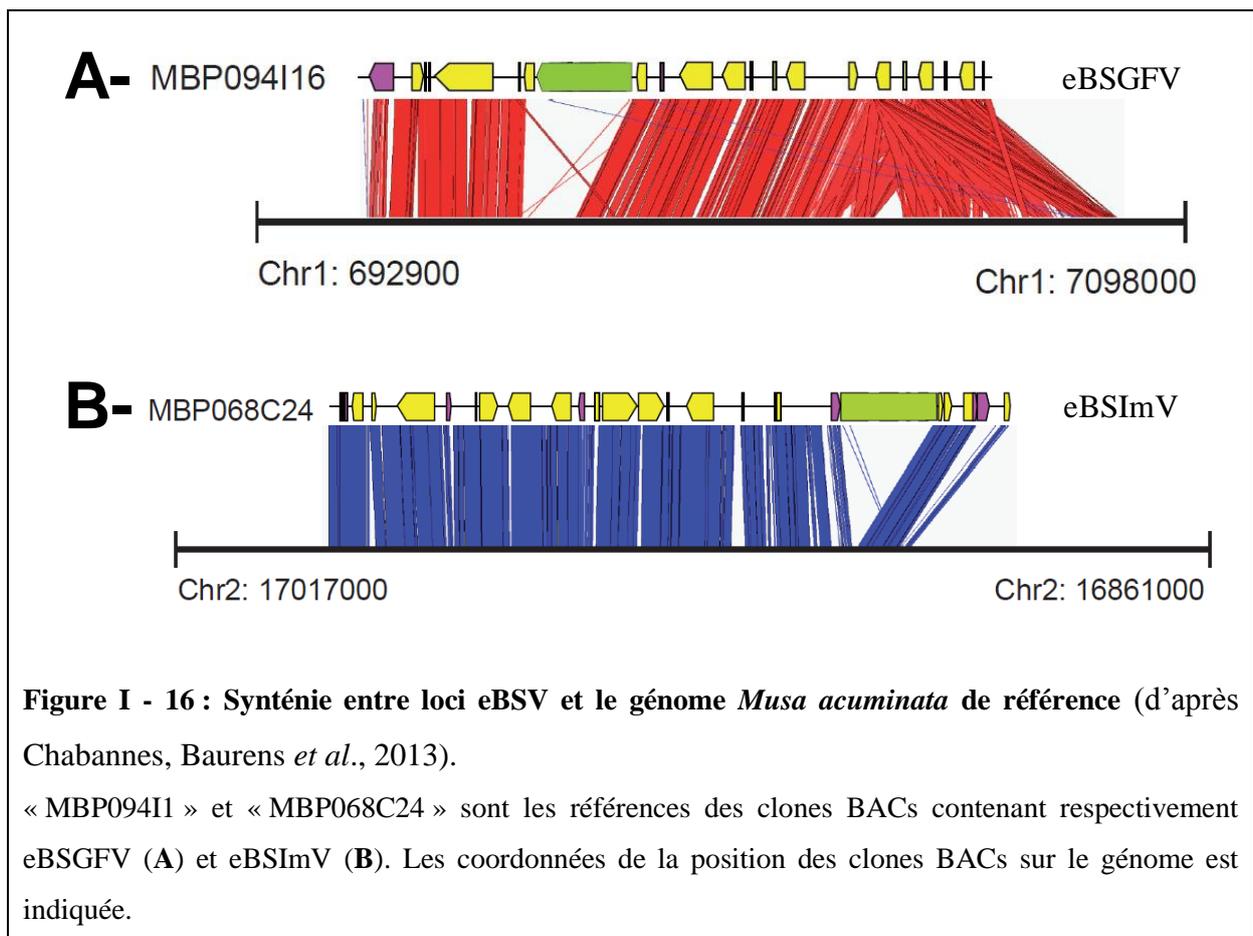
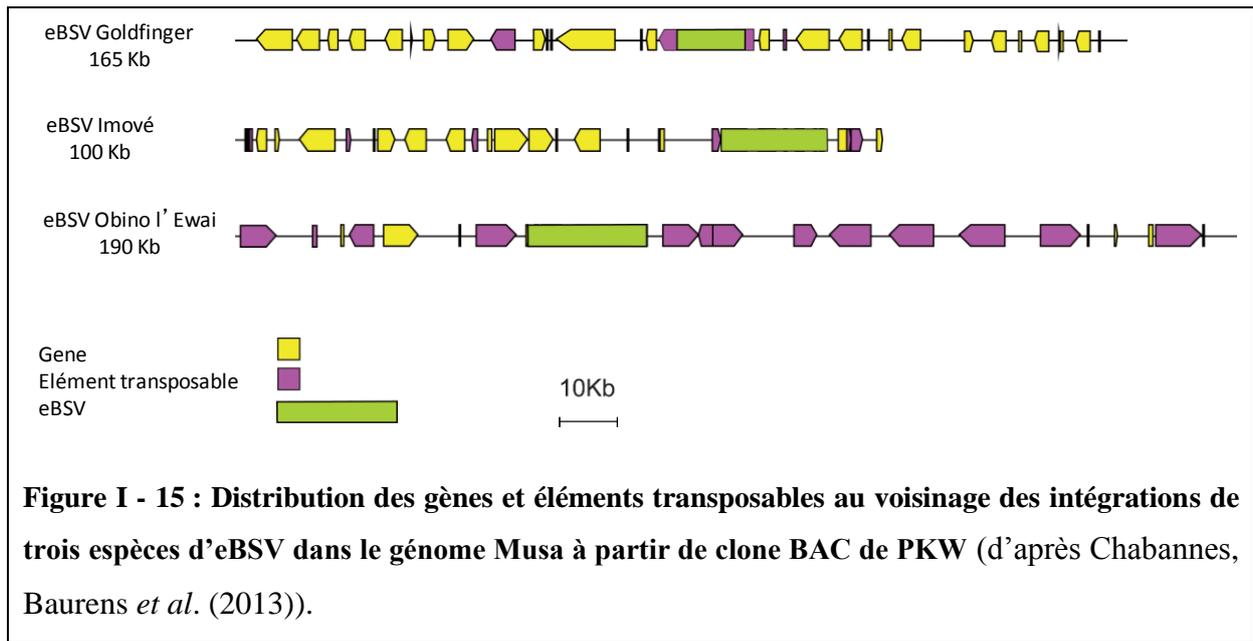
Noreen *et al.*, 2007) , le *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) chez le riz du genre *Tungrovirus* (Kunii *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2009), et le *Dhalia mosaic virus* (DMV) chez le dahlia qui appartient au genre *Caulimovirus* - (Pahalawatta *et al.*, 2008).

Malgré la découverte de séquences virales intégrées de plus en plus fréquente, seules les intégrations du PVCV (Richert-Pöggeler *et al.*, 2003), du TVCV (Lockhart *et al.*, 2000) et du BSV - BSOLV, BSGFV et BSI_mV - (Harper et Hull, 1998 ; Ndowora *et al.*, 1999 ; Harper *et al.*, 2002 ; Safár *et al.*, 2004 ; Gayral *et al.*, 2008 ; Iskra-Caruana *et al.*, 2010) sont infectieuses c'est-à-dire capables de restituer des particules virales responsables d'infections systémiques. Dans la suite de ce document, je vais m'intéresser exclusivement aux intégrations BSV (eBSV), objet de ce travail.

I – 4 – 4. 2. Localisation des eBSV

Il a été montré que les EPRV se trouvent très majoritairement dans les zones riches en rétro transposons à Longue région Terminale Répétée - LTR (Jakowitsch *et al.*, 1999 ; Ndowora *et al.*, 1999 ; Richert-Pöggeler *et al.*, 2003 ; Gregor *et al.*, 2004 ; Staginnus *et al.*, 2007 ; Gayral *et al.*, 2008). Les expériences de type FISH (Fluorescent *in situ* hybridization) ont permis de mettre en évidence que les ePVCV du pétunia et les EPRV de la pomme de terre se trouvent situés dans les zones centromériques et péricentromériques des chromosomes (Richert-Pöggeler *et al.*, 2003 ; Hansen *et al.*, 2005). Les différentes observations montrent que dans la plupart du temps, les EPRV sont intégrés dans l'hétérochromatine tout comme les éléments transposables avec lesquels ils co-localisent (Lippman *et al.*, 2004). La première hypothèse émise de l'insertion privilégiée dans ces zones est que ces parties du génome sont très pauvres en gènes et peuvent absorber les EPRV sans effet délétère sur la *fitness* de la plante. La deuxième hypothèse est que comme tous les EPRV décrits sont issus de la même famille virale (*Caulimoviridae*) des micros homologies existent avec les autres intégrations ou les rétro éléments (RE) ce qui pourrait expliquer que les intégrations se retrouvent dans les mêmes zones (Duroy, 2012). Ces observations ont été décrites chez le tabac, le pétunia et le bananier (Mette *et al.*, 2002 ; Richert-Pöggeler *et al.*, 2003 ; Gayral *et al.*, 2008).

Chez le bananier, la caractérisation des intégrations BSV à partir de clones de chromosomes artificiels bactérien (BAC) du génome du bananier diploïde *M. balbisiana* (Pisang Klutuk Wulung - PKW) a été réalisée. Ce travail a montré qu'il existait une forte homologie de séquence (99,99%) sur environ 108,6 Kb du génome *Musa* dans les régions flanquantes des intégrations de deux espèces BSOLV et BSGFV. Ces zones d'insertion,



riches en ET, sont assez conservés chez les *Musa* (Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Les intégrations eBSGFV et eBSIMV sont dans des régions riches en gènes avec une moyenne respective de 0.17 et 0.15 gène par Kpb. L'intégration eBSOLV est dans une zone riche en éléments trasposables (**Figure I-15**).

Le séquençage du génome du bananier *M. acuminata malaccensis* clone Pahang (D'Hont *et al.*, 2012) a permis des avancées significatives quant à la localisation chromosomique des intégrations BSV. De fait, l'hybridation d'un clone BAC contenant eBSGFV sur le génome de référence *M. acuminata* (AA) Pahang montre une homologie parfaite de séquence sur le chromosome 1 à l'exception de la partie qui correspond à l'intégration (**Figure I-16-A**).

Le clone BAC contenant eBSIMV montre également une homologie parfaite avec le chromosome 2 du bananier sauf au niveau de l'intégration (**Figure I-16-B**) (Duroy, 2012 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Une co-hybridation de sondes virales marquant spécifiquement eBSGFV et eBSOLV sur des plaques métaphasiques de cellules racinaires de PKW en division révèle par FISH quatre spots représentant les quatre allèles d'eBSGFV et d'eBSOLV co-localisés sur une paire de chromosomes homologues (**Figure I-17-A**) (Duroy, 2012 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Ces quatre spots représentent les deux allèles de chacune des 2 espèces eBSV. Ces observations ont permis de conclure que les intégrations eBSGFV et eBSOLV sont à deux loci différents sur le chromosome 1 ; tandis que l'intégration eBSIMV est sur le chromosome 2 (**Figure 1-17-B**) (Chabannes, Baurens *et al.*, 2013).

I – 4 – 4. 3. Structure des intégrations BSV chez PKW

La Fleur *et al.*, (1996) ont été les premiers à mettre en évidence des intégrations BSV dans le bananier. Les études menées par Ndowora *et al.* (1999) ; Harper *et al.*, (1999a) ; Lheureux *et al.*, (2003) ; Gayral *et al.* (2008) ; Iskra-Caruana *et al.* (2010) ; Chabannes, Baurens *et al.* (2013) ont montré que les eBSV infectieux sont présents dans le génome B du bananier *M. balbisiana*. La détermination de la structure de ces eBSV s'est faite à partir du génome B du diploïde sauvage *M. balbisiana* (BB) PKW qui a des intégrations pour les quatre espèces de BSV suivantes: eBSGFV, eBSOLV, eBSIMV et eBSMYV. L'intégration BSMYV n'est pas complètement caractérisée à ce jour, pour cette raison, elle ne sera pas décrite dans la suite de ce document. Pour mettre en œuvre cette étude, une banque BAC intégrant le génome de PKW (BB) a été construite et caractérisée (Safár *et al.*, 2004).

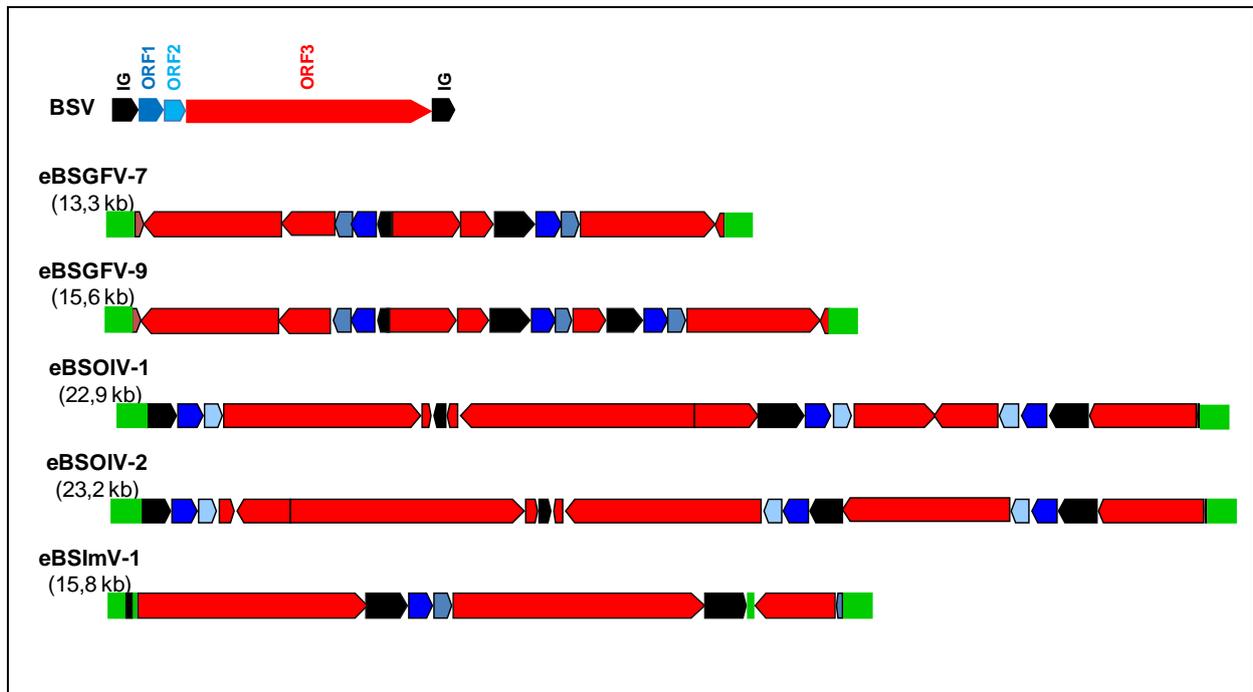
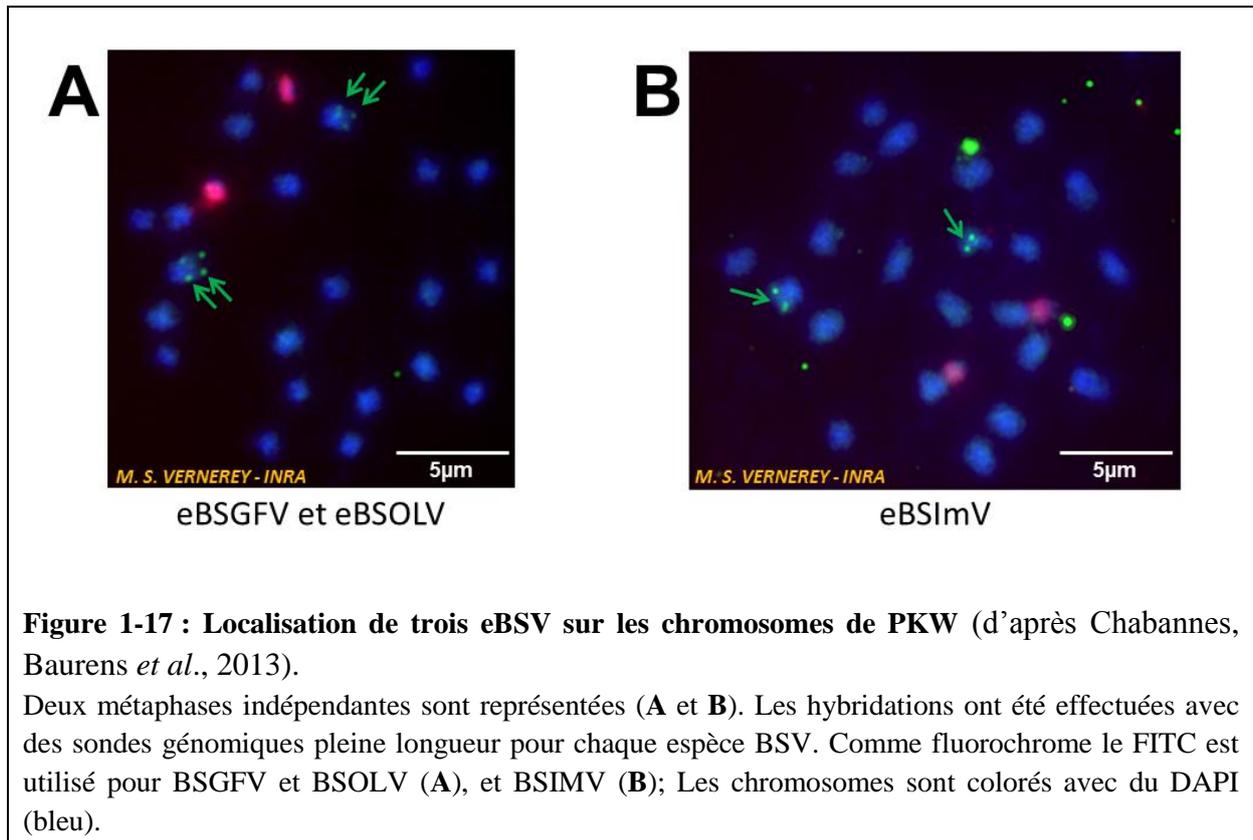


Figure I - 18: Structure génomique des intégrations BSV présents dans le génome de PKW (d'après Gayral, 2008; Iskra-Caruana *et al.*, 2010; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013)

Le BSV et les eBSVs sont représentés sous la forme linéaire. Les rectangles colorés représentent les ORF 1, 2 et 3 en bleu foncé, bleu clair et rouge respectivement. Les rectangles noirs représentent la zone inter-génique (IG) du BSV. En vert est représenté le génome de la plante PKW. L'orientation des flèches indique le sens de lecture des séquences virales par rapport au génome du virus libre (BSV).

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

La banque BAC a été hybridée avec des sondes virales représentant le génome complet de BSGFV, BSOLV et BSIMV. Les résultats de ces hybridations ont montré que différents eBSVs sont intégrés en quelques copies seulement chez le bananier alors qu'elles peuvent être de plusieurs centaines de copies chez le pétunia pour les ePVCV (Richert-Pöggeler *et al.*, 2003) et de plusieurs milliers chez le tabac pour eTVCV (Gregor *et al.*, 2004 ; Mette *et al.*, 2002). Les études phylogénétiques couplées à des études du polymorphisme d'intégration chez *Musa* ont montré que chez le bananier la fixation des intégrations a eu lieu après la spéciation entre *M. acuminata* et *M. balbisiana* et avant la diversification de *M. balbisiana* (Gayral et Iskra-Caruana, 2009 ; Iskra-Caruana *et al.*, 2010 ; Duroy, 2012).

Les différences en nombre de copies chez le bananier, chez le pétunia et chez le tabac pourraient s'expliquer par des temps d'intégration différents et/ou par une duplication accentuée des intégrations du fait que leurs sites d'intégrations est à proximité d'éléments transposables qui facilitent le processus (Gayral *et al.*, 2008 ; Mette *et al.*, 2002 ; Richert-Pöggeler *et al.*, 2003 ; Staginnus et Richert-Pöggeler, 2006).

Les intégrations chez le bananier présentent toutes, à un niveau plus ou moins grand des réarrangements par rapport à l'organisation linéaire du virus libre correspondant, leur structure est fortement fragmentée et dupliquée (**Figure I-18**) (Gayral *et al.*, 2008 ; Duroy, 2012 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Chabannes, Baurens *et al.* (2013) proposent que cette structure fortement réarrangée des intégrations puisse provenir d'un seul événement d'intégration, dupliquée par la suite au niveau de ce même site d'intégration jusqu'à la structure observée et actuelle. Chacun des eBSVs obtenus a été annotés. Les trois espèces eBSGFV, eBSOLV et eBSIMV intégrées au génome de PKW sont di-alléliques à un locus. Toutes les intégrations ont une taille supérieure à celle d'un génome viral linéaire (7,4kb) : 13,28 et 15,58 Kb pour eBSGFV, 22,9 et 23,2 Kb pour eBSOLV et 15,8kb pour chacun des allèles eBSIMV (**Figure I-18**) (Gayral *et al.*, 2008 ; Duroy, 2012 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013).

I – 4 – 4. 4. Organisation des intégrations BSV dans le génome de Pisang Klutuk Wulung (PKW – BBs)

Le séquençage des clones BAC de PKW contenant les intégrations eBSV a montré qu'ils étaient de deux types : (1) des eBSVs **non infectieux** dont le génome ne possédait pas la séquence complète du virus libre ; et (2) des eBSVs **infectieux** à génome viral complet et capable de former une particule virale libre et infectieuse. Les formes alléliques de ces

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

Tableau I - 2 : Marqueurs PCR et dCAPs spécifiques des intégrations de trois espèces eBSV du génome *Musa* - (d'après Gayral et al. (2010) et Chabannes, Baurens et al. (2013)).

Marqueurs		Amorces (F/R)		Taille amplicon (en pb)
Espèce	Type	Nom	Séquence 5' – 3'	
eBSGFV	Jonction	VM1*	F/ TTG TCC AAA ATC TGC TCG TG R/ TGT AAT TCC TGC TCC TGC AA	481
		VM2*	F/ TTC TCC CTT TTC GAT CCG TA R/ TTT TGA TGC ATC TCC AGC AG	374
	Structure	VV1	F/ ACA GCT CCA GGA GAT TGG AA R/ CTG AAG TGT GCC TGT GGA GA	268
		VV2	F/ TCT GAG ATC TCC AGC CAG GT R/ GAC AGT TCC AGC ACA GCA GA	639
		VV3*	F/ TTG CCA AGA ATT CCT CCA AG R/ AAG TTC TTG TCG GCA AGG TG	376
		VV4	F/ GAG CAA CAC GAG TCA ACG AA R/ TCT CCA CAG GCA CAC TTC AG	784
		VV6	F/ GCA TGA AGC ATG ACT GGA GA R/ AAT GCA TAA GGG CCT CGA AT	264
	Allèle eBSGFV-7	DifGF*	F/ TTG CAG GAG CAG GAA TTA CA R/ GGA TGG AAG ATG AGC TCT TTG	670
	Allèle eBSGFV-9	VV5*	F/ CCA TGG AGG TTG ACC TGT CT R/ ACC CCT CTG TCT TCC CAA CT	628
eBSOLV	Jonction	Musa-OL jonction1* (16/17)	F/ TGC ATT AGA TGG TCT GGG AAA R/ ACT TCA CGA TGC CCA TGT TT	563
		Musa-OL jonction2* (25/26)	F/ GAG CTG TTT CCT CCG TGT CT R/ CCT GGA AGA AAG CAG ACG AG	590
	Structure	Sig1	F/ TTC GAG GAG TCA ACG GAG TC R/ CCT GGT CTG CAC AGA GAT GA	606
		Sig2*	F/ CTT GCT CTG TGG GCA AGA CT R/ CCA TTT TTC TCG CAG ATT GTC	426
	Allèle eBSOLV-1	Marker2-BSOLV(1)* (23/24)	F/ GTG GTG GTT CTT GAT CCG GT R/ CAC GTG GTA GGG GTC CGC CA	1463
	Allèle eBSOLV-2	Marker1-BSOLV(2) (18/19)	F/ ATA CGA AGC CCA ACG AAT TG R/ ATG GCT TGC CTT CAC AGA TT	601
	Allèle eBSOLV-2	Marker2-BSOLV(2)* (20/21)	F/ ACT CGC ACA AAG TGA ACT CG R/ ACA GTA CAA GCC CCA CCA AT	399
	Allèle eBSOLV	Dif-OL (HaeIII)	F/ GAA TCA TTA TTC GAG GAG TCA ACG G R/ CGA GTA GAG CGC AAG ATC CTA GTT C	337
	Allèle eBSOLV	Dif-OL (AhdI)	F/ TTG GAA CAA GAC AGA TTG ACT TCC T R/ GGT TCG TTT TTA TGG CTT TCA TGG	500
eBSIMV	Jonction	Musa/F2*	F/ ACT CAG CAA AGG CAA GCA GT R/ TCT GGT GTG AGT TTT AAT AAT ACC G	561
		F5/Musa*	F/ GTA TGG TTC TTG CCC GAT GA R/ TCG TGC AGA CCC CTT ACT CT	594
	Structure	F1/F3	F/ TTC GGT ATT ATT AAA ACT CAC ACC A R/ GCT GCT AAC TGA GGA TAA TCG AA	490
		F3/F4	F/ TCC CAC GCA AGC TTA CTT CT R/ GAA GCT GTC CAA GCC TAT ATC A	600
		F4/F5	F/ TGG ACA GCT TCT GGT GTG AG R/ AGC AGC TAC AAC CCT GGA GA	540

(*) marqueurs eBSVs utilisés pour définir le génotype eBSV des plantes au cours de cette étude

intégrations ont été nommées eBSGFV-7 et eBSGFV-9 pour BSGFV, eBSOLV-1 et eBSOLV-2 pour BSOLV. Pour l'intégration eBSImV, aucune distinction n'a été faite à ce jour entre les séquences des deux allèles (Gayral *et al.*, 2008 ; Duroy, 2012 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Pour confirmer le statut infectieux ou non des différents allèles eBSVs, des marqueurs spécifiques de type PCR et dCAPs (derived cleaved amplified polymorphic sequences) ont été développés pour génotyper les intégrations eBSOLV, eBSGFV et eBSIMV dans une descendance d'hybrides interspécifiques issue du croisement entre le diploïde *M. balbisiana* (BB) PKW sain (*i.e.* indemne de particules virales) (parent femelle) et le tétraploïde *M. acuminata* IDN 110 (AAAA) sain (parent mâle) (**Tableau I-2**). Ces marqueurs sont spécifiques soit, des zones de jonction entre le génome viral et le génome *Musa* (**marqueur jonction**), soit spécifiques des zones de structure ou de réarrangement (**marqueur interne**), soit, si possible, **allèle spécifique**. Ils ont permis de suivre la ségrégation des allèles eBSVs dans les descendance hybrides. Chez ceux-ci, les différents allèles eBSOLV-1 et 2 et eBSGFV-7 et 9 ont ségrégué en hérédité mendélienne monogénique. L'intégration eBSIMV quant à elle était présente chez tous les individus. Ce type de ségrégation confirme le statut allélique de chacune des intégrations eBSGFV, eBSOLV, et eBSImV (Gayral *et al.*, 2008 ; Gayral *et al.*, 2010 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013).

Cette étude a été jumelée avec la recherche de plantes infectées par BSGFV et par BSOLV dans la population F1. La présence du virus BSGFV a pu être corrélée avec la présence de l'intégration eBSGFV-7 alors que les plantes porteuses de l'intégration eBSGFV-9 ne développaient jamais d'infection. De même pour BSOLV, la présence du virus a été corrélée avec la présence de l'intégration eBSOLV-1 alors que les plantes porteuses de l'intégration eBSOLV-2 ne développaient pas la maladie. Ces résultats ont permis de conclure que seules les intégrations eBSGFV-7 et eBSOLV-1 étaient infectieuses (Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). A ce jour, seules les intégrations eBSGFV et eBSOLV sont clairement caractérisées et analysées (Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes et Iskra-Caruana, 2013). Dans le cadre de ces travaux, les eBSV ont été caractérisés chez notre population d'étude à l'aide des marqueurs eBSV décrits au **Tableau I-2**.

I – 4 – 4. 5. Activation des eBSVs

Trois types d'intégration virus-plantes sont décrits à ce jour comme capables de produire des particules virales infectieuses. Il s'agit : (1) du TVCV chez le tabac *Nicotiana edwardsonii* qui est un hybride hexaploïde issu du croisement entre *N. glutinosa* (n=24) et *N.*

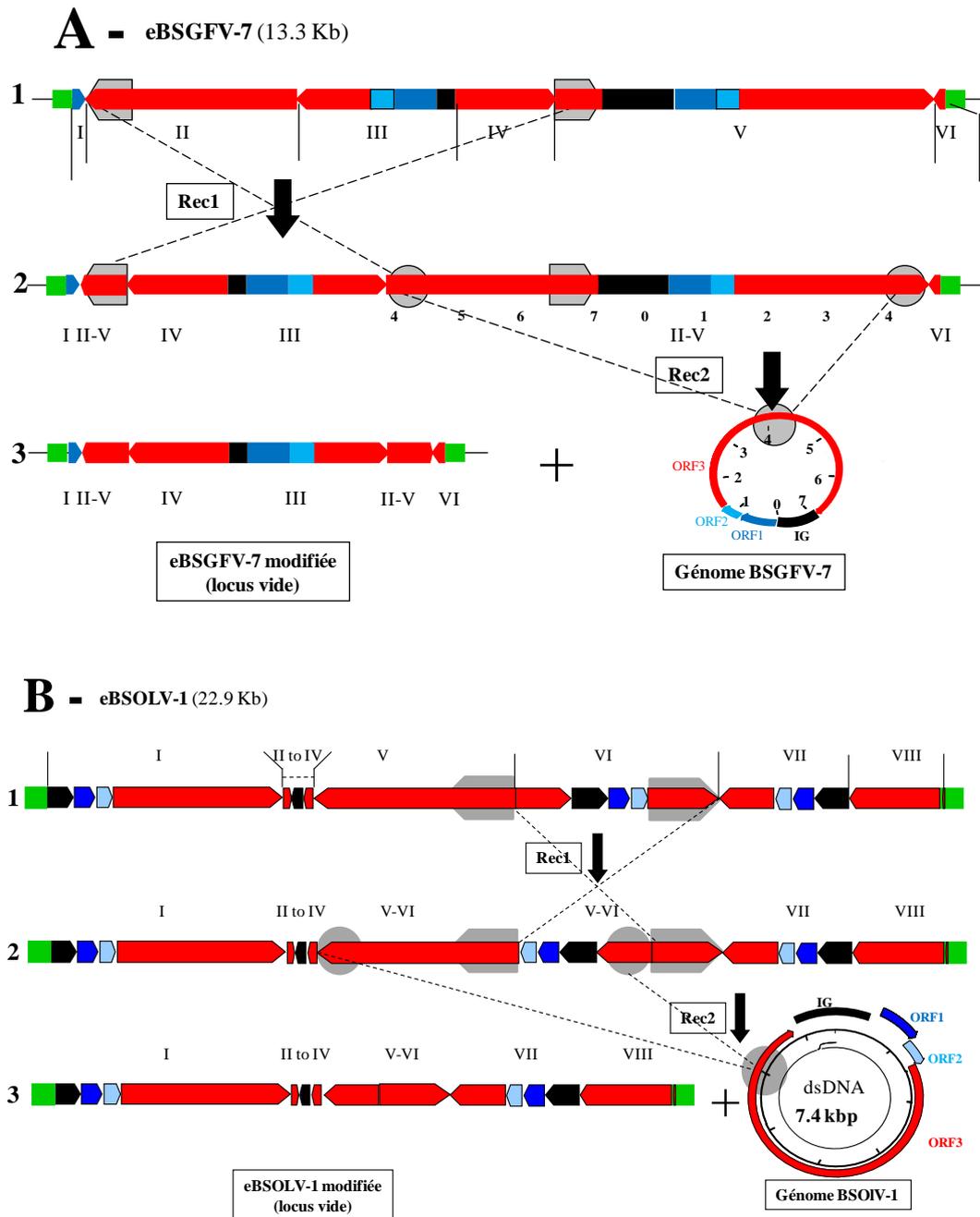


Figure I - 19 : Modèles théorique de base pour expliquer la production de virus libre BSGFV (A) et BSOLV (B) à partir du génome de leur homologue intégré - (d'après Iskra-Caruana *et al.* (2010) et Chabannes et Iskra-Caruana (2013)).

Les rectangles colorés représentent les ORF 1, 2 et 3 en bleu foncé, bleu clair et rouge respectivement. Les rectangles noirs représentent la zone intergénique (IG) du BSV. En vert est représenté le génome de la plante PKW. L'orientation des flèches indique le sens de lecture des séquences virales par rapport au génome du virus libre (BSV). Les séquences répétées utilisées pour les RH sont grisées.

1- Représentation schématique des eBSGFV (A) et eBSOLV (B). Les lignes verticales délimitent les fragments de séquences de BSV constitutives de l'eBSV (I à VI chez eBSGFV et I à VIII chez eBSOLV)

2- Structure théorique de la molécule recombinée - eBSGFV-7 (A) et eBSOLV-1 (B) - après le premier évènement de RH (**Rec1**)

3- structure théorique de la molécule recombinée - eBSGFV-7 (A) et eBSOLV-1 (B) - après le second évènement de RH (**Rec2**). A gauche la molécule résiduelle d'eBSGFV-7 (A) et d'eBSOLV-1 (B) après la Rh restant dans le génome de PKW et à droite la molécule virale excisée – BSGFV-7 (A) et BSOLV-1 (B).

clevelandii (n=12) (Lockhart *et al.*, 2000) ; (2) du PVCV chez l'hybride *Petunia hybrida* issu d'un croisement entre *P. integrifolia* ssp. *inflata* et *P. axillaris* ssp. *axillaris* (Richert-Poggeler *et al.*, 2003) et (3) du BSV chez les hybrides interspécifiques de bananier issus de croisement entre *M. balbisiana* et *M. acuminata* (Lheureux *et al.*, 2003, ; Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Dans ces trois cas de figure, l'activation a lieu systématiquement chez les hybrides interspécifiques avec des parents porteurs sains des intégrations.

En général, la production de particules virales à l'origine des infections est liée à la constitution génomique des séquences endogènes. Chez les rétrovirus (virus à ARN) et chez les pétuvirus (virus à ADN) par exemple, le génome viral complet est intégré en tandem au génome de la plante hôte comme chez les rétro-provirus (Noreen *et al.*, 2007). L'activation de ces séquences résulte en la production d'un transcrite ARN qui dans le cas des virus à ADN, est rétro-transcrit en ADN (Harper *et al.*, 2003 ; Staginnus *et al.*, 2007). On observe alors une reconstitution du génome viral circulaire à partir de ces EPRV probablement par transcription directe de copies comme dans le cas du pétunia (Richert-Poggeler *et al.*, 2003). Dans le cas des eBSV, l'activation ne peut être envisagée suivant ce modèle de transcription directe à cause de leur structure fragmentée, réorganisée, inversée et plus souvent dupliquée.

Un modèle théorique suggère une activation des eBSVs via au moins une étape de recombinaison homologue (**Figure I-19**) (Iskra-Caruana *et al.*, 2010 ; Chabannes et Iskra-Caruana, 2013) entraînant *in fine* la formation de particules virales et l'infection de la plante. (Gayral *et al.*, 2008 ; Iskra-Caruana *et al.*, 2010 ; Chabannes et Iskra-Caruana, 2013).

Pour l'intégration eBSGFV-7 (**Figure I-19-A**), une première recombinaison (appelée REC1) a lieu entre deux séquences inversées-répétées de 642 pb, séparées de 6,942 Kpb. La deuxième recombinaison (REC2) se produit entre deux séquences de 633 pb, flanquantes à cette séquence virale complète et conduit à l'excision d'un ADN viral de BSGFV-like qui peut ensuite se circulariser (Gayral *et al.*, 2008 ; Iskra-Caruana *et al.*, 2010).

Pour l'intégration eBSOLV-1 (**Figure I-19-B**), une première recombinaison homologue (REC1) a lieu entre deux séquences inversées-répétées de 1799 pb séparées par 3329 pb. Cette recombinaison intramoléculaire aboutit à l'inversion du fragment VI, générant ainsi une séquence linéaire complète du génome BSOLV contenant les trois cadres ouverts de lecture (Open reading frame - ORFs) dans un même sens d'orientation. Cette séquence virale complète est flanquée aux deux extrémités par deux séquences répétées identiques de 1141

pb. Celles-ci sont impliquées dans la deuxième étape de recombinaison homologue (REC2) qui produit un eBSOLV-1 modifié car portant une délétion de 7389 pb. L'excision 'pop out' d'une molécule virale circulaire serait à l'origine de la multiplication virale (Chabannes et Iskra-Caruana, 2013). Ce schéma d'activation de l'eBSOLV prend en compte les seuls fragments V et VI de la séquence eBSOLV décrite par Chabannes, Baurens *et al.* (2013). Une analyse *in silico* de l'intégralité des fragments impliqués dans la reconstitution du génome BSOLV est compatible avec ce modèle. En effet, la séquence des fragments V et VI du eBSOLV-1 sont exempts de toute mutation qui causeraient la perte de fonction virale (Chabannes et Iskra-Caruana, 2013 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Une zone d'ombre reste à élucider sur ces deux hypothèses d'activation eBGFV-7 et eBSOLV-1 par recombinaison homologue car la localisation de l'étape de recombinaison reste inconnue et on ne sait pas si la recombinaison homologue se produit au niveau de l'ADN génomique ou lors de la transcription de l'ARN.

I-4 – 4. 6. Régulation épigénétique des EPRV

a – Contrôle des EPRV par les plantes

Comme décrit au paragraphe précédant (I-4-4-5) les EPRV infectieux sont capables de restituer des virions probablement par recombinaison homologue et/ou transcription directe. Les études menées sur les EPRV des solanacées (*Petunia* et *Nicotiana*) ont montré une **faible transcription** par RT-PCR pour les intégrations du PVCV (Richert Pöggeler *et al.*, 2003 ; Nooren *et al.*, 2007), de *LycEPRV* (Staginnus *et al.*, 2007), de *SotuEPRV* (Hansen *et al.*, 2005) et de *NsEPRV* (Mette *et al.*, 2002). Ces transcrits ARN peuvent alors former des structures secondaires double brin, et servir de précurseurs pour la formation des siARN (small-interfering RNA), comme observé chez le petunia et la tomate (Nooren *et al.*, 2007 ; Staginnus *et al.*, 2007). Ces siARN interviendraient dans la régulation des EPRV (infectieux ou non) par un contrôle permanent de type « gene silencing » au niveau transcriptionnel (TGS) via la méthylation de l'ADN et/ou une modification des histones (Staginnus *et al.*, 2006 ; Hohn *et al.*, 2008 ; Mette *et al.*, 2002 ; Richert-Pöggeler *et al.*, 2003 ; Nooren *et al.*, 2007 ; Staginnus *et al.*, 2007) comme proposé dans le modèle développé par Staginnus et Richert-Pöggeler en 2006 (**Figure I-20 (a)**). Ce système de régulation des EPRV serait donc similaire à celui mis en place par les plantes pour contrôler les ET afin de se protéger contre les dommages liés à la ré-activation des transposons. D'autre part, les structures ARNdb obtenues à partir de la transcription des EPRV pourraient également permettre une résistance de la plante à l'infection par les virus apparentés. Cette résistance de type gene silencing

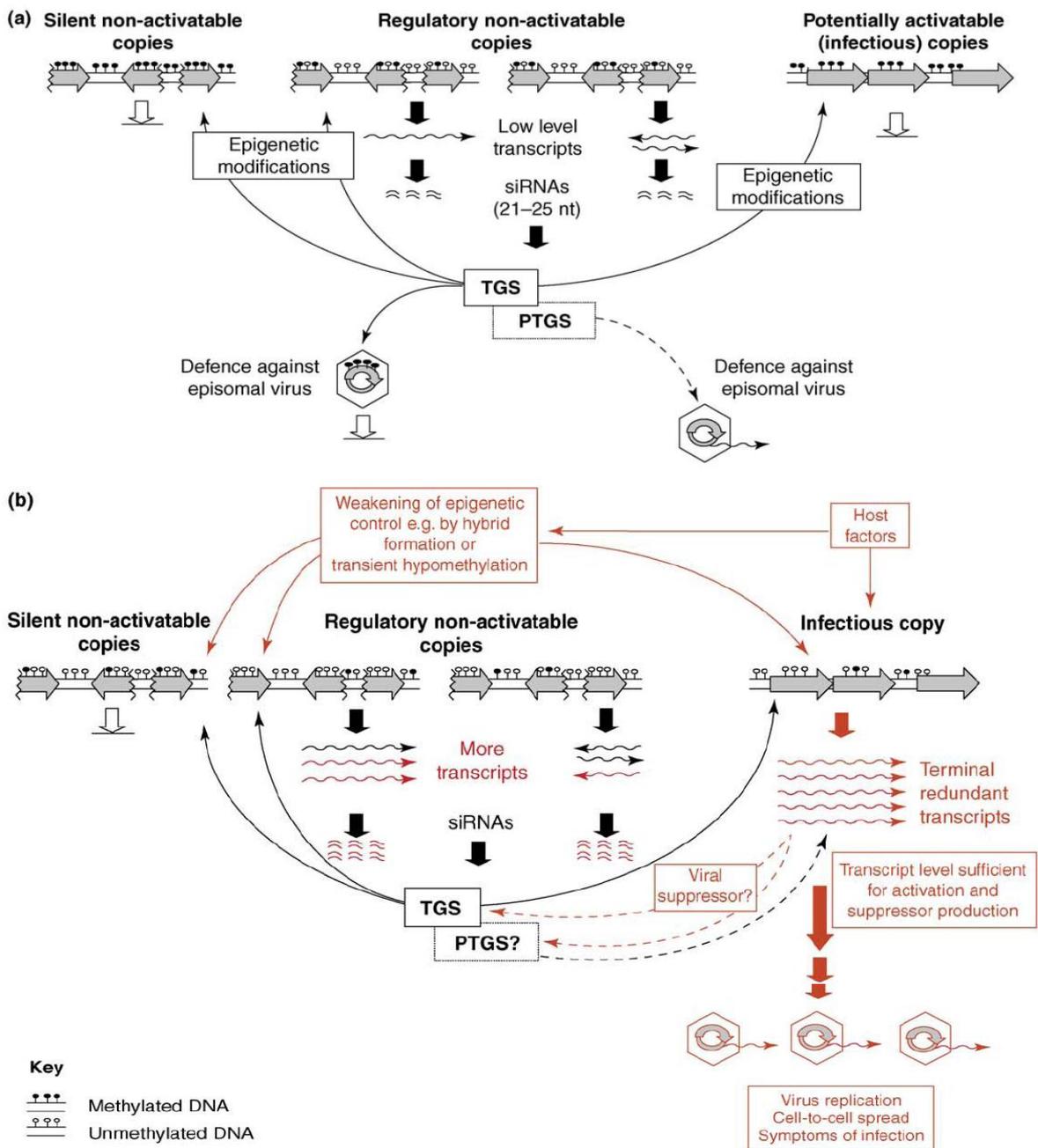


Figure I - 20 : Contrôle épigénétique des EPRV (Staginnus et Richert-Pöggeler (2006))

(a) **Modèle de régulation épigénétique des EPRV.** Le génome des plantes contient un grand nombre de copies dites silencieuses car méthylées et associées à l'hétérochromatine (gauche), ainsi qu'un faible nombre de copies EPRV pouvant être transcrites à un faible niveau par l'ARN polymérase (milieu). La majorité des EPRV ont des ORF défectives, mais certains peuvent également être infectieux (droite). Les transcrits des EPRV sont utilisés comme matrice pour la production des siARN qui induisent ou maintiennent des modifications épigénétiques (méthylation de l'ADN et/ou des histones) des autres EPRV homologues par TGS (Transcriptional gene silencing). Ce mécanisme permet également de réprimer l'activation des éventuels EPRV infectieux, ou des virus exogènes apparentés. Des mécanismes de PTGS (Post-transcriptional gene silencing – indiqués par les flèches en pointillé) pourraient également être impliqués.

