

UNIVERSITE DE PARIS XI
U. F. R. DES SCIENCES D'ORSAY

THESE

présentée pour obtenir le grade de
Docteur en Sciences de l'Université Paris XI
spécialité : Biologie, Diversité et Adaptation des Plantes Cultivées
option Phytopathologie
par

Laurence ALBAR

**ETUDE DES BASES GENETIQUES DE LA RESISTANCE
PARTIELLE DU RIZ AU VIRUS DE LA
PANACHURE JAUNE (RYMV)
Cartographie Moléculaire et Relation avec la Diversité Génétique**

Soutenue le 2 octobre 1998
devant la commission d'examen :

M. de VIENNE D., Professeur, Université Paris XI
M. DRON M., Directeur Scientifique, CIRAD
M. DUNEZ J., Directeur de Recherche, INRA
M. GHESQUIERE A., Chargé de Recherche, ORSTOM
M. PALLOIX A., Directeur de Recherche, INRA
M. THIELLEMENT H., Professeur, Université de Genève

Président
Examineur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Rapporteur

Remerciements

Quand j'ai commencé mon stage de DEA de Phytopathologie puis ma thèse à l'ORSTOM, j'étais déjà familiarisée avec les virus des plantes et j'ai rapidement fait connaissance avec le RYMV. Mais c'est Alain Ghesquière qui m'a présenté mes deux autres compagnons de route, le riz et la génétique, et qui m'a aidée à les apprivoiser. Il m'a communiqué un peu de ses larges connaissances en génétique, m'a encadrée, aidée, conseillée ... Bref, il m'a accordé beaucoup de temps et m'a beaucoup appris. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance.

Souvent, je me suis échappée du labo de génétique pour rejoindre le labo de virologie, ses virus et ses tests ELISA. Là, Denis Fargette a suivi mon travail avec beaucoup d'intérêt, m'a donné de nombreux conseils et m'a encouragée tout au long de cette thèse. Je l'en remercie vivement.

Une thèse, c'est en grande partie, la paillasse et les manips. Au laboratoire de biologie moléculaire, c'est Isa qui m'a aidée de membranes en membranes, des sondes froides aux sondes chaudes. Merci, Isa. Au LPRC, Agnès était toujours présente quand j'ai eu besoin d'aide et c'était toujours très agréable de travailler avec elle, merci beaucoup. Merci également à Jamel qui s'est occupé à merveille de mes plants de riz. Merci aussi à Marie qui, la première, m'a montré toutes les techniques de biologie moléculaire.

J'ai eu l'occasion au cours de cette thèse de partir quatre mois à l'ADRAO, en Côte d'Ivoire. Malgré quelques petits déboires, ce fut très enrichissant autant d'un point de vue personnel que professionnel. Je tiens à exprimer ma reconnaissance à l'équipe qui m'a accueillie : Monsieur Sy, responsable du Laboratoire de Pathologie à cette période, Messieurs Akator et Afolabi, et toute l'équipe du laboratoire de Pathologie, ainsi que le personnel de la maison d'hôtes. Merci également à Placide N'Guessan.

De Côte d'Ivoire, je suis allée en mission à Sikasso, au Mali. Je remercie vivement Nour Ahmadi pour les essais réalisés à Sikasso ainsi que pour son accueil.

Depuis mon arrivée à l'ORSTOM, l'équipe riz s'est agrandie. Isa, Mathias, Cécile et Marie-No sont là quand il s'agit de percer les mystères d'une carte génétique, d'une courbe de DO ou de l'informatique. Je les remercie pour leurs conseils, leur aide et leur soutien ainsi que pour leur bonne humeur. Merci, en particulier à Mathias qui m'a initiée à la cartographie génétique et dont j'ai beaucoup apprécié les conseils au cours de l'analyse des résultats comme de la rédaction.

Merci également à Fabienne, Philippe et Laurent: on a partagé des soucis, des idées, des discussions enrichissantes et des moments très sympathiques. Beaucoup de stagiaires sont également passés par l'ORSTOM ou le CIRAD depuis que j'ai commencé cette thèse et ils ont largement contribué à créer l'ambiance agréable du labo. Merci à tous et merci en particulier à Gaël et Juliette.

Je souhaite remercier tout le personnel du Laboratoire de Génétique, du Laboratoire de Virologie et des serres de l'ORSTOM. Merci en particulier à Serge Hamon qui m'a accueillie dans le laboratoire, à « Super Véro » pour ses conseils avisés en traitement de texte et mise en forme, à Michel Noirot pour ses conseils en statistiques et à Alain Borgel qui m'a fait bénéficier de ses compétences en informatique

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur Dunez et Monsieur Thiellement qui ont accepté de rapporter ce travail et à Messieurs de Vienne, Dron et Palloix qui participent au jury.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à Philippe Prior et aux enseignants du DEA de Phytopathologie qui m'ont permis de faire mes premiers pas dans la recherche et à qui je dois de terminer aujourd'hui une thèse en Phytopathologie.

Enfin, j'adresse un très grand merci à ma famille et à tous les amis qui m'ont aidée, encouragée et supportée pendant ces quelques années.

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications dans des revues scientifiques :

- Ghesquière A, Albar L, Lorieux M, Ahmadi N, Fargette D, Huang N, McCouch SR, Notteghem J-L (1997). A major QTL for rice yellow mottle virus (RYMV) resistance is lying in a cluster of blast resistance genes on chromosome 12. **Phytopathology** 87 : 1243-1249.
- Albar L, Ahmadi N, Rimbault I, Pinel A, Lorieux M, Sy AA, Fargette D, Ghesquière A. (1998). Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus. I. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology. **Theoretical and Applied Genetics** 97 (7) : 1145-1154.
- Pressoir G, Albar L, Ahmadi N, Rimbault I, Lorieux M, Fargette D, Ghesquière A. (1998) Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus. II. Evidence of a complementary epistasis between two QTLs. **Theoretical and Applied Genetics** 97 (7) : 1155-1161.

Communications orales :

- Albar L, Ghesquière A, Fargette D, Notteghem J-L (1994). Recherche de marqueurs de résistance au Rice Yellow Mottle Virus (RYMV), agent de la panachure jaune du riz. **Colloque INRA AIP Gènes de résistance aux maladies**, La Colle-sur-Loup, 17-19 octobre.
- Albar L, Ghesquière A, Fargette D, Notteghem J-L (1995). Recherche de marqueurs de résistance au Rice Yellow Mottle Virus, agent de la panachure jaune du riz. **Cinquièmes Rencontres de Virologie Végétale**, Aussois, 23-27 janvier.
- Albar L, Ghesquière A, Lorieux M, Fargette D, Notteghem J-L (1995). Identification and mapping of DNA markers linked to loci that confer resistance to RYMV. **International Symposium on Rice Yellow Mottle Virus**, Bouaké, Côte d'Ivoire, 18-22 septembre.
- Albar L, Ghesquière A, Fargette D, Lorieux M, Notteghem J-L (1995). Cartographie de la résistance au Rice Yellow Mottle Virus, agent de la panachure jaune du riz. **Colloque INRA AIP Gènes de Résistance aux Maladies**. Seillac, 8-10 novembre.
- Albar L, Ghesquière A, Fargette D, Lorieux M, Pinel A, Notteghem J-L, Sy AA, Ahmadi N (1997). Cartographie de la résistance au virus de la panachure du riz (RYMV). **Sixièmes Rencontres de Virologie Végétale**, Aussois, 9-13 mars.
- Albar L, Ghesquière A, Fargette D, Lorieux M, Notteghem J-L, Sy AA, Ahmadi N (1997). Cartographie de gènes de résistance du riz au RYMV, virus de la panachure du riz. **Colloque INRA AIP Gènes de Résistance aux Maladies**, L'Isle-sur-la-Sorgue, 26-28 mars.

Poster :

- Albar L, Pressoir G, Ahmadi N, Fargette D, Lorieux M, Ghesquière A (1998). Mapping of quantitative trait loci controlling resistance to rice yellow mottle virus in an *indica* x *japonica* doubled haploid population. **Plant and Animal Genome VI**, San Diego, CA, USA, 18-22 janvier.

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SIGLES

ACP-ELISA	antibody coated plate-enzyme linked immunosorbent assay
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADRAO	Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest
AFC	analyse factorielle des correspondances
AFLP	amplified fragment length polymorphism
ARN	acide ribonucléique
BAC	bacterial artificial chromosome
BC	backcross
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
cM	centimorgan
CMV	cucumber mosaic virus
dATP	désoxyadénosine triphosphate
dCTP	désoxycytidine triphosphate
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
dNTP	désoxynucléoside triphosphate
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dUTP	désoxyuridine triphosphate
DAS-ELISA	double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay
D _n	déséquilibre de liaison normalisé
DO	densité optique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
G _{st}	différenciation génétique
H	diversité génétique
h ²	héritabilité
HD	haploïde doublé
HR	hypersensitive reaction
IER	Institut d'Economie Rurale (Mali)
IITA	Institut International pour l'Agriculture Tropicale
ILTAB	Laboratoire International de Biotechnologies Agricoles Tropicales
IRRI	Institut International de Recherche sur le Riz
kb	kilobase
ln	logarithme népérien
LOD	logarithm of odds ratio
log	logarithme décimal
LPRC	Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes
LRR	leucine rich repeat
LZ	leucine zipper
MSV	maize streak virus
NBS	nucleotide binding site
ORF	open reading frame
ORSTOM	Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération
PBS-T	tampon phosphate salin et Tween (voir annexe 3)
PCR	polymerase chain reaction
pNPP	para-nitrophenylphosphate
PR	pathogenesis related
PVY	potato virus Y
QTL	quantitative trait locus
r	coefficient de corrélation

R ²	coefficient de détermination
RIL	recombinant inbred line
RAPD	random amplified polymorphic DNA
RFLP	restriction fragment lenght polymorphism
RGP	Rice Genome Program (Tsukuba, Japon)
RHBV	rice hoja blanca virus
RTBV	rice tungro bacilliform virus
RTSV	rice tungro spherical virus
RYMV	rice yellow mottle virus
SAM	sélection assistée par marqueurs
SSC	standard saline citrate (voir annexe 3)
TAE	tris-acétate-EDTA (voir annexe 3)
TBE	tris-borate-EDTA (voir annexe 3)
TE	tris-EDTA (voir annexe 3)
TMV	tobacco mosaic virus
TSRI	The Scripps Research Institute
VPg	protéine virale liée au génome
YAC	yeast artificial chromosome

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1. LE RIZ.....	15
1.1. LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE CHEZ LE RIZ CULTIVÉ	15
1.2. LA CARTOGRAPHIE DU RIZ	19
1.3. LES MALADIES DU RIZ	20
1.3.1. <i>Les principaux pathogènes</i>	21
1.3.2. <i>L'utilisation des gènes de résistance</i>	22
2. LA RÉSISTANCE DES PLANTES AUX PATHOGENES.....	23
2.1. L'EXPRESSION DE LA RÉSISTANCE	23
2.1.1. <i>Les mécanismes de résistance</i>	23
2.1.2. <i>La résistance au cours des différentes étapes de l'interaction plante/virus</i>	27
2.2. BASES GÉNÉTIQUES DE LA RÉSISTANCE.....	28
2.2.1. <i>Des résistances monogéniques aux résistances polygéniques</i>	28
2.2.2. <i>Principe de la cartographie de gènes et de QTL</i>	29
2.2.3. <i>Nombre et effets des QTL de résistance</i>	31
2.2.4. <i>Organisation des gènes et des QTL de résistance sur le génome</i>	33
2.2.5. <i>Des QTL « généralistes » et des QTL « spécialistes »</i>	36
3. UTILISATION DES MARQUEURS MOLÉCULAIRES	37
3.1. LA SÉLECTION ASSISTÉE PAR MARQUEUR.....	37
3.1.1. <i>L'introgression d'un gène assistée par marqueurs</i>	37
3.1.2. <i>Sélection pour un caractère quantitatif</i>	38
3.1.3. <i>La sélection assistée par marqueurs en pratique</i>	39
3.2. VERS UNE MEILLEURE CONNAISSANCE DES GÈNES DE RÉSISTANCE.....	39
4. L'INTERACTION RIZ-RYMV.....	41
4.1. INCIDENCE ÉCONOMIQUE ET ÉPIDÉMIOLOGIE DE LA PANACHURE JAUNE	41
4.2. L'AGENT DE LA PANACHURE JAUNE : LE RYMV	45
4.2.1. <i>Caractéristiques structurales</i>	45
4.2.2. <i>Diversité</i>	46
4.3. LE MOUVEMENT DU VIRUS DANS LA PLANTE.....	46
4.4. LES MÉTHODES DE LUTTE	47
4.4.1. <i>Les pratiques culturales</i>	47
4.4.2. <i>Les variétés résistantes</i>	49
CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	51
1. MATÉRIEL VÉGÉTAL	51
1.1. LA COLLECTION VARIÉTALE	51
1.2. LES POPULATIONS DE LIGNÉES HAPLOÏDES DOUBLÉES	53
2. ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE.....	54
2.1. ISOLATS VIRAUX ET MÉTHODE D'INOCULATION	54
2.2. ÉVALUATION DE L'IMPACT DE LA MALADIE SUR DES CARACTÈRES AGRO-MORPHOLOGIQUES	55
2.2.1. <i>Méthode d'estimation</i>	55
2.2.2. <i>Essai réalisé au Mali</i>	55
2.2.3. <i>Essai réalisé en Côte d'Ivoire</i>	57
2.3. ÉVALUATION DU CONTENU EN VIRUS.....	58
2.3.1. <i>Principe et technique du test ELISA</i>	58