(b) **Modèle d'activation des EPRV.** Le contrôle épigénétique qui permet en temps normal de réprimer l'activation des EPRV infectieux, peut être relâché lors d'une hypométhylation transitoire provoquée par un stress (hybridation interspécifique, stress hydrique, variation de température) ou d'autres facteurs internes. Cela conduirait à l'augmentation du nombre de transcrits viraux et conduirait à la formation de particules virales et à l'infection systémique de la plante.

s'effectuerait au niveau post-transcriptionnel (PTGS) par dégradation des transcrits viraux issus des EPRV en siARN de 21 nt qui iraient à leur tour cibler les ARN viraux issus des virus épisomaux pour les dégrader et empêcher ainsi l'infection de se développer (Baulcombe, 2004 ; Almeida & Allshire 2005) (**Figure I – 20 (a)**).

b – Activation des EPRV infectieux

L'activation des EPRV résulterait d'un dysfonctionnement du système de régulation épigénétique de ces derniers (**Figure I – 20 (b)**). Le croisement génétique interspécifique et les stress abiotiques sont les principaux facteurs activateurs identifiés et communs aux différents modèles d'EPRV infectieux connus (Ndowora *et al.*, 1999 ; Lockhart *et al.*, 2000 ; Dallot *et al.*, 2001 ; Richert-Pöggeler *et al.*, 2003). Ces stress induiraient un relâchement du contrôle épigénétique caractérisé par une déméthylation importante des EPRV. Cette déméthylation provoquerait ensuite une augmentation conséquente du nombre de transcrits qui conduirait à la néoformation de particules virales à l'origine de l'infection de la plante (**Figure I – 20 (b)**). La encore, ces mécanismes seraient communs à ce qui est connu chez les rétroéléments (Capy *et al.*, 2000; Grandbastien *et al.*, 2005; Sabot & Schulman, 2006; Slotkin & Martienssen, 2007).

c – Régulation des eBSV

Les eBSV, tout comme les éléments transposables (ET) sont des séquences parasites du génome. Ils sont capables de se multiplier et d'envahir le génome de leur hôte avec des effets délétères possibles sur leur *fitness*. Chez le maïs par exemple, les ET représentent 85% du génome (Schnable *et al.*, 2009). Les rétro-éléments (RE) à LTR par exemple, qui font partie des ET produisent tous des éléments nécessaires à la synthèse de particules virales exceptée la protéine d'enveloppe. Ils restent de ce fait dans la cellule qu'ils colonisent sans pouvoir passer aux cellules environnantes. Leurs effets sont donc limités au niveau cellulaire chez l'hôte contrairement aux EPRV qui ont des conséquences beaucoup plus néfastes sur l'hôte par une invasion systémique de la plante par les particules virales produites. Un premier moyen de contrôler ces séquences parasites par l'hôte est l'accumulation des mutations ou la recombinaison homologe. Celles-ci permettent des réarrangements du génome de ces séquences parasites empêchant leur multiplication et/ou amplification. Par l'accumulation de ces recombinaisons, on aboutit *in fine* à la disparition de ces séquences parasites par sélection naturelle purifiante (Duroy, 2012).

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

Le mécanisme épigénétique de type ARNi est également un moyen de défense contre l'invasion du génome par des ADN étrangers (ET, virus, transgènes) (**Figure I - 21**). Il est aussi exploité largement pour la régulation des gènes (Mette *et al.*, 2000 ; Staginnus et Richert-Pöggeler, 2006 ; Hohn *et al.*, 2008 ; Teycheney et Geering, 2011). Les similarités qui existent entre les EPRV et les ET suscitent à un rapprochement de ces deux types de séquences. Tout d'abord, ET et EPRV co-localisent fréquemment dans les zones hétérochromatiques et péri-centromériques (Richert-Pöggeler *et al.*, 2003 ; Harper, et Heslop-Harrison, 2005 ; Staginnus *et al.*, 2007). Ensuite, le contexte de stress responsable de l'activation des EPRV (cf paragraphe **I-4-3.2.**) est similaire à ceux responsables de l'activation des ET. Lockton et Gaut (2010) ont mis en évidence le réveil des ET lors de croisements interspécifiques entre *Arabidopsis thaliana* et *A. lyrata*. On observe aussi une activation des ET lors de divers stress abiotiques.

La majorité des travaux sur la régulation a porté sur les ET. Ils ont notamment permis de démontrer que l'ARNi induisait la répression de l'expression des ET (pour revue voir Rigal et Mathieu, 2011) via différents processus tels que la méthylation des cytosines de l'ADN, la modification de la région N terminale des histones H3 lysine 9 par di-méthylation et/ou acétylation et/ou phosphorylation (Johnson *et al.*, 2002). Ces processus sont médiés principalement par la machinerie de méthylation de l'ADN guidée par l'ARN. Cette machinerie est guidée par des petits ARN (sARN) de 24 nucléotides (nt). Ces sARN sont issus de la transcription des ET par l'ARN polymérase IV (Huettel *et al.*, 2006). Cette polymérase qui ne possède pas de fonction exo nucléase 3' vers 5' a la particularité de produire des ARN à partir de n'importe quelle séquence ADN avec une préférence pour les séquences ADN non-codantes (Wierzbicki, 2012). L'existence de cette combinaison de marques épigénétiques permet de définir l'état chromatique d'une zone de génome. Méthylation de l'ADN et modification des histones sont étroitement interconnectées. L'étude des mécanismes impliqués dans la mise en place ou le maintien de ces processus a montré des liens étroits entre présence de sARN de 24 nt, méthylation de l'hétérochromatine et silencing des ET (Zilberman *et al.*, 2006), indiquant que la méthylation était le mode principal de contrôle des ET. Cette régulation de type Transcriptional Gene Silencing (TGS) est également suspectée pour la régulation des EPRV. La transcription de certains ET peut cependant être accompagnée de la production de sARN de 21 nt (Mirouze *et al.*, 2009 ; McCue *et al.*, 2012). Ces sARN de 21 nt sont considérés comme des marques de Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) qui peuvent être activés lorsque le TGS est 'relâché' (Bourc'his et

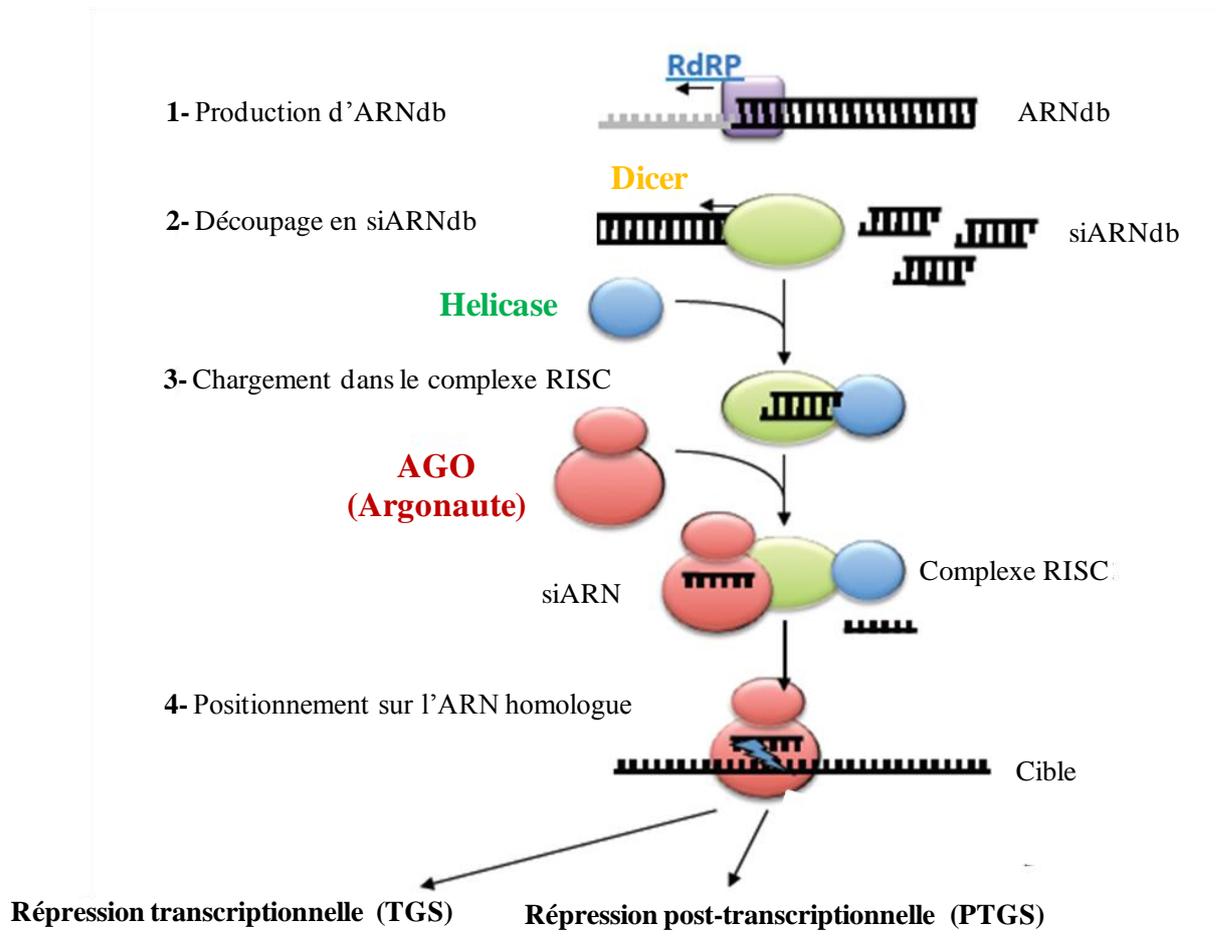


Figure I - 21 : Représentation des principales voies de l'ARN interférent (ARNi) (adapté de N. Baumberger, Sainsbury Laboratory, 2005)

- 1- Production d'ARN double brin (ARNdb) par l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRP).
- 2-Découpage de l'ARNdb aberrant en siARNdb par des endonucléases de type DICER.
- 3-Formation du complexe RISC (RNA-Induced Silencing-Complex) qui se compose d'une protéine d'accroche avec les enzymes DICER, d'une hélicase permettant l'ouverture des siRNAdb, et d'une protéine Argonaute (AGO) qui guide le siARN sur la cible à dégrader ou méthyler. Le complexe recrute les siARNdb et élimine le brin sens.
- 4-Présentation des siARN à l'ARN homologue et reconnaissance. Selon la taille des siRNA et la nature de la protéine AGO, les régulations mises en place seront soit de nature transcriptionnelle (TGS) soit post-transcriptionnelle (PTGS).

Voinnet, 2010). De manière intéressante, Llave (2010) a montré que le PTGS est le plus fréquemment impliqué dans les mécanismes de défense antiviraux ce qui suggère que ces deux mécanismes (TGS et PTGS) coopèreraient pour contrôler les ET et donc les EPRV. Ceci laisse dire à Hohn *et al.* (2008) que les ET pourraient jouer un rôle dans l'activation des EPRV. Le niveau des connaissances actuelles à ce sujet confirme une régulation ARNi des EPRV. Toutes fois, celles-ci ne permettent pas une analyse fine de la compréhension des mécanismes régissant cette régulation.

Dans le cas du pathosystème BSV/bananiier, une étude portant sur l'activation de l'eBSOLV-1 chez une population d'hybrides interspécifiques issue du croisement entre PKW (BB) (parent femelle sain mais portant des intégrations infectieuses) et IDN110 (AAAA) (parent mâle sans intégration BSV) réalisée par (Lheureux *et al.*, 2003) à l'aide des marqueurs AFLP leur a permis d'identifier 10 marqueurs AFLP qui co-ségrègent avec l'absence (3 marqueurs) ou la présence (7 marqueurs) de l'infection BSV. Ces marqueurs sont présents dans le génome *M. balbisiana* (B) et absents du le génome *M. acuminata* (A). Une ségrégation mendélienne monogénique de la répartition du BSV était observée pour la moitié de la population indiquant qu'un facteur génétique était impliqué dans l'activation de l'eBSOLV-1. Une analyse de la ségrégation des marqueurs chez la descendance (AAB) à l'aide d'un croisement test a montré l'existence d'un locus nommé BSV Expressed Locus (BEL) lié à l'expression du BSV. Ce locus était absent chez le parent *M. acuminata* et présent chez le parent *M. balbisiana*.

Dans le cadre de cette étude, nous avons identifié des marqueurs microsatellites (SSR) candidats pour suivre la ségrégation des génomes A et B impliqués dans le croisement dont est issue la population d'étude. L'un des objectifs visé dans ce travail est de pouvoir identifier des allèles de ces deux génomes (A et B) liés à la régulation (activation ou non activation) des eBSV de notre système d'étude.

La ploïdie du génome B chez les hybrides interspécifiques est corrélée à l'activation des eBSV. Contrairement aux hybrides interspécifiques à génome B diploïde (ABB, AABB) et porteur d'intégrations infectieuses, l'infection par le BSV suite à l'activation d'eBSV n'a été observée jusqu'à ce jour que chez les hybrides interspécifiques à génome B haploïde (AB, AAB, AAAB) (Teycheney *et al.*, non publié). Il est de ce fait tentant d'émettre l'hypothèse selon laquelle la régulation épigénétique des eBSV serait en rapport direct avec le nombre de copie du génome B chez les hybrides interspécifiques. On aurait ainsi une synthèse accrue de

siRNA chez les hybrides à génome B diploïde. Qu'elle serait dans ce cas l'impact de ces siRNA et des loci BEL sur la régulation des eBSV chez ces hybrides à génome B diploïdes ?

I – 5 - Objectifs de la présente étude

Chez les *Musa*, seuls les génomes *M. balbisiana* sont porteurs d'eBSV infectieux. D'autre part, outre l'hétérozygotie qu'ils confèrent aux hybrides, ces génomes *M. balbisiana* sont également porteurs de caractères agronomiques intéressants pour l'amélioration variétale du bananier notamment en termes de vigueur végétative et de résistance à la maladie des raies noires. La présence des eBSV **infectieux** a conduit le CIRAD à mettre en place un moratoire sur l'utilisation du génome *M. balbisiana* dans ses programmes de croisement. Ainsi l'utilisation d'hybrides tétraploïdes AAAB de plantains en tant que produit fini a été abandonnée au profit de leur intégration en tant que parent amélioré dans un schéma 4x/2x aboutissant à la création d'hybrides triploïdes. En effet, il est apparu récemment que le rétrocroisement d'hybrides 4x contenant du génome B (porteur d'intégrations infectieuses eBSV) avec des diploïdes *acuminata* pouvait déboucher sur des hybrides triploïdes qui ne manifestaient plus aucun symptôme de maladie (Tenkouano, com. pers.). Ce résultat pourrait s'expliquer par la recombinaison et la redistribution des chromosomes A et B dans les descendances triploïdes, résultat de la formation de gamètes très hétérogènes par le parent tétraploïde.

La ségrégation méiotique chez les polyploïdes (triploïdes et tétraploïdes) ainsi que les conditions d'appariement, de recombinaison et de redistribution des chromosomes A et B chez les clones interspécifiques ne sont encore que partiellement documentées chez le bananier. L'existence d'appariements homéologues entre génomes A et B à la méiose a pu être établie chez les hybrides interspécifiques et naturels (AAB, ABB, AABB) (Dodds et Pittendrigh, 1946 ; Shepherd, 1999 ; D'Hont *et al.*, 2000 ; D'Hont, 2005 ; Jeridi *et al.*, 2011). Cependant, ces informations restent partielles d'une part à cause de la petite taille et du mauvais étalement des chromosomes observés en métaphase chez les cellules analysées (Wilson, 1946; Simmonds, 1962 ; Dolezel *et al.*, 1994 ; Lysak *et al.*, 1999 ; Bartos *et al.*, 2005 ; Jeridi *et al.*, 2011) et d'autre part, à cause de l'accessibilité partielle des chromosomes analysés par des techniques (GISH) qui ne permettent qu'une analyse des zones centromériques et péricentromériques des chromosomes (D'Hont *et al.*, 2000 ; D'Hont, 2005 ; Jeridi *et al.*, 2011).

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

Partant de cette problématique, l'objectif global des recherches effectuées dans le cadre de la présente thèse est de comprendre la ségrégation et la recombinaison des chromosomes A et B à la méiose chez l'hybride synthétique allotétraploïde CRBP39 (AAAB), issu du programme d'amélioration bananier plantain du CARBAP, et d'analyser la ségrégation des eBSV et l'impact du contexte chromosomique sur la régulation de l'expression des eBSV. Pour cela nous avons produit et génotypé à l'aide de marqueurs de type microsatellite et de marqueurs PCR spécifique des eBSV, une descendance issue du croisement CRBP39 (AAAB) X Pahang_CARBAP (AA).

Les objectifs spécifiques de ce travail se regroupent autour des trois questions ci-dessous :

- 1- Comment ségrégent les chromosomes issus du génome B du tétraploïde interspécifique CRBP39 (AAAB) dans les gamètes ? et donc comment s'apparient-ils à la méiose ?
- 2- Comment ségrégent les eBSV infectieux dans la descendance de CRBP39 ?
- 3- Existe-t-il des contextes chromosomiques/génomiques favorables à l'expression des eBSV ?

L'objectif final et appliqué de ce travail est de pouvoir piloter la gestion des séquences endogènes de BSV dans les programmes d'amélioration chez le bananier sans risque d'activation des eBSV.

Le travail de thèse a été organisé en plusieurs étapes :

- ✚ La création d'une population d'hybrides interspécifiques à partir du croisement entre CRBP39, hybride artificiel allotétraploïde de constitution génomique AAAB (parent femelle) et Pahang_CARBAP, diploïde naturel *M. acuminata* de constitution génomique AA (parent mâle) ;
- ✚ La duplication *in vitro* de la population afin de soumettre les deux lots de plantes à des conditions de stress d'activation des eBSV différents : un lot maintenu en culture *in vitro* (CIV) et le deuxième lot de plantes cultivé en serre tropicalisée « *insect-proof* » ;
- ✚ Le tri des marqueurs SSR candidats, pour me permettre de suivre le génome B du CRBP39 (AAAB) dans la descendance ;

Chapitre I – Bibliographie et objectifs de l'étude

✚ Le suivi des chromosomes (ou partie de chromosomes) A et B et de leur redistribution chez la descendance hybride pour comprendre les interactions entre les génomes A et B à la méiose chez CRBP39 ;

✚ La détermination des profils eBSV des parents et des 184 individus de la descendance afin d'identifier les individus porteurs des séquences eBSV infectieuses et donc capable de produire du virus ;

✚ Le diagnostic par IC- PCR - DNase des particules BSV chez les individus de la population afin d'identifier les individus qui expriment du virus ;

✚ L'analyse statistique des corrélations entre marqueurs SSR/eBSV et l'infection chez ces hybrides interspécifiques afin de préciser s'il existe des phénomènes de recombinaison et/ou une redistribution des chromosomes *M. balbisiana* chez ceux-ci facilitant la restitution d'un génome viral fonctionnel à partir des eBSV.

CHAPITRE II

Matériels et

Méthode

II – 1 - Matériels

II – 1 - 1. Le matériel végétal

La population d'étude est constituée d'une population en ségrégation issue d'un croisement interspécifique entre un allotétraploïde de constitution génomique AAAB ; CRBP39 (ITC1344) parent femelle et le parent mâle diploïde naturel *M. acuminata* spp. *malaccensis* cv Pahang_CARBAP (code interne CARBAP : PHG) de constitution génomique AA. Pour une étude généalogique, les parents du CRBP39 ; French clair (ITC1185) plantain cultivé de constitution génomique AAB et M 53 (code interne CARBAP : M53) hybride diploïde de constitution génomique AA ont été également analysés. Quatre accessions *M. balbisiana* (Cameroun ITC0246, Honduras ITC0247, Lal Velchi ITC1588 et Pisang klutuk wulung – PKW ITC1587) représentant la diversité des *balbisiana* disponibles en collection (Gayral *et al.*, 2010) ont également été analysées. Les références des différentes accessions *Musa* sont disponibles dans la base de données MGIS gérée par Bioversity International (<http://www.crop-diversity.org/banana/>).

Il est à noter ici qu'au cours de cette étude, nous avons constaté que le Pahang disponible dans la collection du CARBAP (nommé ici Pahang_CARBAP) est génétiquement différent du Pahang (ITC0609) dont est issu l'haploïde doublé dont le génome est complètement séquencé à ce jour (D'Hont *et al.*, 2012). Les deux accessions sont néanmoins très proches génétiquement.

II – 1 - 2. Les marqueurs moléculaires

II – 1 - 2. 1. Les marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites ou SSRs (*Simple sequence repeats*) sont de petits segments d'ADN contenant de courts motifs de 2 à 6 nucléotides répétés en tandem 10 à 50 fois et dispersés le long des génomes. Les SSRs ont été choisis pour mener ce travail de thèse car ils sont polymorphes, multi-alléliques, co-dominants et leur amplification par PCR a l'avantage d'être reproductible. De plus, une collection de marqueurs SSR était déjà disponible au CIRAD au démarrage de ce projet (D'Hont *et al.*, 2012). Notre population a été caractérisée à l'aide de 38 marqueurs SSR sélectionnés parmi 335. Vingt six de ces marqueurs

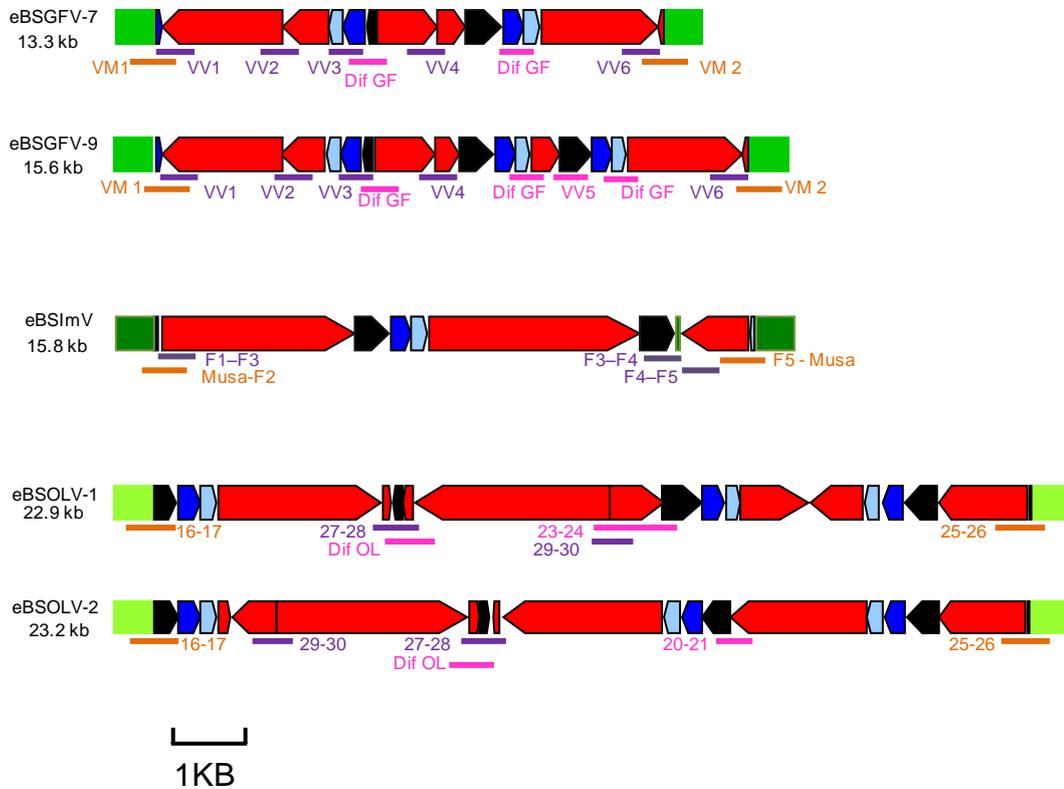


Figure II - 1: Position des loci PCR et dCAPs sur les intégrations BSGFV, BSOLV et BSIMV chez PKW (d'après Gayral *et al.* (2010) et Chabannes, Baurens *et al* (2013)).

Les fragments amplifiés par PCR sont représentés par des lignes orange, violet et rose correspondant respectivement aux marqueurs jonctions, internes et allèles spécifiques.

possèdent un allèle permettant de suivre la ségrégation des chromosomes B. La stratégie de tri des marqueurs SSR est développée au paragraphe **II-2-6**.

II – 1 - 2. 2. Les marqueurs eBSV

Suite à la caractérisation des intégrations BSV chez le diploïde *M. balbisiana* (BB) Pisang Klutuk Wulung (PKW), Chabannes, Baurens *et al.*, (2013) ont développé des marqueurs PCR et dCAPs qui permettent de définir le génotype d'intégration BSV pour chacune des plantes étudiées. Les marqueurs développés sont de trois types:

- a- des marqueurs **externes** situés au niveau des zones de jonction entre le génome viral et le génome de la plante,
- b- des marqueurs **internes** spécifiques des zones de réarrangements,
- c- des marqueurs **allèles spécifiques** qui permettent de différencier les deux allèles d'une même espèce eBSV.

Ces marqueurs sont présentés au **Tableau I-2** du **Chapitre I**, et positionnés sur le génome des différentes espèces eBSV caractérisés et décrits chez PKW sur la **Figure II-1** ci-contre.

Dans le cadre de cette thèse, les marqueurs eBSV ont été utilisés pour définir le génotype eBSV des parents du croisement et de tous les individus de ma population. J'ai utilisé pour chacune des espèces BSV intégrée au génome maternel CRBP39 (AAAB) (eBSOLV et eBSGFV) 3 marqueurs eBSV dont 2 spécifiques des zones d'intégration (ou jonction) entre le génome de la plante et le génome viral et un marqueur interne spécifique d'une zone de réarrangement.

II – 2 - Méthodes

II – 2 - 1. La production du matériel végétal

Les croisements, le sauvetage d'embryons et leur mise en culture ont été effectués au CARBAP. Pour obtenir une population suffisamment importante, 14 fleurs femelles de CRBP39 ont été hybridées par du pollen produit par 5 pieds mâles (Pahang_CARBAP) (**Figure II – 2 (2)**). Les 206 embryons issus de ces croisements ont ensuite été transférés sur Montpellier en boîte de Pétri sur un milieu gélosé de culture pour embryon zygotique (Bakry, 2008) dont la composition est décrite en **Annexe 1**.

Chapitre II – Matériels et Méthodes

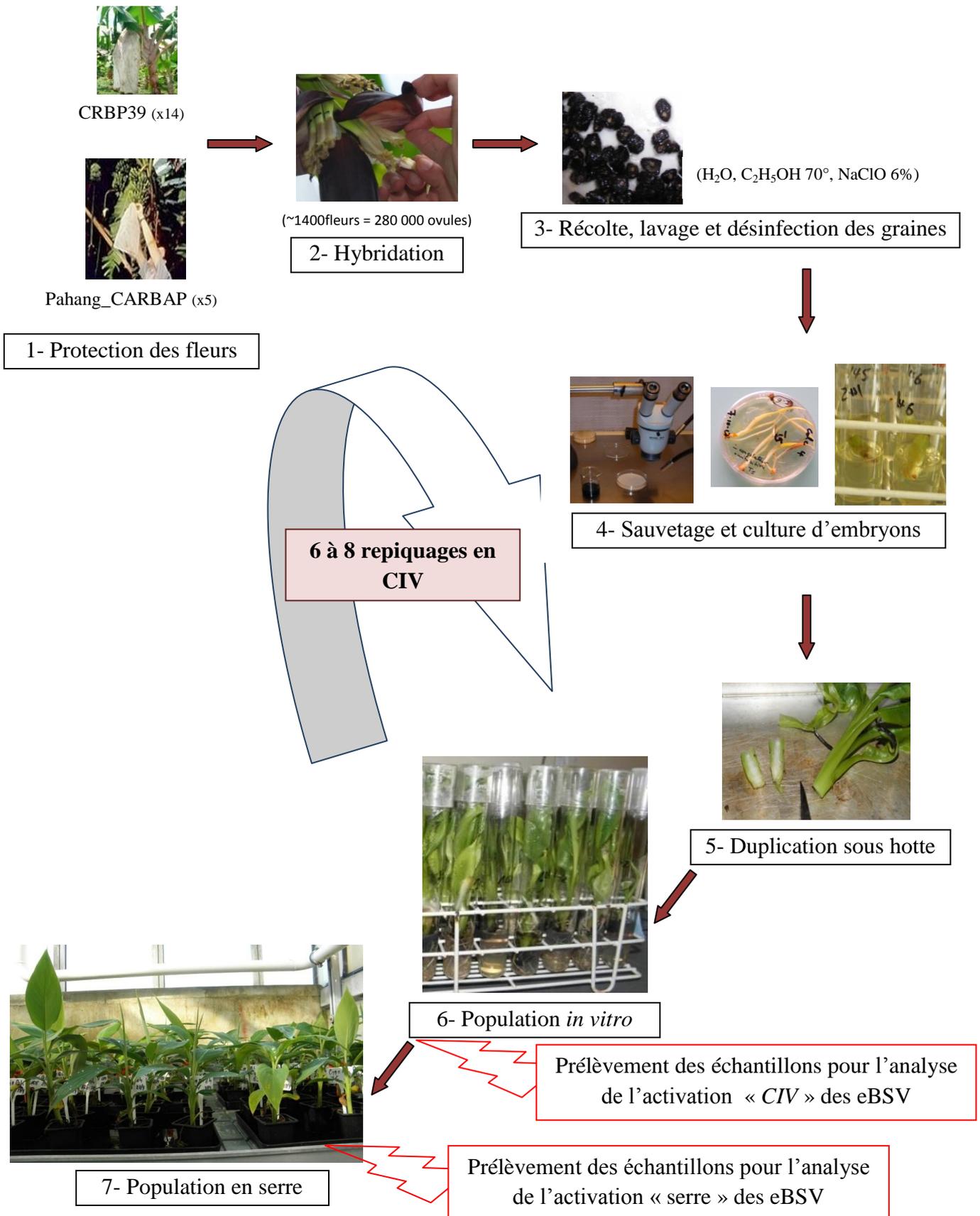


Figure II – 2 : Plan expérimental de production de la population d'étude

II – 2 - 1. 1. Le repiquage des plantules

Quarante cinq à 60 jours après la mise en culture, les embryons germés ont été repiqués en tubes à essai sur un milieu de croissance dérivé de Murashige et Skoog (1962) (milieu MS de base) (**Annexe 1**) (**Figure II - 2**). Le tube est référencé de façon unique, scellé au scellofrais et stocké en chambre de culture à une température comprise entre 25° et 29°C et à la photopériode 16h/8h – jour /nuit. La lumière du jour est reproduite par des tubes fluorescents d'intensité 100 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Les repiquages sont renouvelés toutes les 6 semaines.

II – 2 - 1. 2. La duplication du matériel végétal

Pour pallier à toute perte de matériel végétal, ma population a été dupliquée *in vitro* par une entaille verticale faite sur chaque plantule pour fendre le méristème apical et le corne en deux parties égales (**Figure II – 2 (5)**). Chaque fragment de bulbe a par la suite été repiqué dans un tube à essai contenant le milieu de prolifération pour banane (Proli B) (**Annexe 1**). Les deux tubes sont référencés à l'identique pour chaque plante. Ils sont ensuite stockés à l'obscurité à une température comprise entre 25 et 28°C pendant six semaines. Au bout de cette période, chaque fragment de bulbe ayant émis un bourgeon est repiqué dans un tube contenant le milieu de croissance MS de base. Ces tubes sont ensuite stockés en chambre de culture à une température comprise entre 22° et 25°C et à la photopériode 16h/8h – jour /nuit.

II – 2 - 2. Détermination du niveau de ploïdie de la descendance par cytométrie en flux

La cytométrie de flux a permis une estimation de la taille du génome de l'haploïde doublé (HD) Pahang à 523 mégabase (Mb) (D'Hont et *al.*, 2012). Cette technique, recommandée pour une estimation rapide de la teneur d'ADN nucléaire des *Musa* (Dolezel et *al.*, 1997) a été utilisée pour estimer la ploïdie des individus de la population. Le riz Nipponbare (*Oryza sativa*) dont la taille du génome haploïde est de 420 Mb a été utilisé au cours de cette expérience comme référence interne diploïde. Cette technique repose sur l'utilisation d'un fluorochrome spécifique de l'ADN (l'iodure de propidium -IP- dans notre cas) et sur la quantification de l'intensité relative de la fluorescence des noyaux marqués. La teneur en ADN est corrélée avec le niveau de ploïdie.

Pour vérifier les résultats obtenus en cytométrie, un comptage des chromosomes a été effectué chez quelques individus à partir de méristèmes racinaires en croissance active suivant le protocole décrit par Bakry et Shepherd (2008).

II – 2 - 2. 1. Préparation des échantillons : extraction et coloration des noyaux

Quarante milligrammes (mg) de feuille fraîche de bananier et 30mg de feuille fraîche de riz Nipponbare ont été prélevés respectivement sur des plantes en CIV et sur des plantes en serre. Ces échantillons ont été déposés dans une boîte de Pétri posée sur un « pain à glace » contenant 1,5ml de tampon LB01 modifié (Doležel et Bartoš, 2005) de composition suivante : 15 mM TRIS, 2 mM Na₂EDTA, 0.5 mM spermine 4HCl, 80 mM KCl, 45mM MgCl₂, 30mM de Citrate de sodium et 40 mM Na₂SO₃; le tout à pH 7,5. Les tissus foliaires sont ensuite hachés très finement à l'aide d'une lame de rasoir. La suspension, qui comprend des noyaux isolés, est alors prélevée à l'aide d'une pipette pasteur de 3 ml et filtrée à l'aide d'un tamis en polyéthylène de 30 µm (Partec Celltries). L'iodure de propidium (IP) - 50 ppm (parties par million)- est rajouté au filtrat puis le mélange est vortexé et laissé au repos pendant 30 min à l'obscurité avant analyse. L'IP, agent intercalant des acides nucléiques, va se lier aux molécules d'ADN contenues dans le noyau cellulaire.

II - 2 - 2. 2. Dosage de la teneur des plantes en ADN par cytométrie en flux

Le dosage d'ADN est réalisé à l'aide d'un cytomètre en flux Partec II PAS (Particle Analysing System) (Partec GmbH, Münster, Allemagne) dont le rayonnement laser de longueur d'onde comprise entre 454 et 515 nm traverse le noyau et excite par fluorescence l'IP fixé par la molécule d'ADN. La quantité d'IP fixée est corrélée à la quantité d'ADN contenu dans les noyaux et donc au niveau de ploïdie de l'échantillon. Pour chaque échantillon, 800 noyaux ont été analysés en moyenne. La distribution des intensités de fluorescence (teneur relative en ADN) obtenue par cytométrie en flux est généralement exprimée en unités arbitraires (C). La valeur 1C représente la teneur en ADN d'un jeu chromosomique haploïde (n). Pour déterminer le niveau de ploïdie, il convient de calibrer cette échelle en fonction d'une référence. Dans cette étude, j'ai utilisé le riz Nipponbare comme référence diploïde (sa valeur 1C est 0,91 avec un génome de 430Mb) (Dolezel *et al.*, 1997).

II – 2 - 3. La préparation des ADNs pour la caractérisation moléculaire

II – 2 - 3. 1. Le prélèvement et le broyage du matériel végétal

Pour chaque individu de la population, un mélange de feuilles, pseudo-tronc et racines collectés lors d'un repiquage *in vitro* est broyé à l'azote liquide dans un mortier en céramique contenant une pincée de sable de Fontainebleau et de polyvinylpyrrolidone

(PVPP) à l'aide d'un pilon en céramique. La poudre ainsi produite est utilisée pour l'extraction d'ADN génomique ou stockée à -80°C pour une utilisation ultérieure.

II – 2 – 3. 2. L'extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait en utilisant trois grammes de broyat de plante suivant le protocole d'extraction des acides nucléiques décrit par (Gawel et Jarret, 1991) (**Annexe 2**). L'extraction s'est faite à partir d'un tampon de broyage de constitution suivante : Tris HCl pH8 (0,1M), NaCl (1,4M), EDTA (20 mM), PEG 6000 (1% w/v), sulfite de sodium (0,5% w/v), MATAB (2% w/v) et RNase A (50 µg/ml). Le culot d'ADN obtenu en fin d'extraction a été récupéré dans 500µl d'H₂O ultra pure et stocké au congélateur à -20°C.

II – 2 - 3. 3. Le dosage de l'ADN et la vérification de la qualité d'ADN

Chacun des ADN extrait a été quantifié par électrophorèse en gel d'agarose à 1% (w/v). Pour cette quantification, j'ai utilisé une gamme étalon faite de 10µl de solutions standard d'ADN purifié de Phage Lambda de concentration connue et variant de 50 à 300 ng/µl (0.5 à 30 pg). La migration s'est faite dans une solution de TBE 0.5x (45 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA - pH 8) pendant 1h à 100V. L'observation s'est faite après incubation du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pour coloration pendant 15 minutes puis par visualisation sur une lampe à rayonnement ultra-violet. La concentration des différentes solutions d'ADN est estimée en comparant l'intensité des bandes obtenues à celles des solutions d'ADN témoins.

Un dosage complémentaire des solutions d'ADN a été réalisé au Nanodrop (Nanodrop2000 Spectrophotometer-Thermo Scientific).

La qualité des solutions ADN a été contrôlée en réalisant une amplification PCR des ADNs avec les amorces du gène d'actine ; Actine1F (5'-TCC TTT CGC TCT ATG CCA GT-3') et Actine1R (5'-GCC CAT CGG GAA GTT CAT AG-3'). Les réactions PCR sont effectuées dans le mélange réactionnel suivant : 5 µl d'ADN de plante à une concentration de 20 ng/µl, 5 µl de Tampon vert 5x contenant le tampon de charge pour le dépôt sur gel d'agarose (Green GoTaq®, PromegaTM, Madison, WI), 1 µl de dNTPs à la concentration de 350 µM, 1 µl de chacune des deux amorces à 10 µM et 0,2 µl (soit 1U) de GoTaq® ADN polymérase (PromegaTM, Madison, WI) le tout dans un volume réactionnel de 25 µl complété avec de l'eau. Le programme PCR utilisé est le suivant : un cycle de 5 min à 94°C puis 25 cycles comme suit : 30s à 94°C, 30s à 58°C et 35s à 72°C et un dernier cycle d'élongation

finale de 10 min à 72°C. Dix microlitres de produit PCR sont ensuite séparés sur un gel d'agarose à 1,5% (w/v) dans du tampon TBE 0,5x (45 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA - pH 8) à 100V pendant 25 min. La révélation se fait par incubation du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) pendant 15 minutes puis par visualisation sur une lampe à rayonnement ultra-violet (UV).

II – 2 - 4. Analyse de la conformité des parents

A cause de la faible fertilité femelle observée chez les triploïdes et les tétraploïdes *Musa* et dans l'objectif d'obtenir un nombre d'hybrides suffisamment important pour créer la population nécessaire à cette étude, 14 fleurs femelles de l'allotétraploïde CRBP39 ont été hybridées par du pollen produit par 5 pieds du parent mâle Pahang_CARBAP comme précisé au paragraphe **II-1-1**.

Il a fallu dans un premier temps vérifier la conformité des différentes plantes utilisées comme géniteurs lors des croisements (c'est à dire vérifier que toutes les plantes utilisées comme parents - mâles ou femelles - sont bien des clones). J'ai pour cela caractérisé chacune de ces plantes à l'aide de 12 marqueurs SSR répartis sur les 11 chromosomes de Pahang. Le protocole expérimental est détaillé au paragraphe **II-2-6**.

II – 2 - 5. Identification et suivi du génome B dans la descendance

A l'exception des marqueurs eBSV présentés au paragraphe **II-1-2.2.**, il n'existait au début de cette thèse aucun autre marqueur spécifique du génome B des *Musa*. Il existait cependant toute une collection de loci SSR au CIRAD provenant d'études antérieures (Grapin *et al.*, 1998 ; Hippolyte *et al.*, 2010 ; D'Hont *et al.*, 2012).

Pour sélectionner des marqueurs SSR me permettant de suivre *in fine* le génome B dans la population hybride en ségrégation, je suis parti de 335 loci SSR cartographiés chez Pahang (D'Hont *et al.*, 2012) et distribués sur les 11 chromosomes *Musa*. J'ai avec ces 335 loci caractérisé huit accessions *Musa* : (CRBP39 (AAAB), Pahang_CARBAP (AA), French clair (AAB), M 53 (AA) et quatre *M. balbisiana* strict (BB) ; B. Cameroun, B. Honduras, Lal velchi et PKW représentant la diversité actuelle des *M. balbisiana* en collection *in vivo* (Gayral *et al.*, 2010). Ces quatre *M. balbisiana* doivent aider à l'identification de l'allèle B à chaque locus puisque l'origine du génome B du French clair et par conséquent du CRBP39 est inconnue. L'objectif était de sélectionner au moins 4 loci SSR par chromosome.

II – 2 - 6. Tri des marqueurs SSR et génotypage

Le tri s'est opéré en deux étapes :

- La première étape était basée sur le polymorphisme des marqueurs chez CRBP39 (AAAB) et French Clair (AAB) (la « grand-mère » de la descendance étudiée) (**Figure II - 3**) avec une priorité aux loci à trois ou quatre allèles dont l'un des allèles nous permettait d'identifier le chromosome B. Un allèle était considéré comme provenant du génome B s'il était présent chez French clair (AAB) et CRBP39 (AAAB) et chez au moins une accession *M. balbisiana* (BB) mais absent chez M 53 (AA) et Pahang-CARBAP (AA). Pour les deux loci mMaCIR1234 et mMaCIR2016 l'identification de leur allèle B s'est faite en se basant sur la proximité de leur taille à celle des allèles *M. balbisiana*. Le marqueur mMaCIR0017 extrêmement polymorphe avec six allèles chez CRBP39 a également été retenu avec l'hypothèse que les allèles de ce marqueur SSR particulier provenaient d'un locus dupliqué dans le génome du bananier (un seul locus a été analysé).

- La deuxième étape de tri portait sur l'évaluation de la ségrégation des loci présélectionnés au sein de la population. Pour cela, les 72 loci SSR présélectionnés ont été testés sur seize plantes : les parents (CRBP39 et Pahang_CARBP) et 14 individus de la population choisis arbitrairement pour éviter tout biais dans mon expérience. J'ai tout de même pris en compte leur statut d'intégration BSV (3 plantes possédant à la fois les intégrations eBSOLV et eBSGFV – comme le parent femelle CRBP39 ; 4 plantes ne possédant que l'intégration eBSGFV, 4 plantes ne possédant que l'intégration eBSOLV et 3 plantes ne possédant aucune intégration - comme le parent mâle Pahang_ CARBP). Les loci sélectionnés ont une distribution mendélienne de leurs allèles au sein de notre échantillon de descendant.

Une fois le tri des loci SSR terminé, l'ensemble de la population et les deux parents ont été caractérisés par les 38 loci SSR sélectionnés (**Tableau II-1**). L'amplification des loci SSR s'est effectuée suivant le protocole expérimental décrit par (Christelová *et al.*, 2011) à l'aide d'amorces spécifiques aux loci SSR présentées au **Tableau II-1** (D'Hont *et al.*, 2012 ; Hippolyte *et al.*, 2010 ; Lagoda *et al.*, 1998).

Le génotypage a été réalisé sur le séquenceur capillaire Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer du Grand Plateau Technique Régional de Génotypage (GPTR - Génotypage) du Languedoc Roussillon abrité par l'UMR AGAP du CIRAD. Le codage et la

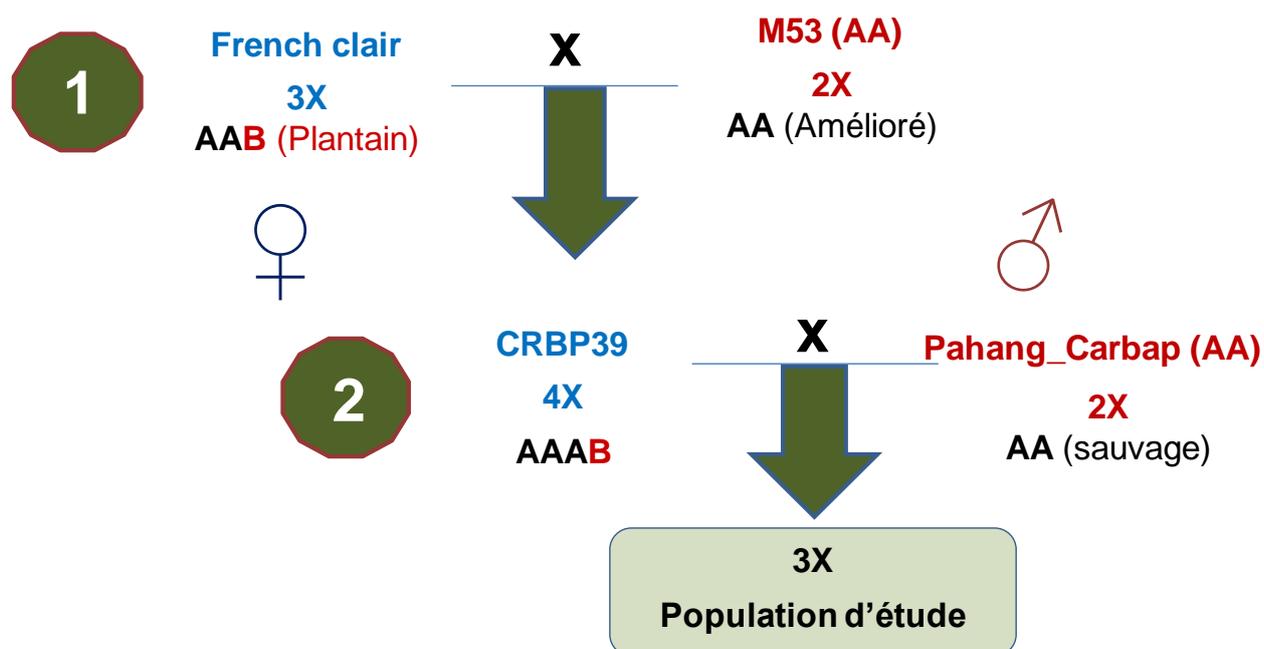


Figure II - 3 : Schéma des croisements effectués pour la création de la population d'étude

Le CRBP39 (AAAB) est issu de la fécondation entre un gamète non réduit triploïde (AAB) produit par le plantain French clair -parent femelle- et un gamète (A) produit par l'hybride diploïde amélioré M 53 -parent mâle-. Le génome B présent chez CRBP39 provient du French Clair.

La population d'étude (triploïde – $2n=3x$) est issue du croisement entre CRBP39 et Pahang_CARBP

Tableau II - 1 : Liste des loci SSR sélectionnés et des amorces forward et reverse correspondantes ayant servi à caractériser la population issue du croisement CRBP39xPahang_CARBP.