2.3.2. Evaluation de la collection en conditions contrôlées.....	61
2.3.3. Evaluation des populations HD avec le test « précoce », en conditions contrôlées	63
2.3.4. Evaluation des populations HD avec le test « tardif », en conditions contrôlées.....	66
2.3.5. Evaluation de la population IR64/Azucena au champ.....	67
3. TECHNIQUES DE MARQUAGE MOLÉCULAIRE.....	69
3.1. EXTRACTION D'ADN.....	69
3.2. MARQUEURS RFLP.....	70
3.2.1. Principe.....	70
3.2.2. Préparation des membranes	70
3.2.3. Provenance, conservation et marquage des sondes.....	71
3.2.4. Hybridation et révélation des marqueurs RFLP.....	73
3.2.5. Déshybridation et conservation des membranes.....	74
3.3. MARQUEURS RAPD.....	74
3.3.1. Principe.....	74
3.3.2. Protocole d'amplification.....	75
3.3.3. Isolement d'un fragment pour réaliser une sonde RFLP.....	75
4. ANALYSE DE DONNÉES	75
4.1. ANALYSE DESCRIPTIVE DU PHÉNOTYPE	75
4.2. CARTOGRAPHIE GÉNÉTIQUE.....	76
4.3. RECHERCHE DE QTL.....	77
CHAPITRE III : EVALUATION DE LA RÉSISTANCE AU RYMV	79
1. RÉSISTANCE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE.....	79
1.1. VALIDATION DES MÉTHODES UTILISÉES POUR ESTIMER LE NIVEAU DE RÉSISTANCE.....	79
1.2. RELATION ENTRE LE GROUPE GÉNÉTIQUE ET LE NIVEAU DE RÉSISTANCE.....	81
1.3. CONCLUSION.....	83
2. LA RÉSISTANCE DANS DEUX POPULATIONS INDICA X JAPONICA.....	83
2.1. LA MORPHOLOGIE DANS LA POPULATION IR64/AZUCENA	85
2.2. LA RÉSISTANCE AU CHAMP ET LES SYMPTÔMES DANS LA POPULATION IR64/AZUCENA	87
2.3. LE CONTENU EN VIRUS ESTIMÉ PAR TEST ELISA	89
2.3.1. Le contenu en virus dans les populations HD.....	89
2.3.2. Le contenu en virus dans des descendance F1 et F2.....	91
2.4. COMPARAISON DES DIFFÉRENTES MÉTHODES D'ÉVALUATION DE LA RÉSISTANCE	93
2.5. RELATION ENTRE LA RÉSISTANCE ET LA MORPHOLOGIE	95
2.6. CONCLUSION.....	96
CHAPITRE IV : CARTOGRAPHIE DES QTL DE RÉSISTANCE.....	97
1. LES CARTES GÉNÉTIQUES DES POPULATIONS DE LIGNÉES HD.....	97
1.1. CARTE GÉNÉTIQUE DE LA POPULATION IR64/AZUCENA	97
1.2. CARTE GÉNÉTIQUE DE LA POPULATION IRAT177/APURA.....	100
1.3. CONCLUSION.....	101
2. CARTOGRAPHIE DE QTL	104
2.1. MÉTHODE DE DÉTECTION DES QTL	104
2.2. CARTOGRAPHIE DE QTL DE MORPHOLOGIE CHEZ IR64/AZUCENA	105
2.2.1. Nombre et effets des QTL.....	105
2.2.2. Localisation des QTL.....	107
2.3. CARTOGRAPHIE DE QTL DE RÉSISTANCE.....	109
2.3.1. Détection des QTL	111
2.3.2. Nombre et effets des QTL.....	113
2.3.3. Localisation des QTL.....	113
2.3.4. Les QTL détectés sont-ils spécifiques de certains critères de résistance ?	115
2.4. COMPARAISON DES QTL DE RÉSISTANCE ET DE MORPHOLOGIE.....	117
3. ETUDE FINE DU QTL DU CHROMOSOME 12.....	120
3.1. ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LE QTL DU CHROMOSOME 12 ET LE RESTE DU GÉNOME	120
3.1.1. Stratégie utilisée	120

3.1.2. Les interactions retenues	121
3.2. INTROGRESSION DU QTL12 DANS IR64	121
3.2.1. Description du processus d'introgession	123
3.2.2. Première étape de la validation de l'interaction RG869 x CDO418	123
4. DISCUSSION	125
4.1. RAPPEL DES PRINCIPAUX RÉSULTATS	125
4.2. DÉTERMINISME GÉNÉTIQUE DE LA RÉSISTANCE	126
4.3. LA RÉSISTANCE ET LA MORPHOLOGIE	127
4.5. AVANTAGES ET LIMITES DES CROISEMENTS <i>INDICA</i> X <i>JAPONICA</i>	129
CHAPITRE V : RÉSISTANCE ET DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE	131
1. RAPPEL DE LA STRUCTURE DE LA DIVERSITÉ RFLP CHEZ <i>O. SATIVA</i>	131
2. ANALYSE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE SUR LE CHROMOSOME 12	133
2.1. LA STRATÉGIE UTILISÉE	133
2.1.1. Les variétés et les locus étudiés	133
2.1.2. Les méthodes d'analyse	134
2.2. RÉSULTATS	137
2.2.1. Estimation des déséquilibres de liaison	137
2.2.2. Différenciation entre les groupes <i>indica</i> et <i>japonica</i> sur le chromosome 12	139
2.3. CONCLUSION	141
3. DIVERSITÉ AU NIVEAU DU QTL12H ET NIVEAU DE RÉSISTANCE	143
3.1. RELATION ENTRE LE GÉNOTYPE ET LE NIVEAU DE RÉSISTANCE	143
3.1.1. Au sein de l'ensemble des variétés	143
3.1.2. Dans chaque groupe de variétés	145
3.2. DISCUSSION	145
4. CONCLUSION	150
CHAPITRE VI : DISCUSSION GÉNÉRALE	153
1. EXPRESSION ET MÉCANISMES DE LA RÉSISTANCE AU RYMV	155
1.1. LA RÉSISTANCE EST ASSOCIÉE À DES CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES	155
1.2. UN RETARD DANS LA PROGRESSION DE L'INFECTION	157
2. BASES GÉNÉTIQUES DE LA RÉSISTANCE ET CONSÉQUENCES POUR L'AMÉLIORATION	159
2.1. RÉSISTANCE PARTIELLE POLYGÉNIQUE OU RÉSISTANCE MONOGÉNIQUE ?	159
2.2. STABILITÉ DES QTL DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS D'ÉVALUATION	160
2.3. EFFET DU FOND GÉNÉTIQUE	161
2.4. LIAISON AVEC DES CARACTÈRES DÉFAVORABLES	162
3. CONCLUSION	163
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	165
LISTE DES TABLEAUX	179
LISTE DES FIGURES	180
ANNEXES	183

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le riz est la deuxième céréale cultivée dans le monde, après le blé. Dans de nombreux pays, le riz est la principale source de calories dans l'alimentation humaine. Il est cultivé sur près de 150 millions d'hectares et, ces dernières années, la production a atteint plus de 500 millions de tonnes. Les pays d'Asie, dont la Chine, l'Inde et l'Indonésie, sont de loin les principaux producteurs et consommateurs, mais la consommation est également très importante en Afrique et en Amérique du Sud. En Afrique, en particulier, la consommation s'accroît de près de 2% par an et la production locale est insuffisante, près de trois millions de tonnes sont importées chaque année.

Les deux principales maladies du riz sur le continent africain, la pyriculariose et la panachure jaune, engendrent des pertes de rendement très significatives. La panachure jaune est une maladie virale causée par le « rice yellow mottle virus » (RYMV). Décrite pour la première fois en 1970 au Kenya (Bakker, 1974), elle a connu une incidence croissante conjointement à l'intensification de la riziculture et elle est aujourd'hui présente sur l'ensemble du continent. En raison des difficultés de mise en œuvre de mesures prophylactiques, le contrôle de la maladie réside essentiellement dans l'exploitation des résistances variétales. L'espèce de riz majoritairement cultivée, *Oryza sativa*, se subdivise en deux groupes, analogues à des sous-espèces, le groupe *indica* et le groupe *japonica*. Les variétés du groupe *indica*, cultivées en conditions aquatiques, sont très sensibles au RYMV. En revanche, des sources de résistance partielle ont été identifiées parmi les variétés du groupe *japonica* adaptées à la culture pluviale. Au cours des dix ou vingt dernières années, des programmes de sélection ont été développés dans le but de transférer la résistance d'un groupe variétal à l'autre. Toutefois, il semble difficile d'associer un niveau de résistance élevé et une adaptation satisfaisante aux conditions de culture irriguée. Par ailleurs, certaines variétés de l'espèce *O. glaberrima* sont très hautement résistantes mais, jusqu'à présent, cette résistance n'a pas été transférée chez des variétés *O. sativa*. Pour l'instant, la lutte variétale contre le RYMV reste donc à peu près inexistante, en l'absence de variétés résistantes adaptées à la culture irriguée.

L'objectif du travail présenté ici est l'étude des bases génétiques de la résistance partielle au RYMV, à l'aide des approches de marquage moléculaire et de cartographie. Cette étude devrait permettre de mieux comprendre l'association entre les variétés de type *japonica* pluvial et la résistance, de préciser le déterminisme génétique de cette résistance et d'identifier des QTL (Quantitative Trait Locus) qui pourront éventuellement être utilisés pour améliorer le niveau de résistance de variétés adaptées à la culture irriguée.

Ce travail s'intègre aux différentes études réalisées depuis le développement des marqueurs moléculaires pour accéder à une meilleure connaissance de la résistance des plantes aux pathogènes. Les marqueurs moléculaires et la construction de cartes génétiques ont permis la cartographie de gènes et de QTL et cette approche constitue un outil performant pour déterminer les bases génétiques des résistances quantitatives et les « disséquer » en leur différentes composantes. Le riz, en particulier, est considéré comme une plante modèle pour les études de génétique moléculaire. De nombreux gènes et QTL de résistance à des insectes et diverses maladies ont déjà été cartographiés et des gènes de résistance sont également clonés ou en voie de l'être. Ces nouvelles connaissances permettront rapidement de mieux comprendre les mécanismes développés par les plantes pour lutter contre les pathogènes et de développer des stratégies de lutte et de sélection plus performantes. Ainsi, l'identification de marqueurs étroitement liés à des gènes, voire des QTL, de résistance ouvre la voie à la sélection assistée par marqueurs (SAM) qui devrait permettre une sélection beaucoup plus rapide et facile de variétés résistantes.