LG	SSR loci	Amorce forward	Amorce reverse
LG01	mMaCIR0007	AACAAC TAGGATGGTAATGTGTGGAA	AACAAC TAGGATGGTAATGTGTGGAA
	mMaCIR0172	CAGCTAATGCCAAACCC	CAGCTAATGCCAAACCC
	mMaCir0180	GCCTCAGCCTCATCATC	GCCTCAGCCTCATCATC
	mMaCIR1052	TGCATTGATGTTTTCT	TGCATTGATGTTTTCT
	mMaCIR1324	AAAAGCTCGCGGTAGAAG	AAAAGCTCGCGGTAGAAG
	mMaCIR1620	CCAACCCGTCCTTATCC	CCAACCCGTCCTTATCC
	mMaCIR2094	AAGCAGCTCGAACACCA	AAGCAGCTCGAACACCA
LG02	mMaCir0360	GTGGTGGTTGACCCAAAGTT	GTGGTGGTTGACCCAAAGTT
	mMaCIR1016	GGAGAGAGGAAAGAGGCA	GGAGAGAGGAAAGAGGCA
	mMaCIR1390	TGCGTTGCTTGATGTGT	TGCGTTGCTTGATGTGT
	mMaCIR1572	ATCAGTGCATTCAGTCAGG	ATCAGTGCATTCAGTCAGG
	mMaCIR2016	GTTGCCACCAACCAAGA	GTTGCCACCAACCAAGA
LG03	mMaCIR1234	AACTTGGCCCTTTTCCTT	AACTTGGCCCTTTTCCTT
	mMaCIR1474	TTCATCAACTCGCTCCA	TTCATCAACTCGCTCCA
	mMaCIR1641	CGACGCAGTCTCTCACC	CGACGCAGTCTCTCACC
	mMaCIR1658	TCTTGAGGAAGGCCAAAC	TCTTGAGGAAGGCCAAAC
LG04	mMaCIR0411	TGCAAGATTCCCATTGTTCA	TGCAAGATTCCCATTGTTCA
	mMaCIR1185	CCCAAGGAGACTGAAAGG	CCCAAGGAGACTGAAAGG
	mMaCIR1306	GCGCACTGATTAGGTTTTTC	GCGCACTGATTAGGTTTTTC
	mMaCIR1338	AGAAGGGAGGAGAAAGAACA	AGAAGGGAGGAGAAAGAACA
	mMaCIR1554	ACCCGAACCCTAAACCA	ACCCGAACCCTAAACCA
LG05	mMaCIR0017	GTTTACTGGCACTCTGTCTC	GTTTACTGGCACTCTGTCTC
	mMaCIR1609	TGCAATTCGACTCTTCCTC	TGCAATTCGACTCTTCCTC
LG06	mMaCIR0120	ATGCCCACTTCCACCT	ATGCCCACTTCCACCT
	mMaCIR1131	TCTTGCCGCTCCATTT	TCTTGCCGCTCCATTT
LG07	mMaCIR1395	TCCAAGCCGTTCCAAG	TCCAAGCCGTTCCAAG
	mMaCIR2927	TGTCCACACCTCCTTCC	TGTCCACACCTCCTTCC
LG08	mMaCIR0388	CTTATCGCCACCTCCAATTC	CTTATCGCCACCTCCAATTC
	mMaCIR1026	GGAGGTGCAGGAGAACA	GGAGGTGCAGGAGAACA
	mMaCIR1602	CACGCAAAACAGAAGGG	CACGCAAAACAGAAGGG
	mMaCIR1733	GATCGAACACAGCGAGG	GATCGAACACAGCGAGG
LG09	mMaCIR1520	GCGATGTGTCGTTTCAGG	GCGATGTGTCGTTTCAGG
	mMaCIR1994	GCTTTCCTTTGTCCCTTC	GCTTTCCTTTGTCCCTTC
LG10	mMaCIR0273	TGGTTGAAGATTCCCAT	TGGTTGAAGATTCCCAT
	mMaCIR1209	TCGGACAACATCAAAGGA	TCGGACAACATCAAAGGA
	mMaCIR1429	CATTGCCTCCATCGTCT	CATTGCCTCCATCGTCT
LG11	mMaCIR1670	CAAAACATCCACCCAAAA	CAAAACATCCACCCAAAA
	mMaCIR1917	TCGAATCAAATGCCGAG	TCGAATCAAATGCCGAG

(LG) Linkage group

lecture des allèles ont été réalisés à l'aide du logiciel GeneMapper v4.1 software (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com). La lecture automatisée des allèles a été systématiquement suivie d'une vérification manuelle. Les allèles visibles ont été annotés chez les parents et chez l'ensemble des individus.

II – 2 - 7. Génotypage eBSV des individus de la population

Afin de déterminer la nature des eBSV des individus de la population, ceux-ci ont été génotypés à l'aide des marqueurs eBSV décrits au paragraphe **II-1-2.2**. Chaque individu de ma population a ainsi été caractérisé par six marqueurs eBSV (3 par espèce BSV).

II – 2 - 7. 1. Réactions de polymérisation en chaîne

Les couples d'amorces utilisés pour les 6 marqueurs testés sont décrits dans Chabannes, Baurens *et al.* (2013) et sont repris dans le **Tableau II - 2** ci-dessous. Pour chacun de ces marqueurs eBSOLV et eBSGFV le mélange réactionnel est constitué de : 5 µl d'ADN de plante à la concentration de 20ng/µl, 5 µl de Tampon vert 5x contenant le tampon de charge pour le dépôt sur gel d'agarose (Green GoTaq®, Promega™, Madison, WI), 1 µl de dNTPs à la concentration de 350 µM, 1 µl de chacune des deux amorces - Forward (F) et Reverse (R) - à 10 µM, et 0,2 µl (soit 1U) de GoTaq® ADN polymérase (Promega™, Madison, WI) le tout dans un volume réactionnel de 25 µl complété avec de l'eau.

Tableau II - 2 : Liste des marqueurs eBSV utilisés, description des amorces et taille des séquences amplifiées (d'après Chabannes, Baurens *et al.*, 2013)

		Marqueurs	Amorces (F/R)	Taille amplicon (pb)
Espèce BSV	Type	Désignation	Séquence 5' – 3'	
eBSGFV-7	Jonction	VM1	F/ TTG-TCC-AAA-ATC-TGC-TCG-TG R/ TGT-AAT-TCC-TGC-TCC-TGC-AA	481
	Interne	VV3	F/ TTG-CCA-AGA-ATT-CCT-CCA-AG R/ AAG-TTC-TTG-TCG-GCA-AGG-TG	376
	Jonction	VM2	F/ TTC-TCC-CTT-TTC-GAT-CCG-TA R/ TTT-TGA-TGC-ATC-TCC-AGC-AG	374
eBSOLV-1	Jonction	Musa-OI jonction1 (16/17)	F/ TGC-ATT-AGA-TGG-TCT-GGG-AAA R/ ACT-TCA-CGA-TGC-CCA-TGT-TT	563
	Interne	Sig2 eBSOLV (29/30)	F/ CTT-GCT-CTG-TGG-GCA-AGA-CT R/ CCA-TTT-TTC-TCG-CAG-ATT-GTC	426
	Jonction	Musa-OI jonction2 (25/26)	F/ GAG-CTG-TTT-CCT-CCG-TGT-CT R/CCT-GGA-AGA-AAG-CAG-ACG-AG	590

Le programme PCR utilisé comprend : 1 cycle de 5 min à 94°C pour dénaturer l'ADN, puis 30 cycles comme suit : 30s à 94°C, 30s à 60°C et 35s à 72°C et un dernier cycle d'élongation finale de 10 min à 72°C.

II – 2 - 7. 2. Détection de l'activation des eBSVs chez les individus de la population

a - Les stress activateurs des eBSV

Pour aborder l'étude de l'activation des eBSV la population a été soumise à deux conditions de culture différentes connues pour favoriser le réveil de ces eBSV: le Stress Culture *in vitro* (CIV) (Dallot *et al.*, 2001 ; Côte *et al.*, 2010) et la culture en Serre (Lheureux, 2002). Au cours de cette thèse, les plantes ont été successivement repiquées en CIV 6 à 8 fois selon leur état et leur vigueur après le transfert des embryons sur Montpellier. Les échantillons de feuilles qui ont servi à définir le degré d'activation des eBSV suite au stress CIV ont été prélevés lors du transfert des plantes en serre. Pour les mesures en serre, des feuilles ont été prélevées cinq et neuf mois après le transfert des plantes. L'activation des eBSV est déterminée par la détection de particules virales BSV grâce à la technique d'IC-PCR DNase.

b - L'immuno-capture PCR DNase (IC-PCR DNase)

La technique d'immunocapture PCR permet la détection de particules virales libres. Cette technique combine deux approches : une sérologique et une moléculaire. L'approche sérologique consiste en une capture des particules virales d'un échantillon grâce à des anticorps spécifiques reconnaissant la protéine de capsid du virus (BSV). L'approche moléculaire consiste en l'amplification du génome viral de ces particules par PCR en utilisant des amorces spécifiques de chacune des deux espèces BSV étudiées au cours de ce travail. L'IC-PCR DNase est une variante de l'IC-PCR décrit par Le Provost *et al.* (2006) puisqu'on rajoute un traitement à la DNase pour éliminer l'ADN génomique résiduel de la plante. Ce traitement DNase permet d'éviter des « faux positifs » liés à l'amplification PCR des séquences BSV intégrées au génome de la plante.

Procédure IC-PCR DNase : Cinq cent milligrammes de feuille sont broyés dans 5 ml du tampon de broyage suivant [PVP 2% (w/v), Na₂SO₃ 0,2% (w/v), BSA 0,2% (w/v) dans du tampon phosphate salin avec du Tween 20 (PBS-T) 1x, pH 6,8] puis sont clarifiés par centrifugation à froid (4°C) 5 min à 7000 rpm. Vingt-cinq microlitres d'extrait de feuille ainsi

obtenus sont déposés dans des puits PCR prétraités (« coatés ») une nuit à 4°C avec 30 µl de sérum polyclonal anti BSV (AF 1660 ou 1659) dilué au 1/8000 dans du tampon carbonate (Na₂SO₃ 15 mM, NaHCO₃ 34 mM, qsp H₂O, pH 9,6) et rincé une fois au PBS-T 1x. L'ensemble est incubé 3 heures à température ambiante après centrifugation. Après cinq rinçages (3 au PBS-T 1x et 2 à l'H₂O ultra pure (H₂O milliQ)), 30 µl de mix DNase [3µl de tampon 10x (400 mM Tris-HCl pH 8 à 25°C, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂), -3U d'enzyme RQ1 RNase free DNase (PromegaTM, Madison, WI) et qsp 30 µl d'H₂O ultra pure (H₂O milliQ)] sont distribués dans chaque puits PCR. La plaque PCR contenant les échantillons est ensuite placée dans un incubateur à 37°C pendant 1h (digestion d'ADN génomique de plante). Le mix est éliminé par pipetage et les puits rincés à l'H₂O ultra pure (H₂O milliQ). Un traitement thermique de 10 min à 95°C est ensuite appliqué afin d'inactiver l'action de la DNase.

La PCR est réalisée par addition dans chaque puits du mix constitué de 2,5µl de tampon 10x (400 mM Tris-HCl pH 8 à 25°C, 100 mM MgSO₄, 10 mM CaCl₂), 0,75µl de MgCl₂ à 50mM, 1µl de dNTPs à 1 mM, 2U de Taq polymérase et 1 µl d'amorces Forward et Reverse de chaque espèce BSV à 10 µM. Le volume final est ramenée à 25µl avec l'H₂O ultra pure (H₂O milliQ). Les amorces sont spécifiques de chaque espèce BSV et sont décrites ci-dessous. Le programme PCR est le suivant : un cycle de 5 min à 94°C suivi de 30 cycles de 30s à 94°C, 30s à 58°C et 30s à 72°C et un dernier cycle de 10 min à 72°C. Les produits PCR sont visualisés sous lumière UV après migration en gel d'agarose à 1% (dans du TAE 1x) et coloration au BET. Les amorces utilisées pour l'étape de PCR sont présentées ci-dessous (Le Provost *et al.*, 2006).

Espèce Obino l'ewai

OL F/ ATC TGA AGG TGT GTT GAT CAA TGC

OL R/ GCT CAC TCC GCA TCT TAT CAG TC

Espèce Gold Finger

GF F/ ACG AAC TAT CAC GAC TTG TTC AAG C

GF R/ TCG GTG GAA TAG TCC TGA GTC TTC

II – 3 - Méthodes statistiques d'analyse des données

II – 3 - 1. Distribution des quantités d'ADN chez les descendants suite à l'analyse en cytométrie de flux

La distribution des quantités d'ADN contenues dans les noyaux des individus de la population a été testée par le test de normalité de Shapiro-Wilk et Kolmogorov-Smirnov à l'aide du logiciel statistique R.

II – 3 - 1. 1. Détermination de la distribution attendue des allèles et de la fréquence des gamètes en fonction de la constitution allélique du CRBP39 aux loci SSR

a – Distribution des allèles

Les SSR sont des marqueurs co-dominants. Ils permettent de détecter la présence simultanée de plusieurs allèles à un locus. En ce qui concerne le CRBP39, allotétraploïde de constitution génomique AAAB, le cas idéal est lorsque les quatre allèles visibles sont différents ($X_1X_2X_3X_4$). Pour de nombreux marqueurs SSR, 3 ou 2 allèles ont été observés chez CRBP39. Ceci signifie que les allèles ont la même taille sur au moins deux chromosomes ou bien qu'on est en présence d'un ou de deux allèles nuls (c'est-à-dire où on n'a pas d'amplification de cible sur un ou plusieurs chromosomes). Cette absence d'amplification peut s'expliquer par une variation chromosomique (mutation, insertion, délétion, translocation ou inversion) survenu dans la zone de fixation de l'amorce et empêchant le déroulement de la PCR à ce locus. On peut donc être en présence d'allèle(s) double(s), triple(s) ou d'allèle(s) nul(s). En prenant en compte tous les cas de figure possible, le **Tableau II-3** présente la distribution attendue des allèles dans la population en fonction du nombre d'allèles au locus chez CRBP39.

Notons que les allèles communs aux deux parents ont été éliminés au cours de nos analyses. En effet si un allèle présent chez CRBP39 est aussi présent chez le parent male Pahang-CARBAP, il n'est pas possible de déterminer sa ségrégation lors de la méiose de CRBP39 ; et ce indépendamment de sa configuration allélique chez le parent mâle (homozygote ou hétérozygote). En fonction de la ségrégation de chaque allèle au sein de la population (présence et absence de l'allèle), nous avons déterminé par un test de Khi2 sa dose chez CRBP39. L'allèle est considéré en simple dose chez CRBP39 si sa ségrégation est de type 1/1 (présence/absence) et en double dose chez CRBP39 si sa ségrégation est de type 5/6 : 1/6 (présence/absence).

Tableau II - 3 : Distribution attendue des allèles dans la population en fonction du nombre d'allèles visibles chez CRBP39

Nbre al. visibles	Génotypes	[X1]	[X2]	[X3]	[X4]	[X0]
4 allèles	X1/X2/X3/X4	1/2	1/2	1/2	1/2	-
3 allèles	X1/X1/X2/X3	5/6	1/2	1/2	-	-
	X1/X2/X2/X3	1/2	5/6	1/2	-	-
	X1/X2/X3/X3	1/2	1/2	5/6	-	-
	X1/X2/X3/X0	1/2	1/2	1/2	-	0
2 allèles	X1/X1/X2/X0	5/6	1/2	-	-	0
	X1/X2/X0/X0	1/2	1/2	-	-	1/6
	X1/X1/X1/X2	1	1/2	-	-	-
	X1/X1/X2/X2	5/6	5/6	-	-	-
1 allèle	X1/X1/X1/X1	1	-	-	-	-
	X1/X1/X1/X0	1	-	-	-	0
	X1/X1/X0/X0	5/6	-	-	-	1/6
	X1/X0/X0/X0	1/2	-	-	-	1/2

b - Fréquences gamétiques

Le CRBP39 est un hybride allotétraploïde de constitution génomique AAAB. En supposant que les trois génomes A soient différents, cette constitution génomique peut s'écrire $X_1/X_2/X_3/X_4$. Dans ce cas, une analyse théorique simple de la ségrégation des génomes de CRBP39 à la méiose selon l'hypothèse qu'il s'opère une ségrégation chromosomique de type tétrasomique (c'est-à-dire que les quatre génomes présents chez CRBP39 s'apparient de façon aléatoire – cf. paragraphe **I-3-2. Chapitre I**) donnerait naissance à six types de gamètes (X_1X_2 , X_1X_3 , X_1X_4 , X_2X_3 , X_2X_4 et X_3X_4) suivant le **Tableau II-4** des gamètes ci-contre.

En fonction de la constitution allélique du CRBP39 comme décrit au paragraphe **II-3-1-1.** ci-dessus (**Tableau II-3**), les fréquences des gamètes produits par CRBP39 à la méiose sont présentées au **Tableau II-5**.

Tableau II - 4 : Tableau des gamètes produits à la méiose chez CRBP39 suivant une recombinaison chromosomique de type tétrasomique sans double réduction.

		CRBP39			
		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
CRBP39	X ₁	-	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₁ X ₄
	X ₂	X ₁ X ₂	-	X ₂ X ₃	X ₂ X ₄
	X ₃	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	-	X ₃ X ₄
	X ₄	X ₁ X ₄	X ₂ X ₄	X ₃ X ₄	-

Tableau II-5 : Fréquences gamétiques attendues dans la population en fonction du nombre d'allèles observés chez CRBP39 suivant une ségrégation allélique de type tétrasomique sans double réduction.

Nbre al. visibles	Génotypes	Types de gamètes										
		X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₁ X ₄	X ₂ X ₃	X ₂ X ₄	X ₃ X ₄	X ₁ X ₀	X ₂ X ₀	X ₃ X ₀	X ₄ X ₀	X ₀ X ₀
4 allèles	X ₁ /X ₂ /X ₃ /X ₄	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6	-	-	-	-	-
3 allèles	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₃	1/3	1/3	-	1/6	-	-	1/6	-	-	-	-
	X ₁ /X ₂ /X ₂ /X ₃	1/3	1/6	-	1/3	-	-	-	1/6	-	-	-
	X ₁ /X ₂ /X ₃ /X ₃	1/6	1/3	-	1/3	-	-	-	-	1/6	-	-
	X ₁ /X ₂ /X ₃ /X ₀	1/6	1/6	-	1/6	-	-	1/6	1/6	1/6	-	-
2 allèles	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₀	1/3	-	-	-	-	-	1/2	1/6	-	-	-
	X ₁ /X ₂ /X ₀ /X ₀	1/6	-	-	-	-	-	1/3	1/3	-	-	1/6
	X ₁ /X ₁ /X ₁ /X ₂	1/2	-	-	-	-	-	1/2	-	-	-	-
	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₂	2/3	-	-	-	-	-	1/6	1/6	-	-	-
1 allèle	X ₁ /X ₁ /X ₁ /X ₁	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	X ₁ /X ₁ /X ₁ /X ₀	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
	X ₁ /X ₁ /X ₀ /X ₀	-	-	-	-	-	-	5/6	-	-	-	1/6
	X ₁ /X ₀ /X ₀ /X ₀	-	-	-	-	-	-	1/2	-	-	-	1/2

II – 3 - 2. Test Khi2 de distribution des allèles et des gamètes du CRBP39 à chaque loci SSR

A partir du fichier des résultats de génotypage de la population aux 38 loci SSR (**Annexe 3**), nous avons à chaque locus déterminé les effectifs de chaque allèle provenant de CRBP39 chez la population ainsi que les effectifs des différentes combinaisons de gamètes produits à la méiose par CRBP39. Les effectifs théoriques ont été calculés pour chaque configuration allélique possible du CRBP39 au locus en fonction de l'effectif total de la population (184 plantes) (voir **Tableau II-5**). Un test de Khi2 a été utilisé pour déterminer la constitution allélique correspondante pour chaque locus SSR chez CRBP39 en fonction de ces deux paramètres : la distribution attendue des allèles et les fréquences gamétiques de CRBP39 au locus.

Une méiose normale chez CRBP39 produit des gamètes à 2 allèles à tous les loci. Dans tous les cas de figures présentés au **Tableau II-5**, et dans le cas d'un locus à 4 allèles distincts, l'identification de trois allèles de CRBP39 chez un descendant à un locus suggère un mauvais déroulement de la méiose conduisant à des gamètes déséquilibrées : un gamète à 1 allèle et un gamète à 3 allèles au locus. De ce fait, les individus chez qui on observait 3 allèles de CRBP39 à un locus donné ont été éliminés de l'effectif pour les analyses.

II-3-3. Analyses des corrélations entre marqueurs SSR et l'infection par BSGFV ou BSOLV

Les coefficients de corrélations de Pearson et de Spearman ont été calculés entre la présence/absence des marqueurs SSR et l'infection par BSGFV ou BSOLV. Afin de tester la significativité statistique des associations entre les différents marqueurs et l'infection par BSGFV ou BSOLV, un test du khi-2 a ensuite été réalisé pour chaque marqueur, puis pour chaque couple de marqueurs. Dans les deux cas, une correction de Benjamini & Hochberg (Benjamini et Hochberg, 1995) pour tests multiples à été appliquée.

CHAPITRE III

**Etude de la ségrégation
des chromosomes B
dans un contexte
de croisement
AAAB x AA**

Préambule à l'article

La stratégie actuelle d'amélioration conventionnelle des plantains (AAB), (stratégie dite $3x/2x$) est basée sur l'exploitation de la fertilité résiduelle des cultivars triploïdes naturels en combinaison avec des accessions diploïdes fertiles. Cette stratégie implique deux générations de croisements. A l'issue du premier croisement, on sélectionne un hybride tétraploïde produit de la fusion d'un gamète non réduit en méiose 2 ($2n=3x$) du plantain à améliorer -parent femelle- et d'un gamète normal ($n=x$) du diploïde (AA, AB ou BB) -parent mâle- porteur des caractères recherchés. Un second croisement entre le tétraploïde et un autre diploïde aboutit à l'obtention de populations de triploïdes améliorés. La compréhension des possibilités d'appariement entre chromosomes A et B et du type de ségrégation des chromosomes issus du tétraploïde sont donc d'un grand intérêt pour les programmes d'amélioration. Cependant très peu de données existent à ce sujet. D'autre part, le génome B est porteur de séquences virales intégrées (eBSV) qui peuvent être réactivées et produire des particules virales infectieuses dans un contexte interspécifique. Il est donc important d'étudier la possibilité d'obtenir des descendants sans eBSV par le biais des recombinaisons chromosomiques.

L'objectif du travail présenté dans l'article qui suit a été de comprendre la ségrégation des chromosomes de *M. acuminata* (génome A) et *M. balbisiana* (génome B) à la méiose chez le tétraploïde CRBP39 (AAAB), et d'analyser la ségrégation des eBSV présents dans le génome B de cet allotétraploïde issu du programme d'amélioration bananier plantain du Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains (CARBAP). Pour cela nous avons produit une descendance de 184 individus issue du croisement CRBP39 (AAAB) x Pahang (AA) et nous l'avons analysée à l'aide de marqueurs de type microsatellite et de marqueurs PCR spécifiques des eBSV.

Article: Chromosome segregation and e-BSV elimination in offsprings from a *Musa* interspecific tetraploid AAAB

Noumbissié GB^{1,2,3}, Chabannes M³, Bakry F¹, Cardi C¹, Njembele J-C², Yohoume D², Ricci S^{1,2}, Tomekpe K^{1,2}, Iskra-Carwana M-L³, D'Hont A^{1*} and Baurens F-C¹

1. CIRAD, UMR AGAP, F-34098 MONTPELLIER, France

2. Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains (CARBAP)

Rue D'inde n°110, Bonanjo BP : 832 DOUALA - Cameroun

3. CIRAD, UMR BGPI, F-34098 MONTPELLIER, France

* Corresponding author:

Angélique D'Hont, CIRAD, UMR AGAP, Avenue Agropolis, TA A108-03, F-34398 Montpellier, France.

Phone: 33(0)4 67 61 59 27, Fax: 33(0)4 67 61 56 05

E-mail: angelique.dhont@cirad.fr

Abstract

Many banana cultivars (including Plantain) are triploid interspecific hybrids between *Musa acuminata* (genome A) and *Musa balbisiana* (genome B). Conventional banana breeding requires complex strategy due to triploidy and very low fertility of cultivars, an essential characteristic to produce edible fruit. Furthermore, the exploitation of *M. balbisiana* resources has been restricted due to the presence in its genome of endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSVs) that can, in interspecific genome context, spontaneously release infectious viral particles. We analyzed chromosomes and eBSVs segregation in a triploid progeny of 184 individuals from crosses between the tetraploid AAAB CRBP39 breeding accession and the Pahang diploid AA accession. More than 300 SSR spread over the *M. acuminata* reference sequence were tested to select multiallelic loci in which alleles from the B genome could tentatively be identified. Finally, 38 were analyzed on the progeny together with eBSV specific PCR markers. The results showed that i) the vast majority of the alleles are found in the expected frequency in the progeny with only 10% biased; ii) most of them followed a distribution compatible with a tetrasomic segregation and iii) interspecific intrachromosomal recombinations occurred for all the chromosome segments surveyed. However, in half of the offspring, we detected the transmission of one or three alleles from the tetraploid female parent CRBP39 instead of two for one or a few loci. This peculiar segregation, together with genetic mapping and marker correlations, suggested at least one structural variation between A and B genomes and more precisely that one B chromosome corresponds to part of chromosome 1A and part of chromosome 3A. The two infectious eBSVs present in CRBP39 are located on this B chromosome and appeared in a higher proportion (86%) than expected in the progeny. Interestingly, we showed that both eBSVs were absent from 24 offspring that represent promising material for breeding. These results proved that such breeding strategy is efficient to overcome eBSV constraint, and pave the way to the safe use of *M. balbisiana* genome in breeding programs.

Keys words: allopolyploidy, SSR genotyping, interspecific chromosomes recombination and segregation structural variation, endogenous banana streak virus, Plantain bananas

Introduction

Banana cultivars (including plantain) are derived from natural hybridization between wild/seedy diploid *Musa* species and subspecies. The main species involved are *Musa acuminata* (A genome, $2n=2x=22$) that is encountered in all banana cultivars, and *M. balbisiana* (B genome, $2n=2x=22$) in many of them (Simmonds and Shepherd, 1955). Intercrossing among species and subspecies may have led to the appearance of sterility, a character early selected by men in conjunction with parthenocarpy, thereby enabling the production of edible fruits. Most banana cultivars are triploids and some are diploids or tetraploids; the triploids level being considered as the most favorable for vigor, productivity, adaptability and fruit quality.

Nowadays, global banana production mainly relies on a few groups of highly related sterile triploid genotypes. The two first group of cultivar in term of production are the Cavendish group (dessert banana, AAA) that represents around 56% of the world production and almost all exported banana and the Plantain group (cooking banana, AAB) that represents around 18% of the world production and is mainly produced in West Africa and Central/South America. Pests and diseases have gradually become adapted to these clonal monocultures, representing an imminent danger for the global banana production.

There is thus an urgent need for a wider diversity of genetically improved cultivars with additional disease resistance sources and similar fruit quality. However, breeding is very complex due to the high level of sterility and triploidy of cultivars. Another difficulty, which has hampered the use of *M. balbisiana* (B genome) in breeding programs since the mid 1990, is the presence in the B genome of a few infectious endogenous viral sequences of banana streak viruses (eBSVs) that in interspecific genome context are able to produce BSV particles causing banana streak disease (BSD) (Gayral and Iskra-Caruana, 2009; Chabannes and Baurens *et al.*, 2013; Iskra-Caruana *et al.*, 2010).

The usual strategy to produce improved triploid banana cultivars exploits residual fertility of triploids and relies on two successive crosses. The first cross involves a triploid and a highly fertile diploid accession to produce tetraploid offsprings. In a second step, a selected tetraploid offspring is crossed with another diploid accession to produce triploid offspring from which improved cultivars may be selected (Tomekpe *et al.*, 2004). An alternative strategy, involving the tetraploidization of a diploid accession using colchicine prior to crossing with a diploid accession, has been proposed by Tezenas du Montcel *et al.* (1995). In

both approaches a tetraploid, originating from either *M. acuminata* (A) only or from a combination of *M. acuminata* (A) and *M. balbisiana* (B), is crossed with a diploid to produce triploid offsprings. Understanding chromosomes segregation and recombination during meiosis, in particular in case of inter-specific hybrids, is of a great interest to breeders because it determines the possibility of combining the agronomical attributes of both species (parthenocarp, fruit length and shape, biotic resistance from *M. acuminata*; good ratooning ability, strong root system, vigor, cold and drought resistance, biotic resistance from *M. balbisiana* (Thomas *et al.*, 1998 ; Jain *et al.*, 2009; Baurens *et al.*, 2010 ; Vanhove *et al.*, 2012). It is thus essential for Plantain breeding to understand chromosome pairing and segregation in interspecific tetraploid banana breeding accessions.

Chromosome pairing during meiosis in a tetraploid can occur randomly when any of the four hom(oe)ologous chromosomes pair with any one of the three other hom(oe)ologs to form bivalents, or in some cases quadrivalents/tetavalent. This is generally the case in autotetraploids and leads to tetrasomic inheritance (*e.g. Solanum tuberosum*: (Bradshaw *et al.*, 2008). Conversely, a chromosome may exclusively pairs to another single homolog leading to disomic inheritance, which is generally considered indicative of allotetraploidy (Ramsey & Schemske 2002; Soltis *et al.*, 1993). Many intermediate pairing situations exist between these two extremes (Stift *et al.* 2008; Jannoo *et al.* 2004; Li *et al.* 2012).

Although first studies on the meiosis of *Musa* species have been performed several decades ago, our knowledge of this crucial step in banana life cycle is still poorly understood. Generally, meiosis in wild/seedy diploids are considered as regular whereas in inter-specific (AB) or inter-subspecific (AA') diploid hybrids, pairing is altered as evidenced by cytogenetic studies (Dodds and Simmonds, 1948 ; Faure *et al.*, 1993; Shepherd, 1999; Jeridi *et al.* 2012), as well as genetic mapping studies (Hippolyte *et al.*, 2010; D'Hont *et al.*, 2012). These analyses suggested that *M. acuminata* subspecies differed in their chromosome structure resulting in disturbed meiosis in the hybrids and contributing to their sterility (Dodds and Simmonds, 1948; Shepherd, 1999; Jeridi *et al.*, 2012). In allotriploid AAB, and ABB hybrids, both cytogenetic (Jeridi *et al.* , 2012) and SSR (Crouch *et al.* 1998) based analysis also evidenced disturbed meiosis together with frequent interspecific recombination. In an allotetraploid (AABB), a mixed disomic and polysomic inheritance have been suggested based on statistical analysis of pairing configuration analysis and Genome In Situ Hybridization (Jeridi *et al.*, 2012).

Chapitre III -Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAABxAA

The objective of the present study was to analyze chromosome pairing and segregation in an allo3+1tetraploid (AAAB) Plantain breeding accession (CRBP39) and to analyze the segregation of two infectious eBSVs present in this accession. For this purpose, we developed a progeny from crosses between CRBP39 (AAAB) and Pahang (AA) and analysed it with Single Sequence Repeat (SSR) markers and eBSV specific PCR markers.

Materials and methods

Plant material and DNA extraction

A population of 184 hybrids from crosses between a allo3+1tetraploid AAAB female parent, CRBP39 (ITC1344) and the wild natural AA diploid male parent, Pahang-CARBAP, (*M. acuminata* spp. *malaccensis*, MGIS code NY09) was produced at CARBAP (Centre Africain de Recherches sur Bananiers et Plantains, Cameroun) with a step of embryo rescue (Bakry, 2008) to maximize recovery of all viable progeny. Due to the low female fertility observed in CRBP39, this large population was obtained by mixing seeds produced in 14 bunches (14 female flowers of CRBP39 hybridized with pollen of five plants of Pahang-CARBAP). The identity of the various plants that contribute as parent to this progeny was confirmed using 12 SSR loci (data not shown). Leaves from the parents of CRBP39 (French Clair-AAB cultivated plantain/ITC1185-NY0201 ♀ parent and M53-AA hybrid/NY0105, ♂ parent) as well as four accessions of *M. balbisiana* (Cameroun ITC0246, Honduras ITC0247, Lal Velchi ITC1588 and Pisang Klutuk Wulung (PKW) ITC1587) were obtained from the CRB-CIRAD collection in Guadeloupe. DNAs from all these accessions were extracted from 3g of leaf material ground in liquid nitrogen following the modified CTAB/MATAB method (Gawel and Jarret, 1991). We noticed during our analysis that the male parent of the studied progeny, Pahang-CARBAP was genetically different from Pahang (ITC0609), which was the parent of the doubled-haploid that was used to produce the reference *M. acuminata* genome sequence (D'Hont *et al* 2012). These two accessions are genetically very close but not identical: among 141 SSR markers that were found heterozygous in Pahang (ITC609) according to D'Hont *et al* (2012), 91 loci (65%) were homozygous in Pahang-CARBAP. However, globally 93% of alleles recorded in Pahang-CARBAP were also recorded in Pahang (ITC0609).

Nuclear DNA content

The nuclear DNA content of the progenies (*i.e.* 184 plants) and the two parents was assessed by flow cytometry. A leaf sample of each plant was chopped together with leaf tissue

Chapitre III -Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAABxAA

of *Oryza sativa* L. ssp *japonica* (cv Nipponbare as an internal reference ($2n=2x=24$, haploid genome size = 430Mb). Nuclei extraction was performed in a modified LB01 buffer (Dolezel et al. 1989) in which mercaptoethanol was substituted by Na_2SO_3 (40 mM and 50ppm of propidium iodide (IP) was added to stain nuclei. Analyses were performed with a PAS II flow cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) coupled with a laser lamp for IP excitation as described by Dolezel and Bartos (2005).

eBSV analysis

PCR and dCAPS markers as described in Chabannes, Baurens, *et al.* (2013) were used to detect the presence of three endogenous Banana streak virus species Obino l'Ewai (eBSOLV), Goldfinger (eBSGFV) and Imove (eBSImV). The different molecular markers used to trace each eBSV allele (eBSOLV-1 or eBSGFV-7) gave identical results when analyzed on the whole population (184 individuals). We therefore considered each eBSV as a single marker named eBSOLV and eBSGFV for all genetic analyses.

SSR marker selection and genotyping

A total of 336 SSR loci spread over the eleven *M. acuminata* chromosomes based on the DH-Pahang reference genome sequence (Lagoda *et al.*, 1998 ; Hippolyte *et al.*, 2010 ; D'Hont *et al.*, 2012) were tested on the parent of the progeny and 38 of them (Supplementary Figure 1 and primers listed in **Supplementary Table 1**) were analyzed on the whole progeny using the protocol described by Christelová *et al.* (2011). The genotyping was carried out using the Applied Biosystems® 3500xL Genetic Analyzer and GeneMapper v4.1 software (Applied Biosystems; www.appliedbiosystems.com). Automated scoring of the data was corrected by manual check.

Segregation analysis

Distributions of CRBP39 alleles in the progeny were tested for significant deviation from expected 1:1 and 1:5 Mendelian segregation ratios (**Supplementary Table 3**) using a χ^2 test. A gametic distribution under a tetrasomic model of segregation (Table 2) was assessed using a χ^2 test to identify significant deviations of tested distributions from expected distributions. Based on the number of scored alleles for each SSR locus and the distribution of alleles and gamete in the progeny, the CRBP39 genotype was determined.

Genetic mapping and correlation analysis.

Genotyping data generated on 184 individuals with 38 SSR markers and two eBSV specific PCR markers were coded as presence/absence and treated as F2 using mapmaker® 3.0 program. Cosegregation groups (CG) were built at LOD = 5 with maximum distance between two markers of 38cM. Final map construction was performed with 107 markers using Haldane's mapping function. Pairwise Pearson's correlation coefficients were calculated using Darwin program (<http://darwin.cirad.fr/>).

Results

Characterization of progeny ploidy level by flow cytometry.

A population of 184 individuals involving the allo3+1tetraploid female parent CRBP39 (genome AAAB) and the diploid male parent Pahang-CARBAP (genome AA) was produced. Flow cytometry analyses estimated the nuclear DNA content to 2.338pg +/- 0.238 for CRBP39 (2n=44) and 1.181pg +/- 0.145 for Pahang-CARBAP (2n=22). For the 184 hybrids the values ranged from 1.634pg to 2.034pg with an average of 1.801pg, which is close to the median between the two parents (1.759). This indicated that the progenies had a global 3x ploidy level with potentially some small variations in the chromosome number among offsprings (**Supplementary table 2**).

Selection of SSR markers and genotyping of the progeny

A total of 336 SSR loci spread over the eleven chromosomes of the *M. acuminata* reference genome sequence (D'Hont *et al.*, 2012) were analyzed on 8 *Musa* accessions: the parents of the progeny (CRBP39, AAAB and Pahang-CARBAP, AA), the parents of CRBP39 (French Clair, AAB and M53, AA) and four *Musa balbisiana* accessions (BB), representing the diversity currently accessible for this species (Cameroun, Honduras, Lal Velchi and PKW) (Gayral and Iskra-Caruana, 2009; Gayral *et al.*, 2010). Loci were selected mainly based on their ability to detect a maximum of alleles in CRBP39 and French Clair, and to identify the alleles originating from the B genome. An allele was tentatively considered as originating from the B genome if it was present in CRBP39 (AAAB), French Clair (AAB) and at least in one accession of the four *M. balbisiana* (BB) but absent in M53 (AA) and Pahang-CARBAP (AA). A second step of selection was performed with the two parents (CRBP39 and Pahang CARBAP) and 14 offsprings to select loci that produced easily scorable

Table 1: Number, origin, and segregation behavior of alleles from 38 SSR and 2 eBSV loci in the tetraploid breeding accession CRBP39

	Locus name	Nb	CRBP39 Alleles		Allelic configuration	p-value (All. Segr.)	p-value (Gam. Segr.)	Locus segregation
			Transmitted by M 53	Transmitted by French Clair				
	mMaCIR1620	1	273		X ₁ /X ₀ /X ₀ /X ₀	0.819	0.819	polysomic
	mMaCIR2094	3	269	275 283	X ₁ /X ₂ /X ₃ /X ₀	0.287	0.156	polysomic
	mMaCIR0007	4	162	155 157 169	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₄	0.345	0.156	polysomic
	mMaCIR1324	4	275	266 274 287	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₄	0.654	0.111	polysomic
LG01	mMaCIR0172	2	259	269	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₀	0.307	0.057	polysomic
	mMaCIR1052	4	301	267 287 303	X ₁ ^b /X ₂ /X ₃ /X ₄	0.010	0.004	biased
	mMaCir0180	2	250	242	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₀	0.285	0.260	polysomic
	eBSOLV	1 ⁺						
	eBSGFV	1 ⁺						
	mMaCIR1390	3	294	284 287	X ₁ /X ₁ /X ₂ ^b /X ₃	0.712	0.000	biased
	mMaCIR1016	2	222	234	X ₁ /X ₂ /X ₂ /X ₂	0.405	0.974	polysomic
LG02	mMaCir0360	3	206	188 210	X ₁ /X ₂ ^b /X ₂ ^b /X ₃	0.286	0.001	biased
	mMaCIR1572	3	185	195 209	X ₁ /X ₂ /X ₂ /X ₃	0.592	0.000	biased
	mMaCIR2016	3	128	146 172	X ₁ /X ₂ /X ₃ ^b /X ₃ ^b	0.539	0.000	biased
	mMaCIR1641	3	253	246 249	X ₁ /X ₁ /X ₂ ^b /X ₃	0.559	0.254	polysomic
LG03	mMaCIR1474	4	217*	202 213 223	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₀ ⁺	0.571	0.027	polysomic
	mMaCIR1658	3	198	194 209	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₃	0.578	0.309	polysomic
	mMaCIR1234	3	266	247 302	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₀	0.511	0.164	polysomic
	mMaCIR1338	3	278*	249 276	X ₁ /X ₁ /X ₂ ^b /X ₀ ⁺	0.288	0.078	polysomic
	mMaCIR1306	3	177	174 188	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₃	0.095	0.047	polysomic
LG04	mMaCIR0411	3	285	255 265	X ₁ /X ₁ /X ₂ ^b /X ₃	0.226	0.180	polysomic
	mMaCIR1554	3	221	200 229	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₃	0.076	0.005	biased
	mMaCIR1185	3	288	289 294*	X ₁ /X ₂ /X ₀ /X ₀ ⁺	0.022	0.000	biased
LG05	mMaCIR1609	3	257	250	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₀	0.473	0.427	polysomic
	mMaCIR0017	3	139	157 163	X ₁ /X ₂ /X ₃ ^b /X ₀	0.328	0.653	polysomic
	mMaCIR1131	3	102	110 121	X ₁ /X ₂ /X ₃ /X ₃	0.679	0.538	polysomic
LG06	mMaCIR1395	3	303	290 325	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₃	0.588	0.341	polysomic
	mMaCIR0120	3	148	144 146	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₀	0.043	0.057	polysomic
LG07	mMaCIR2927	2	273	276	X ₁ /X ₂ /X ₀ /X ₀	0.277	0.000	biased
	mMaCIR1733	3	209	205 220	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₃	0.060	0.006	biased
LG08	mMaCIR1602	3	288	283 292	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₃	0.329	0.188	polysomic
	mMaCIR0388	3	210	203* 209	X ₁ ^b /X ₂ /X ₀ /X ₀ ⁺	0.312	0.000	biased
	mMaCIR1026	4	286	289 292 295	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₄	0.371	0.433	polysomic
LG09	mMaCIR1520	3	268*	256 285	X ₁ ^b /X ₂ /X ₂ /X ₀ ⁺	0.401	0.385	polysomic
	mMaCIR1994	3	256	253 273	X ₁ ^b /X ₂ /X ₃ /X ₃	0.630	0.000	polysomic
	mMaCIR1209	3	281*	268 284	X ₁ ^b /X ₁ ^b /X ₂ /X ₀ ⁺	0.087	0.231	polysomic
LG10	mMaCIR0273	4	206	200 210 218	X ₁ /X ₂ /X ₃ /X ₄ ^b	0.063	0.035	polysomic
	mMaCIR1429	3	172	168 176	X ₁ /X ₁ /X ₂ /X ₃	0.633	0.624	polysomic
LG11	mMaCIR1917	2	236	256	X ₁ /X ₂ ^b /X ₂ ^b /X ₀	0.460	0.144	polysomic
	mMaCIR1670	2	194	226	X ₁ /X ₂ ^b /X ₀ /X ₀	0.374	0.127	polysomic

Locus Name are those of the SSR loci; LG: Linkage group (location on *M. acuminata* reference map); Nb Number of alleles; CRBP39 allele are indicated by their size in bp; CRBP39's alleles are classified according to parental origin (M53 and French Clair), alleles in bold are those tentatively assigned to the B genome, alleles marked with an asterisks indicate to the presence of the same allele in Pahang-CARBAP (the male parent of the progeny) that prevent segregation analysis for this particular allele. Allelic configuration p value of the χ^2 testing the segregation of all alleles of the given locus in the progeny (All. Segr.) and all possible gamete formation assuming polysomic pairing.(Gam. Segr.).

Table 2: Aneuploid gamete transmission in CRBP39

	Locus	Allele N°	Allelic configuration	Number of plant from aneuploid gamete in the whole progeny (184)	
				3 alleles	Single allele
LG01	CIR0007	4	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₄	43	9
	CIR1324	4	X ₁ /X ₂ ^b /X ₃ /X ₄	40	10
	CIR1052	4	X ₁ ^b /X ₂ /X ₃ /X ₄	19	20
	CIR2094	3	X ₁ /X ₂ /X ₃ /X ₀	0	n/a
LG02	CIR1572	3	X ₁ / X ₂ / X ₂ / X ₃	1	4
	CIR2016	3	X ₁ / X ₂ / X ₃ ^b / X ₃ ^b	2	9
	CIR0360	3	X ₁ /X ₂ ^b /X ₂ ^b /X ₃	2	2
	CIR1390	3	X ₁ / X ₁ / X ₂ ^b / X ₃	1	4
LG03	CIR1234	3	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₀	0	n/a
	CIR1474	3	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₀	1	n/a
	CIR1641	3	X ₁ /X ₁ / X ₂ ^b / X ₃	2	9
	CIR1658	3	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₃	3	6
LG04	CIR1306	3	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₃	1	3
	CIR1554	3	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₃	1	4
	CIR0411	3	X ₁ /X ₁ / X ₂ ^b / X ₃	1	5
	CIR1185	3	X ₁ / X ₂ / X ₃ / X ₀	8	3
LG05	CIR0017	3	X ₁ / X ₂ / X ₃ ^b / X ₀	2	n/a
LG06	CIR0120	3	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₀	1	n/a
	CIR1131	3	X ₁ / X ₂ / X ₃ / X ₃	1	4
	CIR1395	3	X ₁ /X ₂ ^b / X ₃ / X ₃	1	3
LG08	CIR1026	4	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₄	0	6
	CIR1602	3	X ₁ / X ₂ ^b / X ₃ / X ₃	0	3
	CIR1733	3	X ₁ / X ₁ / X ₂ / X ₃	0	1
LG09	CIR1994	3	X ₁ ^b / X ₂ / X ₃ / X ₃	0	4
LG10	CIR0273	4	X ₁ / X ₂ / X ₃ / X ₄ ^b	3	14
	CIR1429	3	X ₁ / X ₁ / X ₂ / X ₃	1	6

LG = Linkage group (from *M. acuminata* reference map); n/a = not applicable

segregation pattern in the progeny. Finally, 38 SSR loci were selected (**Table 1**). The B alleles were tentatively identified for 26 of these loci including two loci (mMaCIR1234 and mMaCIR2016), for which the identification of the B alleles were based only on their size proximity with the alleles of the four *M. balbisiana* accessions. Six, 25 and 6 loci displayed four, three, and two distinct alleles in CRBP39 respectively. One locus displayed a unique allele. The distribution of the selected SSR loci on the chromosomes of the *M. acuminata* DH-Pahang reference genome sequence is indicated in **Table 1** (and **supplementary Figure 1**).