Nous avons développé deux approches pour appréhender les bases génétiques de la résistance partielle au RYMV, l'une basée sur l'étude d'une collection variétale, l'autre sur l'étude de populations en ségrégation pour la résistance. D'une part, nous avons évalué, en conditions contrôlées, la résistance d'une collection de variétés choisies pour représenter la diversité génétique trouvée chez *O. sativa*. Ayant ainsi précisé la relation entre la diversité génétique et le niveau de résistance, nous avons, d'autre part, cartographié des QTL de résistance dans deux populations de lignées haploïdes doublées (HD) issues de croisements propices à l'étude de ce caractère. Une des deux populations est une population modèle utilisée, au niveau international, dans de nombreux programmes de cartographie. Le niveau de résistance de ces populations a été étudié en conditions contrôlées à Montpellier et au champ, lors d'essais réalisés à la station IER (Institut d'Economie Rurale)/CIRAD (Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) de Sikasso (Mali), et au Laboratoire de Pathologie Végétale de l'ADRAO (Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest), Bouaké (Côte d'Ivoire), lors d'un séjour que j'ai effectué en Côte d'Ivoire de juillet à novembre 1996. Les essais au champ nous ont en particulier offert la possibilité d'étudier la morphologie des plantes et l'impact de la maladie sur certaines composantes morphologiques. Enfin, la dernière partie de ce travail a été consacrée à une étude plus approfondie d'un QTL. Les interactions entre ce QTL et le reste du génome ont été recherchées dans une population de lignées HD. L'effet de ce QTL est actuellement en cours de validation grâce à la construction de lignées quasi-isogéniques. Par ailleurs, nous avons étudié la diversité génétique au niveau de ce QTL dans la collection variétale. Cette étude permettra de préciser la structuration de la diversité génétique chez *O. sativa* sur une région de quelques centimorgans, et elle devrait apporter, en relation avec l'évaluation de la résistance dans cette collection, des informations essentielles sur la distribution du QTL dans les variétés de riz.

Cette thèse a été réalisée grâce à une allocation du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, accordée spécifiquement pour la Recherche Tropicale et demandée conjointement par le CIRAD et l'ORSTOM (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération). Elle a été conduite au Laboratoire de Génétique des Plantes de l'ORSTOM de Montpellier, en étroite collaboration avec le Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (LPRC, ORSTOM/CIRAD), le CIRAD et l'ADRAO. Elle s'intègre à un programme plus général d'étude des bases génétiques et des mécanismes des résistances totale et partielle au RYMV, développé au sein des laboratoires cités précédemment et du Laboratoire International de Biotechnologie Agricole Tropicale (ILTAB, ORSTOM/TSRI). Ce programme a notamment pour but d'identifier et de cartographier les bases génétiques de la résistance de certaines variétés *O. glaberrima* et d'étudier les différentes étapes de l'interaction plante/virus à l'aide d'approches sérologiques, cytologiques et moléculaires afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance.

Dans ce document, une étude bibliographique nous permettra tout d'abord de préciser quelques éléments utiles à la compréhension du travail réalisé et à son intégration dans un contexte plus général. Ensuite, après un descriptif du matériel végétal et des méthodes utilisés, l'analyse des résultats sera traitée en trois chapitres successivement consacrés à l'évaluation de la résistance, la cartographie de QTL de résistance et l'étude de la diversité génétique au niveau d'un QTL. Enfin, l'apport de cette étude pour la connaissance de la résistance partielle au RYMV et son exploitation sera abordé dans la discussion générale.

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LE RIZ

Le riz étant une culture alimentaire majeure, son étude et son amélioration constituent, au niveau mondial, un enjeu agronomique et économique considérable. Les progrès réalisés sur la connaissance génétique et moléculaire du riz sont évidemment liés à cet enjeu mais également à ses caractéristiques génétiques qui en font la plante modèle pour l'étude du génome des graminées, de même qu'*Arabidopsis thaliana* est la plante modèle pour l'étude du génome des dicotylédones.

1.1. La diversité génétique chez le riz cultivé

Parmi les différentes espèces de riz, deux sont cultivées : *Oryza sativa* L. et *O. glaberrima* Steud. Elles appartiennent au genre *Oryza*, groupe *sativa* et sont diploïdes ($2n=24$). Les espèces sauvages d'Asie (*O. rufipogon*) et d'Afrique (*O. longistaminata* et *O. breviligulata*) se sont différenciées à partir d'un ancêtre commun en Eurasie. Ensuite, deux domestications indépendantes, environ 5000 ans avant Jésus-Christ, ont conduit en Asie à l'espèce *O. sativa*, à partir d'*O. rufipogon*, et en Afrique à l'espèce *O. glaberrima* à partir d'*O. breviligulata* (Second, 1991). Aujourd'hui, *O. sativa* a une distribution mondiale et, suite à son introduction par l'homme en Afrique, il supprime *O. glaberrima* sur ce continent en raison de meilleures qualités agronomiques. Au sein de l'espèce *O. sativa*, on distingue des groupes de variétés analogues à des sous-espèces, le groupe *indica* et le groupe *japonica*. La comparaison du polymorphisme entre les formes d'*O. rufipogon* et des variétés *indica* et *japonica* pour des marqueurs neutres (iso-enzymes, marqueurs RFLP nucléaires et cytoplasmiques) suggère que les groupes *indica* et *japonica* dérivent de la domestication de deux lignées divergentes d'*O. rufipogon* séparées par la barrière himalayenne (Second, 1991). En comparaison, il n'existe pas une telle structuration en groupes variétaux chez *O. glaberrima* qui présente une diversité génétique beaucoup plus faible. Nous nous intéresserons dans la suite à la diversité génétique au sein de l'espèce *O. sativa*.

Parmi les 120000 accessions répertoriées chez *O. sativa* (Khush, 1997), on peut distinguer trois types morphologiques (Matsuo, 1952, cité par Watanabe, 1993 ; Jacquot et Arnaud, 1979). Chaque type de variété présente des caractères morphologiques propres et une adaptation à des conditions climatiques et d'alimentation hydrique particulières. Les principales caractéristiques morphologiques

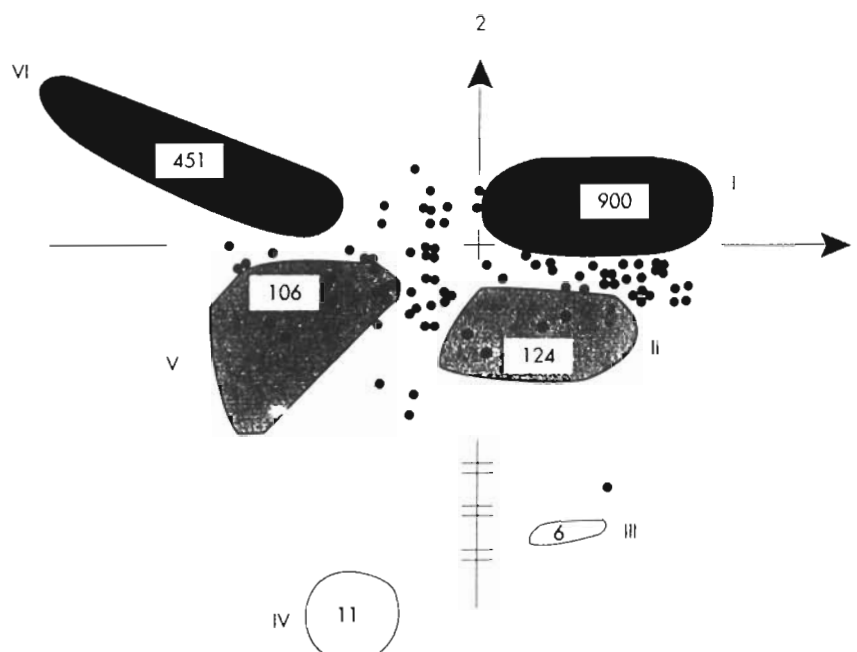


Figure 1.1. Les groupes iso-enzymatiques chez *O. sativa* : analyse factorielle des correspondances (axes 1 et 2) appliquée à la variation iso-enzymatique d'un échantillon de 1688 variétés. Le nombre de variétés dans chacun des six groupes principaux est indiqué et les points isolés représentent 90 variétés en position intermédiaire ou se classant différemment sur d'autres plans (d'après Glaszmann, 1987).

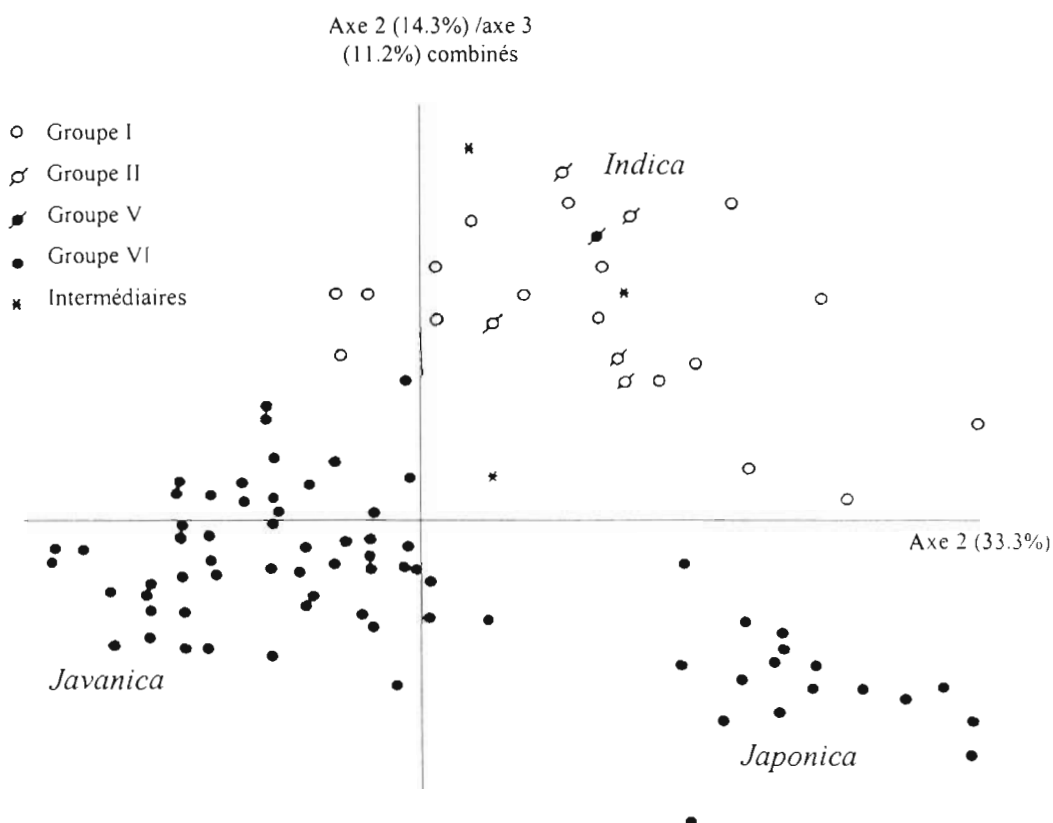


Figure 1.2. Types morphologiques et groupes iso-enzymatiques chez *O. sativa* : identification des trois types morphologiques de riz grâce à une analyse en composantes principales basée sur 46 caractères morphologiques (Jacquot et Arnaud, 1979) et relations avec la classification iso-enzymatique (d'après Glaszmann, 1987).

différenciant les trois classes, selon Matsuo (1952), sont la forme du grain, la longueur et la forme de certaines feuilles et l'angle entre les feuilles, la couleur et la rigidité du corps de la plante, le nombre et le port des talles, la pubescence des glumelles et des feuilles, la présence de barbe et d'égrenage, et certaines caractéristiques de l'inflorescence. Les variétés de type *indica*, ont des talles nombreuses et étalées, des feuilles étroites, des racines fines et un grain effilé ; elles sont adaptées à la culture aquatique en régions tropicales. Les variétés de type *japonica* ont des talles moins nombreuses et érigées, leur grain est arrondi ; on les trouve également en conditions de culture aquatique mais dans les régions tempérées. Les variétés de type *javanica*, moins nombreuses, se caractérisent par un tallage faible, des talles érigées, des feuilles larges, des racines profondes et épaisses et un grain long et large ; ce sont essentiellement des variétés de culture pluviale en régions tropicales.

La stérilité des hybrides obtenus par croisement de variétés des différents groupes confirme en partie la classification basée sur des critères morphologiques (Oka, 1958). Les variétés de type *indica* se croisent difficilement avec des variétés *japonica* ou *javanica*. En revanche, les hybrides *japonica* x *javanica* présentent un bon niveau de fertilité ; ce résultat suggère une faible distance génétique entre ces deux groupes.

Ces quinze dernières années, les marqueurs moléculaires ont permis de confirmer et de compléter l'étude de la diversité des variétés de riz basée sur les critères morphologiques et les croisements inter-groupes. Glaszmann (1987) a classé 1688 variétés traditionnelles d'Asie à l'aide de 15 marqueurs iso-enzymatiques. Il distingue six groupes dont deux, les groupes I et VI, englobent 80% des variétés (Fig. 1.1.). Le groupe I correspond aux variétés de type morphologique *indica* tandis que le groupe VI comprend les variétés de type *japonica* et *javanica* (Fig 1.2.). Ces deux derniers groupes de variétés sont maintenant désignés par les appellations « *japonica* tempéré » pour le groupe *japonica* et « *japonica* pluvial (ou tropical) » pour le groupe *javanica*. Les groupes II, III, IV et V représentent une part importante de la diversité variétale du sous-continent indien et incluent les variétés Aus et Boro (groupe II), les variétés flottantes (groupe III et IV) et les variétés Sadri et Basmati (groupe V).

Par la suite, différents auteurs ont confirmé ces études de diversité avec des marqueurs RFLP (Wang et Tanksley, 1989 ; Wang *et al.*, 1992 ; Zhang *et al.*, 1992 ; Zheng *et al.*, 1994), RAPD (Yu et Nguyen, 1994) et microsatellites (Yang *et al.*, 1994 ; Patry, travaux en cours au laboratoire). Ces différentes études montrent une différenciation nette entre le groupe *indica* et le groupe *japonica*. Comme l'avait déjà mis en évidence Glaszmann (1987), le groupe *indica* apparaît plus variable que le groupe *japonica*.

En raison de cette double origine de l'espèce *O. sativa*, il est probable qu'un petit nombre de croisements entre quelques variétés éloignées, judicieusement choisies, puisse restituer la plus grande part de la diversité adaptative chez le riz cultivé d'origine asiatique (Second et Ghesquière, 1995).

Tableau 1.1. Exemples de populations de riz ayant permis la cartographie de QTL contrôlant des caractères d'intérêt agronomique. Le groupe génétique des variétés dont sont issues les populations est indiqué par un I (pour *indica*) et un J (pour *japonica*).

Croisement et type de population	Marqueurs	Caractères	Références
IR64 (I) x Azucena (J) 135 HD ^a	146 RFLP	forme du grain résistance à <i>Nilaparvata</i> spp morphologie des racines hauteur tolérance à la toxicité ferrique	Huang <i>et al.</i> , 1997b Yadav <i>et al.</i> , 1997 Huang <i>et al.</i> , 1996 Wu <i>et al.</i> , 1998
Italica Livorno (J) x Labelle (J) 118 F2	129 RFLP 18 RAPD	vigueur des plantules	Redona et Mackill, 1996
Co39 (I) x Moroberekan (J) 281 RIL ^b	127 RFLP	résistance à <i>Magnaporthe grisea</i> hauteur caractéristiques des racines	Wang <i>et al.</i> , 1994 Huang <i>et al.</i> , 1996 Ray <i>et al.</i> , 1996
IR42 (I) x Palawan (J) 231 F2	104 RFLP	hauteur, tallage, rendement hauteur	Wu <i>et al.</i> , 1995 Wu <i>et al.</i> , 1996 Huang <i>et al.</i> , 1996
Lemont (J) x Teqing (I) 255 F2	113 RFLP	hauteur, durée du cycle résistance à <i>Rhizoctonia solani</i> rendement	Li <i>et al.</i> , 1995b Li <i>et al.</i> , 1995a Li <i>et al.</i> , 1997
9024 (I) x LH422 (J) 194 RIL	141 RFLP	hauteur, durée du cycle, rendement, stérilité	Xiao <i>et al.</i> , 1995
Tesanai 2 (I) x CB (I) 171 F2	93 RFLP	rendement	Lin <i>et al.</i> , 1996 Zhuang <i>et al.</i> , 1997
Waiyin 2 (I) x CB (I) 171 F2	101 RFLP	rendement	Lin <i>et al.</i> , 1996
Zhai-Ye-Qing (I) x Jing-Xi (J) 132 HD	137 RFLP	hauteur, durée du cycle, rendement	Lu <i>et al.</i> , 1997

^a lignées haploïdes doublées

^b lignées recombinantes

1.2. La cartographie du riz

Le riz a le plus petit génome connu chez les monocotylédones (1C~0,45 pg, 430 Mb ; Arumuganathan et Earle, 1991), il est diploïde, a peu de séquences répétées (moins de 40%) et son ADN est moins méthylé que celui des autres espèces cultivées. Ces caractéristiques en font donc un excellent modèle d'étude pour le généticien. La carte génétique du riz est la plus complète du règne végétal après celle d'*A. thaliana*, avec plus de 2000 marqueurs cartographiés (Harushima *et al.*, 1998) et la carte physique est en cours de construction (Kurata *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1997).

La première carte génétique du riz basée sur l'utilisation des marqueurs moléculaires a été obtenue en 1988 (McCouch *et al.*). Actuellement, deux cartes servent de référence. La carte établie par Causse *et al.* (1994) comprend plus de 700 marqueurs, et plus de 2275 marqueurs ont été cartographiés sur la carte établie au Japon (Kurata *et al.*, 1994 ; Harushima *et al.*, 1998). La majorité des marqueurs utilisés proviennent de banques d'ADN génomique de riz et d'ADN complémentaire (ADNc) de riz ou d'autres céréales. Ces cartes couvrent une distance d'environ 1500 cM et la cartographie de séquences spécifiques des télomères indique que l'ensemble du génome est couvert. La position des centromères est connue grâce à de récentes études de cytogénétique (Singh *et al.*, 1996 ; Harushima *et al.*, 1998) et les cartes sont maintenant orientées avec le bras court du chromosome vers le haut.

Chez le riz, le faible polymorphisme des marqueurs RFLP impose souvent de cartographier des croisements entre variétés éloignées. Ainsi, la carte de McCouch *et al.* (1988) et la carte de référence de Harushima *et al.* (1998) sont basées sur des croisements *indica* x *japonica* et la carte de Causse *et al.* (1994) a été établie sur un rétrocroisement développé à partir d'un hybride interspécifique entre *O. sativa* et *O. longistaminata* (Ghesquière, 1988). Les cartes intraspécifiques présentaient initialement des zones peu polymorphes qui n'ont pu être saturées qu'au prix d'un effort important. Un des inconvénients des croisements entre variétés éloignées, interspécifiques ou *indica* x *japonica*, est l'observation de nombreuses distorsions de ségrégation, susceptibles d'introduire des biais dans les cartes génétiques, et le plus souvent occasionnées par des gènes de stérilité (Xu *et al.*, 1997 ; Harushima *et al.*, 1996). Afin d'éviter ces distorsions et de faciliter l'exploitation en sélection des gènes ou QTL cartographiés, il peut être préférable, malgré un faible polymorphisme, de cartographier des croisements *indica* x *indica* ou *japonica* x *japonica* (Redoña et Mackill, 1996). Alors que les premières cartes ont été construites à partir de marqueurs RFLP, assez peu polymorphes, des cartes de marqueurs basés sur la PCR se sont développées plus récemment (Inoue *et al.*, 1994 ; Maheswaran *et al.*, 1997) ; en particulier, le développement de marqueurs microsatellites, hautement polymorphes (Chen *et al.*, 1997), devrait faciliter l'établissement de cartes entre parents du même groupe génétique.

A partir des cartes de référence, de nombreuses cartes ont été établies sur différentes populations, essentiellement *indica/japonica*, et ont permis de cartographier des gènes et des QTL impliqués dans l'expression de nombreux caractères (Tab. 1.1.). Des QTL contrôlant la morphologie

(hauteur, caractéristiques des racines), des composantes du rendement ou la résistance à des stress biotiques et abiotiques ont été identifiés. Antonio *et al.* (1996) ont comparé les cartes obtenues sur cinq populations *indica/japonica*. D'une population à l'autre, les différents marqueurs restent assignés aux mêmes groupes de liaison, sont cartographiés dans le même ordre et les distances entre marqueurs ne varient pas significativement. Cette observation facilite l'étude de l'organisation des gènes et QTL sur le génome du riz. Les comparaisons entre cartes sont cependant limitées par un alignement partiel des deux cartes de référence basées sur des marqueurs d'origines différentes. En revanche, la carte classique de marqueurs phénotypiques a été bien alignée avec les cartes de marqueurs moléculaires (Yoshimura *et al.*, 1997). La localisation des mutants morphologiques sur les cartes moléculaires est particulièrement intéressante puisque plusieurs études, chez le riz ou d'autres plantes, ont mis en évidence la colocalisation de mutations qualitatives et de QTL (Huang *et al.*, 1996 ; Beavis *et al.*, 1991).

La cartographie physique du riz est actuellement en cours de réalisation à l'aide de clones YAC et de clones BAC (Kurata *et al.*, 1997 ; Zhang *et al.*, 1997). Dès à présent, la moitié du génome est disponible dans des clones YAC qui sont progressivement arrangés en « contigs », ce qui permet d'envisager rapidement le clonage positionnel de gènes intéressants. Le rapport distance physique/distance génétique, environ 270 kb/cM, est faible comparé aux autres espèces de graminées.

En tant que plante modèle, le riz est bien évidemment intégré aux programmes de cartographie comparée des graminées. Les premiers résultats obtenus indiquent une bonne colinéarité entre les génomes des différentes espèces (Devos et Gale, 1997). La synténie est observée pour des marqueurs et pour différents gènes mais pas au niveau des régions intergéniques qui ont évolué plus rapidement (Chen *et al.*, 1998). La cartographie comparée devrait permettre de comprendre les mécanismes évolutifs qui ont conduit d'une espèce ancestrale aux différentes espèces de graminées connues aujourd'hui. Par ailleurs, la synténie pourra être exploitée pour isoler des gènes repérés dans diverses céréales à partir du génome du riz, plus petit. Une telle stratégie a déjà été mise en œuvre pour isoler un gène de résistance initialement identifié chez l'orge, *Rpg1* (Kilian *et al.*, 1995). Pour l'instant, elle n'a cependant pas donné de résultats positifs, peut être en raison des capacités des gènes de résistance à se réarranger beaucoup plus rapidement que d'autres gènes (Leister *et al.*, 1998).

1.3. Les maladies du riz

Le riz est cultivé dans plusieurs conditions d'apport en eau. La majeure partie des surfaces cultivées (55%) sont irriguées ; plantées avec des variétés *indica* ou *japonica* tempérées améliorées, elles fournissent 75% de la production (Khush, 1997). Près du quart des surfaces est cultivé en riz de bas-fonds : la submersion des rizières est non maîtrisée et variable au cours du cycle et d'une rizière à l'autre. Le riz pluvial représente 12% des surfaces, il est essentiellement cultivé en Asie et Amérique Latine. Enfin, un pourcentage plus faible des surfaces est occupé par le riz flottant.

La culture irriguée est une culture intensive, avec des apports azotés importants. Ce type de culture favorise le développement des maladies. Les autres types de culture sont moins favorables aux pathogènes, cependant, ce sont des cultures vivrières et, souvent, les paysans n'ont pas les moyens d'utiliser des produits phytosanitaires pour limiter leur développement. L'étude des pathogènes du riz et la recherche de variétés résistantes sont donc un enjeu majeur de la riziculture.

1.3.1. Les principaux pathogènes

A chaque type de culture correspondent des pathogènes particuliers et de nombreux pathogènes, fongiques, bactériens, viraux, des nématodes et des insectes peuvent localement entraîner des dégâts considérables (Bonman *et al.*, 1992). Cependant, notre objectif n'étant pas de répertorier l'ensemble de ces pathogènes, nous ne parlerons ici que des deux pathogènes les plus répandus et de quelques maladies virales.