SSR allele segregation in the progeny

The 184 progenies were genotyped with the 38 selected SSR loci representing a total of 105 CRBP39 SSR alleles (**Table 2**). A total of 76 SSR alleles (72%) presented an expected 1:1 Mendelian ratio in the progeny and 29 alleles (28%) significantly deviated from this ratio ($p < 0.01$, **Table 2**). Among those 29 alleles, 18 had a frequency that fitted a 1:5 ratio suggesting double dose alleles. The distribution of the 11 remaining alleles (6%) in the progeny was considered as resulting from biased segregation. Among the progeny, we noticed that some individuals displayed loci with three or one alleles respectively from the maternal tetraploid parent CRBP39. This phenomenon involved mainly four of the 38 SSR loci studied (**Table 2**) and involved 91 individuals of the offsprings (50%). Transmission of aneuploid gametes from the paternal parent Pahang-CARBAP (AA) was not detected in the progeny. Transmission of one or three alleles from CRBP39 was detectable only with SSR loci displaying four or three alleles in CRBP39, and only loci displaying four alleles in CRBP39 were fully informative. Only five SSR loci displayed four loci in our study: three from chromosome 1, one from chromosome 8 and one from chromosome 10. The extent of aneuploid gamete transmission from CRBP39 in the progeny is thus most probably underestimated.

Most of the observed cases of three-CRBP39 allele's transmission involved chromosome class 1 with 48 individuals (87% of the cases accounting for 26% of the whole progeny). The fully informative SSR loci from chromosome 1 (mMaCIR0007, mMaCIR1324 and mMaCIR1052) revealed respectively 43, 40 and 19 individuals with three CRBP39 alleles. Thirteen individuals displayed three CRBP39 alleles for all three SSR loci, 28 individuals displayed three CRBP39 alleles for two SSR loci (1 individual with mMaCIR0007 and mMaCIR1052 and 27 individuals with mMaCIR0007 and mMaCIR1324) and seven individuals displayed three CRBP39 alleles for a single SSR locus (1 with mMaCIR0007, and

6 with mMaCIR1052). Three-CRBP39 alleles transmission was also detected at low frequency with loci belonging to other chromosomes for 15 individuals (chromosome 2, 3, 4, 5, 6 and 10 are concerned) with six individuals showing three CRBP39 alleles for SSR loci belonging to two different chromosomes. Regarding the cases of single-CRBP39 allele transmission, 43 individuals displayed loci with only one CRBP39 allele, 32 individual missed alleles from a single chromosome and 11 individuals missed alleles for more than one chromosome (**Table 3**). Most of the observed cases of single-CRBP39 allele transmission involved chromosome class 1, with 30 individuals involved from which 9, 10 and 20 individuals involved mMaCIR0007, mMaCIR1324 and mMaCIR1052, respectively. One individual displayed single-CRBP39 allele transmission for the three SSR loci, 7 individuals displayed single-CRBP39 allele transmission for two markers (6 for mMaCIR0007 and mMaCIR1324 and one for mMaCIR1324 and mMaCIR1052). Twenty-two individuals showed single-CRBP39 allele transmission with one loci of chromosome 1 (2 for mMaCIR0007, 2 for mMaCIR1324 and 18 for mMaCIR1052). Single-CRBP39 allele transmission was also detected with loci belonging to chromosome 8 (6 individuals) and chromosome 10 (14 individuals). Six individuals showed single-CRBP39 allele transmission for loci belonging to two or more chromosomes.

Interestingly, considering only fully informative SSR loci, we noticed that some alleles were always present (mMaCIR0007_169, mMaCIR1324_287 from chromosome 1, and mMaCIR0273_218 from chromosome 10) or at very high frequency (mMaCIR1052_303 for loci from chromosome 1) when three CRBP39 alleles were transmitted (Table 3). In addition, some of them were totally absent (mMaCIR0007_169 and mMaCIR1324_287 from chromosome class 1 or at low frequency (mMaCIR1052_303 from chromosome 1 and mMaCIR0273_218 from chromosome 10) when single-CRBP39 allele were transmitted.

Transmission of aneuploid gamete may impact the distribution of alleles in the progeny. Allele distribution was thus re-analyzed for each chromosome after removing individuals resulting from aneuploid gamete. In these conditions, the number of alleles with a distorted frequency in the progeny compared to the expected distribution for single dose or double dose alleles ($p < 0.01$, **Supplementary Table 2**) decreased only from 11 to 9.

Finally, for each locus, the segregation was assessed by testing the distribution of gamete in the progeny under a tetrasomic model of segregation excluding individuals resulting from aneuploid maternal gamete transmission. Among the 38 SSR loci, 27 loci (71%) segregated without gametic distortion indicating tetrasomic segregation. The eleven

Table 3: Allelic composition of aneuploidy maternal gametes

	3 alleles gamete		Single allele gamete	
	Nb	% in gamete	Nb	% in gamete
mMaCIR0007_155	35	81%	4	44%
mMaCIR0007_157b	25	58%	2	22%
mMaCIR0007_162	27	63%	3	33%
mMaCIR0007_169	43	100%	0	0%
<i>Total mMaCIR0007</i>	<i>43</i>		<i>9</i>	
mMaCIR1324_266b	21	53%	3	30%
mMaCIR1324_274	30	75%	5	50%
mMaCIR1324_275	29	73%	2	20%
mMaCIR1324_287	40	100%	0	0%
<i>Total mMaCIR1324</i>	<i>40</i>		<i>10</i>	
mMaCIR1052_267b	17	90%	9	45%
mMaCIR1052_287	15	79%	9	45%
mMaCIR1052_301	8	42%	0	0%
mMaCIR1052_303	17	90%	2	10%
<i>Total mMaCIR1052</i>	<i>19</i>		<i>20</i>	
mMaCIR1026_286	0	-	3	50%
mMaCIR1026_289	0	-	2	33%
mMaCIR1026_292	0	-	1	17%
mMaCIR1026_295b	0	-	0	0%
<i>Total mMaCIR1026</i>	<i>0</i>	<i>-</i>	<i>6</i>	
mMaCIR0273_200	2	67%	5	36%
mMaCIR0273_206	2	67%	4	29%
mMaCIR0273_210b	2	67%	4	29%
mMaCIR0273_218	3	100%	1	7%
<i>Total mMaCIR0273</i>	<i>3</i>		<i>14</i>	

remaining loci are scattered along the genome and may represented local bias in the segregation (**Table 1**).

Genetic linkage analysis in CRBP39

A genetic map was build based on the segregation of the 107 markers (105 SSR and two eBSV markers) in the 184 individuals of the progeny. At LOD 4, twelve markers originating from distinct chromosome classes according to the *M. acuminata* reference genome sequence (chr 1, chr 3, chr 4 and chr 8) remained associated in a single Linkage Group (LG). This group was composed of Cosegregation Group CG3-1 (all three markers), CG4-1 (all four markers), three markers of CG 1-3 and two unlinked markers (from chromosome class 1 and 8). At LOD 5 all CGs were made up of markers originating from the same *Musa acuminata* chromosome class, resulting in 27 CG (82 markers) and 25 unlinked markers. Linkage groups (LG) corresponding to chromosome classes were built manually using common SSR loci. Finally, linkage analysis resulted in 27 CG containing 82 markers (**Figure1**).

Four CGs, representing four haplotypes, were obtained for chromosome 1 and 3. Between one and three haplotypes with up to three CGs were obtained for the other chromosomes classes. CRBP39 alleles derived from its parent M53 (AA) were always linked in CGs as expected. Alleles tentatively assigned to the B chromosome assembled in the same CGs (7 CGs), to the exception of two markers from chromosome 1. The most parsimonious interpretation is that these alleles were wrongly assigned to the B genome, we thus reassigned alleles mMaCIR0007_157, mMaCIR1324_266 to the A genome and mMaCIR0007_169 and mMaCIR1324_287 to the B genome.

In several cases, although the set of data was small, it was possible to compare the genetic distances between loci in the different CGs (dashed lines in Figure1). Small variations in genetic distance were observed between the *M. acuminata* CGs except for some skewed markers for which these variations were more important. When comparing *M. acuminata* and *M. balbisiana* CGs the genetic distances were smaller in *M. balbisiana* CGs compare to the *M. acuminata* CGs for five chromosome classes (chr 1, chr 2, chr 3, chr 4 and chr 9) and the distance appeared similar for two chromosomes (chr 6 and chr 8).

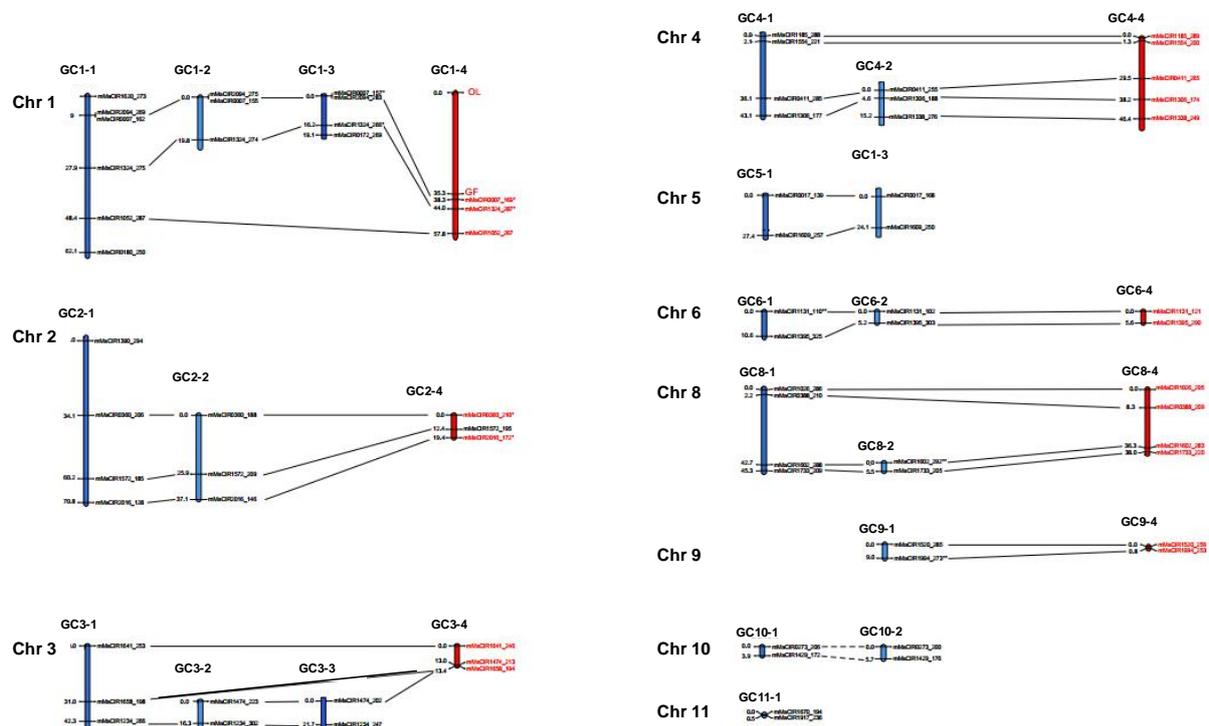


Figure 1: Genetic map of the tetraploid breeding accession CRBP39

Linkage groups (LG) according to *Musa acuminata* reference map are indicated on the left of each cosegregation groups (CG). Marker names (mMaCIRxxx for SSR, OL and GF for eBSOLV and eBSGFV respectively) are indicated on the right whereas genetic distances are on the left (cM, Haldane mapping function). Markers labeled with asterisks showed distorted segregation. Alleles from the same loci are connected with lines, Alleles tentatively assigned to the B genome are indicated in green color. Alleles from the M53 parent of CRBP39 are indicated in blue color.

Correlation between markers from different chromosomes.

Marker correlations were calculated for all pairs of alleles present in single dose in CRBP39 with data from all 184 individuals (**Supplementary Figure 2**). Positive correlations between alleles were observed for alleles belonging to the same CG, with intensity reflecting the genetic distance, and negative correlations were observed between alleles of CG belonging to the same LG, as expected. Interestingly, additional correlations were observed between markers from different chromosome classes particularly between several alleles of chromosomes class 1 and 3 (**Figure 2**). Alleles of CG1.4 (genome B) and CG3.4 (genome B) were positively correlated (0.14 to 0.32 Pearson's correlation coefficient). Alleles of CG1.2 (genome A) were positively correlated with two alleles of CG3.1 (genome A) (0.08 to 0.27 Pearson's correlation coefficient) and two alleles of CG4.1 (genome A) (0.18 to 0.25 Pearson's correlation coefficient). Alleles of CG1.4 (genome B) showed negative correlation with alleles of CG1.1, CG1.2 and CG1.3 (genome A) and interestingly with alleles of CG3-1 (genome A).

eBSV allele segregation in the progeny

The parents of the progeny were genotyped with eBSV markers corresponding to the three infectious BSV species known to be integrated in the B genome: BSV Obino l'Ewai species - BSOLV, BSV Goldfinger species - BSGFV, BSV Imové species – BSIMV (Gayral *et al.*, 2008; Chabannes and Baurens *et al.*, 2013). None of them was identified in Pahang-CARBAP as expected because eBSV have never been reported in *M. acuminata* genomes so far (Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). This is also in agreement with the *in silico* analysis performed on the reference DH-Pahang (*M. acuminata malaccensis*) genome where no eBSV was detected (D'Hont *et al.*, 2012). BSOLV and BSGFV were detected as integrated in CRBP39 genome but not of BSIMV. The alleles present in CRBP39 were eBSOLV-1 and eBSGFV-7 known as infectious alleles (Chabannes, Baurens, *et al.*, 2013). In the progeny, 120 of the offsprings (65%) had both eBSVs (eBSOLV-1/eBSGFV-7), 24 (13%) were eBSV-free and 22% had either eBSOLV-1 (3%) or eBSGFV-7 (19%).

Both eBSV alleles segregated with a biased ratio compare to 1:1 ratio, the bias appeared much more important for eBSGFV. Both eBSVs are associated on the genetic map with CG1.4 that corresponds to genome B, CG of chromosome class 1 (**Figure1**). However, due to this biased segregation, their position compare to other markers was not clear. The two eBSVs were, as other markers from the CG1.4, over-represented in aneuploid gametes that

Figure 2 : Pearson's correlation between single dose markers of chromosome class 1 and 3

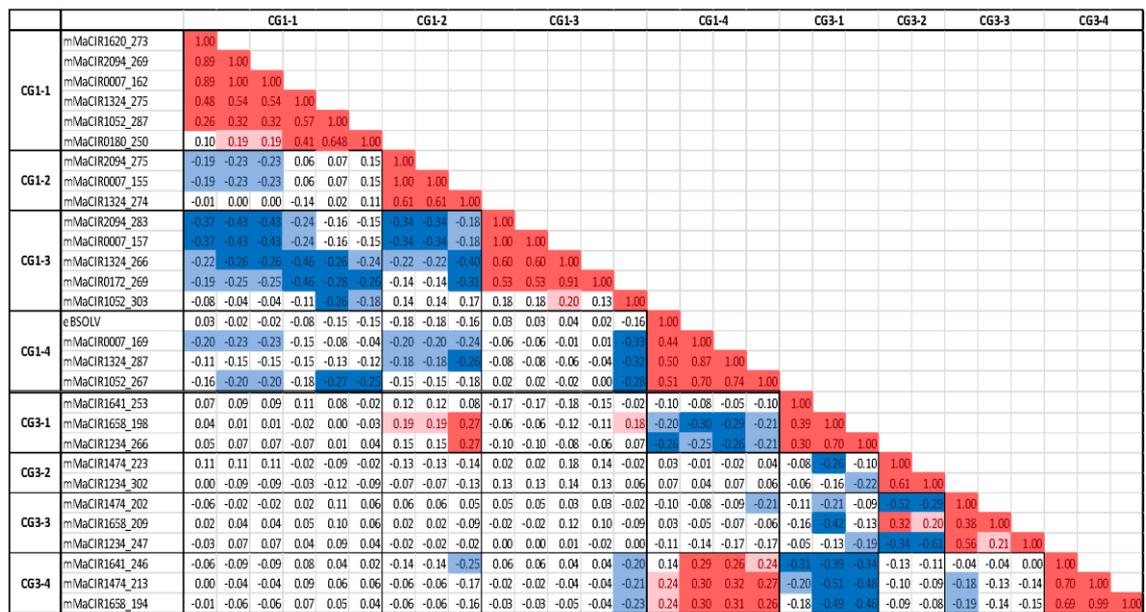


Figure 2: Pearson's correlation between single dose markers of chromosome class 1 and 3.

Cosegregation groups (CG) and marker names are indicated on the left. Pairwise Pearson's coefficient between markers are indicated. Blue color indicates negative correlation, red color indicates positive correlation with intensity reflecting absolute value of the correlation.

transmitted three CRBP39 alleles to the progeny (68% for eBSOLV and 84% for eBSGFV) instead of two.

Discussion

The tetraploid accession CRBP39 (AAAB), analyzed in this study, is a breeding accession from the CARBAP Plantain breeding program that resulted from crossing the triploid Plantain cultivar French Clair (AAB) and the diploid M53 (AA synthetic hybrid). CRBP39 was crossed with the wild diploid Pahang (AA) to produce the studied progeny made of 184 individuals.

In *Musa*, 4x-2x crosses produce predominantly triploid progeny (Oselebe *et al.*, 2006; Jeridi *et al.*, 2012). Accordingly, we showed by flow cytometry that our progeny is triploid with however potentially some small variations in the chromosome number among offsprings.

The frequency of most SSR alleles in the progeny had an expected Mendelian ratio (1:1 for single dose alleles (72%) and 1:5 for double dose (18%). Only 11 alleles scattered on various LG (10%) had a biased/skewed distribution. In addition, most of the alleles followed a tetrasomic segregation and we showed that recombination between *M. acuminata* (genome A) et *M. balbisiana* (genome B) chromosomes occurred for all the classes of chromosomes segments that we were able to surveyed. The possibility of chromosome pairing between A and B chromosome has been suggested for long from classical cytogenetic studies and was recently demonstrated by Genomic In Situ Hybridisation (Jeridi *et al.*, 2011, Jeridi *et al.*, 2012). In addition, it has been suggested based on statistical analysis of pairing configuration in the Kunnan AABB tetraploid that the different classes of chromosomes have different ability to pair between the A and B genome (Jeridi *et al.*, 2012). Here, we showed that recombination rate within A chromosomes and between A and B chromosomes is similar for two of chromosome segment classes we surveyed (LG6 and LG8) but lower for five of chromosome segment classes (LG1, LG2, LG3, LG4, and LG9). However, a denser genotyping of the population would be necessary to allow a finer global assessment of chromosomes recombination rate.

Interestingly, in 50 % of the offspring, we detected for one or a few loci the transmission of one or three alleles from the tetraploid female parent instead of two. This proportion of aneuploid gametes transmission is most probably underestimated since only a small part of the SSR loci were fully informative, *i.e.* were able to discriminate four alleles. In

addition, although most of the analyzed alleles segregated as expected from their distribution in chromosome classes that was based on the A genome, several particular situations were observed. A few markers belonging to different chromosome classes in the A genome were found associated in the correlation analysis and require high LOD to split in different LG. In addition, we observed that the aneuploid gametes transmitted to the progeny had particular allelic constitution.

Due to the low number of markers used in this study a global interpretation of these results is difficult. However, the case of chromosomes 1 and 3 that were best covered with SSR loci, displayed the largest number of alleles and for which these peculiarities were particularly evident, allowed deeper analysis.

The first observation was the important number of aneuploid gametes involving chromosome 1 and the fact that alleles from *M. balbisiana* CG were always (or very often) involved in the cases of three-CRBP39 allele transmission and conversely were generally absent (or at low frequency) in the case of one CRBP39 allele transmission (Table 3). This suggested that *M. balbisiana* CG were involved in these aneuploid gametes. One interpretation could be that this *M. balbisiana* CG is involved in multivalent, leading to un-symmetrical distribution of alleles. In addition, markers from chromosome class 1 and chromosome class 3 remained linked at LOD4 in genetic linkage and correlations were observed between markers of these two chromosome classes. Positive correlations were observed between CG1-4 and CG3-4 and to a lower intensity between CG3-1 and CG1-2. Conversely, negative correlations were observed between alleles of CG1.4 and CG3.1, potentially indicating pairing between CG1-4 and CG3-1. In addition, negative correlation of various intensity were observed within chromosome class 1 and within chromosome class 3 (**Figure 2**).

All these data suggested the presence of structural variations between A and B genomes and more precisely that one chromosome of *M. balbisiana* (B genome) correspond to part of chromosome 1 and part of chromosome 3 of *M. acuminata* (A genome). One consequence is the formation of multivalents, at least trivalents, involving CG1.4 from the B genome, one of the CG1 (CG1.1/2/3) from the A genome and one of the CG3 (CG3.1/2/3) from the A genome that led to cases of un-symmetrical distribution of alleles.

The importance of interspecific A/B chromosomes recombination and aneuploid gametes transmission raise the question of the genomic constitution of interspecific cultivars. These cultivars have been classified in genomic group (AB, AAB, ABB, AAAB, AABB)

based on their morphology and chromosome numbers (Cheesman, 1947; Simmonds and Shepherd, 1955). It is believed that they resulted from one or two steps of combination between the parental species, featuring 2n gametes derived from AA and AB genotypes (Cheesman, 1947; Simmonds and Shepherd, 1955; Perrier *et al.*, 2009). De Langhe *et al.*, (2010) emphasized that additional steps of combination may have occurred. The importance of A/B pairing together with the occurrence of unbalanced gametes transmission revealed by our study implies that chromosome re-assortments and exchanges of chromosome segments between the two genomes may have occurred, leading to unbalanced genome transmission with respect to the parental species. The 8A + 25B chromosome constitution of the triploid interspecific cultivar ‘Pelipita’ revealed by GISH (D’Hont *et al.*, 2000) constitutes the first accurately documented example of important unbalanced genome constitution.

Two endogenous viral sequences of *Banana streak viruses* (eBSVs), namely eBSOLV and eBSGFV, were located on the same *M. balbisiana* chromosome in the *M. balbisiana* diploid Pisang Klutuk Wulung using multidisciplinary approaches (Chabannes and Baurens *et al.*, 2013) and this chromosome was proposed to correspond to chromosome 1 of *M. acuminata*. Our result confirmed the location of these two eBSVs (infectious alleles eBSOLV-1 and eBSGF-7) on a *M. balbisiana* chromosome segment homeologous to at least part of chromosome 1A. The distribution of these eBSVs was skewed toward an excess in the progeny. This could be partly explained by the structural variation between chromosome 1B and 1A/3A but additional factor such as gene gametic and/or zygotic selection could also be involved. Cases of important local biased in allele segregation have already been reported in *Musa* genetic mapping studies (Hippolyte *et al.*, 2010, D’Hont *et al.*, 2012, Mbanjo *et al.*, 2012). Interestingly, the most detailed one concerned chromosomes 1 and 4 of Pisang Lilin (Hippolyte *et al.*, 2010) and Pahang (D’Hont *et al.*, 2012), two diploid *M. acuminata* accessions,.Hippolyte *et al.* (2010) suggested a structural variation (duplication) associated with gametic selection as a possible cause for such distortion. Another concerned chromosome 3 of Pisang Lilin, where the authors suggested gene selection as a possible cause for the distortion (Hippolyte *et al.*, 2010). It would be interesting to intensify the genotyping of the studied population to better understand the extent and causes of un-regular allele segregation. This would be particularly important for eBSVs that are very important traits for breeding and were found to have important segregation bias. The *de novo* sequencing of the B genome that is in progress will help in provide a global picture of the variation in chromosome organization between the A and the B genomes.

Chapitre III -Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAABxAA

Regarding breeding, our results demonstrated that the production of accessions without eBSVs is possible from crosses AAAB x AA. These results, that are based on plant material used in conventional (4x/2x) breeding strategy, open undoubtedly new positive perspectives for breeding programs. Indeed, the presence of infectious eBSVs within B genomes is nowadays the main constraint for exploiting *M. balbisiana* for breeding dessert, cooking and plantain banana as well as for exchanging *Musa* germplasm (Pillay *et al.*, 2002; Bakry *et al.*, 2009). The eBSV diagnostic markers (Chabannes and Baurens *et al.*, 2013) used in this study will be very useful for selecting eBSV-free triploid hybrid at a very early stage to avoid large field evaluation. The 24 eBSV-free triploid hybrids identified in this study already represent important materials for the CARBAP Plantain breeding programs. These results pave the way for the safe exploitation of *M. balbisiana* characteristic in particular vigor and resistance to biotic and abiotic factors.

ACKNOWLEDGMENTS:

This work was financed by Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD). The SSR genotyping was performed on the Montpellier-Languedoc Roussillon Grand Plateau Technique Regional.

Supplementary Material

Tables (3), Figure (2).

Supplementary Table 1: Sequence and origin of 38 SSR primers

Supplementary Table 2: DNA content of the mapping population measured by flow cytometry

Supplementary Table 3: Allelic segregation in the progeny

Supplementary Figure 1: Localization of the 38 SSR markers on the *M. acuminata* reference sequence

Figure supplémentaire 2 : Illustration schématique de la variation structurelle entre groupes de co-ségrégations des classes de chromosomes 1 et 3 (a) et de la formation des gamètes (b) chez CRBP39

Supplementary File 1: Pairwise Pearson's correlation coefficient between markers.

References

- Bakry, F., (2008).** Zygotic embryo rescue in bananas. *Fruits*, **63**, p.111–116.
- Bakry, F. et al., (2009).** Genetic improvement of banana. In *Breeding plantation tree crops: tropical species*. Springer, p. 3–50.
- Baurens, F.-C. et al., (2010).** Mechanisms of haplotype divergence at the RGA08 nucleotide-binding leucine-rich repeat gene locus in wild banana (*Musa balbisiana*). *BMC plant biology*, **10**, p.149.
- Bradshaw, J.E. et al., (2008).** QTL mapping of yield, agronomic and quality traits in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics*, **116**(2), p.193–211.
- Chabannes, M.; Baurens F.C. et al., (2013).** Three infectious viral species lying in wait in the banana genome. *Journal of virology*, **87**, p.8624–8637.
- Cheesman, E.E., (1947).** Classification of the Bananas: The Genus *Musa* L. *Kew Bulletin*, p.106–117.
- Christelová, P., Valárik, M. & Hribova, E., (2011).** A platform for efficient genotyping in *Musa* using microsatellite markers. *AoB plants*, 2011.
- Crouch, H.K. et al., (1998).** Segregation at microsatellite loci in haploid and diploid gametes of *Musa*. *Crop Science*, **38**, p.211–217.
- D’Hont, A. et al., (2000).** The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp . revealed by genomic DNA in situ hybridization. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, **100**, p.177–183.
- D’Hont, A. et al., (2012).** The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*.
- Dodds, K.S. & Simmonds, N.W., (1948).** Sterility and parthenocarpy in diploid hybrids of *Musa*. *Heredity*, **2**, p.101.
- Dolezel, J., Binarova, P. & Lucretti, S., (1989).** Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, **31**, p.113–120.
- Dolezel, J. & Bartos, J., (2005).** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, **95**, p.99–110.
- Faure, S. et al., (1993).** A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). *Theoretical and Applied Genetics*, **87**, p.517–526.
- Gawel, N.J. & Jarret, R.L., (1991).** Chloroplast DNA restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) in *Musa* species. *Theoretical and applied genetics*, **81**, p.783–786.
- Gayral, P. et al., (2008).** A single Banana streak virus integration event in the banana genome as the origin of infectious endogenous pararetrovirus. *Journal of virology*, **82**, p.6697–6710.
- 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**, p.65–80.

- Gayral, P. et al., (2010). Evolution of endogenous sequences of banana streak virus: what can we learn from banana (*Musa* sp.) evolution? *Journal of virology*, **84**, p.7346–7359.
- Hippolyte, I. et al., (2010). A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. *BMC Plant Biology*, **10**, p.65.
- Iskra-Caruana, M.-L. et al., (2010). A four-partner plant-virus interaction: enemies can also come from within. *Molecular plant-microbe interactions*, **23**, p.1394–1402.
- Jain, S.M. et al., (2009). Genetic Improvement of Banana. In *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*. New York, NY: Springer.
- Jannoo, N. et al., (2004). Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers. *Heredity*, **93**, p.460–467.
- Jeridi, M. et al., (2012). Cytogenetic evidence of mixed disomic and polysomic inheritance in an allotetraploid (AABB) *Musa* genotype. *Annals of Botany*, **110**, p.1593-1606.
- Lagoda, P.J. et al., (1998). Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the *Musaceae*. *Molecular Ecology*, **7**, p.659.
- De Langhe, E. et al., (2010). Did backcrossing contribute to the origin of hybrid edible bananas? *Annals of botany*, **106**, p.849–857.
- Li, J. et al., (2012). Statistical models for genetic mapping in polyploids: Challenges and opportunities. In *Quantitative Trait Loci (QTL)*. Springer, p. 245–261.
- Mbanjo, E.G.N. et al., (2012). Molecular marker-based genetic linkage map of a diploid banana population (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica*, **188**, p.369–386.
- Oselebe, H.O., Tenkouano, A. & Pillay, M., (2006). Ploidy variation of *Musa* hybrids from crosses. *African Journal of Biotechnology*, **5**.
- Perrier, X. et al., 2009. Combining biological approaches to shed light on the evolution of edible bananas. *Ethnobotany Research & Applications*, **7**, p.199–216.
- Pillay, M., Tenkouano, A. & Hartman, J., (2002). Bananas and plantains: future challenges in *Musa* breeding. *Crop Improvement, Challenges in the Twenty-First Century*. Food Products Press, New York, USA, p.223–252.
- Ramsey, J. & Schemske, D.W., (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual review of ecology and systematics*, **33**, p.589–639.
- Shepherd, K., (1999). *Cytogenetics of the genus Musa*, IPGRI.
- Simmonds, N.W. & Shepherd, K., (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London, Botany*, **55**, p.302–312.
- Soltis, D.E., Soltis, P.S. & Rieseberg, L.H., (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **12**, p.243–273.
- Stift, M. et al., (2008). Segregation models for disomic, tetrasomic and intermediate inheritance in tetraploids: a general procedure applied to Rorippa (yellow cress) microsatellite data. *Genetics*, **179**, p.2113–2123.
- Tezenas du Montcel, H., Carreel, F. & Bakry, F., (1995). Improve the diploids: the key for banana breeding. In *Proceedings of the workshop on New Frontiers in Resistance Breeding for Nematodes, Fusarium and Sigatoka*. p. 2–5.

Chapitre III -Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAABxAA

- Thomas, D.S., Turner, D.W. & Eamus, D., (1998).** Independent effects of the environment on the leaf gas exchange of three banana (*Musa* sp.) cultivars of different genomic constitution. *Scientia Horticulturae*, **75**, p.41–57.
- Tomekpe, K., Jenny, C. & Escalant, J.-V., (2004).** A review of conventional improvement strategies for *Musa*. *InfoMusa*, **13**, p.2–6.
- Vanhove, A.-C. et al., (2012).** Screening the *Musa* biodiversity for drought tolerance: proteomics as a tool to understand homeostasis. *Frontiers in Plant Science*.

Supplementary Table 1: Sequence and origin of 38 SSR primers

LG	SSR loci	Forward primer	Reverse primer	Reference
LG01	mMaCIR0007	ACAACACTAGGATGGTAATGTG TGGAA	ACAACACTAGGATGGTAATGTG TGGAA	Grapin et al, 1998
	mMaCIR0172	CAGCTAATGCCAAACCC	CAGCTAATGCCAAACCC	Hippolyte et al , 2010
	mMaCIR0180	GCCTCAGCCTCATCATC	GCCTCAGCCTCATCATC	Hippolyte et al , 2010
	mMaCIR1052	TGCATTGATGTTTTCTT	TGCATTGATGTTTTCTT	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1324	AAAAGCTCGCGGTAGAAG	AAAAGCTCGCGGTAGAAG	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1620	CCAACCCGTCCTTATCC	CCAACCCGTCCTTATCC	D'Hont et al 2012
	mMaCIR2094	AAGCAGCTCGAACACCA	AAGCAGCTCGAACACCA	D'Hont et al 2012
LG02	mMaCIR0360	GTGGTGGTTGACCCAAAGTT	GTGGTGGTTGACCCAAAGTT	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1016	GGAGAGAGGAAAGAGGCA	GGAGAGAGGAAAGAGGCA	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1390	TGCGTTGCTTGATGTGT	TGCGTTGCTTGATGTGT	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1572	ATCAGTGCATTAGTCAGG	ATCAGTGCATTAGTCAGG	D'Hont et al 2012
	mMaCIR2016	GTTGCCACCAACCAAGA	GTTGCCACCAACCAAGA	D'Hont et al 2012
LG03	mMaCIR1234	AACTTGGCCCTTTTCCTT	AACTTGGCCCTTTTCCTT	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1474	TCTCATCAACTCGCTCCA	TCTCATCAACTCGCTCCA	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1641	CGACGCAGTCTCTCACC	CGACGCAGTCTCTCACC	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1658	TCTTGAGGAAGGCCAAAC	TCTTGAGGAAGGCCAAAC	D'Hont et al 2012
LG04	mMaCIR0411	TGCAAGATTCCCATTGTTCA	TGCAAGATTCCCATTGTTCA	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1185	CCCAAGGAGACTGAAAGG	CCCAAGGAGACTGAAAGG	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1306	GCGCACTGATTAGGTTTTT	GCGCACTGATTAGGTTTTT	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1338	AGAAGGGAGGAGAAAGAACA	AGAAGGGAGGAGAAAGAACA	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1554	ACCCGAACCCTAAACCA	ACCCGAACCCTAAACCA	D'Hont et al 2012
LG05	mMaCIR0017	GTTTACTGGCACTCTGTCTC	GTTTACTGGCACTCTGTCTC	Lagoda et al, 1998
	mMaCIR1609	TGCAATTCGACTCTTCTC	TGCAATTCGACTCTTCTC	D'Hont et al 2012
LG06	mMaCIR0120	ATGCCCACTTCCACCT	ATGCCCACTTCCACCT	Hippolyte et al , 2010
	mMaCIR1131	TCTTGCCGCTCCATTT	TCTTGCCGCTCCATTT	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1395	TCCAAGCCGTTCCAAG	TCCAAGCCGTTCCAAG	D'Hont et al 2012
LG07	mMaCIR2927	TGTCCACACCTCCTTCC	TGTCCACACCTCCTTCC	D'Hont et al 2012
LG08	mMaCIR0388	CTTATCGCCACCTCCAATTC	CTTATCGCCACCTCCAATTC	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1026	GGAGGTGCAGGAGAACA	GGAGGTGCAGGAGAACA	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1602	CACGCAAAACAGAAGGG	CACGCAAAACAGAAGGG	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1733	GATCGAACACAGCGAGG	GATCGAACACAGCGAGG	D'Hont et al 2012
LG09	mMaCIR1520	GCGATGTGTCGTTTCAGG	GCGATGTGTCGTTTCAGG	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1994	GCTTTCCTTTGTCCCTTC	GCTTTCCTTTGTCCCTTC	D'Hont et al 2012
LG10	mMaCIR0273	TGGTTGAAGATTCCCAT	TGGTTGAAGATTCCCAT	Hippolyte et al , 2010
	mMaCIR1209	TCGGACAACATCAAAGGA	TCGGACAACATCAAAGGA	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1429	CATTGCCTCCATCGTCT	CATTGCCTCCATCGTCT	D'Hont et al 2012
LG11	mMaCIR1670	CAAAACATCCACCCAAAA	CAAAACATCCACCCAAAA	D'Hont et al 2012
	mMaCIR1917	TCGAATCAAATGCCGAG	TCGAATCAAATGCCGAG	D'Hont et al 2012

LG: Linkage group (location on *M. acuminata* reference map)

Supplementary Table 2: DNA content of the progenies measured by flow cytometry

Plants	DNA			content			
	content (pg)	CV (%)	std-dev (pg)		(pg)	(%)	(pg)
CRBP39	2.338	10.2	0.238	P042	1.733	10.2	0.176
PAHANG	1.181	12.3	0.145	P043	1.841	9.5	0.175
P001	1.797	23.3	0.418	P045	1.762	9.4	0.165
P002	1.957	17.0	0.333	P046	1.763	7.3	0.129
P003	1.863	12.1	0.225	P047	1.752	9.3	0.163
P005	1.634	16.8	0.274	P048	1.724	10.9	0.187
P006	1.770	10.5	0.185	P049	1.913	8.0	0.153
P007	1.784	14.0	0.250	P050	1.709	9.9	0.169
P008	1.753	11.4	0.199	P051	1.774	8.9	0.158
P009	1.753	11.4	0.199	P052	1.841	10.4	0.191
P010	1.765	12.4	0.219	P053	1.867	9.0	0.168
P011	1.814	9.8	0.177	P054	1.920	9.9	0.191
P012	1.783	10.7	0.192	P055	1.770	10.1	0.179
P013	1.839	15.2	0.279	P056	1.776	9.3	0.164
P014	1.861	14.0	0.260	P057	1.787	7.5	0.135
P015	1.706	12.5	0.213	P058	1.881	9.5	0.178
P016	1.753	10.9	0.191	P059	1.784	9.2	0.165
P017	1.864	16.4	0.306	P060	1.739	9.9	0.172
P018	1.896	12.0	0.228	P061	1.834	12.3	0.225
P019	1.777	10.0	0.178	P062	1.821	8.4	0.152
P021	1.701	12.4	0.211	P063	1.861	8.9	0.165
P022	1.799	14.7	0.264	P065	1.780	8.3	0.147
P023	1.672	13.7	0.229	P066	1.753	11.1	0.195
P024	1.887	11.2	0.212	P067	1.805	9.4	0.169
P025	1.701	12.7	0.215	P068	1.820	13.0	0.237
P026	1.790	12.9	0.231	P069	1.749	11.1	0.194
P027	1.832	8.6	0.158	P070	1.733	9.6	0.165
P028	1.843	10.0	0.184	P071	1.680	11.5	0.192
P029	1.808	9.3	0.167	P072	1.723	11.5	0.198
P030	1.848	8.9	0.164	P073	1.765	11.2	0.197
P031	1.874	8.0	0.150	P074	1.761	12.0	0.212
P032	1.760	7.7	0.135	P075	1.757	8.4	0.148
P033	1.871	8.6	0.160	P076	1.867	8.8	0.164
P034	1.760	8.9	0.156	P077	1.754	7.9	0.139
P035	1.735	10.2	0.176	P078	1.719	7.4	0.127
P037	1.751	8.1	0.141	P079	1.868	7.3	0.137
P038	1.842	10.7	0.198	P080	1.792	11.0	0.196
P039	1.696	10.4	0.176	P081	1.783	7.4	0.133
P040	1.742	11.7	0.205				
P041	1.740	9.2	0.160				
Plants	DNA	CV	std-dev				

Supplementary Table 2 (continued)

Plants	DNA content (pg)	CV (%)	std-dev (pg)	Plants	DNA content (pg)	CV (%)	std-dev (pg)
P082	1.793	9.1	0.159	P125	1.886	12.8	0.24
P083	1.735	9.1	0.159	P126	1.816	9.1	0.166
P084	1.766	9.5	0.168	P127	1.795	7.3	0.131
P085	1.745	9.6	0.167	P128	1.786	8.0	0.143
P086	1.818	7.2	0.131	P129	1.789	8.1	0.146
P087	1.789	6.4	0.115	P130	1.756	7.5	0.132
P088	1.812	7.4	0.135	P131	1.795	10.1	0.182
P089	1.806	8.7	0.156	P132	1.730	9.2	0.159
P090	1.816	8.1	0.147	P133	1.783	9.4	0.168
P091	1.869	9.1	0.170	P134	1.707	8.2	0.140
P093	1.829	11.0	0.201	P135	1.822	6.6	0.121
P094	1.794	11.5	0.207	P136	1.771	9.8	0.173
P095	1.762	9.5	0.166	P137	1.802	6.1	0.111
P096	1.797	12.8	0.229	P138	1.810	9.3	0.168
P097	1.721	8.9	0.153	P139	1.754	9.5	0.166
P098	1.794	10.0	0.179	P140	1.749	10.2	0.179
P099	1.801	11.0	0.198	P141	1.787	10.7	0.191
P100	1.852	12.0	0.221	P142	1.769	11.2	0.198
P101	1.798	10.2	0.183	P143	1.793	10.0	0.179
P102	1.787	9.7	0.173	P145	1.790	8.5	0.152
P103	1.821	10.8	0.197	P146	1.782	10.4	0.186
P104	1.758	9.2	0.162	P147	1.862	10.9	0.202
P105	1.667	9.1	0.152	P149	1.764	9.9	0.174
P106	1.763	7.6	0.134	P150	1.855	8.9	0.165
P107	1.902	8.5	0.161	P151	1.775	9.6	0.170
P109	1.804	9.9	0.178	P152	1.747	9.2	0.160
P110	1.737	6.8	0.118	P153	1.782	9.6	0.170
P111	1.776	9.4	0.166	P154	1.817	9.6	0.174
P112	1.834	5.9	0.109	P155	1.714	10.6	0.182
P113	1.785	8.7	0.155	P156	1.821	11.5	0.209
P114	1.768	8.6	0.151	P157	1.696	9.2	0.156
P115	1.773	8.7	0.155	P158	1.715	14.1	0.242
P116	1.817	8.7	0.158	P159	1.917	16.1	0.309
P118	1.845	7.5	0.139	P161	1.941	8.9	0.173
P119	1.826	15.7	0.286	P162	1.823	10.6	0.193
P120	1.799	10.0	0.179	P163	1.930	10.3	0.199
P121	1.708	7.7	0.131	P164	1.872	7.8	0.147
P122	1.849	9.1	0.168	P165	1.680	7.0	0.118
P123	1.819	11.6	0.211				

Supplementary Table 2 (continued)

Plants	DNA		
	content (pg)	CV (%)	std-dev (pg)
P166	1.680	7.0	0.118
P167	1.783	11.0	0.196
P168	1.957	8.7	0.170
P169	1.788	9.4	0.168
P170	1.880	11.3	0.212
P171	1.976	10.6	0.209
P172	1.910	10.0	0.190
P173	1.973	10.8	0.213
P174	1.932	7.9	0.152
P175	1.898	9.6	0.182
P177	1.853	8.9	0.165
P178	1.836	9.9	0.181
P179	2.034	9.8	0.199
P180	1.996	8.7	0.174
P181	1.976	12.6	0.249
P182	1.903	10.2	0.194
P183	1.847	13.4	0.248
P185	1.932	14.6	0.282
P186	1.809	14.5	0.263
P187	1.855	13.3	0.246
P188	1.874	11.3	0.213
P190	1.983	12.9	0.256
P191	1.987	9.5	0.189
P193	1.769	11.2	0.198
P194	1.757	9.0	0.158
P195	1.755	9.2	0.161
P196	1.728	9.4	0.162
P198	1.693	9.3	0.158
P200	1.671	7.6	0.127
P203	1.737	9.4	0.163
	1.706	8.2	0.140