La principale maladie du riz est la pyriculariose dont l'agent est le champignon *Magnaporthe grisea*. Ce champignon est présent dans la plupart des écosystèmes ; il occasionne des dégâts sur les feuilles et sur les panicules et constitue la principale contrainte phytosanitaire en culture pluviale. La pyriculariose des feuilles se manifeste par des taches claires entourées d'une bordure plus sombre. La pyriculariose des panicules entraîne une faiblesse de la base des panicules et provoque l'échaudage.

La bactériose causée par *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* est également un fléau considérable de la riziculture. Cette maladie est présente en Asie, Afrique et Amérique, essentiellement en riziculture inondée. Elle est responsable de lésions qui s'étendent de la bordure à l'ensemble des feuilles. Elle occasionne fréquemment près de 30% de pertes et peut provoquer la mort de la plante lorsque celle-ci est infectée à un stade jeune.

Plusieurs virus ont aussi une incidence économique considérable. Plus de quinze virus attaquant le riz ont été répertoriés (pour revue Hibino, 1996) mais les dégâts les plus importants sont occasionnés par la maladie du Tungro en Asie, le « rice hoja blanca virus » (RHBV) en Amérique du Sud et le RYMV en Afrique. La maladie du Tungro, transmise par des insectes, *Nephotetix* spp., est liée à l'infection de la plante par deux virus : le « rice tungro spherical virus » (RTSV), membre du groupe des ribotungrovirus, et le « rice tungro bacilliform virus » (RTBV), membre du groupe des badnavirus. Les plantes infectées par les deux virus sont rabougries et présentent une coloration jaune orangé, les plantes infectées uniquement par le RTBV ont des symptômes similaires mais moins sévères, tandis que le RTSV, inoculé seul, ne provoque pas de symptômes nets. En Amérique du Sud, le RHBV, un tenuivirus, est également transmis par un insecte, *Sogatodes orizicola*, et il occasionne des chloroses, des jaunissements et un rabougrissement des plants. Les caractéristiques de la panachure jaune, objet de notre étude, seront détaillées plus loin. De manière générale, les dégâts occasionnés par les virus se sont sévèrement accrus depuis les années soixante, début de

l'intensification de la riziculture, la double culture et l'introduction de variétés à haut potentiel agronomique (Hibino, 1996).

1.3.2. L'utilisation des gènes de résistance

La résistance aux maladies constitue un des principaux objectifs de sélection du riz, avec la qualité du grain et l'adaptation au milieu physique, en particulier à l'alimentation en eau et à certaines aptitudes culturales.

Le plus souvent des gènes majeurs de résistance ont été utilisés (Bonman *et al.*, 1992). Plus de 20 gènes de résistance à la pyriculariose et *X. oryzae* pv *oryzae* ont été identifiés ; ces gènes interviennent en général dans des interactions de type gène pour gène (Flor, 1955) et les couples riz/*M. grisea* et riz/*X. oryzae* pv *oryzae* constituent d'ailleurs des modèles pour l'étude des interactions hôte/pathogène. De même, 10 gènes de résistance à des virus et près de 35 gènes de résistance à des insectes sont répertoriés (Kinoshita, 1995). Cependant, en raison de l'utilisation d'isolats différents de pathogènes, de l'absence de tests d'allélisme systématiques, lourds à mettre en œuvre, et d'une cartographie trop peu précise, il est parfois difficile de savoir si des gènes de résistance cartographiés dans une même région sont liés, alléliques ou identiques.

Les résistances totales et monogéniques sont faciles à sélectionner, très efficaces les premières années d'exploitation, mais leur inconvénient majeur est une efficacité réduite à long terme. En effet, les résistances majeures à la pyriculariose, par exemple, sont souvent contournées en un à cinq ans par le pathogène. De même, l'utilisation d'un gène majeur de résistance à l'insecte vecteur de la maladie du Tungro a été rapidement limitée par l'émergence de nouvelles populations d'insectes, aptes à contourner la résistance (Dahal *et al.*, 1990). Même si certains gènes de résistance, comme *Xa-4* contre *X. oryzae* pv *oryzae*, ont été efficaces pendant plus de 15 ans, probablement en raison d'un effet résiduel du gène de résistance sur des races virulentes, ou de l'effet du fond génétique (Bonman *et al.*, 1992), il est donc important d'adapter les stratégies de sélection à la rapidité d'évolution des pathogènes. En particulier, l'exploitation de nouvelles sources de résistance totale est constamment nécessaire. Afin d'optimiser leur efficacité, ces résistances peuvent être superposées dans une même variété ou être utilisées simultanément grâce à des mélanges de variétés. Dans tous les cas, il est essentiel de prendre en considération la diversité du pathogène et des gènes de résistance, en fonction du lieu ou du type de culture. Par ailleurs, d'autres sources de résistance sont exploitées. Ainsi, la tolérance à la maladie du Tungro est une stratégie de lutte intéressante (Hibino *et al.*, 1990), de même que l'utilisation des résistances partielles. Par exemple, des programmes de sélection pour améliorer le niveau de résistance partielle à la pyriculariose ont été développés afin de disposer de variétés adaptées à la culture intensive aussi résistantes que les variétés traditionnelles.

2. LA RESISTANCE DES PLANTES AUX PATHOGENES

Malgré de nombreuses propositions pour tenter d'homogénéiser le vocabulaire, le terme « résistance » appliqué à la réaction d'une plante face à un pathogène peut désigner différents types d'interactions. Fréquemment, le pathologiste l'utilise pour désigner une réaction très spécifique de la plante face au pathogène, tandis que le sélectionneur entendra par « résistance » tout mécanisme qui a pour effet de réduire l'impact de la maladie sur la culture et la récolte. Dans la suite de ce travail, nous l'utiliserons au sens le plus général, pour désigner toute inhibition du développement du pathogène ou de ses effets négatifs sur l'hôte. De même, nous désignerons par « QTL de résistance » tout QTL qui a un effet sur la résistance ainsi définie.

2.1. L'expression de la résistance

2.1.1. Les mécanismes de résistance

La résistance des plantes aux pathogènes peut se décomposer en deux grandes classes de mécanismes : la résistance active et la résistance passive. Les mécanismes actifs de résistance empêchent le développement optimal de la maladie grâce à l'intervention de signaux de reconnaissance du pathogène par la plante et de mécanismes de défense. Ces mécanismes ont été plus particulièrement décrits lors d'interactions gène pour gène (Flor, 1955) mais ils interviennent aussi dans des interactions non spécifiques et quantitatives. La résistance passive résulte de l'absence de conditions favorables au développement de la maladie. Dans le cadre des interactions plante/virus, Fraser (1998) qualifie ces deux types de mécanismes de « positif », lorsque la résistance résulte d'un mécanisme actif qui inhibe le cycle du virus, et « négatif », lorsqu'un élément nécessaire au virus est absent dans la plante.

a) La reconnaissance du pathogène et la transduction du signal

L'étape précédant la mise en place des mécanismes de défense est la reconnaissance du pathogène par la plante grâce à des éliciteurs ou suite à l'interaction entre un gène d'avorulence et un gène de résistance. Dans le cas des interactions plante/virus, plusieurs protéines virales peuvent servir d'éliciteur, notamment la protéine de capsid (Berzal-Herranz *et al.*, 1995), la protéine de mouvement (Weber *et al.*, 1993) ou la réplicase (Padgett et Beachy, 1993).

La majorité des gènes de résistance clonés jusqu'à présent sont probablement impliqués dans la reconnaissance du pathogène par la plante ou dans la transduction du signal conduisant à la mise en place des mécanismes de défense (pour revue Hammond-Kosack et Jones, 1997). Les produits des différents gènes de résistance montrent des homologies entre eux et avec des séquences protéiques connues (Tab. 1.2.). Ainsi, plusieurs gènes de résistance codent pour des protéines contenant des séquences répétées riches en leucine (LRR), qui pourraient intervenir dans la reconnaissance du

Tableau 1.2. Quelques gènes de résistance clonés et leurs fonctions ou leurs homologues avec des domaines protéiques de fonction connue.

Gène	Plante	Pathogène	Homologies et/ou fonction	Références
<i>Hm1</i>	maïs	<i>Helminthosporium maydis</i>	enzyme impliquée dans la réduction d'une toxine	Johal et Briggs, 1992
<i>Pto</i>	tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>	kinase	Martin <i>et al.</i> , 1993
<i>RPS2</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i> pv <i>tomato</i>	LZ ^a /NBS ^b /LRR ^c	Bent <i>et al.</i> , 1994
<i>RPM1</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>P. syringae</i> pv <i>maculicola</i>		Grant <i>et al.</i> , 1995
<i>Mi</i>	tomate	<i>Meloidogyne</i> spp		Milligan <i>et al.</i> , 1998
<i>N</i>	tabac	tobacco mosaic virus	Toll ^d /NBS/LRR	Whitham <i>et al.</i> , 1994
<i>L6</i>	lin	<i>Melampsora lini</i>		Lawrence <i>et al.</i> , 1995
<i>Cf-9</i>	tomate	<i>Cladosporium fulvum</i>	LRR	Jones <i>et al.</i> , 1994
<i>Cf-2</i>				Dixon <i>et al.</i> , 1996
<i>Xa-21</i>	riz	<i>Xanthomonas oryza</i> pv <i>oryzae</i>	LRR/kinase	Song <i>et al.</i> , 1995

^a « Leucine Zipper »

^b « Nucleotide Binding Site »

^c « Leucine Rich Repeat »

^d homologue de la protéine Toll de la drosophile et du récepteur Interleukine 1 des mammifères

pathogène. D'autres produits des gènes de résistance contiennent des sites probablement impliqués dans une liaison avec des nucléotides (NBS pour « Nucleotide Binding Site »), des « leucine zipper » (LZ) et des domaines homologues aux protéines Toll chez la drosophile et aux récepteurs d'Interleukine-1 chez les mammifères. Ces domaines pourraient jouer un rôle dans l'activation de kinases. Enfin, les produits de certains gènes de résistance ont des régions spécifiques de sérine/thréonine kinases qui pourraient déclencher la mise en place des mécanismes de défense. Le gène *Xa-21* chez le riz, impliqué dans la résistance à *X. oryzae* pv *oryzae*, contient à la fois un site LRR et un domaine spécifique de protéine kinase ; il pourrait donc être impliqué à la fois dans la reconnaissance du pathogène et dans la transduction du signal (Song *et al.*, 1995). Pour l'instant, le seul gène de résistance aux virus cloné est le gène *N* de résistance du tabac au virus de la mosaïque du tabac (TMV) (Whitham *et al.*, 1994).

b) Les mécanismes de défense

La plante est capable d'activer différents mécanismes de défense dans le but de limiter la progression du pathogène. Le mécanisme le plus caractéristique est la réaction d'hypersensibilité (HR). Cette réaction provoque la mort des cellules localisées autour du point d'infection et empêche la progression du pathogène (pour revue Dangl *et al.*, 1996), elle peut être déclenchée en réponse à une infection fongique, bactérienne ou virale.

Certains mécanismes de défense sont activés au cours de la HR mais sont aussi présents dans des interactions hôte/pathogène de type compatible, qui conduisent au développement de la maladie. Ainsi, en réponse à l'infection par un pathogène ou un éliciteur, les plantes peuvent produire de l'oxygène actif, sous forme d'anion superoxyde ou de peroxyde d'hydrogène. Cet oxygène est toxique pour le pathogène ; il pourrait aussi participer à la construction d'une barrière physique contre la progression de l'infection et être impliqué dans la transduction du signal et l'induction d'autres mécanismes de défense (pour revue Baker et Orlandi, 1995). Par ailleurs, divers composés toxiques sont produits par la plante. Parmi ces composés on peut citer les composés phénoliques, les phytoalexines ou les PR protéines (pour Pathogenesis Related) (Gianinazzi *et al.*, 1970 ; Stintzi *et al.*, 1993). Bien que ces dernières aient été mises en évidence pour la première fois dans l'interaction entre le tabac et le TMV, les principales classes de PR protéines dont la fonction est connue semblent plutôt avoir une activité anti-fongique. Dans le cadre de la résistance systémique acquise, certains de ces composés sont produits suite à une réaction incompatible et restent présents dans la plante pendant plusieurs semaines. Ils protègent ainsi la plante contre des infections ultérieures (pour revue Sticher *et al.*, 1997).

c) La résistance passive

La résistance des plantes ne résulte pas toujours de mécanismes de défense spécifiques ; parfois elle est liée à des caractéristiques constitutives plus générales, sélectionnées pour les avantages

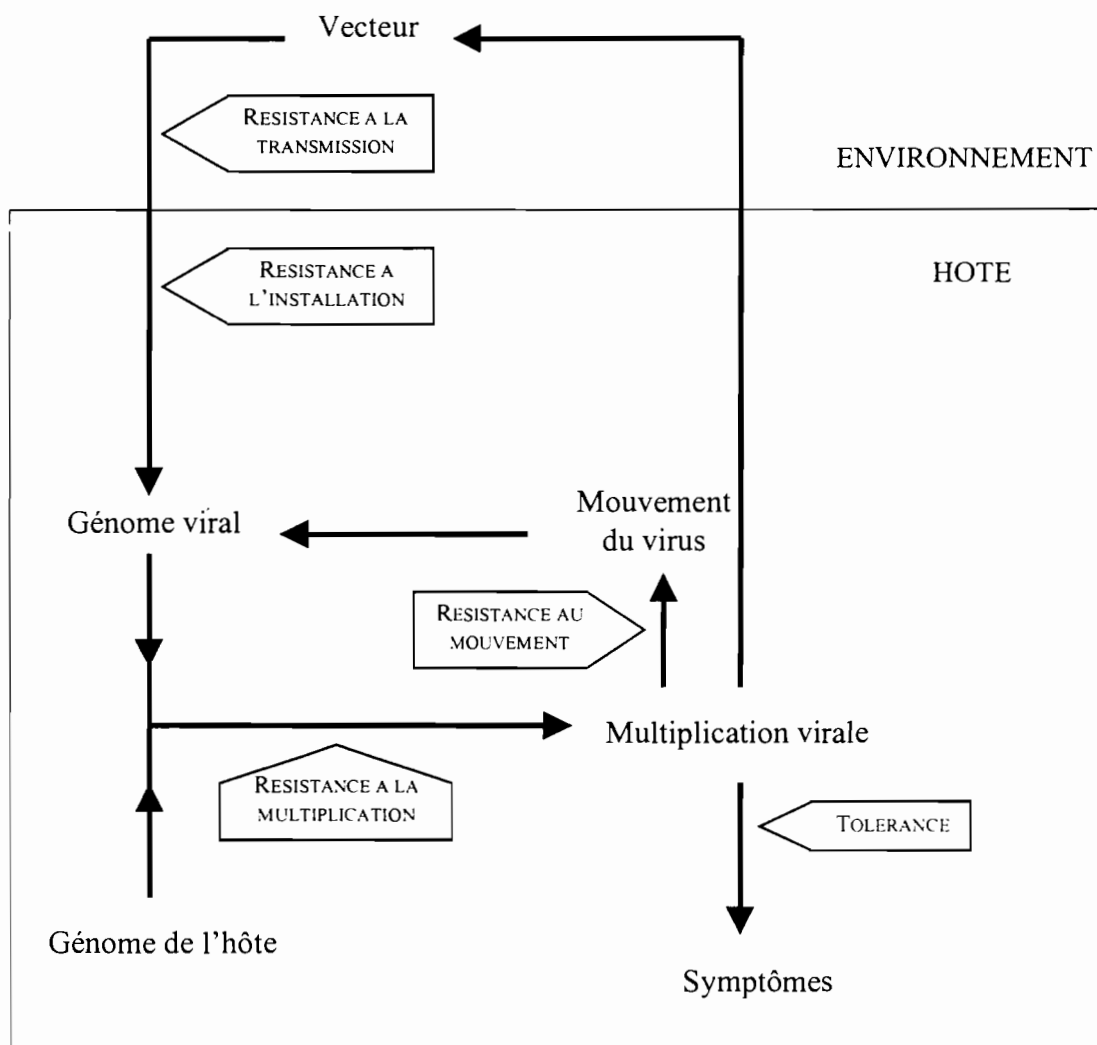


Figure 1.3. Le cycle du virus dans la plante et les sites d'action potentiels des mécanismes de résistance. La résistance peut intervenir au niveau de la transmission, de l'installation, de la multiplication ou du mouvement du virus dans la plante. A chaque étape, la résistance peut résulter de la présence d'un inhibiteur (modèle positif de Fraser, 1998) ou de l'absence d'un facteur nécessaire au cycle viral (modèle négatif de Fraser, 1998). Une tolérance peut également être observée.

qu'elles confèrent face au pathogène ou pour d'autres raisons, et qui vont freiner ou empêcher le développement de la maladie. Par exemple, un port de plante érigé et une faible densité de branches chez le haricot *Phaseolus vulgaris* seront défavorables au développement de *Rhizoctania solani*, sans que l'architecture de la plante résulte nécessairement d'une adaptation face à la maladie (Jung *et al.*, 1996). De même, l'ouverture tardive des stomates chez des variétés de blé est un frein au développement de certaines rouilles car si la rosée s'évapore avant que le champignon n'ait pu pénétrer dans la plante par les stomates ouverts, le tube germinatif du champignon se dessèche (cité par Agrios, 1997).

Au cours des interactions plante/virus, à tous les stades de l'infection, le développement de la maladie requiert des gènes, des protéines ou des fonctions de chacun des deux partenaires. La résistance pourra donc résulter de l'absence d'un des éléments de la plante nécessaire au virus ou d'un élément modifié ne pouvant pas interagir avec les protéines ou l'ARN viraux. La résistance sera alors constitutive et récessive et résultera souvent en une immunité complète. Ce type de résistance correspond au modèle négatif de Fraser (1998) et sera difficilement contournée par le virus.

2.1.2. La résistance au cours des différentes étapes de l'interaction plante/virus

La résistance des plantes aux virus peut se manifester à chacune des étapes de l'infection plante/virus et résulter de mécanismes actifs ou passifs de résistance (Fig. 1.3.). Certaines résistances aux virus résultent en fait d'une résistance à l'insecte vecteur, ou à la transmission en général, mais nous ne nous intéresserons dans ce paragraphe qu'aux interactions directes entre la plante et le virus.

La première étape de l'interaction plante/virus est la réplication du virus. Dès cette étape, l'infection peut être stoppée. C'est ainsi que le gène *Tm-1* qui confère la résistance de certaines variétés de tomates aux tobamovirus, semble coder pour une protéine impliquée dans la réplication virale. La réplication du virus de la mosaïque du tabac (TMV) est réduite de 60% chez les plantes hétérozygotes pour *Tm-1* et de 95% chez les plantes homozygotes pour *Tm-1* (Fraser et Loughlin, 1980). De même la résistance au « cowpea mosaic virus » du cultivar Arlington de niébe est en co-ségrégation avec un inhibiteur de protéase qui empêche la maturation de la polyprotéine virale (Ponz *et al.*, 1988). Cependant, fréquemment, des virus se multiplient dans des protoplastes de variétés résistantes. Dans ces cas là, la résistance se manifeste donc à une étape plus tardive de l'interaction plante/virus.

Une fois que le virus s'est multiplié dans la première cellule infectée, il doit migrer de cellule à cellule. Cette migration se fait souvent *via* les plasmodesmes mais n'est pas un mécanisme passif. Elle fait appel à des protéines de mouvement et parfois à la protéine de capsid. Il semblerait qu'il existe une spécificité d'action entre les protéines virales impliquées dans le mouvement et la plante (Nono-Womdim *et al.*, 1993). Cette interaction, par exemple, est altérée dans des variétés de tomates ayant le

gène *Tm-2* ; le TMV ne peut pas migrer de cellule à cellule dans de telles variétés. Lorsque le virus peut se répliquer mais est incapable de migrer de cellule à cellule, on parle d'infection subliminale.

Enfin, dans certaines plantes hôtes, certains virus sont capables de se répliquer, de se déplacer de cellule à cellule mais restent confinés à la feuille inoculée, mettant ainsi en évidence que la résistance peut intervenir sur le mouvement longue distance. C'est notamment le cas chez certaines lignées de soja résistantes au « cowpea chlorotic mottle virus » (Goodrick *et al.*, 1991). Les mécanismes impliqués dans le mouvement longue distance des virus sont encore peu connus mais ils semblent se distinguer des mécanismes impliqués dans le mouvement de cellule à cellule (Lucas et Gilbertson, 1996). Probablement, l'absence de facteurs de la plante hôte pourrait, à cette étape également, être responsable de la résistance.

D'autres mécanismes de défense sont également suspectés mais encore peu connus. C'est notamment le cas du « gene silencing » qui pourrait intervenir dans la défense des plantes contre certains virus. Ratcliff *et al.* (1997) ont ainsi mis en évidence dans l'infection du tabac par le « tomato black ring nepovirus », que les plantes pouvaient limiter la réplication virale quelques semaines après l'infection par un mécanisme proche du « gene silencing » détecté dans les plantes transgéniques.

Les mécanismes de résistance développés par les plantes contre les pathogènes, et en particulier contre les virus, peuvent donc être très divers. Ces différents mécanismes se manifestent par des phénotypes différents, allant de la résistance totale à une maladie atténuée par rapport aux témoins sensibles. Ils peuvent être très spécifiques d'un pathogène ou être dirigés contre une large gamme de pathogènes et ils peuvent intervenir à plusieurs niveaux de l'interaction plante/pathogène, comme nous l'avons vu pour les virus. Compte tenu de la diversité des mécanismes de résistance, on attend un contrôle génétique également très variable et complexe.

2.2. Bases génétiques de la résistance

2.2.1. Des résistances monogéniques aux résistances polygéniques

La majorité des résistances connues et exploitées en sélection sont monogéniques. Par exemple sur 179 interactions plante/virus citées par Khetarpal *et al.* (1998), des résistances monogéniques ont été identifiées dans 78% des cas. Ces résistances sont le plus souvent dominantes mais peuvent aussi être récessives ou partiellement dominantes. Le modèle positif de Fraser (1998), la résistance active, s'accorde bien avec un déterminisme génétique dominant, tandis que le modèle négatif correspond sans doute dans la plupart des cas à un déterminisme récessif.

Les résistances quantitatives sont plus difficiles à étudier et à sélectionner que les résistances totales car elles nécessitent un critère d'évaluation quantitatif et sont souvent influencées par les conditions du test et le fond génétique. Cependant, elles représentent des sources de résistance fréquentes dans la nature et intéressantes, car souvent plus durables que les résistances monogéniques qui peuvent être contournées par le pathogène. Les mécanismes impliqués dans ce type de résistance sont peu connus, mais il est probable qu'ils incluent à la fois des mécanismes actifs et des mécanismes passifs. Les méthodes de génétique classique n'ont permis d'acquérir que peu d'informations sur les bases génétiques de ces résistances mais le développement de la cartographie de QTL permet actuellement de bien mieux les étudier.

2.2.2. Principe de la cartographie de gènes et de QTL

La carte génétique d'une espèce est une représentation de son génome à l'aide de marqueurs qui balisent les chromosomes. Les premières cartes génétiques ont été construites grâce à des marqueurs morphologiques, mais c'est le développement des marqueurs moléculaires, en particulier des marqueurs RFLP, dans les années 1980, qui a permis la construction de cartes saturées chez les principales espèces cultivées.

Les cartes génétiques sont très fréquemment utilisées pour cartographier les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique. Lorsqu'on étudie un caractère qui présente deux états phénotypiques et dont le déterminisme est monogénique, comme de nombreuses résistances totales, le gène impliqué peut être cartographié comme un marqueur classique. Le problème est plus complexe lorsque le caractère étudié présente une variation quantitative. Dans ce cas, le phénotype est considéré comme résultant de l'action simultanée et indépendante de l'environnement et de plusieurs unités à ségrégation mendélienne, ayant chacune un effet faible sur le caractère. Ces unités constituent les QTL (Quantitative Trait Locus). Un QTL peut correspondre à un seul gène ou à un groupe de gènes liés, les méthodes de cartographie utilisées ne permettant pas, le plus souvent, de distinguer les deux cas. La cartographie de QTL requiert tout d'abord une population d'étude cartographiée et en ségrégation pour les unités génétiques contrôlant le caractère étudié. Le phénotype est évalué selon un dispositif qui dépend du caractère, du type de population et de la précision désirée. La confrontation des données génotypiques et phénotypiques permet ensuite de cartographier les QTL grâce à différentes approches statistiques.