Supplementary Table 3: Allelic segregation type in the progeny

LG	Marker	N	Whole progeny			Without aneuploid gametes					Segregation type	
			absent	present	(p-value)	Simplex Khi2	Duplex khi2	(p-value)	Simplex Khi2	Duplex Khi2		
LG01	mMaCIR1620_273	160	86	74	0.343	0.000	101	54	47	0.484	0.000	simple dose
	mMaCIR2094_269	184	86	98	0.377	0.000	112	54	58	0.708	0.000	simple dose
	mMaCIR2094_275	184	82	102	0.141	0.000	112	58	54	0.708	0.000	simple dose
	mMaCIR2094_283	184	102	82	0.141	0.000	112	63	49	0.186	0.000	simple dose
	mMaCIR0007_155	184	82	102	0.141	0.000	112	58	54	0.708	0.000	simple dose
	mMaCIR0007_157	184	102	82	0.141	0.000	112	63	49	0.186	0.000	simple dose
	mMaCIR0007_162	184	86	98	0.377	0.000	112	54	58	0.708	0.000	simple dose
	mMaCIR0007_169 ^b	184	64	120	0.000	0.000	112	50	62	0.256	0.000	simple dose
	mMaCIR1324_266 ^b	179	96	83	0.332	0.000	109	56	53	0.777	0.000	simple dose
	mMaCIR1324_274	179	86	93	0.603	0.000	109	59	50	0.390	0.000	simple dose
	mMaCIR1324_275	179	87	92	0.708	0.000	109	56	53	0.777	0.000	simple dose
	mMaCIR1324_287	179	63	116	0.000	0.000	109	49	60	0.292	0.000	simple dose
	mMaCIR0172_259	183	34	149	0.000	0.488	112	26	86	0.000	0.063	double dose
	mMaCIR0172_269	183	96	87	0.507	0.000	112	58	54	0.708	0.000	simple dose
	mMaCIR1052_267 ^b	182	79	103	0.075	0.000	112	55	57	0.841	0.000	simple dose
	mMaCIR1052_287	182	99	83	0.235	0.000	112	63	49	0.186	0.000	simple dose
	mMaCIR1052_301	182	130	52	0.000	0.000	112	79	33	0.000	0.000	biased
	mMaCIR1052_303	182	69	113	0.001	0.000	112	39	73	0.001	0.000	biased
	mMaCIR0180_242	173	25	148	0.000	0.434	108	18	90	0.000	1.000	double dose
	mMaCIR0180_250	173	97	76	0.110	0.000	108	64	44	0.054	0.000	simple dose
eBSGFV	184	29	155	0.000	0.742	112	21	91	0.000	0.554	biased/double dose	
eBSOLV	184	59	125	0.000	0.000	112	47	65	0.089	0.000	simple dose	
LG02	mMaCIR1390_284 ^b	175	97	78	0.151	0.000	172	95	77	0.170	0.000	simple dose
	mMaCIR1390_287	175	35	140	0.000	0.237	172	35	137	0.000	0.195	double dose
	mMaCIR1390_294	175	87	88	0.920	0.000	172	86	86	1.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1016_222	184	89	95	0.655	0.000	181	89	92	0.823	0.000	simple dose
	mMaCIR1016_234	184	17	167	0.000	0.007	181	17	164	0.000	0.009	biased
	mMaCIR0360_188	184	80	104	0.077	0.000	181	79	102	0.087	0.000	simple dose
	mMaCIR0360_206	184	90	94	0.764	0.000	181	90	91	0.920	0.000	simple dose
	mMaCIR0360_210 ^b	184	22	162	0.000	0.086	181	22	159	0.000	0.103	double dose
	mMaCIR1572_185	184	90	94	0.764	0.000	181	89	92	0.823	0.000	simple dose
	mMaCIR1572_195	184	17	167	0.000	0.007	181	17	164	0.000	0.009	biased
	mMaCIR1572_209	184	90	94	0.764	0.000	181	89	92	0.823	0.000	simple dose
	mMaCIR2016_128	178	86	92	0.655	0.000	175	86	89	0.823	0.000	simple dose
	mMaCIR2016_146	178	81	97	0.230	0.000	175	80	95	0.256	0.000	simple dose
	mMaCIR2016_172 ^b	178	20	158	0.000	0.052	175	20	155	0.000	0.063	double dose
	mMaCIR1641_246 ^b	180	92	88	0.764	0.000	176	92	84	0.549	0.000	simple dose
	mMaCIR1641_249	180	39	141	0.000	0.072	176	38	138	0.000	0.080	double dose
LG03	mMaCIR1641_253	180	86	94	0.549	0.000	176	85	91	0.655	0.000	simple dose
	mMaCIR1474_202	183	84	99	0.267	0.000	179	82	97	0.262	0.000	simple dose
	mMaCIR1474_213 ^b	183	88	95	0.603	0.000	179	88	91	0.823	0.000	simple dose
	mMaCIR1474_223	183	101	82	0.160	0.000	179	100	79	0.117	0.000	simple dose
	mMaCIR1658_194 ^b	184	89	95	0.655	0.000	180	89	91	0.888	0.000	simple dose
	mMaCIR1658_198	184	106	78	0.039	0.000	180	105	75	0.025	0.000	simple dose
	mMaCIR1658_209	184	21	163	0.000	0.056	180	21	159	0.000	0.072	double dose
	mMaCIR1234_247	184	87	97	0.462	0.000	180	84	96	0.371	0.000	simple dose
	mMaCIR1234_266	184	111	73	0.005	0.000	180	109	71	0.005	0.000	biased
	mMaCIR1234_302 ^b	184	99	85	0.301	0.000	180	98	82	0.233	0.000	simple dose
LG04	mMaCIR1338_249 ^b	184	89	95	0.655	0.000	175	84	91	0.597	0.000	simple dose
	mMaCIR1338_276	184	33	151	0.000	0.644	175	33	142	0.000	0.437	double dose
	mMaCIR1306_174 ^b	183	86	97	0.417	0.000	174	82	92	0.450	0.000	simple dose
	mMaCIR1306_177	183	106	77	0.032	0.000	174	101	73	0.034	0.000	simple dose
mMaCIR1306_188	183	31	152	0.000	0.921	174	29	145	0.000	1.000	double dose	

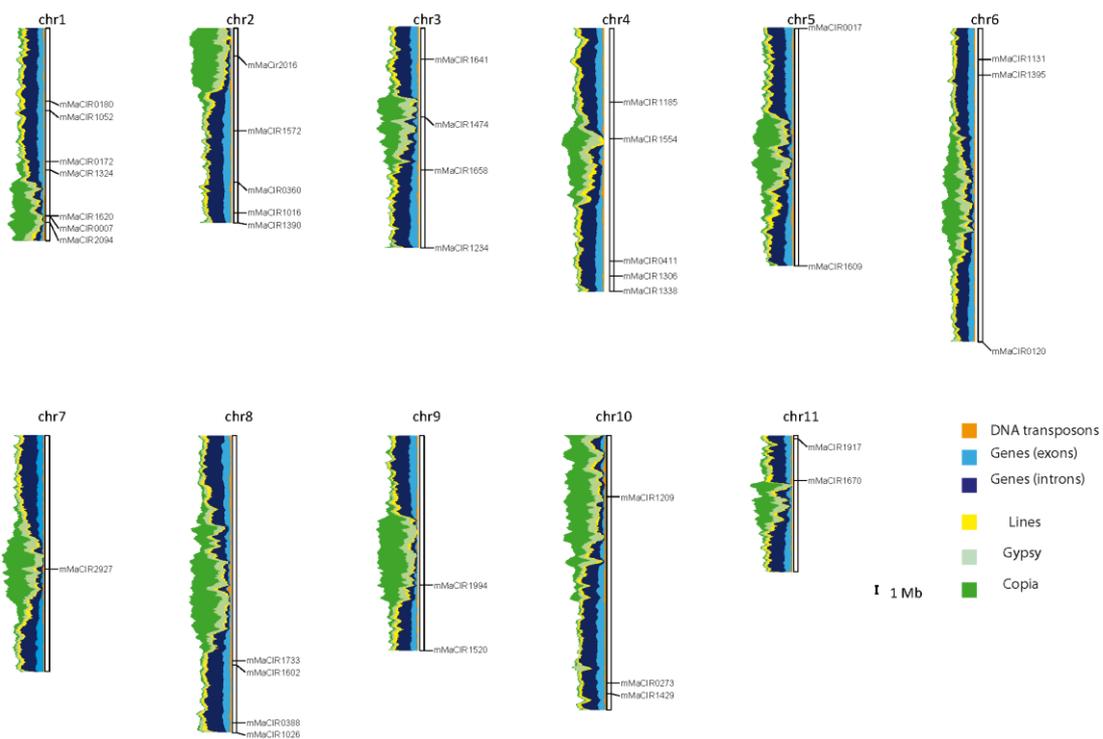
Chapitre III -Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAABxAA

Supplementary Table 3: Allelic segregation type in the progeny (continued)

	Marker	Whole progeny					Without aneuploid gametes					Segregation type
		N	absent	present	Simplex Khi2 (p-value)	Duplex khi2 (p-value)	N	absent	present	Simplex Khi2 (p-value)	Duplex khi2 (p-value)	
LG04	mMaCIR0411_255	184	31	153	0.000	0.947	175	28	147	0.000		
	mMaCIR0411_265 ^b	184	86	98	0.377	0.000	175	83	92	0.498	0.813	double dose
	mMaCIR0411_285	184	103	81	0.105	0.000	175	99	76	0.082	0.000	simple dose
	mMaCIR1554_200 ^b	181	82	99	0.206	0.000	173	82	91	0.493	0.000	simple dose
	mMaCIR1554_221	181	91	90	0.920	0.000	173	91	82	0.493	0.000	simple dose
LG05	mMaCIR1554_229	181	35	146	0.000	0.335	173	27	146	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1185_288	183	92	91	0.920	0.000	174	92	82	0.450	0.708	double dose
	mMaCIR1609_250	161	24	137	0.000	0.549	159	24	135	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1609_257	161	84	77	0.584	0.000	159	84	75	0.475	0.595	double dose
	mMaCIR0017_139	177	91	86	0.708	0.000	175	91	84	0.597	0.000	simple dose
LG06	mMaCIR0017_157	177	97	80	0.202	0.000	175	97	78	0.151	0.000	simple dose
	mMaCIR0017_163 ^b	177	90	87	0.823	0.000	175	90	85	0.708	0.000	simple dose
	mMaCIR1131_102	184	94	90	0.764	0.000	183	94	89	0.708	0.000	simple dose
	mMaCIR1131_110	184	37	147	0.000	0.210	183	37	146	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1131_121	184	84	100	0.238	0.000	183	84	99	0.267	0.197	double dose
LG07	mMaCIR1395_290 ^b	183	77	106	0.032	0.000	182	77	105	0.038	0.000	simple dose
	mMaCIR1395_303	183	94	89	0.708	0.000	182	94	88	0.655	0.000	simple dose
	mMaCIR1395_325	183	43	140	0.000	0.013	182	43	139	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR0120_144	182	95	87	0.554	0.000	181	95	86	0.502	0.012	double dose
	mMaCIR0120_146 ^b	182	97	85	0.374	0.000	181	97	84	0.335	0.000	simple dose
LG08	mMaCIR0120_148	183	90	93	0.823	0.000	182	90	92	0.888	0.000	simple dose
	mMaCIR2927_273	184	82	102	0.141	0.000	184	82	102	0.141	0.000	simple dose
	mMaCIR2927_276	184	101	83	0.185	0.000	184	101	83	0.185	0.000	simple dose
	mMaCIR1733_205	184	46	138	0.000	0.002	178	43	135	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1733_209	184	83	101	0.185	0.000	178	81	97	0.230	0.007	biased
LG09	mMaCIR1733_220	184	81	103	0.105	0.000	178	77	101	0.072	0.000	simple dose
	mMaCIR1602_283 ^b	182	83	99	0.235	0.000	176	79	97	0.175	0.000	simple dose
	mMaCIR1602_288	182	86	96	0.458	0.000	176	84	92	0.549	0.000	simple dose
	mMaCIR1602_292	182	40	142	0.000	0.055	176	37	139	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR0388_209 ^b	183	85	98	0.337	0.000	177	81	96	0.260	0.121	double dose
LG10	mMaCIR0388_210	183	86	97	0.417	0.000	177	83	94	0.410	0.000	simple dose
	mMaCIR1026_286	184	83	101	0.185	0.000	178	80	98	0.177	0.000	simple dose
	mMaCIR1026_289	184	91	93	0.888	0.000	178	87	91	0.764	0.000	simple dose
	mMaCIR1026_292	184	110	74	0.008	0.000	178	105	73	0.016	0.000	simple dose
	mMaCIR1026_295 ^b	184	90	94	0.764	0.000	178	84	94	0.454	0.000	biased
LG11	mMaCIR1520_256 ^b	183	92	91	0.920	0.000	183	92	91	0.920	0.000	simple dose
	mMaCIR1520_285	183	48	135	0.000	0.001	183	48	135	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1994_253 ^b	183	92	91	0.920	0.000	183	92	91	0.920	0.001	biased
	mMaCIR1994_256	183	82	101	0.160	0.000	183	82	101	0.160	0.000	simple dose
	mMaCIR1994_273	183	36	147	0.000	0.275	183	36	147	0.000	0.000	simple dose
LG10	mMaCIR1209_268 ^b	156	50	106	0.000	0.000	144	47	97	0.000	0.275	double dose
	mMaCIR1209_284	156	70	86	0.200	0.000	144	64	80	0.182	0.000	biased
	mMaCIR0273_200	176	80	96	0.229	0.000	160	71	89	0.155	0.000	simple dose
	mMaCIR0273_206	176	97	79	0.175	0.000	160	87	73	0.267	0.000	simple dose
	mMaCIR0273_210 ^b	176	108	68	0.003	0.000	160	97	63	0.007	0.000	simple dose
LG11	mMaCIR0273_218	176	78	98	0.132	0.000	160	66	94	0.027	0.000	biased
	mMaCIR1429_168	183	34	149	0.000	0.488	167	29	138	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1429_172	183	96	87	0.507	0.000	167	88	79	0.484	0.809	double dose
	mMaCIR1429_176	183	85	98	0.337	0.000	167	77	90	0.315	0.000	simple dose
	mMaCIR1917_236	183	83	100	0.209	0.000	182	83	99	0.235	0.000	simple dose
LG11	mMaCIR1917_256 ^b	183	27	156	0.000	0.488	182	27	155	0.000	0.000	simple dose
	mMaCIR1670_194	178	81	97	0.230	0.000	177	81	96	0.260	0.507	double dose
	mMaCIR1670_226 ^b	178	92	86	0.655	0.000	177	91	86	0.708	0.000	simple dose

LG: Linkage group (location on *M. acuminata* reference map); N number of plants, χ^2 test of segregation in the progeny : 1:1 ratio: Simplex χ^2 (p-value) and 1:5 ratio Duplex χ^2 (p-value).

Supplementary Figure 1 : Location of 38 SSR markers onto the Musa reference sequence



Supplementary Figure 1: Localization of the 38 SSR markers on the *M. acuminata* reference sequence

Résumé des résultats décrits dans l'article

Le matériel végétal de cette étude est constitué d'une population de 184 hybrides en ségrégation issue du croisement entre l'allotétraploïde AAAB CRBP39 (parent femelle) et le diploïde AA Pahang_CARBAP (parent mâle). Nous avons trié parmi 335 loci SSR répartis sur l'ensemble du génome de référence *M. acuminata* Pahang HD (523 Mb) (D'Hont et al., 2012), 38 loci SSR multi-alléliques chez CRBP39 dont 26 possèdent un allèle nous permettant de suivre le génome B. Deux marqueurs PCR spécifiques de 2 espèces BSV (eBSGFV-7 et eBSOLV-1) intégrées au génome B ont également été sélectionnés. Nous avons à l'aide de ces loci (40 – 38 SSR et 2 eBSV) génotypé l'ensemble de la population, les deux parents (CRBP39 et Pahang_CARBAP) et, pour une étude généalogique, les grands parents (French clair et M 53 parents de CRBP39).

Chez les *Musa*, les croisements entre génotypes 4x et génotypes 2x produisent principalement des descendances triploïdes (Oselebe et al., 2006 ; Jeridi et al., 2012). Ainsi, par cytométrie de flux, nous avons pu vérifier que notre population est triploïde avec potentiellement des petites variations (aneuploïdies) masquées par l'imprécision des mesures.

L'analyse de la fréquence des allèles SSR dans la descendance est en grande majorité (90%) conforme à l'attendu c'est à dire que chacun des allèles simple dose (72%) se retrouve dans 50% des descendants et chacun des allèles double dose (18%) se retrouve dans 83,3% des descendants. Seuls, 11 allèles distribués sur l'ensemble du génome se retrouvent dans la descendance avec une fréquence biaisée. De plus, la ségrégation des allèles aux loci indique un appariement très majoritairement de type tétrasomique (70%).

Pour les 9 segments de chromosomes B que nous avons pu suivre, nous avons observé de la recombinaison entre génome A (*M. acuminata*) et génome B (*M. balbisiana*). Cette possibilité d'appariement entre groupes de co-ségrégation A et B a été suggérée depuis longtemps et a été démontrée récemment par des études cytogénétiques moléculaire (GISH) (Jeridi et al., 2011 ; 2012). En outre, ces auteurs ont suggéré sur la base d'analyses statistiques des figures d'appariement d'un génotype Kunnan tétraploïde AABB (issu du doublement à la colchicine du Kunnan diploïde), différents modes d'appariement (disomique, tétrasomique et intermédiaire) entre génomes A et B selon les classes de chromosomes. Nos travaux suggèrent que chez CRBP39, le taux de recombinaison entre groupes de co-ségrégation A et

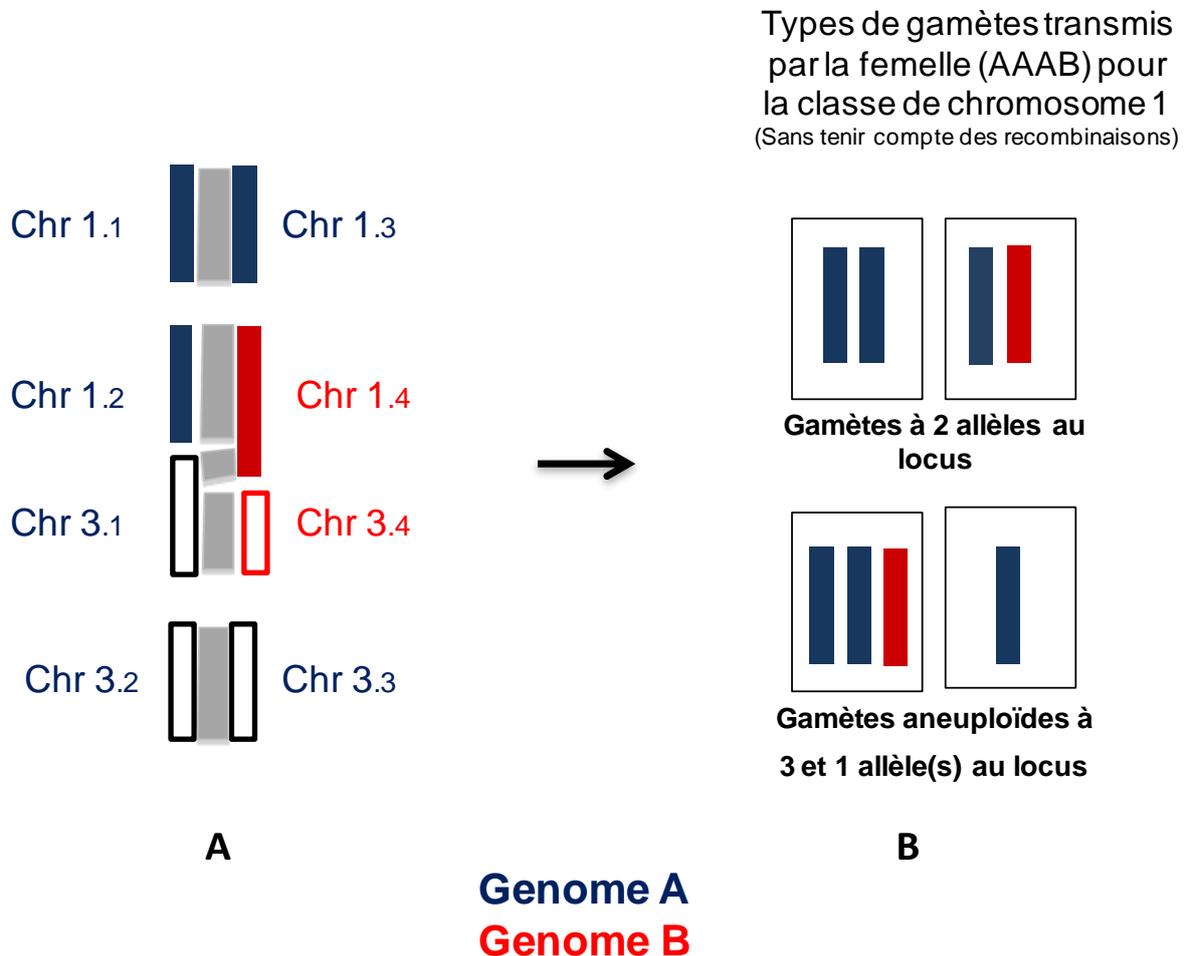


Figure 3 : Illustration schématique de la variation structurelle entre groupes de co-ségrégations des classes de chromosome 1 et 3 et de la formation des gamètes chez CRBP39.

- A-** Le groupe de co-ségrégation 1 du génome B (Chr 1.4) est orthologue avec une partie du groupe de co-ségrégation 1 du génome A (Chr 1.2) et une partie du groupe de co-ségrégation 3 du génome A (3.1). L'appariement des groupes de co-ségrégations hom(é)ologues aboutit à la formation d'un trivalent lié à cette différence de structure 1/3 au locus
- B-** Selon le mode de résolutions du trivalent, on a la production de gamètes normaux à 2 allèles au locus ou de gamètes anormaux (aneuploïdes) à 3 ou 1 allèle(s) au locus.

Chapitre III -Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAABxAA

entre groupes de co-ségrégation A et B est similaire pour deux classes de chromosomes (Chr 6 et Chr 8) et différent pour cinq classes de chromosomes où nous notons un taux de recombinaison plus faible entre groupes de co-ségrégation A et B (Chr 1 , Chr 2 , Chr 3 , Chr 4 et Chr 9).

Nous avons, au cours de nos analyses, détecté la transmission d'un ou de trois allèles du parent femelle tétraploïde (AAAB, CRBP39) à la descendance au lieu de deux et ce pour un ou quelques loci chez la moitié de la descendance. En raison du faible nombre de marqueurs utilisés dans cette étude une interprétation globale de ces résultats est difficile. Toutefois, nous avons proposé une interprétation pour la classe de chromosome 1 dont de nombreux allèles sont impliqués dans la formation des gamètes aneuploïdes et pour laquelle nous disposons d'un nombre de loci avec 4 allèles plus important. Pour cette classe de chromosome 1, les allèles de *M. balbisiana* sont toujours (ou très souvent) impliqués dans les cas d'une transmission de trois allèles par le parent femelle tétraploïde (AAAB, CRBP39) et inversement sont généralement absents (ou à basse fréquence) dans le cas d'une transmission d'un allèle par le parent femelle tétraploïde (AAAB). D'autre part, la cartographie génétique et des analyses de corrélations des marqueurs montrent des associations et des répulsions entre certains allèles des classes chromosomiques 1 et 3. Ceci nous a permis de suggérer la présence d'une variation structurale entre les génomes A et B qui serait à l'origine de cette ségrégation particulière. Plus précisément, nous suggérons qu'un des chromosomes B est orthologue avec une partie du chromosome 1 du génome A et une partie du chromosome 3 du génome A (**Figure 3-A**) ce qui entrainerait la formation de multivalents (au moins de trivalents) qui selon leur mode de résolutions peuvent générer des gamètes comprenant 1, 2 ou 3 allèles (**Figure 3-B**).

Nous avons montré que deux eBSVs infectieux (eBSGFV-7 et eBSOLV-1) sont présents chez le parent femelle tétraploïde (AAAB, CRBP39) et sont situés sur le groupe de co-ségrégation 1B. Ces deux eBSVs infectieux, eBSGFV-7 et eBSOLV-1, sont apparus dans une plus grande proportion (84% et 68%) que prévu (50%) dans la descendance. Cette distorsion de ségrégation peut s'expliquer pour l'allèle eBSOLV-1 par les distorsions de ségrégation due à la variation structurale observée entre les chromosomes 1B et 1A/3A. Pour l'allèle eBSGFV-7, d'autres facteurs tels que la sélection gamétique et/ou zygotique

Chapitre III -Etude de la ségrégation des chromosomes B dans un contexte de croisement AAABxAA

pourraient être impliqués. De façon intéressante, nous avons montré que les deux eBSVs étaient absents chez 24 descendants. Ces résultats montrent que cette stratégie de croisements (3x/2x puis 4x/2x) peut permettre d'éliminer les eBSV et donc surmonter la contrainte eBSV. Elles ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation sans risque du génome *M. balbisiانا* dans les programmes de sélection.

Un génotypage plus dense de cette descendance serait à envisager pour affiner notre compréhension de la transmission des chromosomes du parent femelle tétraploïde (AAAB) à la descendance.

CHAPITRE IV

Caractérisation et activation des eBSVs

IV – 1 – Contexte et objectifs de l'étude

La présence d'eBSV infectieux dans le génome du bananier est aujourd'hui une contrainte majeure pour l'amélioration de cette plante. Trois espèces virales (BSGFV, BSOLV, BSIMV) ont des intégrations infectieuses (eBSGFV, eBSOLV et eBSIMV) chez le diploïde naturel *M. balbisiana* PKW (BB) (Ndowora *et al.*, 1999 ; Lheureux *et al.*, 2003 ; Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Une caractérisation approfondie au niveau génétique, cytogénétique et moléculaire de ces intégrations a récemment été effectuée (Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Il a été démontré que chaque intégration possède un allèle infectieux responsable de l'apparition de la maladie de la mosaïque en tirets chez les hybrides interspécifiques issus des programmes d'amélioration génétique. Cet allèle est identifié seulement pour BSGFV et BSOLV et correspond aux intégrations eBSGFV-7 et eBSOLV-1 respectivement. Des travaux précédents ont montré que ces eBSV pouvaient être activés suite à différents stress abiotiques tels que le stress hydrique et les écarts de températures ainsi que les stress rencontrés lors de la culture *in vitro* (CIV) (Dallot *et al.*, 2001 ; Côte *et al.*, 2010) ou encore lors de croisements génétiques interspécifiques (Lheureux *et al.*, 2003). Les connaissances des mécanismes d'activation et de régulation de ces intégrations restent cependant embryonnaires. Ainsi, les travaux de (Côte *et al.*, 2010) ont montré que différents génotypes de bananiers tous porteurs des allèles infectieux de BSOLV et BSGFV, présentaient des infections BSV différentes suite à la CIV. Les hybrides interspécifiques naturels tels que Kelong Mekintu et Black Penkelon – (AAB), montraient une infection BSOLV alors que l'hybride allotétraploïde artificiel CRBP39 issus des programmes d'amélioration génétique avait une double infection BSOLV et BSGFV. Les travaux réalisés par Lheureux *et al.* (2003) portant quant à eux sur l'expression de la maladie dans des descendances issues de croisements génétiques interspécifiques, ont montré une ségrégation mendélienne de l'expression de la maladie au sein d'une population d'hybrides F1 AAB issus du croisement PKW (BB) x IDN110 T (AAAA) se traduisant par une infection BSOLV pour la moitié de la population. Des déterminants génétiques de l'expression ont été recherchés par une approche sans *a priori* de type AFLP. Dix marqueurs polymorphes ont été isolés, sept co-ségrégent avec la présence de l'infection des plantes par le BSOLV et trois avec l'absence. Ces marqueurs sont tous présents sur le génome *M. balbisiana* PKW. L'analyse de leur ségrégation sur la population F1 a permis de proposer une carte génétique contenant le locus

responsable de l'expression de BSOLV appelé locus BEL (BSV expressed locus). Ce locus est présent à l'état hétérozygote. Les mêmes analyses ont été menées pour les espèces BSIMV et BSGFV sur la même population d'hybrides indiquant que l'activation des eBSV des trois espèces virales était sous la dépendance directe pour eBSIMV et eBSOLV et indirecte pour eBSGFV du même locus BEL et du mécanisme moléculaire qu'il renferme (Lheureux, 2002). De façon intéressante, eBSOLV et eBSGFV, qui sont tous les deux situés sur le même chromosome (Chabannes, Baurens *et al.*, 2013) présentent une différence d'expression virale dans la descendance. Alors que BSOLV est retrouvé infectant 50% des individus de la population, tous porteurs de l'allèle infectieux eBSOLV-1, BSGFV n'infecte que la moitié des individus porteurs de l'allèle infectieux eBSGFV-7 soit 25% de la population totale (Lheureux, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la régulation des eBSV est plus complexe qu'initialement pensé et n'est pas exclusivement contrôlée par BEL.

Dans ce contexte, un des objectifs de ma thèse a consisté à étudier dans une descendance issue de l'hybride interspécifique CRBP39 (AAAB) la ségrégation des eBSV infectieux et l'impact des ségrégations chromosomiques sur leur régulation. Ainsi, ce chapitre se divise en deux parties. La première partie porte sur la ségrégation des eBSV infectieux dans la population d'hybrides triploïdes interspécifiques, et la deuxième partie s'intéresse à leur expression dans deux contextes de culture différents, le stress CIV et la culture en serre tropicalisée. J'ai ensuite recherché l'existence de corrélations entre l'expression des eBSV, et par conséquent leur régulation, et les marqueurs génétiques caractérisés au **Chapitre III** afin de tenter d'identifier des régions chromosomiques impliquées dans cette régulation.

IV – 2 – Génotypage eBSV

IV – 2 - 1- Génotypage eBSV chez les parents et grands parents de la population

La population étudiée lors de ce travail reproduit une des étapes du schéma de croisement 4x/2x appliqué dans les programmes d'amélioration des plantains (cf **Figure II-2.** du **Chapitre matériels et méthodes**). Le plantain triploïde interspécifique naturel French clair de constitution génomique AAB (parent femelle à améliorer) et l'hybride diploïde *M. acuminata* amélioré M 53 de constitution génomique AA (parent mâle) ont été croisés pour donner une population majoritairement allotétraploïde de constitution génomique AAAB, au sein de laquelle l'hybride de référence pour le CARBAP, CRBP39, a été sélectionné. Ce premier croisement n'a pas été réalisé dans le cadre de cette thèse, par contre les parents de

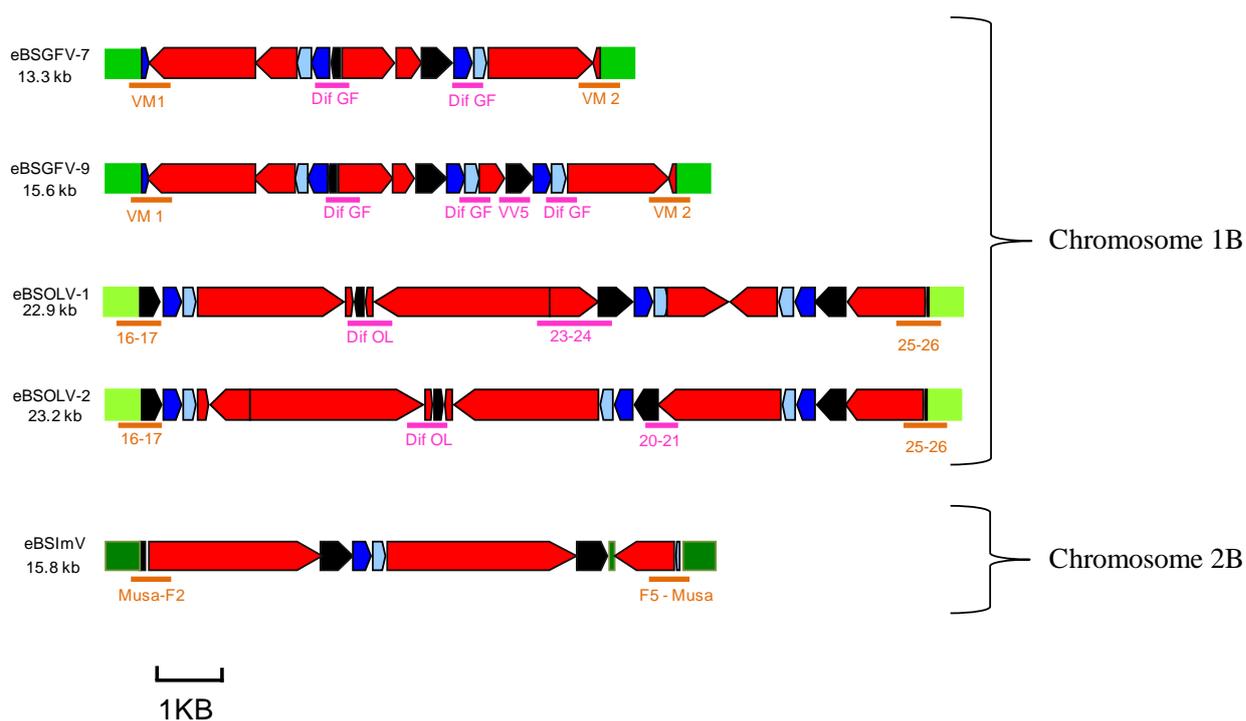


Figure IV-1: Position des marqueurs PCR et dCAPs sur les intégrations BSGFV, BSOLV et BSIMV chez PKW (d'après Gayral *et al.*, 2008, 2010 et Chabannes, Baurens *et al.*, 2013).

Les fragments amplifiés par PCR sont représentés par des lignes orange et rose correspondant respectivement aux marqueurs jonctions et allèles spécifiques.

CRBP39 ont été inclus dans le panel d'analyse. Cet allotétraploïde CRBP39 a été croisé dans le cadre de la thèse avec le diploïde *M. acuminata* spp. *malaccensis* Pahang_CARBP pour générer la population d'hybrides triploïdes interspécifiques étudiée pour mon travail. Le choix de CRBP39 et Pahang-CARBP comme parents s'est opéré suivant les critères suivants : le respect du schéma d'amélioration conventionnel des plantains, l'intérêt agronomique que revêt l'hybride CRBP39 et la disponibilité de la séquence complète du génome ainsi que l'accès à une carte génétique pour l'haploïde doublé Pahang (D'Hont *et al.*, 2012).

Le profil d'intégration eBSV des deux parents et des deux grands parents a été déterminé pour les trois espèces BSV étudiées en utilisant les marqueurs moléculaires décrits dans Gayral *et al.*, (2008) et Chabannes, Baurens *et al.*, (2013) afin d'établir le 'génotype eBSV' de chacune des plantes. Ces marqueurs comprennent des amorces PCR et des marqueurs dCAPs spécifiques des eBSV décrites et caractérisées chez PKW (eBSGFV, eBSOLV et eBSIMV). Ils sont présentés dans le **Tableau I-3** du **Chapitre I** et positionnés sur la **Figure IV-1**.

Le génotype eBSV des parents et grands-parents a été réalisé en deux étapes PCR indépendantes. J'ai tout d'abord utilisé les marqueurs « **jonctions** » spécifiques des 3 loci eBSV puisque ces marqueurs situés entre le génome de la plante et l'intégration BSV permettent d'amplifier indifféremment les deux allèles de chaque espèce BSV intégrée (eBSOLV, eBSGFV et eBSIMV). Ils présentent aussi l'avantage d'être extrêmement conservés au sein de la diversité *Musa* (Duroy, 2012). Les intégrations des parents et grands-parents ont ensuite été analysées à l'aide des marqueurs « **allèle spécifique** » pour préciser la nature des allèles présents (eBSGFV-7 et/ou 9, eBSOLV-1 et/ou 2).

Le génotype eBSV des parents et grands-parents pour les trois espèces BSV est présenté dans le **Tableau IV-1**. Les parents *M. acuminata* strict M 53 et Pahang_CARBP – AA n'ont aucun eBSV correspondant aux trois espèces BSV étudiées comme cela a été décrit pour d'autres *M. acuminata* stricts (Gayral *et al.*, 2008 ; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Par opposition, nous avons pu mettre en évidence la présence des espèces virales BSOLV et BSGFV intégrées chez les parents French clair (AAB) et CRBP39 (AAAB). Ces bananiers possèdent tous les deux les allèles infectieux eBSOLV-1 et eBSGFV-7. Le fait que ces deux plantes présentent des génotypes eBSV identiques était suspecté vu leur lien de filiation. Cela renforce aussi l'idée que le bananier hybride CRBP39 est issu de la fusion d'un gamète non

Chapitre IV - Caractérisation et activation des eBSVs

Tableau IV - 1 : Profil et génotype eBSV des parents et grands parents de la population

Banancier (génotype)	Marqueurs eBSV											Génotype eBSV
	eBSGFV				eBSOLV				eBSIMV			
	VM1 (jonction1)	VM2 (jonction2)	DifGF (Allèle-7 et/ou Allèle-9)	VV5 (Allèle-9)	16-17 (jonction1)	25-26 (jonction2)	23-24 (Allèle-1)	20-21 (Allèle-2)	DifOL (Allèle-1 et/ou Allèle-2)	Musa/F2 (jonction1)	F5/Musa (jonction2)	
French Clair (AAB)	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	eBSGFV-7 et eBSOLV-1
M 53 (AA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
CRBP39 (AAAB)	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	eBSGFV-7 et eBSOLV-1
Pahang-CARBAP (AA)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

‘+’ présence de l’eBSV ; ‘-’ absence de l’eBSV

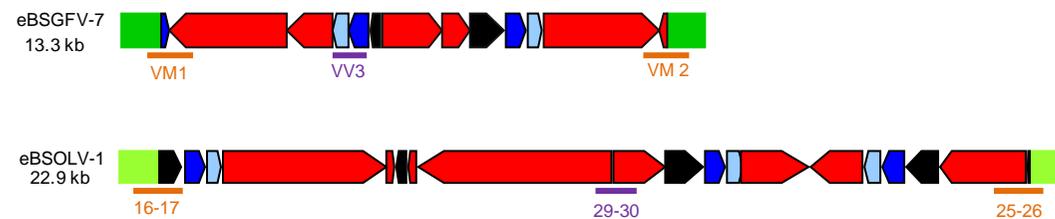


Figure IV-2: Position des marqueurs PCR et dCAPs sur les allèles infectieux eBSGFV-7 et eBSOLV-1 chez PKW (d’après Gayral *et al.*, 2008; 2010 et Chabannes, Baurens *et al.*, 2013).

Les fragments amplifiés par PCR sont représentés par des lignes orange et violettes correspondant respectivement aux marqueurs jonctions et structures.

réduit (n=3x - AAB) de French clair et d'un gamète normal (n=1x - A) de M 53 comme décrit par Vilarinhos (2004) et Tomekpe *et al.*, (2004). Le bananier CRBP39 a ainsi hérité de tout le génome maternel de French clair Le génotype eBSV de l'hybride CRBP39 est plus simple que celui décrit chez PKW puisqu'il n'a qu'un jeu de chromosome B avec les seuls allèles infectieux eBSGFV-7 et eBSOLV-1. De plus, il n'a pas d'eBSIMV. Pour la suite de mon travail je ne m'intéresserai qu'au suivi de ces deux intégrations parmi les 184 individus qui composent la population d'étude.

IV – 2 – 2. Génotypage eBSV de la descendance et analyse statistique de leur ségrégation

Le génotypage eBSGFV-7 et eBSOLV-1 chez les 184 individus de la population a été réalisé selon la même procédure que celle ayant servi à établir le génotype eBSV des parents et grands-parents. Les deux marqueurs jonctions restent inchangés et les marqueurs allèles spécifiques sont remplacés par un marqueur interne, VV3 dans le cas de l'eBSGFV-7 et 29-30 pour l'eBSOLV-1. Ces deux marqueurs internes qui permettent d'amplifier une zone réarrangée (voir **Figure IV-2**) ont été préférés aux marqueurs allèles spécifiques car comme l'allèle à détecter est connu ils sont moins onéreux à utiliser car ils ne nécessitent pas l'utilisation d'enzyme de restriction après l'étape PCR. Une plante est classée comme possédant l'intégration BSV d'une espèce lorsque l'on obtient une amplification PCR pour chacun des trois marqueurs à la taille attendue (**Figure IV-3**).

Le résultat du génotypage eBSV des 184 plantes est consigné en **Annexe 3**. Le **Tableau IV-2** ci-dessous présente le résultat synthétique déduit du tableau précédent.

Tableau IV - 2 : Tableau synthétique des résultats de génotypage eBSV de la population

Effectif (184)	Génotype eBSV		Pourcentage (%)
	eBSGFV-7	eBSOLV-1	
120	1	1	65
24	0	0	13
35	1	0	19
5	0	1	3

Légende : 1 = présence de l'eBSV ; 0 = absence de l'eBSV

Quatre cas de figure sont observés :

1- Les individus ont le même génotype eBSV que le parent femelle CRBP39 ; c'est-à-dire qu'ils possèdent les deux allèles eBSGFV-7 et eBSOLV-1 dans leur génome. C'est le cas des plantes P100, P133, P136, P145, P174 présentées à la **figure IV-3**. Les individus ne possèdent que l'allèle eBSGFV-7 comme la plante P147 **Figure IV-3 (A)**,

2- Les individus ne possèdent que l'allèle eBSOLV-1, exemple de la plante P101 **Figure IV-3. (B)** et,

3- Les individus n'ont aucun des deux allèles, plantes P158 et P200 **figure IV-3**.

Les données montrent très clairement que le génotype majoritaire est celui du parent femelle CRBP39 puisque 120 plantes sur 184 (65%) possèdent à la fois les allèles eBSGFV-7 et eBSOLV-1. On observe également que 24 plantes (soit 13%) ne possèdent aucun des eBSV et 40 plantes (soit 22%) présentent un génotype pour un des deux eBSV avec 35 plantes qui ne possèdent que l'allèle eBSGFV-7 contre 5 plantes qui ne possèdent que l'allèle eBSOLV-1. Le fait de retrouver des plantes ne possédant qu'un des deux allèles indique qu'au cours de la méiose, le chromosome-1 B du CRBP39 recombine avec un chromosome A homéologue. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus au **Chapitre III** où des recombinaisons fréquentes ont été mises en évidence pour chacun des segments de chromosomes accessibles avec les marqueurs microsatellites utilisés.

Pour rappel, les intégrations BSGFV et BSOLV sont toutes les deux sur le chromosome 1B du bananier PKW (Chabannes, Baurens *et al.*, 2013) à deux loci différents. Il est donc vraisemblable qu'il en soit de même pour le parent femelle CRBP39 (AAAB). La distribution de ces intégrations chez la population en ségrégation a été analysée par un χ^2 pour tester l'hypothèse nulle d'une ségrégation de type Mendélienne 1:1 comme attendue dans le cadre d'un appariement polysomique. Nos données indiquent que l'allèle eBSGFV-7 est présent chez 155 des 184 plantes soit 84% des plantes et que l'allèle eBSOLV-1 est présent chez 125 plantes soit 68% de la population. La fréquence attendue de ces deux intégrations dans la population est $\frac{1}{2}$ soit 50%. Le test de χ^2 indique que nous avons une distorsion de ségrégation de l'allèle eBSOLV-1 qui a une ségrégation de type intermédiaire, tandis que l'allèle eBSGFV-7 présente une ségrégation en faveur d'une présence en double dose chez CRBP39 (**Tableau IV-3-A**).

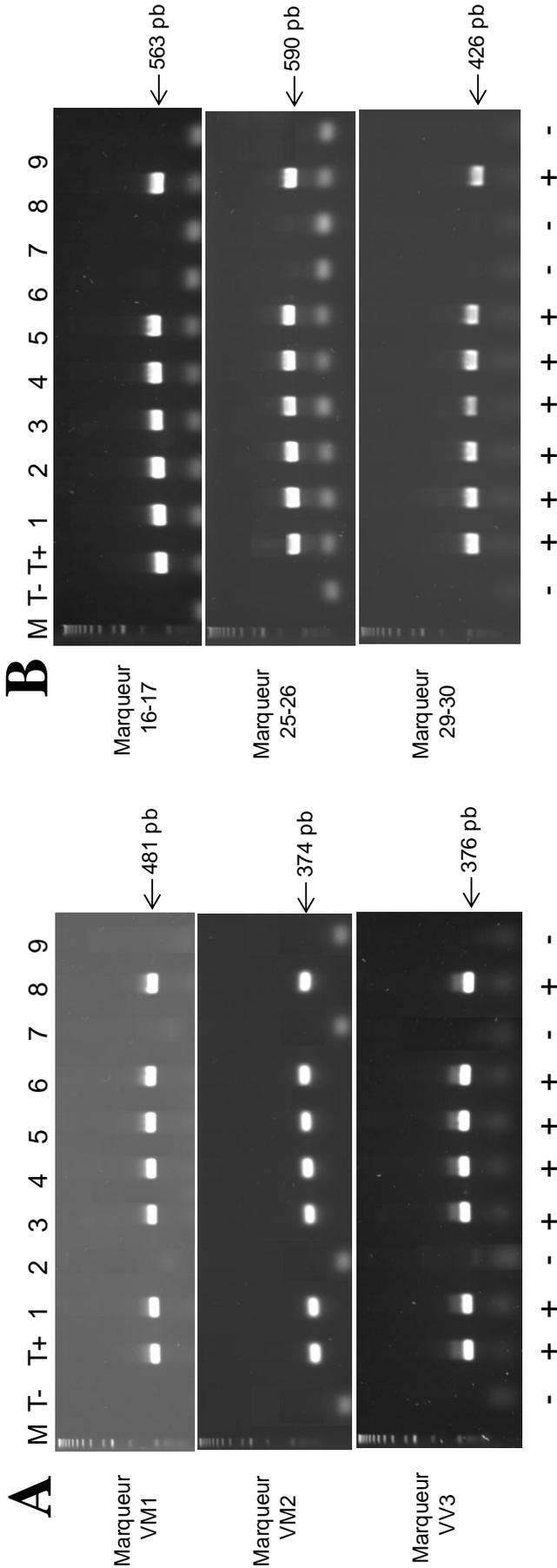


Figure IV-3 : Génotypage eBSGFV-7 et eBSOLV-1 chez 9 individus de la population CRBP39 x Pahang_Carbap à l'aide des marqueurs spécifiques. La taille de l'amplicon attendue est indiquée à droite de chacun des deux gels.

A : Génotypage eBSGFV-7 à l'aide des 3 marqueurs PCR spécifiques (2 marqueurs jonction - VM1 et VM2, et un marqueur interne - VV3-).
B : Génotypage eBSOLV-1 à l'aide des 3 marqueurs PCR spécifiques (2 marqueurs jonction - 16-17 et 25-26 -, et un marqueur interne - 29-30).
 L'eau et l'ADN génomique de PKW sont respectivement utilisés comme témoins négatif et positif. (+) = présence de l'eBSV; (-) = absence de l'eBSV. Les échantillons 1 à 9 correspondent respectivement aux hybrides P100, P101, P133, P136, P145, P147, P158, P174 et P200 issus de la population en ségrégation.