Les méthodes sur marqueurs individuels consistent à rechercher, pour chaque marqueur de la carte génétique, une liaison statistique entre le marqueur et le caractère, le plus souvent à l'aide d'une analyse de variance à un facteur ou grâce aux tests non paramétriques correspondants, comme le test de Kruskal-Wallis (Soller *et al.*, 1976) (Fig. 1.4.). Un marqueur significatif permet d'estimer un certain pourcentage de la variation du caractère. Ce pourcentage dépend de deux facteurs : la part de

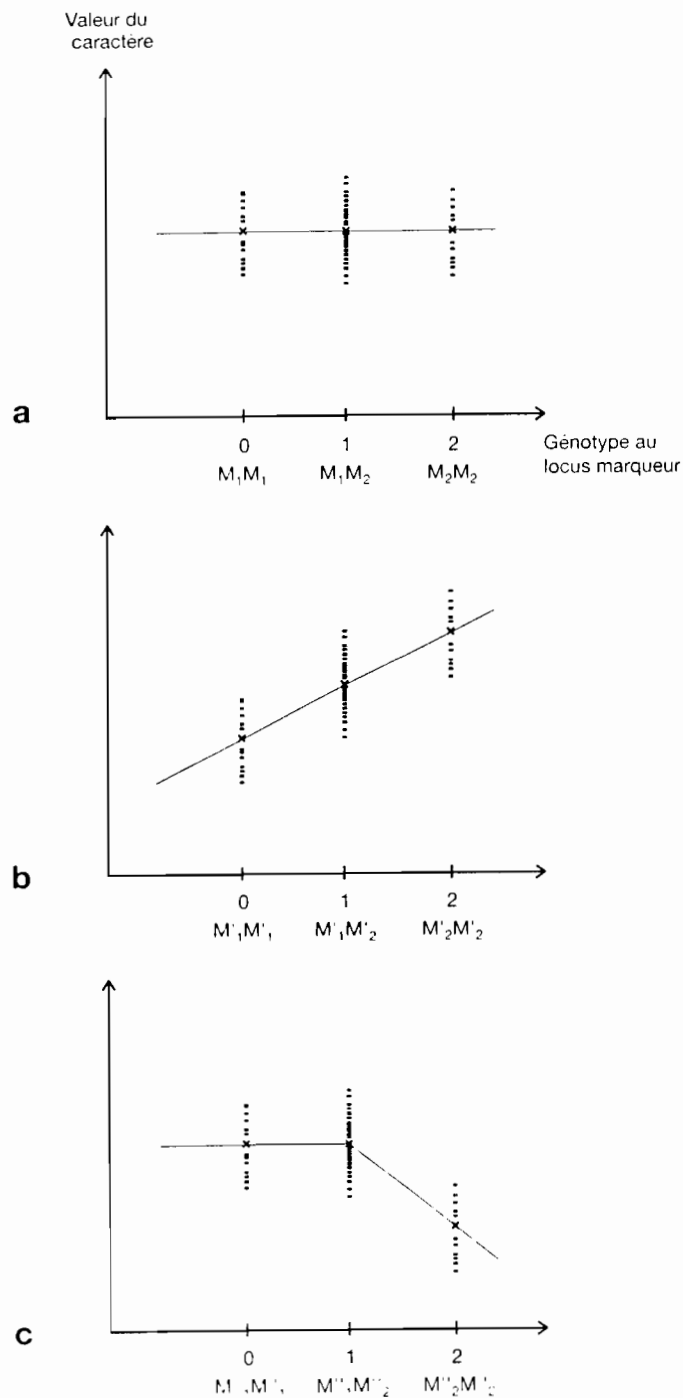


Figure 1.4. Principe de la mise en évidence de QTL dans une descendance F2 avec une recherche sur marqueurs individuels. M , M' et M'' sont trois locus marqueurs non liés. Les indices 1 et 2 désignent les allèles. L'abscisse indique le nombre de doses de l'allèle M_2 dans les trois génotypes.

a : pas de différence entre les moyennes ;

b : différence entre moyennes avec additivité ;

c : différence entre moyennes avec dominance (la moyenne des hétérozygotes est égale à la moyenne de l'un des homozygotes).

(d'après de Vienne et Causse, 1998)

variance réellement expliquée par le QTL et la distance entre le marqueur et le QTL que ces méthodes ne permettent pas de déterminer.

Les méthodes de cartographie d'intervalle, ou « interval mapping », permettent d'estimer la position d'un QTL entre deux marqueurs et de déterminer la part de variance réellement expliquée par le QTL. Pour cela, la probabilité d'avoir un génotype en un locus du génome est estimée pour chaque individu en fonction du génotype aux marqueurs flanquants. Cette estimation du génotype permet de tester la liaison entre le locus et le caractère à l'aide des approches statistiques du maximum de vraisemblance (Lander et Botstein, 1989) ou de régression (Haley et Knott, 1992). La cartographie d'intervalle est une méthode plus puissante que les approches sur marqueurs individuels lorsque l'intervalle entre les marqueurs est de 20 cM ou davantage (Darvasi *et al.*, 1993). En outre, elle permet de déterminer avec une meilleure précision la position du QTL et son effet. Cependant, cette méthode est sensible à la non normalité des données.

En pratique, plusieurs approches sont souvent utilisées au cours d'une même étude : les QTL majeurs sont généralement mis en évidence par toutes les méthodes, tandis que des différences peuvent intervenir dans la détection des QTL de faible effet.

Des méthodes de cartographie de QTL incluant des cofacteurs ont été développées plus récemment (Jansen, 1993 ; Zeng, 1994). Elles permettent d'augmenter la puissance de détection, en sélectionnant les marqueurs liés aux QTL majeurs en cofacteurs, et de mieux localiser les QTL, en sélectionnant comme cofacteurs des marqueurs régulièrement répartis sur la carte génétique.

2.2.3. Nombre et effets des QTL de résistance

Le nombre de QTL impliqués dans l'expression d'une résistance quantitative, ainsi que la part de la variance expliquée par l'ensemble des QTL peuvent être très variables. Le plus souvent, deux ou trois QTL sont détectés (Tab. 1.3.) mais plus de dix QTL expliquent la résistance de la pomme de terre à *Phytophthora infestans* (Leonards-Schippers *et al.*, 1994) ou la résistance du riz à la pyriculariose (Wang *et al.*, 1994). Fréquemment, la résistance, comme d'autres caractères quantitatifs, est contrôlée par un faible nombre de gènes majeurs, contrôlant une part importante de la variance et modulés par l'effet de gènes mineurs. Ainsi, la résistance à *Ralstonia solanacearum* est contrôlée par un QTL expliquant 77% de la variance et deux QTL mineurs (Danesh *et al.*, 1994). Les QTL mineurs ne peuvent pas toujours être mis en évidence et dans beaucoup d'études, seuls les QTL majeurs sont détectés.

Pour une même interaction hôte/pathogène, le nombre et la nature des QTL détectés peuvent varier d'une étude à l'autre. Ainsi, la résistance de l'orge à *E. graminis* est apparue sous le contrôle de deux QTL dans une étude (Heun, 1992) et sous le contrôle de cinq QTL dans une autre (Saghai Maroof *et al.*, 1994). Comme on le verra plus loin, ces variations peuvent refléter des bases

Tableau 1.3. Quelques exemples de QTL de résistance mis en évidence dans différentes interactions plante/pathogène. L'interaction plante/pathogène, le nombre de QTL détectés et le pourcentage de variance expliqué par les QTL sont indiqués pour les différentes études citées. Les pourcentages de variance indiqués correspondent aux QTL expliquant individuellement la plus petite et la plus grande part de la variance.

Plante	Pathogène	Nombre de QTL	% de variance expliqué	Référence
Interactions plante/bactérie				
tomate	<i>Ralstonia solanacearum</i>	3	24-77	Danesh <i>et al.</i> , 1994
haricot	<i>Xanthomonas campestris</i>	7	11-35	Nodari <i>et al.</i> , 1993
Interactions plante/champignon				
riz	<i>Magnaporthe grisea</i>	10	16-60	Wang <i>et al.</i> , 1994
riz	<i>Rhizoctonia solani</i>		5-22	Li <i>et al.</i> , 1995a
pois	<i>Ascochyta pisi</i>	3	38-58	Dirlewanger <i>et al.</i> , 1994
piment	<i>Phytophthora capsici</i>	5	19-55	Lefebvre et Palloix, 1996
maïs	<i>Exserohilum turcicum</i>	7	7-18	Freyemark <i>et al.</i> , 1993
p. de terre	<i>Phytophthora infestans</i>	11		Leonards-Schippers <i>et al.</i> , 1994
maïs	<i>Colletotrichum graminicola</i>	1		Jung <i>et al.</i> , 1994
orge	<i>Erysiphe graminis</i>	2	10-12	Heun, 1992
orge	<i>E. graminis</i>	5 ou 6		Saghai Maroof <i>et al.</i> , 1994
mil	<i>Sclerospora graminicola</i>	5	8-48	Jones <i>et al.</i> , 1995
choux-fleur	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	2	15-58	Landry <i>et al.</i> , 1992
maïs	<i>Cercospora zeae-maydis</i>	>10	4-26	Bubeck <i>et al.</i> , 1993
Interactions plante/virus				
tomate	tomato yellow-leaf curl virus	3		Zamir <i>et al.</i> , 1994
maïs	maize streak virus	3	5-80	Pernet <i>et al.</i> , 1998b
piment	cucumber mosaic virus	2	20-24	Caranta <i>et al.</i> , 1997b
piment	potato virus Y	6	10-67	Caranta <i>et al.</i> , 1997a
piment	potyvirus E	4	10-62	Caranta <i>et al.</i> , 1997a

biologiques différentes, mais le dispositif mis en œuvre dans la recherche de QTL en est fréquemment responsable. En particulier le nombre d'individus et la précision dans l'estimation phénotypique vont influencer sur la puissance des tests. En général, les études sont menées sur des populations de 100 à 500 individus qui ne permettent pas de détecter des QTL expliquant moins de 3% de la variance (Tanksley, 1993). Le nombre et la nature des QTL détectés dépendent également du croisement étudié puisque seuls les QTL cartographiés dans des régions du génome polymorphes entre les parents pourront être détectés.

Dans plusieurs études, des épistasies expliquent une part notable de la résistance. Deux types d'interactions peuvent être recherchés : des interactions entre des QTL détectés individuellement et des interactions entre des locus quelconques du génome. Ainsi, les résultats de Wang *et al.* (1994) suggèrent des interactions entre des QTL impliqués dans la résistance du riz à *M. grisea*. Chez le piment, Caranta *et al.* (1997a) ont mis en évidence des interactions entre un QTL et un autre locus pour expliquer la résistance au virus Y de la pomme de terre (PVY) ou à des potyvirus, et Lefebvre et Palloix (1996) ont mis en évidence des interactions entre des locus non détectés sur la base de leur seul effet additif pour expliquer la résistance à *P. capsici*. Les limites méthodologiques sont importantes lors de la recherche d'épistasies. Pour une population de taille fixée, la détection d'épistasies dans les populations F2 est beaucoup moins puissante que dans des populations de lignées HD ou de lignées recombinantes, on observe en effet neuf classes de génotypes pour un locus au lieu de quatre. Fréquemment, soit le seuil choisi n'exclut pas la détection d'un nombre important de faux positifs, soit il est trop sévère pour retenir les interactions réelles. Li *et al.* (1997) ont utilisé un système en deux étapes pour mettre en évidence des interactions expliquant un caractère morphologique du riz : dans un premier temps, ils ont recherché les interactions avec un seuil peu sévère et dans un second temps, ils les ont validées dans un modèle multi-facteurs incluant l'ensemble des QTL et les interactions détectées.