L'analyse de la méiose du CRBP39 a permis de mettre en évidence une distorsion de ségrégation pour certains loci SSR (cf **Chapitre III**). Nous avons remarqué la transmission de 3 allèles de CRBP39 chez certains individus (64 plantes). Le chromosome 1 était impliqué pour la plupart des cas observés avec 48 plantes à gamète aneuploïde 3x. Nous avons donc réalisé un deuxième test de χ^2 en éliminant ces individus aneuploïdes 3x de l'effectif. Nous avons une ségrégation normale de l'allèle eBSOLV-1 tandis que l'allèle eBSGFV-7 présente toujours une ségrégation en faveur d'une présence en double dose chez CRBP39 (**Tableau IV-3-B**).

Tableau IV – 3 : Détermination du type de ségrégation eBSV suivant un test de χ^2

Tableau IV – 3-A : Test de χ^2 réalisé sur l'effectif total de la population (184 plantes)

GL	allèles	absent	présent	χ^2 simple dose (p-value)	χ^2 double dose (p-value)	Type de ségrégation
	eBSOLV-1	59	125	0,000*	0,000*	biaisé
1	eBSGFV-7	29	155	0,000*	0,742	'double dose'

Tableau IV – 3-B : Test de χ^2 réalisé sur l'effectif total de la population moins les individus à gamète du chromosome 1 triploïde chez CRBP39 (136 plantes)

GL	allèles	absent	présent	χ^2 simple dose (p-value)	χ^2 double dose (p-value)	Type de ségrégation
	eBSOLV-1	57	79	0,06	0,000*	Simple dose
1	eBSGFV-7	29	107	0,000*	0,15	'double dose'

Légende : GL = groupe de liaison ; (*) = distorsion de ségrégation ; valeur seuil = 0,05

IV – 3 - Activation eBSV

Pour favoriser une infection issue des eBSV, nous avons soumis les plantes à deux conditions de culture différentes : un stress suite au maintien en 'culture *in vitro*'- CIV et la culture en 'serre tropicalisée' qui peut dans notre cas s'apparenter à une combinaison de stress hydriques et thermiques. Tous ces stress abiotiques sont décrits comme des stress activateurs des eBSV (Dahal *et al.*, 1998b ; Dallot *et al.*, 2001 ; Côte *et al.*, 2010).

La détection des particules virales s'est faite au final sur 136 individus de la population car 48 plantes sont mortes en CIV (infection, dégénérescence du méristème) au cours des 6 à 8 repiquages que l'ensemble des plantes de la population ont subi avant leur

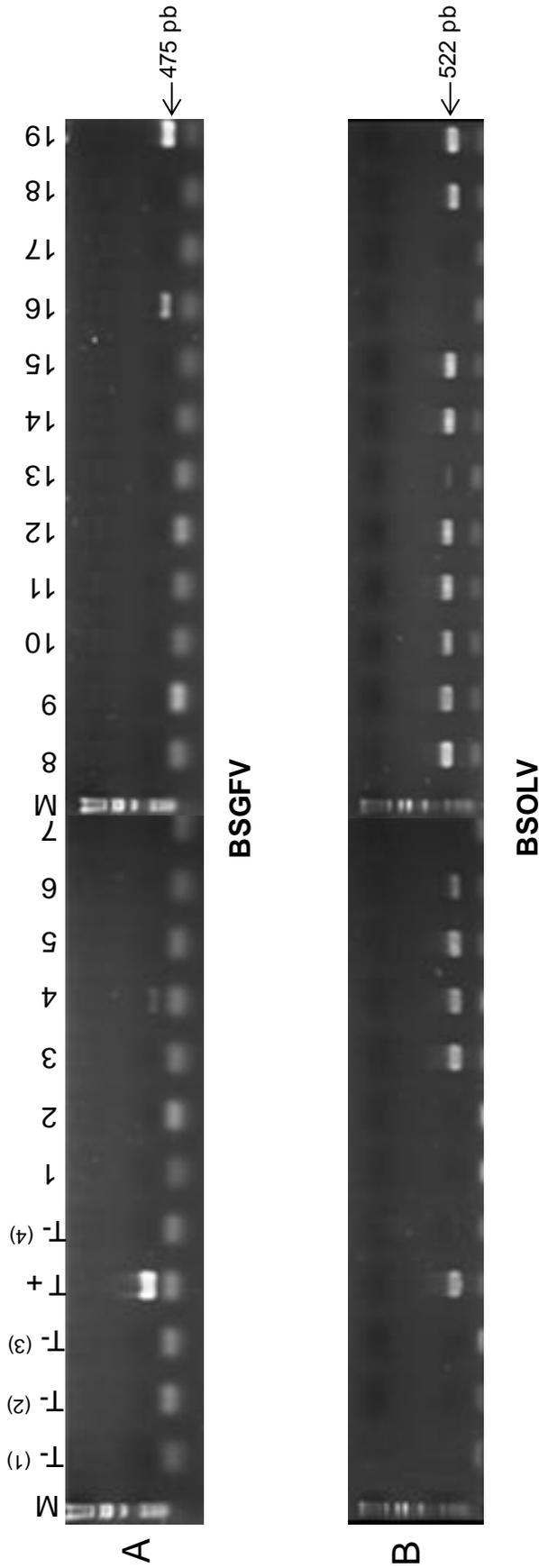


Figure IV-4 : Phénotypage BSV par IC-DNAse-PCR pour 19 individus de la population CRBP39 x Pahang_Carbap.

Détection de BSGFV (A) et de BSOLV (B) à l'aide d'amorces spécifiques de chacune des espèces BSV (cf **Chapitre II - Matériel et méthodes**).

T- (1) : H₂O; T- (2) : Bananier Cavendish sain ; T- (3) : Bananier PKW naturellement résistant aux BSV ; T- (4) : témoin tampon, (absence de broyat de plante); T+ : Bananier Cavendish infecté par l'espèce BSV recherchée. Les échantillons 1 à 19 correspondent respectivement aux hybrides P106, P109, P114, P123, P124, P126, P127, P129, P131, P133, P134, P135, P136, P137, P139, P140, P141, P142, P143 issus de la population en ségrégation.

passage en serre. Pour le stress 'CIV', la détection des particules virales s'est faite sur des échantillons de feuilles prélevés lors du sevrage et transfert des plantes en serre au mois de septembre. En ce qui concerne le stress 'serre tropicalisée', nous avons effectué deux prélèvements, le premier en milieu d'hiver (février - 5 mois après le sevrage des plantes) et le second en début d'été (juin - 9 mois après le sevrage des plantes) comme décrit au paragraphe **II-2-7.2.a.** du **Chapitre Matériels et méthodes**. Les particules virales sont détectées par la technique d'Immunocapture-PCR (IC-PCR). Cette technique utilise un sérum spécifique du BSV pour capturer les virions au sein d'un broyat de plante. C'est à partir de ces particules virales qu'est ensuite réalisée la PCR qui va amplifier une partie du génome viral (Le Provost *et al.*, 2006). Cette technique est une des deux seules avec l'ELISA qui permette de différencier les virions des eBSV qui présentent une identité de séquences d'acides nucléiques parfaite. Néanmoins et afin d'éviter une amplification possible à partir d'ADN résiduel présent dans les tubes, une étape DNase est réalisée évitant l'obtention de faux positifs. Le diagnostic de l'espèce virale se fait en utilisant des amorces spécifiques de chacune des deux espèces BSV. Une plante est considérée comme infectée lorsque l'on obtient une amplification PCR de la séquence de la souche virale à la taille attendue (**Figure IV-4**). Les résultats de diagnostic de l'infection BSV des 136 individus de la population sont présentés en **Annexe 4** et une synthèse est présentée dans le **Tableau IV-4**.

Les effectifs de plantes infectées ne varient pas entre le stress 'CIV' et le premier phénotypage réalisé en serre tropicalisée (S.1 = + 5 mois) pour les deux espèces BSV, nous n'avons pas intégré les résultats S.1 dans notre analyse. Nous avons par conséquent considéré que les plantes nouvellement infectées en serre (S.2) étaient dues à ce stress et non au stress CIV. Toutes les plantes ont été systématiquement analysées à chacun des tests. Les plantes nouvellement infectées lors du dernier test ont été validées par une répétition de l'analyse.

Les résultats dans leur globalité montrent que les plantes ne possédant pas d'intégration BSV (21 plantes) ne sont pas infectées ceci est en accord avec le statut *insect-proof* de la serre tropicalisée validant l'absence de contamination par cochenilles. Nous constatons que seules 66 plantes parmi les 115 ayant des eBSV infectieux sont au final infectées avec majoritairement une infection par BSOLV (70,3% des cas contre 6,2% pour une infection BSGFV). Une différence entre les deux types d'infection est également notée pour les deux modalités de stress. L'infection BSOLV est prononcée suite au stress 'CIV' (61,5% de plants infectés) par rapport à l'infection additionnelle enregistrée suite au passage

en serre (22,8% de plants infectés) alors que celle de BSGFV ne montre pas de réelle différence avec 2,6% et 3,6% respectivement.

L'analyse du génotype eBSV des hybrides bananiers montre que 64 des 88 plantes possédant les deux intégrations infectieuses (eBSGFV-7 + eBSOLV-1) sont infectées par au moins une espèce BSV (soit 73%). D'autre part, BSOLV est l'infection majoritaire (62 plantes) aussi bien suite au stress 'CIV' (51 plantes) que lors de la culture en serre tropicalisée (8 plantes). L'infection BSGFV est faible (7 plantes). Elle est associée à BSOLV pour les deux modalités de culture (3 et 2 plantes respectivement) et n'est enregistrée, seule, que pour la culture en serre (2 plantes).

Chez les plantes ne possédant qu'une seule des deux intégrations BSV infectieuses, seule les plantes de génotype eBSOLV-1 sont infectées. Ces plantes présentent une infection préférentiellement suite au stress CIV puisque deux des trois plantes (66,7%) sont infectées, et que la dernière plante n'est toujours pas infectée suite au passage en serre. Concernant les plantes de génotype eBSGFV-7, aucune des 24 plantes n'est infectée que ce soit suite au stress 'CIV' ou 'serre'.

Nos données suggèrent aussi que l'activation d'eBSOLV-1 est indépendante de la présence de l'eBSGFV-7 puisque le pourcentage d'expression de BSOLV est similaire que les plantes possèdent les deux intégrations (eBSOLV-1 et eBSGFV-7) ou seulement l'intégration eBSOLV-1. En effet, on obtient 70% de plantes infectées par BSOLV lorsque les plantes possèdent les deux intégrations (62 plantes sur 88) contre 67% pour les plantes ne possédant qu'eBSOLV-1 (2 plantes sur 3). Dans ce dernier cas, ces résultats devront être confirmés sur un plus grand nombre de plantes et/ou pour des croisements similaires. Par contre, chez les plantes possédant l'intégration BSGFV, les seules plantes qui expriment le virus (7 plantes) possèdent les intégrations des deux espèces BSV (génotype : eBSGFV + eBSOLV).

De façon intéressante et contrairement à ce que l'on observe pour eBSOLV-1, l'activation de l'eBSGFV-7 pourrait être dépendante du génotype eBSV de la plante. On remarque en effet que seules les plantes qui possèdent les deux intégrations (eBSGFV-7 et eBSOLV-1) expriment le BSGFV. Ces résultats doivent cependant être « relativisés » vu le faible nombre de plantes exprimant du BSGFV (7 plantes) ; soit beaucoup moins que l'effectif observé pour BSOLV (64 plantes) malgré un effectif de plantes plus important (112 plantes avec eBSGFV-7 contre 91 plantes avec l'eBSOLV-1).

Chapitre IV - Caractérisation et activation des eBSVs

Tableau IV - 4 : Tableau synthétique du diagnostic BSV de la population CRBP 39 x Pahang

Type d'intégration	Effectifs traités (136)	Effectifs infectés (BSV)								TOTAL	
		CIV				SERRE				Plantes Infectés	Plantes saines
		BSGFV	BSOLV	BSGFV + BSOLV	Total infection	BSGFV	BSOLV	BSGFV + BSOLV	Total infection		
Sans eBSV	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21
Avec eBSV	115									66	49
eBSGFV-7 + eBSOLV-1	88	0	49+2*	3	54 (61,5%)	2	8	2*		64	24
eBSGFV-7	24	0	0	0	0 (0%)	0	0	0		0	24
eBSOLV-1	3	0	2	0	2 (66,7%)	0	0	0		2	1
Total eBSGFV-7	112	0		3	2,6%	2		2	3,6%	7 (6,2%)	105
Total eBSOLV-9	91		53	3	61,5%		8	0	22,8%	64 (70,3%)	27

Légende : CIV = culture *in vitro* ; (*) = plantes infectées par BSOLV en CIV puis par BSGFV+BSOLV en serre

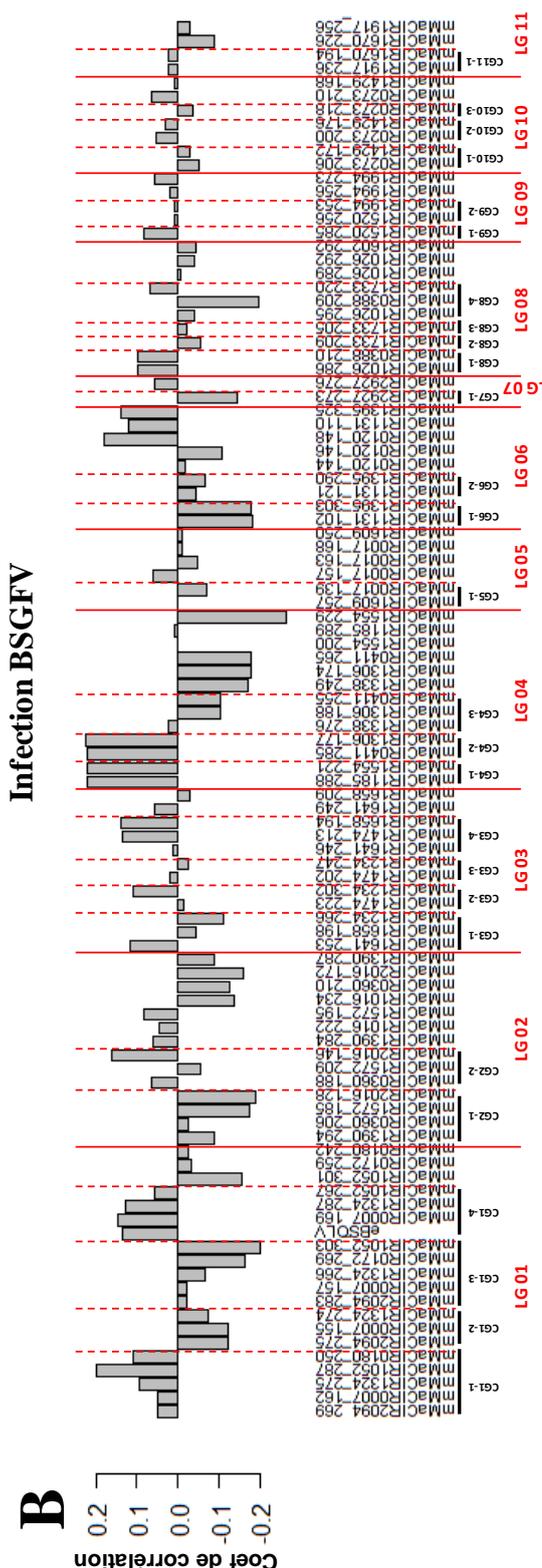
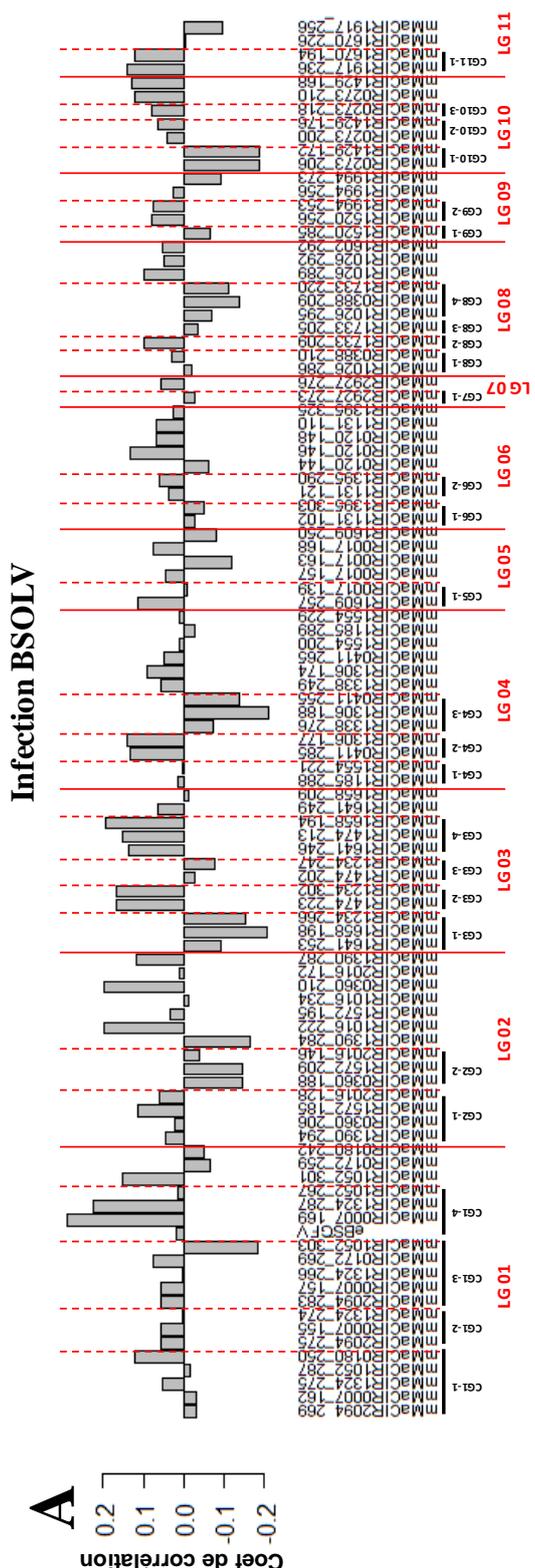


Figure IV-5 : Analyse de la corrélation entre marqueurs SSR/eBSV et les infections par BSGFV ou BSOLV. Les histogrammes représentent le coefficient de corrélation entre chaque marqueur et l'expression de BSOLV (A) ou BSGFV (B). Les marqueurs SSR et eBSV sont ordonnés par groupe de liaison et groupe de co-ségrégation (cf Chapitre III).

IV – 4 - Analyse de corrélations entre la ségrégation des marqueurs SSR/eBSV et l'infection virale

Nous avons à l'aide de la méthode de Pearson recherché des corrélations entre l'expression des eBSV et la ségrégation des marqueurs SSR utilisés au **Chapitre III** qui ont servi à suivre la distribution des allèles A et B chez la descendance hybride. Cette analyse vise à identifier des régions du ou des génome(s) parental (aux) qui seraient impliquées dans la régulation positive (activation) ou négative (non activation) de chacune des intégrations BSV de notre système d'étude (eBSGFV-7 et eBSOLV-1).

L'analyse s'est faite en trois étapes pour chaque espèce BSV. Nous avons tout d'abord réalisé une recherche de corrélation en utilisant un modèle linéaire général (GLM) sans statistiques associées. Nous avons ensuite mené deux analyses statistiques séparées pour rechercher dans un premier temps l'effet de chaque marqueur pris individuellement sur l'expression d'eBSOLV-1 et/ou d'eBSGFV-7 et dans un second temps l'effet par combinaison de marqueurs deux à deux. Les analyses statistiques n'ont porté que sur 115 des 136 plantes précédemment génotypées car 21 plantes ne possèdent aucun eBSV donc aucune infection virale.

L'analyse des corrélations marqueur par marqueur montre que certains marqueurs corrélaient avec l'activation ou la non activation des eBSV même si le coefficient de corrélation reste faible ($r < 0,30$) (**Figure IV - 5**). A titre d'exemple, le marqueur mMaCIR1554_229 du groupe de liaison 4 est plus corrélé avec l'absence d'infection BSGFV ($r = - 0,26$) alors que le marqueur mMaCIR0007_169 du groupe de liaison 1 (groupe de co-ségrégation CG1-4 – **Figure IV – 6-A**) est celui qui est le plus corrélé avec l'infection BSOLV ($r = 0,29$). Les analyses statistiques marqueur par marqueur vont dans le même sens puisque le marqueur mMaCIR0007_169 est le plus significativement associé avec l'infection BSOLV suivi par le marqueur mMaCIR1324_287 lui aussi présent sur le groupe de liaison 1 et le CG1-4 (**Figure IV – 6-A**). Concernant l'infection BSGFV, le mMaCIR1554_229 identifié lors de l'analyse précédente n'arrive qu'en 7^{ème} position par ordre décroissant de significativité mais de façon intéressante, les deux marqueurs les plus significatifs mMaCIR0411_265 et mMaCIR1306_174 (CG4-4) sont aussi situés sur le groupe de liaison 4 et sont eux aussi négativement corrélés à l'infection BSGFV (**Figure IV – 6-B**). Toutefois, aucune corrélation n'est statistiquement significative car la correction pour les tests multiples (102 marqueurs donc 102 variables explicatives) a fortement réduit la puissance de notre test. Cette analyse

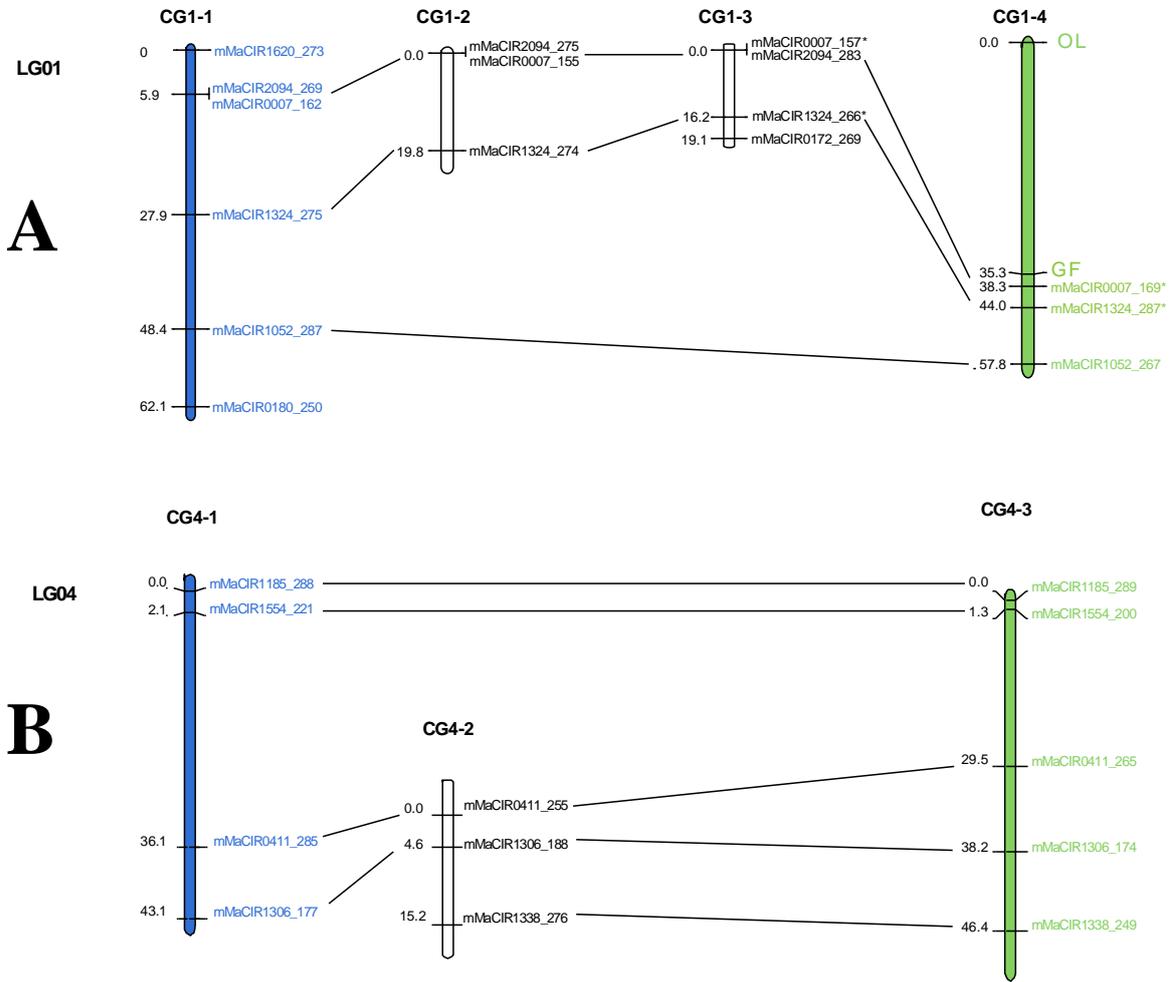


Figure IV-6 : Carte génétique des groupes de liaison 1 (A) et 4 (B) de l'allotétraploïde CRBP39 (AAAB)

Les 4 groupes de co-ségrégations (CG) sont représentés pour chacun des groupes de liaison. La carte a été construite à l'aide de 107 loci microsatellites utilisés pour caractériser la population en ségrégation CRBP39 x Pahang_CARBP à l'exclusion des individus possédant un gamète trisomique du CRBP39.

La couleur verte indique les loci du génome B et la couleur bleue indique les loci du M53 (AA) qui est le parent male du CRBP39. Les loci distordus sont indiqués par des astérisques et les doubles lignes de CG indiquent le faible taux de liaison entre loci.

semble cependant indiquer que la régulation de chacun des deux eBSV est différente ce qui corrobore les résultats de Côte *et al.*, (2010) et Lheureux (2002). L'analyse des corrélations entre allèles 2 à 2 n'a pas permis de mettre en évidence d'interaction double significative quelle que soit l'espèce virale étudiée car le test perd considérablement en puissance du fait de la multiplicité des combinaisons testées.

IV – 5 – Discussion

IV – 5 – 1. Ségrégation des eBSV chez la population d'étude

Sur la base des connaissances acquises récemment lors de la caractérisation des eBSV présents chez le bananier à graines diploïde *M. balbisiana* PKW, nous avons choisi de suivre la ségrégation et l'activation des eBSV chez un allotétraploïde au profil eBSV simplifié. En effet, le CRBP39 ne contient qu'un génome B et le génotypage des eBSV par les marqueurs développés par Chabannes, Baurens *et al.* (2013) montre que cet hybride ne possède que les allèles infectieux eBSOLV-1 et eBSGFV-7 correspondant aux intégrations BSV des espèces Obino l'Ewai et Goldfinger respectivement. Ces deux intégrations sont portées par le Chromosome 1 à deux loci différents chez PKW et supposées présentes sur le même chromosome chez CRBP39 puisque leur environnement génomique est extrêmement bien conservé au sein de la diversité *M. balbisiana* (Duroy, 2012). Il est néanmoins indispensable de réaliser une hybridation *in situ* en fluorescence sur chromosome pour confirmer leur localisation exacte. Le diploïde *M. acuminata* Pahang_CARBAP (AA) ne possède aucune intégration BSV dans son génome. L'ensemble de ces données indique donc que les intégrations BSV présentes chez les individus de la population d'étude sont uniquement transmises par le parent femelle CRBP39.

Le génotypage eBSV de l'ensemble des individus de la population a permis de mettre en évidence que la majorité des plantes (120 plantes sur 184) possédait un génotype identique au parent CRBP39 avec la présence des deux allèles. De façon plus inattendue, nous avons aussi pu mettre en évidence que 40 plantes n'arboraient qu'une seule des deux intégrations BSV parmi lesquelles 35 plantes possédaient l'eBSGFV-7 et 5 plantes l'eBFSOLV-1. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'existence de recombinaisons entre le chromosome 1B qui porterait les deux allèles et un (ou plusieurs) chromosome (s) A qui lui serait homologue ou homéologue au cours de la méiose chez CRBP39. Ces données corroborent celles présentées au **Chapitre III** où nous avons pu établir des recombinaisons

entre génomes A et B à la méiose chez CRBP39 à l'aide de marqueurs SSR. Ces données renforcent et complètent des travaux précédents portant sur l'étude de la structure du génome des bananiers interspécifiques cultivés réalisée par D'Hont *et al.* (2000) et D'Hont (2005) en utilisant la technique d'hybridation génomique *in situ* (GISH) qui montraient que les chromosomes de ces plantes pouvaient être constitués de fragments des deux génomes A et B. Plus récemment, Jeridi *et al.* (2012) ont observé par cette même technique des appariements entre certains chromosomes homéologues A et B chez le bananier hybride interspécifique 'Kunnan 4x' à la métaphase 1 de la méiose. Ces appariements sont souvent partiels et localisés aux zones centromériques et péricentromériques (D'Hont *et al.*, 2000 ; D'Hont, 2005 ; Jeridi *et al.*, 2011). Le génotypage eBSV a également permis de mettre en évidence que 24 plantes ne possèdent aucune intégration BSV. Ce résultat permet d'envisager des perspectives extrêmement intéressantes en terme d'amélioration génétique du bananier car pour la première fois nous montrons au travers de ce travail de thèse qu'il est possible d'obtenir des bananiers dépourvus d'eBSV mais contenant tout de même du patrimoine génétique *M. Balbisiana*.

L'analyse de la distribution des eBSVs chez la population en ségrégation a montré que la fréquence observée de chacune de ces deux intégrations était significativement différente de la fréquence attendue dans le cas d'une ségrégation de type Mendélienne 1:1 pour un appariement polysomique. On observe en effet une surreprésentation des deux intégrations, eBSGFV-7 et eBSOLV-1, qui sont présentes dans 155 et 125 des 184 plantes de la population soit 84% et 68% respectivement. Ces résultats sont contraires à nos premières hypothèses où nous avons envisagé une faible représentativité des intégrations dans la population finale liée à une mortalité précoce (lors du sauvetage d'embryons par exemple) de plantes infectées suite au réveil des séquences intégrées. La surreprésentation des eBSV peut néanmoins s'expliquer par la présence fréquente de gamètes à trois allèles chez CRBP39. En effet, d'après les résultats présentés au chapitre précédent, il y a 48 plantes sur les 184 analysées qui possèdent une copie surnuméraire du chromosome 1B ou une qui contient très certainement les eBSV. De façon intéressante, cette formation importante d'individus aneuploïdes pour le chromosome 1B explique la distorsion de ségrégation de l'allèle eBSOLV-1 qui passe d'une ségrégation de type intermédiaire (cf **Tableau IV-3 A**) lorsqu'elle est calculée sur l'ensemble des individus de la population, à une ségrégation simple dose lorsque l'on élimine les individus issus de gamètes 3n (cf **Tableau IV-3 B**). Ce phénomène ne permet en revanche pas d'expliquer le biais de ségrégation de l'allèle eBSGFV-7 qui garde

une ségrégation double dose que l'on considère les individus aneuploïdes ou non. Deux explications principales pourraient expliquer ce biais de ségrégation d'eBSGFV-7. Il pourrait tout d'abord être effectivement présent en deux copies sur le génome du CRBP39 suite à des problèmes méiotiques rencontrés lors de la formation des gamètes du French Clair qui est le parent du CRBP39 porteur des eBSV ou plus en amont lors de la formation des gamètes d'un des géniteur du French Clair. Il paraît donc essentiel de réaliser des expériences d'hybridation *in situ* en fluorescence sur chromosome pour le CRBP39 et le French Clair pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Une autre explication consiste à penser qu'il existerait un (ou plusieurs) gène (s) essentiels pour la plante qui favorisera(en)t la sélection de ce locus dans la descendance et rendrait ainsi compte de la distorsion de ségrégation observée. Ce ou ces gènes seraient présents sur le chromosome 1B et physiquement plus proche de l'eBSGFV-7 que de l'eBSOLV-1 ce qui expliquerait le nombre plus important de plantes possédant l'eBSGFV-7 seul (35 plantes) que de plantes possédant l'eBSOLV-1 seul (5 plantes). Cette hypothèse de sélection adaptative est similaire à celle formulée par Hippolyte *et al.* (2010) pour expliquer la distorsion de ségrégation de PLG3 (Pisang Lilin linkage group 3) chez un bananier *M. acuminata*.

IV – 5 – 2. Infection des plantes par le BSV

Pour rappel, signalons que la détection des particules virales ne s'est faite que chez 136 individus de la population car 48 plantes sont mortes en CIV au cours des 6 à 8 repiquages de la population en CIV et au cours du sevrage des plantes lors du passage en serre. Le phénotypage BSV suite au stress CIV montre très clairement que le pourcentage de plantes triploïdes AAB issues du croisement CRBP39 x Pahang_CARBAP exprimant BSOLV (61%) est très nettement supérieur à celui de plantes exprimant BSGFV (2,6%) indiquant une régulation différentielle de ces deux espèces BSV intégrées. Ces données sont en accord avec des études précédentes qui ont décrit des taux d'activation d'eBSOLV toujours supérieur à ceux d'eBSGFV en CIV chez des hybrides interspécifiques allotriploïdes (AAB) artificiels issus du croisement entre PKW (BB) et IDN110 T (AAAA) (Lheureux, 2002) ou des hybrides interspécifiques allotriploïdes (AAB) naturels (plantains Kelong Mekintu et Black Penkelon) et allotétraploïdes (AAAB) artificiels (CRBP39 et FHIA21) (Côte *et al.*, 2010). Les analyses de corrélations effectuées entre la ségrégation des marqueurs SSR et les infections virales BSOLV ou BSGFV au sein de la population triploïde ségrégeante renforcent l'idée d'une régulation distincte des deux eBSV à l'origine des infections observées. On remarque en effet que les corrélations les plus fortes concernent des marqueurs

situés sur le chromosome 1 pour expliquer l'activation d'eBSOLV-1 et sur le chromosome 4 pour expliquer la répression d'eBSGFV-7. Ces analyses statistiques restent néanmoins préliminaires et devront être répétées pour identifier plus précisément les régions chromosomiques (ou les loci) impliqué(e)s dans la régulation de ces deux eBSV une fois que la carte génétique du CRBP39 aura été densifiée. Néanmoins, il est intéressant de noter que ces données bien que préliminaires corroborent les travaux de Lheureux (2002) et Lheureux *et al.* (2003). Ces auteurs ont en effet démontré, en caractérisant une population triploïde issue du croisement PKW (BB) x IDN110 T (AAAA), que l'activation de l'eBSOLV était sous le contrôle d'un facteur génétique hétérozygote nommé BEL (BSV expressed Locus) porté par le génome *M. Balbisiana*. Ils ont montré que BEL était situé à proximité de l'intégration BSOLV. On peut donc à la lumière des connaissances actuelles positionner BEL sur le chromosome 1. En parallèle ils ont pu montrer que l'activation de l'intégration BSGFV était régulé en *trans* par BEL. Les données obtenues au cours de notre travail avec un croisement différent de celui étudié par Lheureux, 2002 semblent indiquer que les mécanismes de régulation d'eBSOLV-1 et d'eBSGFV-7 sont bien conservés chez *M. balbisiana*. On observe en effet, une très forte expression de BSOLV quel que soit le génotype eBSV de l'hybride (eBSOLV-1 + eBSGFV-7 et eBSOLV-1 seul) ce qui est compatible avec le fait que l'eBSOLV-1 et BEL soit lié ou génétiquement proches. Les résultats d'expression de BSGFV renforcent aussi l'idée d'un facteur de régulation physiquement proche d'eBSOLV-1 car les 24 plantes dépourvues d'eBSOLV-1 n'expriment pas BSGFV contrairement aux plantes ayant à la fois l'eBSOLV-1 et l'eBSGFV-7. Il faut néanmoins garder à l'esprit que le pourcentage d'expression de BSGFV est très faible (6,2%) ce qui rend l'interprétation des résultats plus difficile. Il sera donc essentiel de valider ces observations sur un plus grand nombre d'individus ou sur d'autres hybrides 3x possédant l'eBSGFV-7 mais dépourvus d'eBSOLV-1 issus d'un schéma de croisement 4x/2x similaire. De tels individus sont actuellement disponibles au CARBAP. Le faible nombre de plantes infectées par BSGFV au cours de ce travail semble indiquer que les conditions favorables à l'activation de l'eBSGFV-7 n'aient pas été réunies lors de nos différentes expériences en CIV ou en serre (voir ci-dessous). Il est possible aussi que l'eBSGFV-7 ne soit pas exclusivement contrôlée par BEL mais que sa régulation soit multifactorielle. Les analyses de corrélations entre expression virale et marqueurs SSR vont dans ce sens avec certainement un facteur réprimant l'expression de BSGFV situés sur le chromosome 4. Néanmoins il est évident que le très faible nombre de plantes exprimant BSGFV « biaise » l'analyse de corrélation et met en avant un ou des

facteurs de répression de l'expression de BSGFV qui joue(nt) peut-être un rôle mineur lorsque les conditions d'expression de l'eBSGFV-7 sont optimales.

L'étude de l'activation des eBSV du CRBP39 cultivé en condition naturelle au champ après une micro propagation par CIV a permis à Côte et à ses collaborateurs de mettre en évidence que les eBSV de ce tétraploïde artificiel étaient différentiellement régulés par rapport à leur expression en CIV (M.-L. Iskra-Caruana, communication personnelle). Contrairement à la CIV où l'expression de BSOLV est très forte et celle de BSGFV négligeable ou absente, tous les plants de CRBP39 cultivés au champ expriment presque exclusivement BSGFV au détriment de BSOLV. Il nous a donc paru intéressant de vérifier en serre si cette observation terrain se confirmait dans le cadre de cette étude qui a porté sur des descendants triploïdes ayant le CRBP39 comme parent. Nos données indiquent clairement que ce n'est pas le cas puisque le nombre de plantes exprimant du virus suite au premier phénotypage BSV réalisé 5 mois après avoir introduit les plantes à la serre reste identique à celui obtenu après le stress 'CIV' et varie assez faiblement lors du second phénotypage réalisé 9 mois après le sevrage. Pour exemple, l'expression BSGFV est similaire que ce soit à la serre ou en CIV (3,6 contre 2.6 % respectivement). Les différences observées entre cette étude et celle menée par Côte *et al.*, peuvent s'expliquer d'au moins deux manières. Il semble tout d'abord que les conditions de culture des bananiers dans nos serres tropicalisées à Montpellier ne sont pas suffisamment stressantes car relativement proches des conditions optimales de culture pour expliquer le faible pourcentage d'activation des séquences intégrées. La seconde raison est que nous avons étudié ici une descendance triploïde issue de CRBP39 x Pahang_CARBP alors que Côte *et al.* ont étudié directement le CRBP39. Il pourrait donc y avoir un effet ploïdie et/ou un effet du génome A de Pahang_CARBP sur l'expression des eBSV. Des études complémentaires devront être réalisées pour tenter de répondre à ces deux questions.

IV – 6 - Conclusion

Les marqueurs eBSV localisés sur le chromosome 1 nous ont permis de montrer qu'au cours de la méiose chez l'hybride allotétraploïde CRBP39, les recombinaisons homéologues ont lieu entre chromosomes A et le chromosome 1B. Nous avons à l'aide de ces marqueurs eBSV noté une distorsion de ségrégation des eBSV chez la descendance avec 87% de plantes possédant au moins une intégration BSV. Ce résultat est soutenu par ceux obtenus avec les marqueurs SSR au **Chapitre III** et par les résultats antérieurs de

Chapitre IV – Caractérisation et activation des eBSVs

cytogénétiques (GISH) (D'Hont *et al.*, 2000; D'Hont, 2005 ; Jeridi et al. 2011). Parmi les plantes phénotypées (136 plantes), bien que nous ayons plus de plantes avec l'eBSGFV-7 (112 plantes), le taux d'activation est plus élevé chez les plantes possédant l'eBSOLV-1 (91 plantes) avec 70,3% des plantes qui expriment le virus contre seulement 6,2% pour l'eBSGFV. L'analyse statistique des corrélations entre marqueurs SSR et eBSV et l'infection des plantes par les deux espèces BSV de notre système d'étude (BSGFV et BSOLV) montrent que les facteurs impliqués dans la régulation de ces deux eBSVs sont différents. Les facteurs de régulation (positive) de l'eBSOLV sont localisés sur le chromosome 1 tandis que les facteurs de régulation (négative) de l'eBSGFV sont quand à eux localisés sur le chromosome 4 laissant suggérer que la régulation des eBSV est sous le contrôle de QTLs différents.

CHAPITRE V

**Discussion générale,
Perspectives
et Conclusion**

Ségrégation des chromosomes dans un croisement AAAB x AA

Chez les eucaryotes, l'appariement des chromosomes au cours de la méiose est un préalable à la ségrégation correcte des chromosomes dans les gamètes. Beaucoup de polyploïdes ont une origine hybride (*allopolyploïde*) et présentent plusieurs jeux de chromosomes apparentés bien que partiellement divergents (*homéologues*) (Liu *et al.*, 2009). Différentes situations sont observées concernant les possibilités d'appariements entre chromosomes homéologues qui conditionnent les possibilités de recombinaisons intra-chromosomiques entre les différents génomes fondateurs des allopolyploïdes (Gaeta et Pires, 2010). Les recombinaisons homéologues peuvent générer des nouvelles combinaisons de gènes et donc de phénotypes mais peuvent aussi déstabiliser les caryotypes et entraîner des perturbations à la méiose et des réductions de fertilité. La sélection naturelle tend donc à stabiliser les appariements (Gaeta et Pires, 2010). Ainsi chez certaines espèces comme le blé tendre ou le colza, il existe des gènes suppresseurs/régulateurs des appariements entre chromosomes homéologues (Cifuentes *et al.*, 2010). Chez d'autres espèces comme la canne à sucre ces appariements homéologues sont possibles (D'Hont *et al.*, 1996; Jannoo *et al.*, 2004).

L'analyse de la méiose chez les hybrides interspécifiques de bananier par cytogénétique conventionnelle (Dodds et Simmonds, 1948; Agarwal, 1988; Shepherd 1999) suggérait depuis longtemps la présence d'appariements homéologues à la méiose entre les génomes A et B. Cela a récemment été démontré par GISH chez plusieurs hybrides interspécifiques (Jeridi *et al.*, 2011). Chez un allotetraploïde (AABB), issu du doublement à la colchicine d'un hybride naturel AB, Jeridi *et al.* (2012) ont montré que les chromosomes ne s'apparient pas uniquement entre homologues (c'est-à-dire sur un mode strictement disomique) mais qu'il existe un pourcentage significatif de bivalents homéologues. De plus, des multivalents impliquant des chromosomes des deux espèces sont observés pouvant suggérer la présence de variations structurales entre les génomes A et B. Au niveau moléculaire, une comparaison de séquences de clones BAC provenant des génomes A et B a permis de mettre en évidence une conservation importante de la micro-synténie au niveau de régions riches en gènes (Lescot *et al.*, 2008). Par contre, le contenu en séquences répétées des deux espèces reste cependant assez différent (Baurens *et al.*, 1997).

L'étude des appariements lors de la méiose d'hybrides constitués de différentes sous-espèces de *M. acuminata* a depuis longtemps permis de suspecter la présence de variations

structurales (de type translocation) entre les chromosomes de ces sous-espèces (Shepherd 1999). Les anomalies méiotiques qui en découlent sont tenues pour responsables, au moins en partie, de la faible fertilité des hybrides inter-subspécifiques. Les analyses de cartographie génétique ont, de la même façon, mis en évidence d'importantes distorsions de ségrégation pour certaines régions chromosomiques, attribuées au moins pour partie à la présence de ces variations structurales (de type translocation) entre les chromosomes de cultivars diploïdes de bananier (Hippolyte *et al.*, 2010; Faure *et al.*, 1993). Plus récemment des anomalies méiotiques de même nature ont été mises en évidence chez une accession sauvage très fertile (*M. acuminata* spp. *malaccensis* « Pahang ») chez laquelle la présence de variation structurale n'était pas attendue (D'Hont *et al.*, 2012).

Dans notre étude, la ségrégation des chromosomes de CRBP39 (AAAB) est apparue relativement régulière. La majorité des marqueurs SSR utilisés montrent une ségrégation dans les proportions attendues et de type polysomique, avec des recombinaisons intrachromosomiques interspécifiques observées pour l'ensemble des 9 segments de chromosomes B que nous avons pu marquer avec le jeu de SSR utilisé. Cependant, nous avons mis en évidence un taux élevé de gamètes aneuploïdes chez le CRBP39. Cette aneuploïdie est le résultat de la présence d'allèles sous- ou surnuméraires (respectivement 1 et 3 allèles du parent tétraploïde dans un gamète) pour un ou plusieurs chromosomes. Ce phénomène touche la moitié des gamètes produits mais un nombre limité de locus majoritairement du chromosome 1. L'analyse de la distribution des allèles transmis dans ces gamètes aneuploïdes, la cartographie génétique et les analyses de corrélations nous ont permis de proposer que ces gamètes aneuploïdes résultent, au moins pour partie, de variations chromosomiques entre les génomes A et B, et plus précisément qu'un chromosome du génome B serait composé d'une partie homéologue au chromosome A1 et d'une partie homéologue au chromosome A3. Ceci entraînerait la formation de multivalents à la méiose (au moins des trivalents) impliquant ces chromosomes, avec une résolution asymétrique et la production de gamètes aneuploïdes.

Indépendamment de la présence de gamètes aneuploïdes, nous avons également mis en évidence au niveau des chromosomes transmis par CRBP39 des distorsions de ségrégation de certains marqueurs du chromosome 1 et des corrélations entre allèles des chromosomes 1 et 4. Ces corrélations entre marqueurs provenant de chromosomes différents ont lieu plus particulièrement entre les allèles d'un segment de chromosome 4 provenant du parent M53 (AA) (donc probablement d'origine Banksii) de CRBP39, et les allèles d'un segment de

chromosome A1 provenant du parent Plantain (AAB) de CRBP39. De façon intéressante, des distorsions de ségrégations au niveau des chromosomes 1 et 4 ont déjà été observées dans d'autres accessions de *Musa* : SF265 un génotype cultivé fortement apparenté à *M. acuminata* spp. *banksii* (Faure *et al.*, 1993), Pisang Lilin un génotype cultivé apparenté à *M. acuminata* spp. *malaccensis* et Pahang (Hippolyte *et al.*, 2010; D'Hont *et al.*, 2012) un génotype sauvage fertile de la sous espèce *malaccensis*. Ces auteurs ont proposé que ces ségrégations particulières résultent de variations de structure chromosomique chez *M. acuminata* et (Hippolyte *et al.*, 2010) ont proposé la présence d'une duplication entre ces deux chromosomes avec mort de certains gamètes.

Notre étude suggère que la ségrégation des chromosomes de CRBP39 (AAAB) est majoritairement régulière, avec quelques exceptions au niveau de classes de chromosomes qui présenteraient des variations d'organisation entre *M. acuminata* et *M. balbisiana*, comme notamment entre les chromosomes A1 et A3 et leurs homéologues chez *M. balbisiana*, ainsi qu'entre sous espèce de *M. acuminata*, notamment au niveau des chromosomes A1 et A4. Toutefois, notre étude est basée sur un faible nombre de marqueurs et donc ne permet pas d'avoir une analyse exhaustive. Il serait intéressant de compléter le génotypage de cette population avec par exemple du génotypage de type Genotyping By Sequencing (GBS) pour étoffer l'analyse. D'autre part, la production en cours d'une séquence de référence du génome B (collaboration BGI, ITBB, CIRAD) va permettre de comparer les génomes A et B et donc d'identifier l'ensemble des différences d'organisation des chromosomes entre ces deux espèces (au moins au niveau des génotypes utilisés pour produire les séquences de référence), ce qui facilitera l'interprétation des données de ségrégations des chromosomes chez les hybrides interspécifiques.

Du point de vue de l'amélioration variétale des plantains, il est intéressant de constater la présence d'appariement entre génomes A et B ce qui doit permettre un brassage génétique intra-chromosomique entre les deux espèces et ainsi assurer des possibilités de combinaison de caractères agronomiques favorables même si leurs déterminants sont localisés sur des chromosomes homéologues. Toutefois il sera important de cerner plus précisément les régions du génome présentant des ségrégations atypiques, ainsi que l'origine de ces atypies : différences structurales, combinaisons d'allèles peu ou non compatibles générant de la sélection gamétique ou zygotique. En effet, il apparaît important de tenir compte de ces facteurs lors des analyses du déterminisme des caractères agronomiques, afin de prendre en compte les biais qu'ils pourraient entraîner (pour des caractères au moins partiellement

régulés par ces régions du génome), mais aussi de prendre en compte leur impact sur la transmission de ces caractères dans les programmes de sélection.

Ségrégation et régulation des eBSV infectieux chez la descendance

La présence d'eBSV infectieux dans les génomes *M. balbisiana* pose de nombreux problèmes en termes d'amélioration génétique et d'échange de germplasm depuis plusieurs années. Cela a notamment amené le CIRAD à mettre en place un moratoire sur l'utilisation de ce génome qui présente cependant de nombreux caractères agronomiques d'intérêt. Dans ce contexte, comprendre comment les eBSV infectieux sont redistribués dans une descendance d'allopolyloïde et identifier quels sont les contextes chromosomiques/génomiques favorables à l'activation de ces eBSV est essentielle.

Un des résultats majeur de cette thèse a été de montrer qu'il était possible d'obtenir des descendants sans eBSV par le biais des ségrégations et également des recombinaisons intra chromosomiques interspécifiques. Ceci a été possible grâce la disponibilité de marqueurs eBSV spécifiques développés récemment (Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour l'amélioration des bananes en général (dessert, plantain et à cuire).

De façon inattendue, nos données ont montré très clairement une surreprésentation des individus de la population possédant au moins une intégration eBSV (160 plantes sur 184 soit 87% des plantes de la population). La présence de gamètes aneuploïdes impliquant majoritairement le chromosome B porteur des deux insertions eBSV pourrait expliquer en partie cette distorsion de ségrégation dans la descendance (Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Ceci est probablement le cas pour l'intégration BSOLV dont la distribution n'est plus biaisée une fois les individus aneuploïdes éliminés. Cela ne permet néanmoins pas d'expliquer celle de l'eBSGFV qui reste fortement biaisée et présente une ségrégation compatible avec la présence de cette eBSV en double dose. Les bananiers *M. acuminata* ne possédant pas d'eBSV, la présence d'eBSGFV en double dose chez le CRBP39, si elle est bien réelle, proviendrait donc d'une recombinaison lors de la méiose du parent French Clair de génotype AAB. Un marquage de cet eBSV par la technique FISH sur CRBP39 et French Clair pourrait permettre de valider ou d'infirmer cette hypothèse

La caractérisation approfondie par des approches multidisciplinaires d'une population hybride AAB issue du croisement PKW x IDN110T par l'équipe 2B2E depuis plus de 10 ans a permis de proposer que la régulation des intégrations de BSOLV et de BSGFV serait sous le contrôle d'un facteur génétique appelé BEL (BSV Expressed Locus) qui est présent à l'état hétérozygote chez le génotype *M. balbisiana* Pisang Klutuk Wulung (PKW) et est physiquement proche de l'intégration BSOLV (Lheureux *et al.*, 2003; Lheureux, 2002; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). Ces deux intégrations sont situées sur le même chromosome B de PKW ; toutefois l'observation en proportion équivalente de génotypes recombinés entre les allèles infectieux (eBSOLV-1 et eBSGFV-7) et non infectieux (eBSOLV-2 et eBSGFV-9) d'eBSOLV et d'eBSGFV (i.e. 25% eBSOLV-1/ eBSGFV-7, 25% eBSOLV-1/ eBSGFV-9, 25% eBSOLV-2/ eBSGFV-9, 25% eBSOLV-2/ eBSGFV-7) dans la descendance PKW x IDN110T confirme qu'ils ne sont pas génétiquement liés (Duroy et Chabannes, communication personnelle). Le phénotypage de cette population (PKW x IDN110T) pour les deux espèces BSV a montré que 100% des hybrides ayant l'allèle eBSOLV-1 sont infectés par BSOLV contre environ 50% infectés par BSGFV pour les hybrides ayant l'allèle eBSGFV-7 (Lheureux, 2002; Gayral *et al.*, 2008; Chabannes, Baurens *et al.*, 2013). L'ensemble de ces données d'expression confirme que la régulation de ces deux eBSV serait monogénique et portée par un locus génétiquement proche ou lié à l'allèle infectieux d'eBSOLV (eBSOLV-1). L'absence d'infection pour les hybrides de génotype « eBSGFV-7 seul » associé à une forte expression des hybrides de génotypes « eBSOLV-1 + eBSGFV-7 » et « eBSOLV-1 seul » observées sur la population AAB générée au cours de cette thèse sont tout à fait compatibles avec une régulation par BEL.

L'étude de la régulation des eBSV a montré depuis toujours et sur des génotypes différents qu'ils soient triploïdes ou tétraploïdes et naturels ou artificiellement créés que l'activation était spontanée, non contrôlée et non synchronisée dans des contextes de stress différents (Côte *et al.*, 2010; Lheureux *et al.*, 2003). Les résultats obtenus dans cette thèse en sont un parfait exemple où des plantes exemptes de virus suite au stress CIV vont développer une infection une fois cultivées en serre. Ce type de variations au niveau de l'activation a déjà été mis en évidence pour des plantes d'un même génotype (Côte *et al.*, 2010; Dallot *et al.*, 2001) ce qui semble indiquer que l'aspect génétique n'est pas seul responsable de la régulation des eBSV et qu'il existerait un deuxième niveau de régulation des eBSV de type épigénétique similaire à ce qui a été décrit pour les éléments transposables. Ces derniers sont en effet contrôlés au niveau transcriptionnel par le système de défense de la plante via la

production de petits ARN interférant (siARN) qui guident leur niveau de méthylation (Zhang *et al.*, 2007).

Ce type de mécanismes mis en place par la plante empêche le mouvement des éléments transposables qui peuvent entraîner l'extinction de gènes suite à leur transposition. La régulation épigénétique des séquences virales endogènes n'a donné lieu jusqu'à présent qu'à un nombre limité d'études. Mette *et al.*, (2002) ont par exemple démontré que l'expression des eTVCV (endogenous *Tobacco vein clearing virus*) chez le tabac était très faible car ces intégrations étaient méthylées. De façon similaire, Noreen *et al.* (2007) ont montré que l'expression des ePVCV (endogenous *Petunia vein clearing virus*) chez le pétunia était réprimée suite à des modifications au niveau des histones. Dernièrement, l'équipe 2B2E a montré la présence de petits ARN viraux (vsARN) chez le bananier PKW qui est un porteur sain d'eBSV infectieux. Ces vsARN sont majoritairement de taille 24nt et sont produits exclusivement au niveau des zones inversées/répétées des eBSV. Ces vsARN induisent la méthylation de ces séquences et une régulation de leur transcription (Duroy, 2012; Duroy *et al.*, non publié, Chabannes et Iskra-Caruana, 2013). Staginnus et Richert-Pöggeler (2006) ont proposé un modèle expliquant les différents mécanismes épigénétiques qui pourraient être impliqués dans la régulation des séquences virales endogènes (EPRV). Ce modèle, qui reste toujours d'actualité, stipule que le réveil des EPRV aurait lieu suite à un affaiblissement du contrôle épigénétique caractérisé par une hypométhylation transitoire lors de stress ou lors d'hybridation génétique interspécifique. Cela induirait une augmentation de la transcription des EPRV suffisante pour permettre la libération d'un génome viral soit directement dans le cas de l'ePVCV chez le pétunia (Richert-Pöggeler *et al.*, 2003) soit via une étape de recombinaison homologue (pour obtenir un génome viral pleine longueur dans le même sens) dans le cas des eBSV chez le bananier (Iskra-Caruana *et al.*, 2010; Chabannes et Iskra-Caruana, 2013).

La localisation des eBSV sur le chromosome peut aussi fortement influencer leur niveau de régulation épigénétique. Il est en effet bien connu que la grande majorité des éléments transposables sont au niveau de l'hétérochromatine (Lippman *et al.*, 2004) et que ce serait sous cette forme condensée de la chromatine que les contrôles épigénétiques seraient les plus forts. L'hétérochromatine est essentiellement localisée proche des centromères et des télomères mais des îlots sont également présent ailleurs dans le génome des plantes (Lippman *et al.*, 2004). L'environnement et le positionnement de l'eBSGFV-7 et de l'eBSOLV-1 pourraient donc aussi participer à leur régulation et expliquer les différences d'activation

observées entre ces deux eBSV pour une condition de culture définie (CIV, serre ou champs). La différence d'activation observée entre deux conditions de culture pour un même eBSV pourrait quant à elle être due à un niveau de méthylation de cet eBSV plus ou moins important en fonction du stress appliqué. La régulation des eBSV semble donc très complexe et pourrait avoir deux niveaux de régulation, un niveau épigénétique et un niveau génétique. Concernant le volet épigénétique, il sera intéressant dans un premier temps de comparer le profil et la quantité de sARN complémentaires des 2 eBSV chez quelques hybrides qui expriment ou non du virus suite à la CIV, la serre et le champ. Une caractérisation de l'état de méthylation des eBSV pourra ensuite être réalisée en fonction des résultats obtenus. Pour l'aspect génétique, il conviendra de continuer le phénotypage BSV à la serre et de le compléter par un phénotypage au champ pour permettre une activation des eBSV pour l'ensemble des plantes activables. En parallèle, nous envisageons de génotyper cette population d'hybride par séquençage (GBS) pour développer de nouveaux marqueurs et ainsi densifier la carte génétique du CRBP39. L'ensemble de ces projets, associé au séquençage du génome de PKW qui est en cours, devrait permettre d'affiner/d'identifier le ou les facteurs génétiques impliqués dans la régulation des eBSV et vérifier l'implication de BEL.

Conclusion générale

Le Banana streak virus (BSV) est aujourd'hui la contrainte majeure des programmes d'amélioration des bananiers plantains car il est présent sous forme de séquences intégrées infectieuses aux génomes *M. balbisiana*. Ces séquences intégrées (eBSV) se transmettent à la descendance au cours des croisements interspécifiques et peuvent dans ce contexte interspécifique s'activer et produire des particules virales capables d'induire une infection systémique de la plante.

Les résultats obtenus durant notre étude ont de forte implication pour les programmes d'amélioration variétale impliquant des croisements interspécifiques, et notamment les programmes de création de nouvelles variétés de plantains. En effet, la première constatation est la présence d'appariement entre génomes A et B, permettant un brassage génétique important entre ces deux espèces. Il est maintenant aussi envisageable d'appliquer diverses stratégies d'amélioration basées sur la recombinaison homéologue, telles que l'introgession et la fixation d'un caractère d'intérêt par rétrocroisement.

La deuxième grande avancée pour la création variétale, est la possibilité de produire des hybrides interspécifiques non porteurs d'allèles eBSV. Ainsi, les marqueurs PCR

Chapitre V – Discussion générale, perspectives et conclusion

spécifique des eBSV nous ont permis de suivre la ségrégation des eBSV et d'identifier 13% des individus sans eBSV. L'identification de ce type d'individus au sein de populations en sélection ouvre désormais une voie de contournement de la contrainte eBSV au sein des programmes d'amélioration.

Au plan pratique, il est envisagé, dorénavant, d'effectuer une sélection assistée par marqueurs sur toutes les plantes hybrides avec les marqueurs PCR spécifiques des eBSV, sur plantes *in vitro*, suite à la culture des embryons mais avant leur sortie en pépinière. La mise en place de cette sélection précoce permettra de ne transférer au champ, en parcelles de sélection, que les hybrides exempts d'eBSV activables et ainsi de faire des économies de temps, d'espace et d'argent dans le processus de sélection.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude montrent également qu'avec le type de croisements utilisés (AAAB x AA), il est nécessaire de polliniser environ 100 fleurs femelles (contenant chacune potentiellement près de 300 sacs embryonnaires fécondables) pour obtenir un hybride exempt de séquences intégrées (1%). Par conséquent, il faudrait polliniser près de 200 à 230 régimes pour espérer obtenir une descendance de 300 hybrides dans laquelle pouvoir sélectionner ensuite efficacement. Dans ce contexte, il sera important de réfléchir, en parallèle, à des stratégies alternatives aux schémas actuels, par exemple des stratégies reposant sur l'utilisation de germplasm de *Musa balbisiana* ne contenant pas, ou plus, de séquences intégrées d'eBSV.

L'ensemble de nos résultats ouvre donc de nouvelles perspectives pour l'amélioration des cultivars de bananier impliquant le génome *M. balbisiana*.

Références bibliographiques

A

- Adams, K. L.**, et **Wendel J. F.** (2005) Polyploidy and genome evolution in plants. *Current opinion in plant biology*, **8**, 135-141.
- Adams, K. L.** (2007) Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *Journal of heredity* **98**, 136-141.
- Agarwal.** (1988) Cytology of Kotta vazhai - A seed mutant of banana cv. Poovan. In *Glimpses of cytogenetics in India: proceedings of first All India Conference on Cytology and Genetics, held at Bangalore University, Bangalore, India on December 31, 1986 and January 1, 1987*, 1:115. *Society of Cytologists and Geneticists, India*.
- Almeida, R.** & Allshire, R.C. (2005). RNA silencing and genome regulation. *Trends in cell biology*, **15**(5), p.251–258.
- Ashby, M. K.**, Warry A., Bejarano E.R., Khashoggi A., Burrell M. et Lichtenstein C.P. (1997) Analysis of Multiple Copies of Geminiviral DNA in the Genome of Four Closely Related Nicotiana Species Suggest a Unique Integration Event. *Plant Molecular Biology*, **35**, 313-321.

B

- Bakry, Frédéric.** (1984). Application des techniques de culture in vitro à l'amélioration du bananier (*Musa* sp.). Orsay: Université de Paris-Sud, 131 p. Thèse Dr 3ème Cycle.
- Bakry, F.**, J. P. Horry, C. Teisson, H. Tezenas De Montcel, et J. Ganry. (1990). L'amélioration génétique des bananiers à l'IRFA/CIRAD. *Fruits*, 25-40.
- Bakry, F.**, et J. P. **Horry** (1992) Tetraploid hybrids from interploid 3x/2x crosses in cooking bananas ». *Fruits* 47.
- Bakry, F.**, Carreel F., Caruana M. L., Côte F.X. et Jenuwein H. (2001), Banana. In Charrier A., Jacquot M., Hamon S. & Nicolas D., Tropical Plant Breeding, 1-21. Ed. Quae.
- Bakry, Frederic.** (2008). Zygotic embryo rescue in bananas. *Fruits* **63**, 111-16.
- Bakry, Frederic**, et **Kenneth** Shepherd. (2008). Chromosome count on banana root tip squashes. *Fruits* **63**, 179-82.
- Bakry, F.**, Carreel F., Jenny C. et Horry J. P. (2009), Genetic improvement of banana In. Mohan Jain S.; Priyadarshan, *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*: 3-50.
- Baulcombe, D.** (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, **431**(7006), p.356–363.
- Bardil, Amélie**, Juliana Dantas de Almeida, Marie Christine Combes, Philippe Lashermes, et Benoît Bertrand. (2011). Genomic expression dominance in the natural allopolyploid *Coffea arabica* is massively affected by growth temperature. *New Phytologist* **192**, 760-74.
- Bartos, J.**, O. Alkhimova, M. Dolezelová, E. De Langhe, et J Dolezel. (2005). Nuclear genome size and genomic distribution of ribosomal DNA in *Musa* and *Ensete* (Musaceae): taxonomic implications. *Cytogenetic and genome research* **109**, 50-57.
- Baumel, Alex**, Malika Ainouche, Ruslan Kalendar, et Alan H. Schulman. (2002). Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* CE Hubbard (Poaceae). *Molecular Biology and Evolution* **19**, 1218-27.
- Baurens, Franc-Christophe.** (1997). Identification par PCR des espèces impliquées dans la composition génomique des cultivars de bananier, à l'aide de séquences répétées. Toulouse: Paul Sabatier Toulouse III.
- Baurens, F. C.**, J. L. Noyer, C. Lanaud, et P. J. L. Lagoda. (1997). A repetitive sequence family of banana (*Musa* sp.) shows homology to Copia-like elements. *Journal of Genetics & Breeding* 51.

Références Bibliographiques

- Bejarano**, E. R., A. Khashoggi, M. Witty, et C. Lichtenstein. (1996). Integration of Multiple Repeats of Geminiviral DNA into the Nuclear Genome of Tobacco during Evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 759-764.
- Benjamini**, Yoav, et Yocef Hochberg. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 289-300.
- Bertsch**, Christophe, Monique Beuve, Valerian V. Dolja, Marion Wirth, Frédérique Pelsy, Etienne Herrbach, et Olivier Lemaire. (2009). Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance. *Biol Direct* **4**, 21.
- Bourc'his**, Déborah, et Olivier Voinnet. (2010). A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science* **330**, 617-22.
- Bousalem**, M., Emmanuel JP Douzery, et S. E. Seal. (2008). Taxonomy, molecular phylogeny and evolution of plant reverse transcribing viruses (family Caulimoviridae) inferred from full-length genome and reverse transcriptase sequences. *Archives of virology* **153**, 1085-1102.
- Brunt** A.A. (1991). Banana bract mosaic potyvirus. In *Viruses of Plants*, Cab International, 150PP. Description and Lists from Video Database. UK.
- Budiman**, Muhammad A., Long Mao, Todd C. Wood, et Rod A. Wing. (2000). A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome research* **10**, 129-36.
- Buggs**, Richard JA, Simon Renny-Byfield, Michael Chester, Ingrid E. Jordon-Thaden, Lyderson Facio Viccini, Srikar Chamala, Andrew R. Leitch, Patrick S. Schnable, W. Bradley Barbazuk, et Pamela S. Soltis. (2012). Next-generation sequencing and genome evolution in allopolyploids. *American Journal of Botany* **99**, 372-82.

C

- Capy**, P. et al. (2000). Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity*, **85**(2), p.101–106.
- Carreel**, F. (1994). Etude de la diversité génétique des bananiers (genre *Musa*) à l'aide des marqueurs RFLP. Paris: Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Carreel**, F., S. Fauré, D.G. De Leon, P.J.L. Lagoda, X. Perrier, F. Bakry, H.T. Du Montcel, C. Lanaud, et JP Horry. (1994). Evaluation de la diversité génétique chez les bananiers diploïdes (*Musa* sp). *Genetics Selection Evolution* **26**, 1-12.
- Carreel**, F., D.G. de Leon, P. Lagoda, C. Lanaud, C. Jenny, J.P. Horry, et H.T. Du Montcel. (2002). Ascertaining maternal and paternal lineage within *Musa* by chloroplast and mitochondrial DNA RFLP analyses. *Genome* **45**, 679-692.
- Chabannes**, Matthieu, et Marie-Line **Iskra-Caruana**. (2013). Endogenous pararetroviruses — a reservoir of virus infection in plants. *Current Opinion in Virology*.
- Chabannes**, Matthieu, Franc-Christophe **Baurens**, Pierre-Olivier Duroy, Stéphanie Bocs, Marie-Stéphanie Vernerey, Marguerite Rodier-Goud, Valérie Barbe, Philippe Gayral, et Marie-Line Iskra-Caruana. (2013). Three Infectious Viral Species Lying in Wait in the Banana Genome. *Journal of virology*.
- Champion**, Jean. (1963). Le bananier.
- Cheesman**, E. E. (1948). Classification of the Bananas. *Kew Bulletin* **3**, 17-28.
- Chelaifa**, Houda, Annabelle Monnier, et Malika Ainouche. (2010). Transcriptomic changes following recent natural hybridization and allopolyploidy in the salt marsh species *Spartina townsendii* and *Spartina anglica* (Poaceae). *New Phytologist* **186**, 161-74.
- Chen**, Z. Jeffrey. (2007). Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids. *Annual review of plant biology* **58**, 377.
- Chen**, Z. Jeffrey, Misook Ha, et Douglas Soltis. (2007). Polyploidy: genome obesity and its consequences. *New Phytologist* **174**, 717-20.

Références Bibliographiques

- Christelová**, Pavla, Miroslav Valárik, et Eva Hribova. (2011). A platform for efficient genotyping in *Musa* using microsatellite markers. *AoB plants* 2011.
- Cifuentes**, Marta, Frédérique Eber, Marie-Odile Lucas, Maryse Lode, Anne-Marie Chèvre, et Eric Jenczewski. (2010). Repeated polyploidy drove different levels of crossover suppression between homoeologous chromosomes in *Brassica napus* allohaploids. *The Plant Cell Online* **22**, 2265-76.
- Comai**, Luca. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics* **6**, 836-46.
- Côte**, François X, Serge Galzi, Michel Folliot, Yannick Lamagnère, Pierre-Yves Teycheney, et Marie-Line Iskra-Caruana. (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.

D

- Dahal**, G., J. d'A Hughes, et B. E. L. Lockhart. (1998a). Status of banana streak disease in Africa: problems and future research needs. *Integrated Pest Management Reviews* **3**, 85-97.
- Dahal**, G., J. d'A Hughes, G. Thottappilly, et B. E. L. Lockhart. (1998b). 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.
- Dahal**, G., R. Ortiz, A. Tenkouano, Jacqueline d'A Hughes, G. Thottappilly, D. Vuylsteke, et B. E. L. Lockhart. (2000). Relationship between natural occurrence of banana streak badnavirus and symptom expression, relative concentration of viral antigen, and yield characteristics of some micropropagated *Musa* spp. *Plant pathology* **49**, 68-79.
- Dale**, James L., Debra A. Phillips, et Judith N. Parry. (1986). Double-stranded RNA in banana plants with bunchy top disease. *Journal of general virology* **67**, 371-375.
- Dallot**, S., P. Acuna, C. Rivera, P. Ramirez, F. Côte, B. E. L. Lockhart, et 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**, 2179-2190.
- Daniells**, J. W., A. D. W. Geering, N. J. Bryde, et J. E. Thomas. (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.
- De Langhe**, E A. (1990). Identification of genetic diversity in the genus *Musa*: a general introduction. In Identification of genetic diversity in the genus *Musa*, 8-16. Proc of a workshop held at Los Banos, Philippines: R.L. Jarret.
- De Langhe**, Edmond, Luc Vrydaghs, Pierre de Maret, Xavier Perrier, et Tim Denham. (2009). Why bananas matter: an introduction to the history of banana domestication. *Ethnobotany Research & Applications* **7**, 165-77.
- Dessauw**, D. (1988). Etude des facteurs de la sterilité du bananier (*Musa* spp.) et des relations cytotaxinomiques entre *M. acuminata* Colla et *M. balbisiana* Colla. *Fruits* **43**, 539-558.
- D'Hont**, Angélique, Laurent Grivet, Philippe Feldmann, J. C. Glaszmann, S. Rao, et N. Berding. (1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG* **250**, 405-13.
- D'Hont**, A., A. Paget-Goy, J. Escoute, et F. Carreel. (2000). The interspecific genome structure of cultivated banana, *Musa* spp. revealed by genomic DNA in situ hybridization. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **100**, 177-183.
- D'Hont**, A. (2005). Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenetic and Genome Research* **109**, 27-33.

Références Bibliographiques

- D'Hont**, Angélique, France Denoeud, Jean-Marc Aury, Franc-Christophe Baurens, Françoise Carreel, Olivier Garsmeur, Benjamin Noel, et al. (2012). The Banana (*Musa Acuminata*) Genome and the Evolution of Monocotyledonous Plants. *Nature* **488**, 213-217.
- Dodds**, K. S., et C. S. **Pittendrigh**. (1946). Genetical and cytological studies of *Musa*; certain aspects of polyploidy. *Journal of genetics* **47**, 162.
- Dodds**, K. S., et N. W. **Simmonds**. (1948). Sterility and parthenocarpy in diploid hybrids of *Musa*. *Heredity* **2**, 101.
- Doležel**, Jaroslav, Pavla Binarová, et S. Lcretti. (1989). Analysis of Nuclear DNA Content in Plant Cells by Flow Cytometry. *Biologia Plantarum* **31**, 113-120.
- Dolezel**, J., M. Dolezelová, et F. J. Novak. (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum* **36**, 351-57.
- Dolezel**, Jaroslav, Martin A. Lysák, Ines Van den Houwe, Marie Dolezelová, et Nicolas Roux. (1997). Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species. *Infomusa* **6**, 6-9.
- Doležel**, J, et J. A. N. **Bartoš**. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* **95**, 99-110.
- Doyle**, Jeff J., Lex E. Flagel, Andrew H. Paterson, Ryan A. Rapp, Douglas E. Soltis, Pamela S. Soltis, et Jonathan F. Wendel. (2008). Evolutionary genetics of genome merger and doubling in plants. *Annual review of genetics* **42**, 443-61.
- Duffy**, Siobain, Laura A. Shackelton, et Edward C. Holmes. (2008). Rates of Evolutionary Change in Viruses: Patterns and Determinants. *Nature Reviews Genetics* **9**, 267-276.
- Duroy**, Pierre-olivier. (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?

F

- Fargette**, D., G. Konaté, C. Fauquet, E. Muller, M. Peterschmitt, et J.M. Thresh. (2006). Molecular Ecology and Emergence of Tropical Plant Viruses. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 235-260.
- Faure**, S., J. L. Noyer, J. P. Horry, F. Bakry, C. Lanaud, et D. Goñzalez de León. (1993). A molecular marker-based linkage map of diploid bananas (*Musa acuminata*). *Theoretical and Applied Genetics* **87**, 517-26.

G

- Gaeta**, Robert T., et J. Chris **Pires**. (2010). Homoeologous recombination in allopolyploids: the polyploid ratchet. *New Phytologist* **186**, 18-28.
- Gambley**, C. F., A. D. W. Geering, V. Steele, et J. E. Thomas. (2008). Identification of viral and non-viral reverse transcribing elements in pineapple (*Ananas comosus*), including members of two new badnavirus species ». *Archives of virology* **153**, 1599-1604.
- Garsmeur**, Olivier, James C. Schnable, Ana Almeida, Cyril Jourda, Angélique D'Hont, et Michael Freeling. (2014). Two evolutionarily distinct classes of paleopolyploidy. *Molecular biology and evolution* **31**, 448-54.
- Gauhl**, F., et C. **Pasberg-Gauhl**. (1995). Temporal dynamics of banana streak badnavirus (BSV) symptoms in *Musa* clones in southern Nigeria. *Phytomedizin* **25**.
- Gauhl**, F., C. Pasberg-Gauhl, et J. d'A. Hughes. (1997). First Report of Banana Streak Badnavirus in Plantain Landraces in Southern Cameroon, Central Africa. *Plant Disease* **81**, 1335-1335.

Références Bibliographiques

- Gauhl**, F., C. Pasberg-Gauhl, B. E. L. Lockhart, J. d'A Hughes, et G. Dahal. (1999). Incidence and distribution of banana streak badnavirus in the plantain production region of southern Nigeria. *International Journal of Pest Management* **45**, 167-171.
- Gawel**, N. J., et R. L. Jarret. (1991). A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Molecular Biology Reporter* **9**, 262-266.
- Gayral**, Philippe. (2008). Evolution des pararétrovirus endogènes de plantes : le cas des séquences intégrées du Banana streak virus chez le bananier (*Musa* sp.). Thèse de doctorat, Montpellier: Université des sciences et techniques de Montpellier 2.
- Gayral**, Philippe, Juan-Carlos Noa-Carrazana, Magali Lescot, Fabrice Lheureux, Benham E L Lockhart, Takashi Matsumoto, Pietro Piffanelli, et Marie-Line Iskra-Caruana. (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.
- Gayral**, Philippe, et Marie-Line Iskra-Caruana. (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.
- Gayral**, Philippe, Laurence Blondin, Olivier Guidolin, Françoise Carreel, Isabelle Hippolyte, Xavier Perrier, et Marie-Line Iskra-Caruana. (2010). Evolution of endogenous sequences of banana streak virus: what can we learn from banana (*Musa* sp.) evolution? *Journal of virology* **84**, 7346-59.
- Geering**, A D, N E Olszewski, G Dahal, J E Thomas, et B E Lockhart. (2001a). Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of *Musa* cultivars. *Molecular Plant Pathology* **2**, 207-213.
- Geering**, Andrew DW, Neil E. Olszewski, Ganesh Dahal, John E. Thomas, et Benham EL Lockhart. (2001b). Analysis of the distribution and structure of integrated Banana streak virus DNA in a range of *Musa* cultivars. *Molecular Plant Pathology* **2**, 207-13.
- Geering**, Andrew D. W., Neil E. Olszewski, Glyn Harper, Benham E. L. Lockhart, Roger Hull, et John E. Thomas. Février 1, (2005a). Banana contains a diverse array of endogenous badnaviruses. *J Gen Virol* **86**, 511-520.
- Geering**, A D W, M M Pooggin, N E Olszewski, B E L Lockhart, et J E Thomas. (2005b). Characterisation of Banana streak Mysore virus and evidence that its DNA is integrated in the B genome of cultivated *Musa*. *Archives of Virology* **150**,787-796.
- Geering**, Andrew D. W., Judith N. Parry, et John E. Thomas. (2011). Complete Genome Sequence of a Novel Badnavirus, Banana Streak IM Virus. *Archives of Virology* **156**, 733-737.
- Gerton**, Jennifer L., et R. Scott Hawley. (2005). Homologous Chromosome Interactions in Meiosis: Diversity amidst Conservation. *Nature Reviews Genetics* **6**, 477-487.
- Grandbastien**, M.-A. et al. (2005). Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae. *Cytogenetic and genome research*, **110**(1-4), p.229-241.
- Grabin**, Agnès, Jean-Louis Noyer, Françoise Carreel, Dominique Dambier, Franc-Christophe Baurens, Claire Lanaud, et Pierre J. L. Lagoda. (1998). Diploid *Musa acuminata* genetic diversity assayed with sequence-tagged microsatellite sites. *Electrophoresis* **19**, 1374-1380.
- Greer**, Emma, Azahara C. Martín, Ali Pendle, Isabelle Colas, Alexandra ME Jones, Graham Moore, et Peter Shaw. (2012). The Ph1 locus suppresses Cdk2-type activity during premeiosis and meiosis in wheat. *The Plant Cell Online* **24**, 152-62.
- Gregor**, Wolfgang, M. Florian Mette, Christina Staginnus, Marjori A. Matzke, et Antonius J.M. Matzke. (2004). A Distinct Endogenous Pararetrovirus Family in *Nicotiana tomentosiformis*, a Diploid Progenitor of Polyploid Tobacco. *Plant Physiology* **134**, 1191-1199.
- Griffiths**, Anthony JF, William M. Gelbart, Jeffrey H. Miller, et Richard C. Lewontin. (1999a). Chromosomal Rearrangements. Text.

Références Bibliographiques

Griffiths, Anthony J.F., Williams M. Gelbart, Jeffrey H. Miller, et Richard C. Lewontin. (1999b). Modern Genetic Analysis - NCBI Bookshelf.

H

- Häkkinen**, Markku. (2013). Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). *Taxon* **62**, 809-813.
- Hamant**, Olivier, Hong Ma, et W. Zacheus Cande. (2006). Genetics of Meiotic Prophase I in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **57**, 267-302.
- Hansen**, C. N., G. Harper, et J. S. Heslop-Harrison. (2005). Characterisation of pararetrovirus-like sequences in the genome of potato (*Solanum tuberosum*). *Cytogenetic and genome research* **110**, 559-65.
- Harper**, Glyn, et Roger **Hull**. (1998). Cloning and sequence analysis of banana streak virus DNA. *Virus Genes* **17**, 271-78.
- Harper**, Glyn, Ganesh Dahal, George Thottappilly, et R. Hull. (1999a). Detection of episomal banana streak badnavirus by IC-PCR. *Journal of Virological Methods* **79**, 1-8.
- Harper**, Glyn, Julian O. Osuji, J. S. Heslop-Harrison, et Roger Hull. (1999b). Integration of Banana Streak Badnavirus into the *Musa* Genome: Molecular and Cytogenetic Evidence. *Virology* **255**, 207-13.
- Harper**, Glyn, Roger Hull, Ben Lockhart, et Neil Olszewski. (2002). Viral sequences integrated into plant genomes. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 119-136.
- Harper**, Glyn, Katja R. Richert-Pöggeler, Thomas Hohn, et Roger Hull. (2003). Detection of petunia vein-clearing virus: model for the detection of DNA viruses in plants with homologous endogenous pararetrovirus sequences. *Journal of virological methods* **107**, 177-84.
- Harper**, Glyn, Darren Hart, Sarah Moul, et Roger Hull. (2004). Banana streak virus is very diverse in Uganda. *Virus research* **100**, 51-56.
- Harper**, G, D Hart, S Moul, R Hull, A Geering, et J Thomas. (2005). The diversity of Banana streak virus isolates in Uganda. *Archives of Virology* **150**, 2407-2420.
- Hippolyte**, Isabelle, Frederic Bakry, Marc Seguin, Laetitia Gardes, Ronan Rivallan, Ange-Marie Risterucci, Christophe Jenny, Xavier Perrier, Françoise Carreel, Xavier Argout, Pietro Piffanelli, Imtiaz A Khan, Robert NG Miller, Georgios J Pappas, Didier Mbéguié-A-Mbéguié, Takashi Matsumoto, Veronique De Bernardinis, et al. (2010). A saturated SSR/DaRT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. *BMC Plant Biology* **10**, 65.
- Hohn**, Thomas, Katja R. Richert-Pöggeler, Christina Staginnus, Glyn Harper, Trude Schwarzacher, Chee How Teo, Pierre-Yves Teycheney, Marie-Line Iskra-Caruana, et Roger Hull. (2008). Evolution of integrated plant viruses. *In Plant Virus Evolution*, 53-81. Springer.
- Horlow**, Christine, et Marie-Pascale **Doutriaux**. (2003). Molecular mechanisms of meiosis in plants. *Médecine Sciences: M/S* **19**, 717-723.
- Horry**, J. P., S. Sharrock, et E. Frison. (2000). Banana research and development: an international perspective. *Banana improvement, production and utilization, Association for the Improvement in Production and Utilization of Banana, Trichy, India*: 1-5.
- Howell**, E.C., H.J. Newbury, R.L. Swennen, L.A. Withers, et B.V. Ford-Lloyd. (1994). The use of RAPD for identifying and classifying *Musa* germplasm. *Genome* **37**, 328-32.
- Huetzel**, Bruno, Tatsuo Kanno, Lucia Daxinger, Werner Aufsatz, Antonius JM Matzke, et Marjori Matzke. (2006). Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *The EMBO journal* **25**, 2828-36.
- Hull**, Roger, et Simon N. **Covey**. (1995). Retroelements: propagation and adaptation. *Virus Genes* **11**, 105-18.

Références Bibliographiques

- Hull, R. (1999).** Classification of reverse transcribing elements: a discussion document. *Archives of Virology* **144**, 209-214.
- Hull, Roger, Glyn Harper, et Ben Lockhart. (2000).** Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends in plant science* **5**, 362-65.

I

- Iskra-Caruana, M.-L., F. Lheureux, et P.-Y. Teycheney. (2003).** Les pararétrovirus endogènes (EPRV), voie nouvelle de transmission des virus de plantes. *Virologie* **7**, 255-265.
- Iskra-Caruana, Marie-Line, Franc-Christophe Baurens, Philippe Gayral, et Matthieu Chabannes. (2010).** A Four-Partner Plant-Virus Interaction: Enemies Can Also Come from Within. *Molecular plant-microbe interactions* **23**, 1394-1402.

J

- Jakowitsch, J., M. F. Mette, J. van Der Winden, M. A. Matzke, et A. J. M. Matzke. (1999).** Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 13241-46.
- James, A.p., R.j. Geijskes, J.l. Dale, et R.m. Harding. (2011).** Molecular Characterisation of Six Badnavirus Species Associated with Leaf Streak Disease of Banana in East Africa. *Annals of Applied Biology* **158**, 346-53.
- Jannoo, N., L. Grivet, J. David, A. D'Hont, et J. C. Glaszmann. (2004).** Differential chromosome pairing affinities at meiosis in polyploid sugarcane revealed by molecular markers. *Heredity* **93**, 460-67.
- Jarret, R.L., D.R. Vuylsteke, N.J. Gawel, R.B. Pimentel, et L.J. Dunbar. (1993).** Detecting genetic diversity in diploid bananas using PCR and primers from a highly repetitive DNA sequence. *Euphytica* **68**, 69-76.
- Jaufeerally-Fakim, Y., Ashwin Khorugdharry, et Glyn Harper. (2006).** Genetic variants of Banana streak virus in Mauritius. *Virus Research* **115**, 91-98.
- Jenny, C., F. Carreel, et F. Bakry. (1997).** Revision on banana taxonomy: 'Klue Tiparot' (*Musa* sp) reclassified as a triploid. *Fruits* **52**, 83-91.
- Jenny, Christophe, Françoise Carreel, Kodjo Tomekpe, Xavier Perrier, Cécile Dubois, J.P. Horry, et Tézenas du Montcel. (1999).** « Banana ». In *Diversité génétique des plantes tropicales cultivées*, Hamon,P., Seguin,M., Perrier,X., and Glaszmann,J;-C. Eds, 113-139. Repères. Montpellier - France: CIRAD.
- Jenny, C., F. Carreel, K. Tomekpé, X. Perrier, C. Dubois, J. Horry, H. Tézenas Du Montcel, P. Hamon, M. Séguin, et X. Perrier. (2003).** Genetic diversity of cultivated tropical plants In : Hamon Perla (ed.), Seguin Marc (ed.), Perrier Xavier (ed.), Glaszmann Jean-Christophe (ed.). Genetic diversity of cultivated tropical plants. Montpellier. CIRAD (FRA). P 99-124.
- Jenuwein, H. (1988).** Avocado, Banana, Coffee. How to Grow Useful Exotic Plants for Fun. 126pp. CABDirect2.
- Jeridi, Mouna, Frédéric Bakry, Jacques Escoute, Emmanuel Fondi, Françoise Carreel, Ali Ferchichi, Angélique D'Hont, et Marguerite Rodier-Goud. (2011).** Homoeologous chromosome pairing between the A and B genomes of *Musa* spp. revealed by genomic in situ hybridization. *Annals of Botany* **108**, 975-981.
- Jeridi, Mouna, Xavier Perrier, Marguerite Rodier-Goud, Ali Ferchichi, Angélique D'Hont, et Frédéric Bakry. (2012).** Cytogenetic Evidence of Mixed Disomic and Polysomic Inheritance in an Allotetraploid (AABB) *Musa* Genotype. *Annals of Botany* **110**, 1593-1606.
- Johnson, James. (1927).** *The classification of plant viruses*. Vol. 76. Agricultural Experiment Station of the University of Wisconsin.

Références Bibliographiques

- Johnson**, Lianna M., Xiaofeng Cao, et Steven E. Jacobsen. (2002). Interplay between two epigenetic marks: DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Current Biology* **12**, 1360-67.
- Jones**, DR. (1999). Diseases of Banana, Abacá and Enset. 544 pp. CAB Direct2.

K

- Kamate**, K., S. Brown, P. Durand, J.-M. Bureau, D. De Nay, et T. H. Trinh. (2001). Nuclear DNA content and base composition in 28 taxa of *Musa*. *Genome* **44**, 622-627.
- Kenton**, A., A. Khashoggi, A. Parokonny, M. D. Bennett, et C. Lichtenstein. (1995). Chromosomal location of endogenous geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana tabacum* L. *Chromosome Research* **3**, 346-50.
- Kerbellec**, Florence. (1996). Etablissement d'une technique d'androgénèse pour l'amélioration génétique du bananier (*Musa* sp.). E.N.S.A. de Rennes.
- Knowles**, N.J., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R. (2012). *Picornaviridae*. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, pp 855-880.
- Kubiriba**, J., J. P. Legg, W. Tushemereirwe, et E. Adipala. (2001). Vector transmission of Banana streak virus in the greenhouse in Uganda. *Annals of applied biology* **139**, 37-43.
- Kunii**, Motoyuki, Masanori Kanda, Hironori Nagano, Ichiro Uyeda, Yuji Kishima, et Yoshio Sano. (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* **5**, 80.

L

- La Fleur**, D. A., B. E. L. Lockhart, et N. E. Olszewski. (1996). Portions of the banana streak badnavirus genome are integrated in the genome of its host *Musa* sp. *Phytopathology* **86**, (supplement 11): 100.
- Lagoda**, P. J., J. L. Noyer, D. Dambier, F. C. Baurens, A. Grapin, et C. Lanaud. (1998). Sequence tagged microsatellite site (STMS) markers in the Musaceae. *Molecular Ecology* **7**, 659.
- Lashermes**, Philippe, M.-C. Combes, J. Robert, Pierre Trouslot, A. D'hont, Fran\ccois Anthony, et A. Charrier. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics MGG* **261**, 259-66.
- Lassois**, Ludivine, Jean-Pierre Busogoro, et Haïssam Jijakli. (2009). La banane : de son origine à sa commercialisation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **13**, 575-586.
- Lassoudiere**, A. (1974). La mosaïque dite "à tirets" du bananier Poyo en Côte d'Ivoire. *Fruits* **29**, 349-57.
- Lassoudière**, André. (2010). *L'histoire du bananier*. Editions Quae.
- Le Provost**, Grégoire, Marie-Line Iskra-Caruana, Isabelle Acina, et Pierre-Yves Teycheney. (2006). Improved detection of episomal Banana streak viruses by multiplex immunocapture PCR. *Journal of virological methods* **137**, 7-13.
- Leitch**, A. R. (2006). Conserved gene order belies rapid genome turnover: The dynamic interplay between genomic DNA and the outside world. *Heredity* **98**, 61-62.
- Lescot**, Magali, Pietro Piffanelli, Ana Y. Ciampi, Manuel Ruiz, Guillaume Blanc, Jim Leebens-Mack, Felipe R. da Silva, Candice MR Santos, Angélique D'Hont, et Olivier Garsmeur. (2008).

Références Bibliographiques

- Insights into the *Musa* genome: syntenic relationships to rice and between *Musa* species. *Bmc Genomics* **9**, 58.
- Lheureux, F.**, F Carreel, C Jenny, B E L Lockhart, et M L Iskra-Caruana. (2003), Identification of genetic markers linked to banana streak disease expression in inter-specific *Musa* hybrids. *TAG. Theoretical and Applied Genetics. Theoretische Und Angewandte Genetik* **106**, 594-598.
- Lheureux, F.**, N. Laboureau, E. Muller, B. E. L. Lockhart, et M.-L. Iskra-Caruana. (2007). Molecular Characterization of Banana Streak Acuminata Vietnam Virus Isolated from *Musa acuminata* Siamea (banana Cultivar). *Archives of Virology* **152**, 1409-1416.
- Lheureux, Fabrice.** (2002). Étude des mécanismes génétiques impliqués dans l'expression des séquences EPRV pathogènes des bananiers au cours de croisements interspécifiques. Thèse de doctorat de l'École nationale supérieure agronomique de Montpellier.
- Lim, K.** Yoong, Douglas E. Soltis, Pamela S. Soltis, Jennifer Tate, Roman Matyasek, Hana Srubarova, Ales Kovarik, J. Chris Pires, Zhiyong Xiong, et Andrew R. Leitch. (2008). Rapid chromosome evolution in recently formed polyploids in Tragopogon (Asteraceae). *PloS one* **3**, e3353.
- Lippman, Zachary,** Anne-Valérie Gendrel, Michael Black, Matthew W. Vaughn, Neilay Dedhia, W. Richard McCombie, Kimberly Lavine, Vivek Mittal, Bruce May, et Kristin D. Kasschau. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* **430**, 471-76.
- Liu, B.,** C. L. Brubaker, Guy Mergeai, R. C. Cronn, et J. F. Wendel. (2001). Polyploid formation in cotton is not accompanied by rapid genomic changes. *Genome* **44**, 321-30.
- Liu, Bao,** Chunming Xu, Na Zhao, Bao Qi, Josphert N. Kimatu, Jinsong Pang, et Fangpu Han. (2009). Rapid genomic changes in polyploid wheat and related species: implications for genome evolution and genetic improvement. *Journal of Genetics and Genomics* **36**, 519-28.
- Llave, César.** (2010). Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends in plant science* **15**, 701-7.
- Lockhart, B. E. L.** (1986). Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. *Phytopathology* **76**, 995-999.
- Lockhart, B. E.** (1995). *Banana streak badnavirus infection in Musa: epidemiology, diagnosis and control*. ASPAC Food & Fertilizer Technology Center.
- Lockhart, B. E. L.** (1990). Evidence for a double-stranded circular DNA genome in a second group of plant viruses. *Phytopathology* **80**, 127.
- Lockhart, B. E. L.,** et **Olszewski N. E.** (1993). Serological and genomic heterogeneity of banana streak badnavirus: implications for virus detection in *Musa* germplasm. In International Symposium on Genetic Improvement of Bananas for Resistance to Diseases and Pests, Montpellier (France), 7-9 Sep 1992.
- Lockhart, B. E. L.,** et **Jones D. R.** (2000), Disease caused by virus: Banana streak. In Diseases of Banana, Abaca and Enset. Edited by D.r. Jones. New York: CABI Publishing, 263-274.
- Lockhart, B E,** J Menke, G Dahal, et N E Olszewski. (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. *The Journal of General Virology* **81**, 1579-1585.
- Lockton, Steven,** et **Brandon S. Gaut.** (2010). The evolution of transposable elements in natural populations of self-fertilizing *Arabidopsis thaliana* and its outcrossing relative *Arabidopsis lyrata*. *BMC evolutionary biology* **10**, 10.
- Loidl, Josef.** (1990). The initiation of meiotic chromosome pairing: the cytological view. *Genome* **33**, 759-778.
- Lysak, M. A.,** M. Dolez, J. P. Horry, Rony Swennen, et J. Dolez. (1999). Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theoretical and Applied Genetics* **98**, 1344-50.

M

Références Bibliographiques

- Maguire**, Marjorie P. (1967). Evidence for Homologous Pairing of Chromosomes prior to Meiotic Prophase in Maize. *Chromosoma* **21**, 221-231.
- Martinez-Perez**, E, P Shaw, et G Moore. (2001). The Ph1 locus is needed to ensure specific somatic and meiotic centromere association. *Nature* **411**, 204-207.
- McCue**, Andrea D., Saivageethi Nuthikattu, Sarah H. Reeder, et R. Keith Slotkin. (2012). Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. *PLoS genetics* **8**, e1002474.
- Menendez**, T., et K. Shepherd. (1975). Breeding new bananas. *World Crops* **27**, 104-112.
- Mertten**, D., G. K. Tsang, K. I. Manako, M. A. McNeilage, et P. M. Datson. (2012). Meiotic chromosome pairing in *Actinidia chinensis* var. *deliciosa*. *Genetica* **140**, 455-62.
- Mette**, M. F., W. Aufsatz, J. Van der Winden, M. A. Matzke, et A. J. M. Matzke. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal* **19**, 5194-5201.
- Mette**, M. F., T. Kanno, W. Aufsatz, J. Jakowitsch, J. Van der Winden, M. A. Matzke, et A. J. M. Matzke. (2002). Endogenous viral sequences and their potential contribution to heritable virus resistance in plants. *The EMBO journal* **21**, 461-69.
- Meyer**, J. B., G. G. F. Kasdorf, L. H. Nel, et G. Pietersen. (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.
- Mézard**, C. (2006). Meiotic recombination hotspots in plants. *Biochemical Society Transactions* **34**, 531-534.
- Mézard**, Christine, Julien Vignard, Jan Drouaud, et Raphaël Mercier. (2007). The road to crossovers: plants have their say. *Trends in Genetics: TIG* **23**, 91-99.
- Mikhailova**, Elena I., Tomás Naranjo, Ken Shepherd, Jannie Wenekes-van Eden, Christa Heyting, et J. Hans de Jong. (1998). The effect of the wheat Ph1 locus on chromatin organisation and meiotic chromosome pairing analysed by genome painting. *Chromosoma* **107**, 339-50.
- Mirouze**, Marie, Jon Reinders, Etienne Bucher, Taisuke Nishimura, Korbinian Schneeberger, Stephan Ossowski, Jun Cao, Detlef Weigel, Jerzy Paszkowski, et Olivier Mathieu. (2009). Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis*. *Nature* **461**, 427-30.
- Murad**, L., J. P. Bielawski, R. Matyasek, A. Kovarik, R. A. Nichols, A. R. Leitch, et C. P. Lichtenstein. (2004). The origin and evolution of geminivirus-related DNA sequences in *Nicotiana*. *Heredity* **92**, 352-58.
- Murashige**, T. et **Skoog** F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* **15**, 473-97.

N

- Ndowora**, Tsitsi, Ganesh Dahal, Daryle LaFleur, Glyn Harper, Roger Hull, Neil E. Olszewski, et Ben Lockhart. (1999). Evidence That Badnavirus Infection in *Musa* can Originate from Integrated Pararetroviral Sequences. *Virology* **255**, 214-220.
- Noreen**, Faiza, Rashid Akbergenov, Thomas Hohn, et Katja R. Richert-Pöggeler. (2007). Distinct Expression of Endogenous *Petunia* Vein Clearing Virus and the DNA Transposon dTph1 in Two *Petunia* Hybrid Lines Is Correlated with Differences in Histone Modification and siRNA Production. *The Plant Journal* **50**, 219-29.
- Noyer**, J. L., S. Causse, K. Tomekpe, A. Bouet, et F. C. Baurens. (2005). A new image of plantain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. *Genetica* **124**, 61-69.

O

- ODEADOM**. (2012). Office agricole chargé du POSEI et d'aides nationales en faveur des départements et collectivités d'outre-mer. Banane. http://www.odeadom.fr/?page_id=22.

Références Bibliographiques

- Ortiz**, Rodomiro. (1996). The Potential of AMMI Analysis for Field Assessment of *Musa* Genotypes to Virus Infection. *HortScience* **31**, 829-832.
- Osuji**, J O., Harrison G., Crouch J., et Heslop-Harrison J. S. (1997). Identification of the Genomic Constitution of *Musa* L. Lines (Bananas, Plantains and Hybrids) Using Molecular Cytogenetics. *Annals of Botany* **80**, 787-793.
- Otto**, Sarah P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* **131**, 452-62.

P

- Pahalawatta**, Vihanga, Keri Druffel, et Hanu Pappu. (2008). A new and distinct species in the genus Caulimovirus exists as an endogenous plant pararetroviral sequence in its host, *Dahlia variabilis*. *Virology* **376**, 253-57.
- Perrier**, Xavier, Frederic Bakry, Françoise Carreel, Christophe Jenny, Jean-Pierre Horry, Vincent Lebot, et Isabelle Hippolyte. (2009). Combining biological approaches to shed light on the evolution of edible bananas. *Ethnobotany Research & Applications* **7**, 199-216.
- Perrier**, Xavier, Edmond De Langhe, Mark Donohue, Carol Lentfer, Luc Vrydaghs, Frédéric Bakry, Françoise Carreel, et al. (2011). Multidisciplinary Perspectives on Banana (*Musa Spp.*) Domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 11311-11318.
- Phothipan**, S., B. Silayoi, K. Wanichkul, et S. Apisitwanich. (2005). Genetic relationship among bananas in AA, AAB and BB groups using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) techniques. *Kasetsart Journal* **39**, 703-10.
- Pillay**, Michael, et Abdou Tenkouano. (2011). *Banana Breeding: Progress and Challenges*. CRC Press.

R

- Ramírez**, P., et C. Rivera. (1998). Current status of banana streak virus in Costa Rica. *Banana streak virus: a unique virus*: **52**.
- Ramsey**, Justin, et Douglas W. Schemske. (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 589-639.
- Richert-Pöggeler**, K. R., et R. J. Shepherd. (1997). Petunia vein-clearing virus: a plant pararetrovirus with the core sequences for an integrase function. *Virology* **236**, 137-46.
- Richert-Pöggeler**, Katja R., Faiza Noreen, Trude Schwarzacher, Glyn Harper, et Thomas Hohn. (2003). Induction of infectious petunia vein clearing (pararetro) virus from endogenous provirus in petunia ». *EMBO J* **22**, 4836-4845.
- Rigal**, Mélanie, et Olivier Mathieu. (2011). A “mille-feuille” of silencing: epigenetic control of transposable elements ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* **1809**, 452-58.
- Rivera**, FN. (1981). The use of protein and isoenzyme banding patterns in determining taxonomic relationships among Philippine cooking bananas and their parents (*Musa* species).
- Robinson**, J. C. (1993). *Handbook of banana growing in South Africa*. Institute for Tropical and Subtropical Crops.
- Ruanguttapha**, S., K. Eimert, M.B. Schröder, B. Silayoi, J. Denduangboripant, et K. Kanchanapoom. (2007). Molecular phylogeny of banana cultivars from Thailand based on HAT-RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* **54**, 1565-1572.

S

- Sabot**, F. & Schulman, A.H. (2006). Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. *Heredity*, **97**(6), p.381–388.
- Safár**, Jan, Juan Carlos Noa-Carrazana, Jan Vrána, Jan Bartos, Olena Alkhimova, Xavier Sabau, Hana Šimková, Fabrice Lheureux, Marie-Line Caruana, et Jaroslav Dolezel. (2004). Creation of a

Références Bibliographiques

- BAC resource to study the structure and evolution of the banana (*Musa balbisiana*) genome. *Genome* **47**, 1182-91.
- Schnable**, Patrick S., Doreen Ware, Robert S. Fulton, Joshua C. Stein, Fusheng Wei, Shiran Pasternak, Chengzhi Liang, Jianwei Zhang, Lucinda Fulton, et Tina A. Graves. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *science* **326**, 1112-15.
- Schubert**, Veit, Young-Min Kim, Alexandre Berr, Jörg Fuchs, Armin Meister, Sylvia Marschner, et Ingo Schubert. (2007). Random Homologous Pairing and Incomplete Sister Chromatid Alignment Are Common in Angiosperm Interphase Nuclei. *Molecular Genetics and Genomics* **278**, 167-176.
- Shepherd**, K. (1994). History and methods of banana breeding. *InfoMusa* **3**, 10-11.
- Shepherd**, Ken. (1999). *Cytogenetics of the genus Musa*. IPGRI.
- Silva**, S. O., M. T. S. Junior, É J. Alves, J. Raimundo, S. Silveira, et M. B. Lima. (2001). Banana breeding program at Embrapa *In Crop. Breeding and Applied Biotechnology* **1**, 399-436).
- Simmonds**, N.W., et K. **Shepherd**. (1955). The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* **55**, 302-12.
- Simmonds**, Norman Willison. (1962). The evolution of the bananas. *The Evolution of the Bananas*.
- Slotkin**, R.K. & Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, **8**(4), p.272–285.
- Song**, Keming, PING Lu, Keliang Tang, et Thomas C. Osborn. (1995). Rapid genome change in synthetic polyploids of Brassica and its implications for polyploid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 7719-23.
- Staginnus**, Christina, et Katja R. **Richert-Pöggeler**. (2006). Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome. *Trends in Plant Science* **11**, 485-491.
- Staginnus**, Christina, Wolfgang Gregor, M. Florian Mette, Chee H. Teo, Eduviges G. Borroto-Fernández, Margit Laimer C. Machado, Marjori Matzke, et Trude Schwarzacher. (2007). Endogenous pararetroviral sequences in tomato (*Solanum lycopersicum*) and related species. *BMC plant biology* **7**, 24p.
- Stebbins**, G. L. (1947). Types of polyploids: their classification and significance. *Advances in genetics* **1**, 403-29.
- Stift**, Marc, Camillo Berenos, Peter Kuperus, et Peter H. van Tienderen. (2008). Segregation Models for Disomic, Tetrasomic and Intermediate Inheritance in Tetraploids: A General Procedure Applied to Rorippa (Yellow Cress) Microsatellite Data. *Genetics* **179**, 2113-2123.
- Stover**, Robert Harry, et Norman Willison **Simmonds**. (1987). *Bananas*. Longman Scientific & Technical.
- Sybenga**, J. (1996). Chromosome pairing affinity and quadrivalent formation in polyploids: do segmental allopolyploids exist? *Genome* **39**, 1176-1184.

T

- Tanne**, Edna, et Ilan Sela. (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**, 614-22.
- Teycheney**, Pierre-Yves, et Andrew DW **Geering**. (2011). Endogenous viral sequences in plant genomes. *Recent Advances in Plant Virology*, 347-66.
- Tezenas de Montcel**, H., Edmond De Langhe, et Rony Swennen. (1983). Essai de classification des bananiers plantains (AAB). *Fruits* **38**, 461-74.
- Thonnalak**, Therdsak, Benchamas Silayoi, Yingyong Paisooksantivatana, et Pradit Pongtongkam. (2010). Meiotic behavior in microsporocytes of some bananas in Thailand. *Kasetsart J* **44**, 536-43.
- Tomekpe**, Kodjo, Christophe Jenny, et Jean-Vincent Escalant. (2004). Revue des stratégies d'amélioration conventionnelle de *Musa* **13**, *infoMusa*, 2-6.

Références Bibliographiques

Tomekpe, Kodjo, P.R. Rowe, H.T. Du Montcel, et Vuylsteke D. (1996). Plantain and Popoulou/Maia Maoli Breeding: Current Approaches and Future Opportunities. In *New frontiers in resistance breeding for nematode, fusarium and sigatoka: proceedings of the workshop held in Kuala Lumpur, Malaysia, 2-5 October 1995*.

U

Ude, G., M. Pillay, D. Nwakanma, et A. Tenkouano. (2002). Genetic diversity in *Musa acuminata* Colla and *Musa balbisiana* Colla and some of their natural hybrids using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* **104**, 1246-1252.

V

Vilarinhos, Alberto Duarte. (2004). Cartographie génétique et cytogénétique chez le bananier : caractérisation des translocations. Montpellier - France: ENSAM.

Vuylsteke, D. R., R. L. Swennen, et R. Ortiz. (1992). Development and performance of balck sigatoka-resistant tetraploid hybrids of plantain (*Musa spp.*, AAB group). *Euphytica* **65**, 33-42.

W

Wassenegger, M. (2005). The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell*, **122**(1), p.13–16.

Weiss-Schneeweiss, H., K. Emadzade, T.-S. Jang, et G. M. Schneeweiss. (2013). Evolutionary Consequences, Constraints and Potential of Polyploidy in Plants. *Cytogenetic and Genome Research*.

Wierzbicki, Andrzej T. (2012). The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Current opinion in plant biology*.

Wilson, G. B. (1946). Cytological studies in the *Musae*. I. Meiosis in some triploid clones. *Genetics* **31**, 241.

Y

Yoo, M. J., E. Szadkowski, et J. F. Wendel. 2012. Homoeolog expression bias and expression level dominance in allopolyploid cotton. *Heredity*.

Yot-Dauthy, Danielle, et Joseph Marie Bové. (1966). Mosaique du bananier. Identification et purification de diverses souches du virus ». *Fruits* **21**, 449-466.

Z

Zhang, Xiaoyu, Ian R. Henderson, Cheng Lu, Pamela J. Green, et Steven E. Jacobsen. (2007). Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (**104**), 4536-41.

Zickler, Denise. (2006). From Early Homologue Recognition to Synaptonemal Complex Formation. *Chromosoma* **115**, 158-174.

Zilberman, Daniel, Mary Gehring, Robert K. Tran, Tracy Ballinger, et Steven Henikoff. (2006). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature genetics*, **39**, 61-69.

Annexes

Annexe 1

Composition de base des différents milieux de culture pour *Musa sp* (d'après Bakry, 2008).

Annexe 1 – A -Milieu de germination d'embryons zygotiques (EMB).

Composants	Eléments	Concentration des composants (mg·L ⁻¹)
Macroéléments de Murashige et Skoog	Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃)	1650
	Nitrate de potassium (KNO ₃)	1900
	Chlorure de calcium (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	440
	Magnesium sulfate (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	370
	Phosphate de potassium, monobasique (KH ₂ PO ₄)	170
Microéléments de Murashige et Skoog	Sulfate de manganèse (MnSO ₄ , H ₂ O)	22.3
	Sulfate de zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	8.6
	Acide borique (H ₃ BO ₃)	6.2
	Iodure de potassium (KI)	0.83
	Acide molybdique (sel sodique) (Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O)	0.25
	Chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6 H ₂ O)	0.025
	Sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5 H ₂ O)	0.025
Vitamines de Morel et Wetmore	Myo-inositol	100
	Thiamine, HCl	1
	Pyridoxine, HCl	1
	Acide nicotinique	1
	Pantothénate de calcium	1
	Biotine	0.01
Fe-EDTA	Na ₂ -EDTA	37.3
	Sulfate ferreux (FeSO ₄ , 7 H ₂ O)	27.8
Acide aminé	Hydrolysate de caséine	500
Hydrate de carbone	Saccharose	25 000
Hormones de croissance	Benzylaminopurine (BAP)	1
	Acide indole-acétique (IAA)	0,4
Gélifiant	Gelrite	1500
Indicateur de pH*	Pourpre de bromocrésol	8

(*) pH 5,7- ajusté avec une solution 0,1N d'hydroxyde de sodium (NaOH)-
Stérilisation du milieu par autoclavage à 118° pendant 20 min avant utilisation.

Annexe 1 – B -Milieu de prolifération (ou de multiplication) (Prolib)

Composants	Eléments	Concentration des composants (mg·L ⁻¹)
Macroéléments de Murashige et Skoog	Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃)	1650
	Nitrate de potassium (KNO ₃)	1900
	Chlorure de calcium (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	440
	Magnesium sulfate (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	370
	Phosphate de potassium, monobasique (KH ₂ PO ₄)	170
Microéléments de Murashige et Skoog	Sulfate de manganèse (MnSO ₄ , H ₂ O)	22.3
	Sulfate de zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	8.6
	Acide borique (H ₃ BO ₃)	6.2
	Iodure de potassium (KI)	0.83
	Acide molybdique (sel sodique) (Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O)	0.25
	Chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6 H ₂ O)	0.025
	Sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5 H ₂ O)	0.025
Vitamines de Morel et Wetmore	Myo-inositol	100
	Thiamine, HCl	1
	Pyridoxine, HCl	1
	Acide nicotinique	1
	Pantothénate de calcium	1
	Biotine	0.01
Fe-EDTA	Na ₂ -EDTA	37.3
	Sulfate ferreux (FeSO ₄ , 7 H ₂ O)	27.8
Acides aminés	Hydrolysate de caséine	500
	Cystéine	50
Hydrate de carbone	Saccharose	25 000
Hormone	Benzyl Amino Purine (BAP)	4
Gélifiant	Gelrite	2000
Indicateur de pH*	Pourpre de bromocrésol	8

(*) pH 5,7- ajusté avec une solution 0,1N d'hydroxyde de sodium (NaOH)-
Stérilisation du milieu par autoclavage à 118° pendant 20 min avant utilisation.

Annexe 1 – C - Milieu de croissance (MS de base)

Composants	Eléments	Concentration des composants (mg·L⁻¹)
Macroéléments de Murashige et Skoog	Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃)	1650
	Nitrate de potassium (KNO ₃)	1900
	Chlorure de calcium (CaCl ₂ , 2H ₂ O)	440
	Magnesium sulfate (MgSO ₄ , 7H ₂ O)	370
	Phosphate de potassium, monobasique (KH ₂ PO ₄)	170
Microéléments de Murashige et Skoog	Sulfate de manganèse (MnSO ₄ , H ₂ O)	22.3
	Sulfate de zinc (ZnSO ₄ , 7H ₂ O)	8.6
	Acide borique (H ₃ BO ₃)	6.2
	Iodure de potassium (KI)	0.83
	Acide molybdique (sel sodique) (Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O)	0.25
	Chlorure de cobalt (CoCl ₂ , 6 H ₂ O)	0.025
	Sulfate de cuivre (CuSO ₄ , 5 H ₂ O)	0.025
Vitamines de Morel et Wetmore	Myo-inositol	100
	Thiamine, HCl	1
	Pyridoxine, HCl	1
	Acide nicotinique	1
	Pantothénate de calcium	1
	Biotine	0.01
Fe-EDTA	Na ₂ -EDTA	37.3
	Sulfate ferreux (FeSO ₄ , 7 H ₂ O)	27.8
Acide aminé	Hydrolysate de caséine	500
Hydrate de carbone	Saccharose	25 000
Hormones de croissance	-	-
Gélifiant	Gelrite	2000
Indicateur de pH*	Pourpre de bromocrésol	8

(*) pH 5,7- ajusté avec une solution 0,1N d'hydroxyde de sodium (NaOH)-
Stérilisation du milieu par autoclavage à 118° pendant 20 min avant utilisation.

Annexe 2

Protocole d'extraction d'ADN

(d'après Gawel et Jarret, 1991)

Matériel et solutions

Chloroforme/alcool iso-amylque 24/1

Isopropanol (propanol-2)

Bain à 74°C

Azote liquide

Mortier /pilon

Tubes 50ml

Tubes eppendorf

Tampon Carlson modifié (pour 500ml de solution)

100mM Tris HCl ph 7,5	50ml (Tris1M)
2% w/v MATAB	10g
0,4% w/v Sulfite de Sodium	2g
1% PEG 6000	5g
1,4M NaCl	140ml (NaCl 5M)
20mM EDTA	20ml (EDTA 500mM)
50 µg/ml RNase	250 µl (100mg/ml)

Protocole

- 1- Broyer 2g de feuilles fraîches dans l'azote liquide avec une pincée de PVPP.
- 2- Transférer dans un tube de 50ml (attention à ce que le broyat ne dégèle jamais !)
- 3- Ajouter 12ml de tampon Carlson Modifié préchauffé à 74°
- 4- Mélanger plusieurs fois par inversion
- 5- Incuber à 74°C avec agitation pendant 20min
- 6- Refroidir à Température ambiante et ajouter 12ml de CIAA
- 7- Vortexer
- 8- Centrifuger 2500t/15min
- 9- Transférer la phase supérieure dans un tube de 50ml propre
- 10- Rajouter 12 ml de CIAA
- 11- Vortexer
- 12- Centrifuger 2500t/15min
- 13- Transférer la phase supérieure dans un tube de 50ml propre
- 14- Ajouter 10ml d'isopropanol
- 15- Récupérer la pelote (quand il y a présence d'une pelote) et la transférer dans un tube Eppendorf avec 1ml d'eau.
! Ne pas jeter les tubes, il faut les conserver pour l'étape suivante.
- 16- Centrifuger à la vitesse max supportée par les tubes 50 ml 15min. Eliminer le surnageant.
- 17- Laisser sécher le culot et reprendre dans 1 ml d'H₂O.
- 18- Une fois les culots complètement repris, les précipiter avec 1 V d'isopropanol. Centrifuger 15 min 14000rpm. Eliminer le surnageant.
- 19- Rincer avec 500 µl d'éthanol 70%. Centrifuger 5 min 14000 rpm. Eliminer le surnageant et laisser sécher le culot et reprendre dans 1 ml d'H₂O.

Annexe 3

Résultat du génotypage des 184 plantes de la population pour les 6 marqueurs eBSV

Trois marqueurs spécifiques de l'allèle eBSGFV-7 (2 marqueurs jonction entre le génome viral et le génome de la plante –VM1 et VM2- et un marqueur interne –VV3) et trois marqueurs spécifiques de l'allèle eBSOLV-1 (2 marqueurs jonction entre le génome viral et le génome de la plante –16-17 et 25-26- et un marqueur interne –29-30) ont été utilisés pour génotyper la population.

La présence (+) ou l'absence (-) d'amplification PCR pour chacun des marqueurs utilisés est renseignée dans chacune des colonnes. Les deux dernières colonnes du tableau synthétisent la présence (1) ou l'absence (0) de chaque espèce eBSV, permettant d'établir le génotype eBSV pour chaque individu (1-1 ou 1-0 ou 0-1 ou 0-0 pour eBSGFV-7 et eBSOLV-1).

Parents et individus de la population	Marqueurs eBSV						Génotype eBSV	
	eBSGFV-7			eBSOLV-1			eBSGFV-7	eBSOLV-1
	VM1	VV3	VM2	16-17	29-30	25-26		
CRBP39	+	+	+	+	+	+	1	1
Pahang-CARBAP	-	-	-	-	-	-	0	0
P001	+	+	+	+	+	+	1	1
P002	+	+	+	+	+	+	1	1
P003	+	+	+	+	+	+	1	1
P005	-	-	-	+	+	+	0	1
P006	-	-	-	-	-	-	0	0
P007	+	+	+	+	+	+	1	1
P008	+	+	+	+	+	+	1	1
P009	+	+	+	+	+	+	1	1
P010	+	+	+	+	+	+	1	1
P011	+	+	+	+	+	+	1	1
P012	+	+	+	+	+	+	1	1
P013	+	+	+	-	-	-	1	0
P014	+	+	+	+	+	+	1	1
P015	+	+	+	+	+	+	1	1
P016	-	-	-	-	-	-	0	0
P017	+	+	+	-	-	-	1	0
P018	+	+	+	+	+	+	1	1
P019	+	+	+	+	+	+	1	1
P021	+	+	+	+	+	+	1	1
P022	+	+	+	+	+	+	1	1
P023	-	-	-	-	-	-	0	0
P024	+	+	+	-	-	-	1	0
P025	+	+	+	+	+	+	1	1
P026	+	+	+	-	-	-	1	0

Annexes

P027	+	+	+	+	+	+	1	1
P028	+	+	+	+	+	+	1	1
P029	+	+	+	+	+	+	1	1
P030	+	+	+	+	+	+	1	1
P031	+	+	+	+	+	+	1	1
P032	+	+	+	+	+	+	1	1
P033	+	+	+	-	-	-	1	0
P034	+	+	+	+	+	+	1	1
P035	+	+	+	-	-	-	1	0
P037	+	+	+	+	+	+	1	1
P038	+	+	+	-	-	-	1	0
P039	+	+	+	+	+	+	1	1
P040	-	-	-	-	-	-	0	0
P041	+	+	+	+	+	+	1	1
P042	-	-	-	-	-	-	0	0
P043	-	-	-	-	-	-	0	0
P045	+	+	+	+	+	+	1	1
P046	+	+	+	+	+	+	1	1
P047	-	-	-	-	-	-	0	0
P048	+	+	+	+	+	+	1	1
P049	+	+	+	+	+	+	1	1
P050	+	+	+	+	+	+	1	1
P051	-	-	-	-	-	-	0	0
P052	+	+	+	-	-	-	1	0
P053	+	+	+	+	+	+	1	1
P054	+	+	+	+	+	+	1	1
P055	-	-	-	+	+	+	0	1
P056	+	+	+	+	+	+	1	1
P057	+	+	+	+	+	+	1	1
P058	+	+	+	+	+	+	1	1
P059	-	-	-	+	+	+	0	1
P060	+	+	+	-	-	-	1	0
P061	+	+	+	+	+	+	1	1
P062	+	+	+	+	+	+	1	1
P063	+	+	+	+	+	+	1	1
P065	+	+	+	+	+	+	1	1
P066	+	+	+	+	+	+	1	1
P067	+	+	+	+	+	+	1	1
P068	+	+	+	-	-	-	1	0
P069	+	+	+	-	-	-	1	0
P070	-	-	-	-	-	-	0	0
P071	+	+	+	-	-	-	1	0
P072	+	+	+	+	+	+	1	1
P073	+	+	+	+	+	+	1	1
P074	+	+	+	+	+	+	1	1
P075	+	+	+	-	-	-	1	0
P076	+	+	+	+	+	+	1	1
P077	-	-	-	-	-	-	0	0
P078	+	+	+	+	+	+	1	1
P079	+	+	+	+	+	+	1	1
P080	+	+	+	-	-	-	1	0
P081	+	+	+	-	-	-	1	0
P082	-	-	-	+	+	+	0	1
P083	+	+	+	-	-	-	1	0
P084	-	-	-	-	-	-	0	0
P085	+	+	+	+	+	+	1	1

Annexes

P086	+	+	+	+	+	+	1	1
P087	+	+	+	+	+	+	1	1
P088	+	+	+	+	+	+	1	1
P089	+	+	+	+	+	+	1	1
P090	+	+	+	+	+	+	1	1
P091	+	+	+	+	+	+	1	1
P093	+	+	+	+	+	+	1	1
P094	+	+	+	+	+	+	1	1
P095	+	+	+	+	+	+	1	1
P096	-	-	-	-	-	-	0	0
P097	+	+	+	+	+	+	1	1
P098	+	+	+	+	+	+	1	1
P099	+	+	+	+	+	+	1	1
P100	+	+	+	+	+	+	1	1
P101	-	-	-	+	+	+	0	1
P102	+	+	+	+	+	+	1	1
P103	+	+	+	+	+	+	1	1
P104	+	+	+	-	-	-	1	0
P105	+	+	+	+	+	+	1	1
P106	-	-	-	-	-	-	0	0
P107	+	+	+	+	+	+	1	1
P109	-	-	-	-	-	-	0	0
P110	+	+	+	-	-	-	1	0
P111	+	+	+	-	-	-	1	0
P112	+	+	+	+	+	+	1	1
P113	+	+	+	+	+	+	1	1
P114	+	+	+	+	+	+	1	1
P115	+	+	+	+	+	+	1	1
P116	+	+	+	+	+	+	1	1
P118	+	+	+	+	+	+	1	1
P119	+	+	+	+	+	+	1	1
P120	+	+	+	+	+	+	1	1
P121	+	+	+	-	-	-	1	0
P122	+	+	+	+	+	+	1	1
P123	+	+	+	+	+	+	1	1
P124	+	+	+	+	+	+	1	1
P125	+	+	+	+	+	+	1	1
P126	+	+	+	+	+	+	1	1
P127	+	+	+	-	-	-	1	0
P128	+	+	+	+	+	+	1	1
P129	+	+	+	+	+	+	1	1
P130	+	+	+	+	+	+	1	1
P131	+	+	+	+	+	+	1	1
P132	+	+	+	+	+	+	1	1
P133	+	+	+	+	+	+	1	1
P134	+	+	+	+	+	+	1	1
P135	+	+	+	+	+	+	1	1
P136	+	+	+	+	+	+	1	1
P137	+	+	+	+	+	+	1	1
P138	+	+	+	-	-	-	1	0
P139	+	+	+	+	+	+	1	1
P140	+	+	+	+	+	+	1	1
P141	+	+	+	-	-	-	1	0
P142	+	+	+	+	+	+	1	1
P143	+	+	+	+	+	+	1	1
P145	+	+	+	+	+	+	1	1

Annexes

P146	+	+	+	+	+	+	1	1
P147	+	+	+	-	-	-	1	0
P149	+	+	+	+	+	+	1	1
P150	+	+	+	+	+	+	1	1
P151	+	+	+	+	+	+	1	1
P152	+	+	+	+	+	+	1	1
P153	+	+	+	-	-	-	1	0
P154	-	-	-	-	-	-	0	0
P155	+	+	+	-	-	-	1	0
P156	+	+	+	-	-	-	1	0
P157	-	-	-	-	-	-	0	0
P158	-	-	-	-	-	-	0	0
P159	+	+	+	-	-	-	1	0
P161	+	+	+	+	+	+	1	1
P162	+	+	+	+	+	+	1	1
P163	+	+	+	-	-	-	1	0
P164	+	+	+	-	-	-	1	0
P165	+	+	+	+	+	+	1	1
P166	+	+	+	+	+	+	1	1
P167	+	+	+	-	-	-	1	0
P168	+	+	+	-	-	-	1	0
P169	+	+	+	+	+	+	1	1
P170	+	+	+	+	+	+	1	1
P171	+	+	+	+	+	+	1	1
P172	+	+	+	+	+	+	1	1
P173	+	+	+	+	+	+	1	1
P174	+	+	+	+	+	+	1	1
P175	+	+	+	+	+	+	1	1
P177	+	+	+	+	+	+	1	1
P178	+	+	+	+	+	+	1	1
P179	+	+	+	+	+	+	1	1
P180	+	+	+	+	+	+	1	1
P181	+	+	+	+	+	+	1	1
P182	-	-	-	-	-	-	0	0
P183	+	+	+	+	+	+	1	1
P185	-	-	-	-	-	-	0	0
P186	+	+	+	+	+	+	1	1
P187	-	-	-	-	-	-	0	0
P188	+	+	+	-	-	-	1	0
P190	+	+	+	+	+	+	1	1
P191	+	+	+	-	-	-	1	0
P193	-	-	-	-	-	-	0	0
P194	+	+	+	+	+	+	1	1
P195	+	+	+	+	+	+	1	1
P196	+	+	+	-	-	-	1	0
P198	-	-	-	-	-	-	0	0
P200	-	-	-	-	-	-	0	0
P203	-	-	-	-	-	-	0	0

Légende : 1 ou (+) = présence de l'eBSV ; 0 ou (-) = absence de l'eBSV

Annexe 4

Diagnostic de l'infection BSOLV et BSGFV pour les 136 individus de la population à trois temps distincts de leur culture

CIV (septembre), S.1 : 'serre hiver' (février) et S.2 : 'serre été' (juin). Le profil d'intégration de chaque plante est indiqué pour chacune des deux espèces eBSV (eBSGFV et eBSOLV).

Plantes caractérisées par IC- PCR	eBSGFV	BSGFV (infection)			eBSOLV	BSOLV (infection)		
		CIV	S.1	S.2		CIV	S.1	S.2
P001	1	-	-	-	1	+	+	+
P002	1	-	-	-	1	+	+	+
P005	0	-	-	-	1	+	+	+
P006	0	-	-	-	0	-	-	-
P008	1	-	-	-	1	+	+	+
P009	1	-	-	-	1	-	-	-
P010	1	-	-	-	1	+	+	+
P011	1	-	-	-	1	+	+	+
P012	1	-	-	-	1	+	+	+
P014	1	+	+	+	1	+	+	+
P015	1	-	-	-	1	-	-	-
P016	0	-	-	-	0	-	-	-
P017	1	-	-	-	0	-	-	-
P018	1	-	-	-	1	-	-	-
P019	1	-	-	-	1	-	-	+
P021	1	-	-	+	1	+	+	+
P022	1	-	-	-	1	+	+	+
P023	0	-	-	-	0	-	-	-
P024	1	-	-	-	0	-	-	-
P025	1	-	-	-	1	-	-	-
P026	1	-	-	-	0	-	-	-
P027	1	-	-	-	1	-	-	-
P028	1	-	-	-	1	+	+	+
P029	1	-	-	-	1	+	+	+
P030	1	-	-	-	1	+	+	+
P031	1	-	-	+	1	-	-	-
P032	1	-	-	-	1	+	+	+
P033	1	-	-	-	0	-	-	-
P034	1	-	-	-	1	-	-	+
P035	1	-	-	-	0	-	-	-
P037	1	-	-	-	1	+	+	+
P038	1	-	-	-	0	-	-	-

Annexes

P039	1	-	-	-	1	+	+	+
P040	0	-	-	-	0	-	-	-
P041	1	-	-	-	1	-	-	+
P042	0	-	-	-	0	-	-	-
P043	0	-	-	-	0	-	-	-
P045	1	-	-	N/D	1	-	-	N/D
P046	1	-	-	-	1	+	+	+
P047	0	-	-	-	0	-	-	-
P048	1	+	+	+	1	+	+	+
P049	1	-	-	-	1	-	-	+
P050	1	-	-	-	1	-	-	-
P051	0	-	-	-	0	-	-	-
P052	1	-	-	-	0	-	-	-
P053	1	-	-	-	1	+	+	+
P054	1	-	-	-	1	-	-	-
P056	1	-	-	-	1	-	-	-
P057	1	-	-	-	1	+	+	+
P058	1	-	-	-	1	+	+	+
P059	0	-	-	-	1	+	+	+
P060	1	-	-	-	0	-	-	-
P061	1	-	-	-	1	+	+	+
P065	1	-	-	-	1	+	+	+
P066	1	-	-	-	1	-	-	-
P067	1	-	-	-	1	-	-	-
P068	1	-	-	-	0	-	-	-
P069	1	-	-	-	0	-	-	-
P071	1	-	-	-	0	-	-	-
P072	1	-	-	-	1	-	-	-
P073	1	-	-	-	1	+	+	+
P074	1	-	-	-	1	-	-	-
P076	1	-	-	-	1	-	-	-
P077	0	-	-	-	0	-	-	-
P080	1	-	-	-	0	-	-	-
P081	1	-	-	-	0	-	-	-
P085	1	-	-	-	1	-	-	-
P087	1	-	-	-	1	+	+	+
P088	1	-	-	-	1	-	-	-
P091	1	-	-	-	1	-	-	+
P093	1	-	-	-	1	+	+	+
P094	1	-	-	-	1	-	-	-
P095	1	-	-	-	1	-	-	-
P096	0	-	-	-	0	-	-	-
P100	1	-	-	-	1	+	+	+
P101	0	-	-	-	1	-	-	-
P102	1	-	-	-	1	-	-	-
P106	0	-	-	-	0	-	-	-
P107	1	-	-	-	1	+	+	+
P109	0	-	-	-	0	-	-	-
P114	1	-	-	-	1	+	+	+
P123	1	-	-	+	1	+	+	+
P124	1	-	-	-	1	+	+	+
P126	1	-	-	-	1	+	+	+
P127	1	-	-	-	0	-	-	-
P129	1	-	-	-	1	+	+	+
P130	1	-	-	-	1	+	+	+
P131	1	-	-	-	1	+	+	+
P133	1	-	-	-	1	-	-	+
P134	1	-	-	-	1	+	+	+

Annexes

P135	1	-	-	-	1	+	+	+
P136	1	-	-	-	1	-	-	+
P137	1	-	-	-	1	+	+	+
P139	1	-	-	-	1	+	+	+
P140	1	-	-	+	1	-	-	-
P141	1	-	-	-	0	-	-	-
P142	1	-	-	-	1	+	+	+
P143	1	+	+	+	1	+	+	+
P145	1	-	-	-	1	+	+	+
P146	1	-	-	-	1	+	+	+
P147	1	-	-	-	0	-	-	-
P150	1	-	-	-	1	-	-	-
P151	1	-	-	-	1	+	+	+
P152	1	-	-	-	1	-	-	-
P153	1	-	-	-	0	-	-	-
P154	0	-	-	-	0	-	-	-
P155	1	-	-	-	0	-	-	-
P156	1	-	-	-	0	-	-	-
P157	0	-	-	-	0	-	-	-
P158	0	-	-	-	0	-	-	-
P161	1	-	-	-	1	-	-	-
P163	1	-	-	-	0	-	-	-
P164	1	-	-	-	0	-	-	-
P165	1	-	-	-	1	+	+	+
P167	1	-	-	-	0	-	-	-
P168	1	-	-	-	0	-	-	-
P169	1	-	-	-	1	-	-	-
P170	1	-	-	-	1	+	+	+
P172	1	-	-	-	1	+	+	+
P174	1	-	-	-	1	+	+	+
P175	1	-	-	-	1	+	+	+
P177	1	-	-	-	1	+	+	+
P179	1	-	-	-	1	+	+	+
P180	1	-	-	-	1	-	-	-
P181	1	-	-	-	1	+	+	+
P182	0	-	-	-	0	-	-	-
P183	1	-	-	-	1	+	+	+
P185	0	-	-	-	0	-	-	-
P186	1	-	-	-	1	+	+	+
P187	0	-	-	-	0	-	-	-
P188	1	-	-	-	0	-	-	-
P190	1	-	-	-	1	-	-	+
P193	0	-	-	-	0	-	-	-
P194	1	-	-	-	1	+	+	+
P200	0	-	-	-	0	-	-	-
P203	0	-	-	-	0	-	-	-

Légende : (+) = présence BSV ; (-) = absence BSV ; 1 = présence eBSV ; 0 = absence eBSV ; S.1 = échantillonnage n°1 en serre hiver (février) ; S.2 = échantillonnage n°2 en serre été (juin) ; CIV = culture *in vitro* ; (N/D) = non disponible (mort)

Résumé

De nombreuses bananes cultivées et consommées sont des hybrides interspécifiques triploïdes entre *Musa acuminata* (génom A) et *Musa balbisiana* (génom B). L'amélioration de ces cultivars nécessite de mettre en place des stratégies complexes liées à leur faible fertilité et leur niveau de ploïdie. De plus, le génome *M. balbisiana* porteur de caractères agronomiques intéressants est malheureusement porteur de séquences intégrées de *Banana streak virus* (ou eBSV pour *endogenous BSV*). Ces eBSV sont capables de produire, dans un contexte de croisements interspécifiques et sous conditions de stress abiotiques, des génomes viraux responsables de l'infection systémique du bananier. L'activation spontanée de ces eBSV est la contrainte majeure des programmes d'amélioration du bananier plantain depuis plus de 10 ans. La ségrégation des chromosomes A et B chez les clones polyploïdes interspécifiques de bananiers est encore très peu connue. Nous avons au cours de cette thèse analysé la recombinaison et la ségrégation chromosomique chez 184 plantes issues de la descendance AAAB (CRBP39) x AA (Pahang_Carbab) au moyen de 38 marqueurs SSR distribués sur les 11 chromosomes *Musa* et de 6 marqueurs PCR spécifiques des deux espèces BSV présentes chez CRBP39 (eBSGFV-7 et eBSOLV-1). Nous avons observé qu'au cours de la formation des gamètes chez l'allotétraploïde CRBP39, la plupart des marqueurs du tétraploïde AAAB CRBP39 ont une ségrégation de type tétrasomique et que les génomes A et B recombinent au niveau de tous les segments de chromosomes pour lesquels nous pouvions suivre les allèles du chromosome B. D'autre part, nous avons montré que 50% des descendants ont reçu, à un ou quelques loci, un ou trois allèles du parent AAAB (CRBP39) au lieu de deux. La composition allélique de ces gamètes aneuploïdes, la cartographie génétique et l'analyse des corrélations entre marqueurs suggèrent que cette particularité résulte d'une variation structurale entre génomes A et B. Un des chromosomes B correspondrait à une partie des chromosomes 1A et 3A. Nous avons également observé une distorsion de ségrégation des loci eBSV avec une surreprésentation d'individus possédant au moins une intégration eBSV (86%). La régulation des eBSV semble très complexe et nécessitera des études complémentaires pour tenter d'identifier le ou les facteurs génétiques qui y sont impliqués. Finalement, notre travail a montré que des croisements de type AAAB x AA peuvent générer des plantes possédant du génome B sans aucune intégration BSV (13%). Ce résultat est important car il ouvre une voie de contournement à la contrainte eBSV dans les programmes d'amélioration génétique.

Mots clés : Bananier plantain, eBSV, Hybride interspécifique, Polyploïde, Ségrégation chromosomique, SSR

Summary

Many cultivated and consumed banana are interspecific triploid hybrids between *Musa acuminata* (A genome) and *Musa balbisiana* (B genome). The genetic improvement of these cultivars requires the implementation of complex breeding strategies due to their low fertility and ploidy level. In addition, the B genome of *M. balbisiana* which bears interesting agronomic traits unfortunately carries endogenous *Banana streak virus* sequences (eBSV). Under certain conditions such as interspecific crosses and abiotic stresses, these eBSV are able to produce infectious viral genomes responsible for systemic infection of banana. The spontaneous activation of these eBSV is the major constraint of plantain improvement programs for more than 10 years. The A and B chromosomes recombination and segregation in interspecific polyploids banana are still poorly understood. We here analyzed chromosomes recombination and segregation in 184 offspring from the cross AAAB (CRBP39) x AA (Pahang_Carbab) using 38 SSR markers distributed on the 11 *Musa* chromosomes and 6 specific PCR markers of both BSV species integrated in CRBP39 (eBSGFV-7 and eBSOLV-1). We noticed that during CRBP39 meiosis most of the SSR markers have tetrasomic segregation and that A and B genomes recombine at all chromosomes segments where we were able to follow chromosome B alleles. Besides, we showed that 50% of the offspring received at one or several loci, one or three alleles of the CRBP39 parent instead of two. The allelic composition of these aneuploid gametes, the genetic map and the analysis of correlations between markers suggest that this peculiar observation is due to a structural variation between A and B genomes. One of the B chromosomes would be part of chromosomes 1A and 3A. We also noticed a distorted segregation of eBSV loci with an overrepresentation of individuals harboring at least one of the eBSV (86%). eBSV regulation seems very complex and requires additional studies to identify the genetic factor(s) involved. Finally, we also showed that AAAB x AA crosses can generate plants with B genome but without eBSV. This is the case for 13% of the offspring. This result is important because it shows that we can overcome eBSV constraint in banana breeding programs.

Keywords: Plantain banana, eBSV, Interspecific hybrid, Polyploid, Chromosome segregation, SSR