2.2.4. Organisation des gènes et des QTL de résistance sur le génome

Fréquemment, on observe que de nombreux gènes de résistance sont regroupés dans une même région du génome. De manière générale, on peut distinguer deux types de regroupement de gènes. D'une part, des gènes de résistance impliqués dans des interactions gène pour gène avec un pathogène sont parfois localisés dans des clusters de gènes, tels les gènes de résistance du lin à *Melampsora lini* (Mayo et Shepherd, 1980 ; Islam *et al.*, 1989) ou les gènes de résistance de la laitue à *Bremia lactucae* (Farrara *et al.*, 1987). D'autre part, des gènes ou des QTL de résistance à des pathogènes différents peuvent aussi être regroupés dans des régions de plus grande taille, de quelques centimorgans ou quelques dizaines de centimorgans. Plusieurs régions de ce type ont été mises en évidence chez différentes espèces végétales dont la laitue (Kesseli *et al.*, 1993) ou le maïs (McMullen et Simcox, 1995). Chez la laitue, une région de 20 cM environ regroupe des gènes de résistance à *B. lactucae*

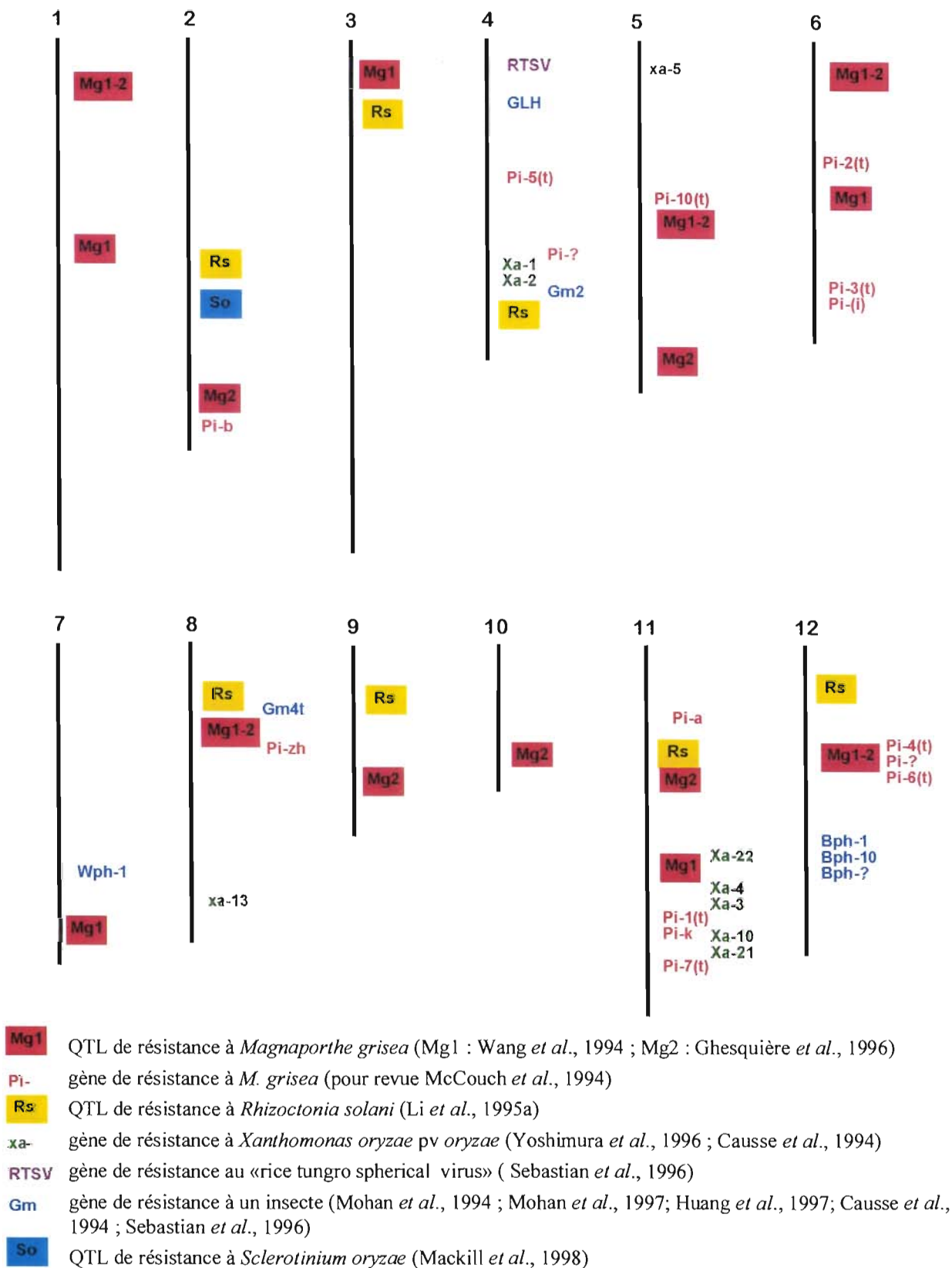


Figure 1.5. Organisation des gènes et des QTL de résistance aux maladies et aux insectes cartographiés chez le riz.

(*Dm5/8*, *Dm10* ; Hulbert et Michelmore, 1985), un gène de résistance au « turnip mosaic virus » (*Tu* ; Zink et Duffus, 1973) et un gène de résistance à *Plasmopara lactucae radialis* (Kesseli *et al.*, 1993). Chez le piment, des colocalisations entre un gène majeur de résistance au PVY et au « tobacco etch virus » et des QTL de résistance au PVY et au potyvirus E ont été mis en évidence sur le chromosome « orange » (Caranta *et al.*, 1997a).

Chez le riz, l'avancement de la carte et les nombreuses études de cartographie de gènes et de QTL de résistance confirment la présence de tels clusters. De nombreux gènes de résistance totale à la pyriculariose, à *X. oryzae* pv *oryzae*, à des insectes et à des virus, ainsi que des QTL de résistance à la pyriculariose, à *Sclerotinium oryzae* et à *R. solani*, ont été cartographiés (Fig. 1.5.). Ces gènes et QTL sont cartographiés sur des cartes et dans des populations différentes, parfois avec des souches de pathogènes différentes ; il n'est donc pas toujours possible de préciser leurs positions relatives, ni même, dans certains cas, de savoir s'il sont identiques, alléliques ou simplement liés. Cependant, l'organisation de ces gènes et QTL sur le génome met clairement en évidence d'importants clusters regroupant des gènes de résistance qualitative et quantitative à plusieurs pathogènes. Sur le chromosome 4, un premier cluster regroupe des gènes de résistance totale à la pyriculariose (McCouch *et al.*, 1994), *X. oryzae* pv *oryzae* (Causse *et al.*, 1994) et à un insecte, *Orseolia oryzae* (Mohan *et al.*, 1994), ainsi qu'un QTL de résistance à *R. solani* (Li *et al.*, 1995a). Sur le chromosome 8, quatre gènes et QTL de résistance à trois pathogènes différents forment un autre cluster (McCouch *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 1995a ; Mohan *et al.*, 1997). Sur le chromosome 11, de nombreux gènes et un QTL de résistance à la pyriculariose et des gènes de résistance à *X. oryzae* pv *oryzae* sont également colocalisés (Causse *et al.*, 1994 ; McCouch *et al.*, 1994 ; Wang *et al.*, 1994 ; Huang *et al.*, 1997). Enfin, sur le chromosome 12, plusieurs gènes de résistance à *M. grisea* et un QTL sont localisés autour du marqueur RG869 (Wang *et al.*, 1994 ; Yu *et al.*, 1996 ; Zheng *et al.*, 1996).

Ces clusters peuvent résulter d'allèles différents, de la liaison génétique entre plusieurs gènes ou QTL de résistance ou de l'effet pléiotrope d'un gène unique, responsable de mécanismes de défense généraux, ou dirigés contre certaines classes de pathogènes. L'approche cartographique n'est souvent pas assez puissante pour distinguer des gènes étroitement liés. Par exemple, aucun recombinant n'a pu être observé entre le gène de résistance *Pto* et le gène *Fen* sur 1200 plantes F2 (Martin, 1994), et seule une stratégie de clonage a mis en évidence qu'il s'agissait de deux gènes différents. Dans la majorité des cas, la cartographie ne permettra donc pas de préciser la relation entre ces gènes. Probablement, les différents cas peuvent être rencontrés. Nelson (1978) a suggéré que des résistances quantitatives pourraient résulter de l'accumulation d'effets résiduels de résistances qualitatives surmontées. Des gènes de résistances qualitatives et quantitatives pourraient aussi être alléliques : ainsi chez le riz des QTL conférant des résistances partielles à la pyriculariose chez certains génotypes confèrent des résistances totales dans d'autres génotypes (Wang *et al.*, 1994). Enfin, la mise en évidence de familles multigéniques, telle celle contenant le gène *Pto* (Martin *et al.*, 1993) suggère des liaisons génétiques

étroites entre certains gènes de résistance. De telles familles pourraient résulter de réarrangements – duplications, recombinaisons, recombinaisons inégales et mutations – à partir d'un gène ancestral (Michelmore, 1995).

2.2.5. Des QTL « généralistes » et des QTL « spécialistes »

Différentes évaluations de la résistance dans une même interaction plante/pathogène permettent d'étudier la stabilité des QTL. Fréquemment, certains QTL sont mis en évidence au cours des différentes évaluations tandis que d'autres sont spécifiques de certaines expérimentations. Quand ces observations reflètent des différences réelles dans l'expression des QTL et non pas des problèmes méthodologiques, on peut qualifier ces différents QTL de QTL « généralistes » et de QTL « spécialistes » (Lefebvre et Palloix, 1996). Souvent, ces variations sont attribuées à l'effet de l'environnement, qui n'est pas contrôlé, mais, lorsqu'on maîtrise les principales variations des conditions environnementales, cette particularité permet de « disséquer » la résistance en différentes composantes (Young, 1996).

La souche ou l'isolat du pathogène est une source potentielle de variation dans l'expression des QTL. Les interactions race (ou souche)/variété ont souvent été associées aux résistances monogéniques totales. En fait, des interactions variété/souche contrôlées par des QTL ont été mises en évidence. Ainsi, Caranta *et al.* (1997a) ont étudié la résistance du piment à deux souches de PVY : quatre locus sont impliqués dans la résistance aux deux souches, tandis que deux QTL semblent spécifiques d'une souche. De même, dans le cas de la résistance du haricot à *X. campestris* pv *phaseoli*, Jung *et al.* (1996) ont mis en évidence des QTL impliqués dans la résistance à plusieurs souches et des QTL de résistance spécifiques de certaines souches.

Par ailleurs, différents jeux de QTL peuvent être mis en évidence avec différents critères de résistance. Par exemple, Young *et al.* (1993) ont cartographié les QTL impliqués dans la résistance de *Vigna radiata* à *Erysiphe polygoni* à deux dates différentes et un QTL apparaît spécifique du stade de mesure le plus tardif. De même, dans l'interaction tomate/*R. solanacearum*, Danesh *et al.* (1994) ont détecté un QTL exprimé lorsque l'inoculation est réalisée par les racines, mais pas lorsque la bactérie est inoculée au niveau de la tige. Dans l'interaction piment/« cucumber mosaic virus », différentes composantes de la résistance ont été étudiées (Caranta 1995 ; Caranta *et al.*, 1997b) : la résistance à l'installation, la résistance à la multiplication et la résistance à la migration. Trois régions génomiques sont impliquées dans la résistance à l'installation et l'une des deux autres composantes de la résistance, tandis que quatre régions semblent spécifiques d'une seule composante. De telles études permettant la dissection d'un caractère complexe en des composantes plus simples pourront faciliter par la suite la recherche de gènes candidats.

3. UTILISATION DES MARQUEURS MOLECULAIRES

En elle-même, la mise en évidence de QTL ou de marqueurs étroitement liés à certains gènes est un outil performant pour disséquer la résistance des plantes aux pathogènes et mieux comprendre les bases génétiques de la résistance. Mais ces approches peuvent également être utilisées comme outil pour la sélection variétale, et la recherche de QTL peut être complétée par d'autres travaux qui permettront ensuite d'accéder à des gènes candidats et aux gènes de résistance.

3.1. La sélection assistée par marqueur

La sélection indirecte pour un caractère à l'aide des marqueurs qui lui sont liés est un des principaux intérêts des marqueurs moléculaires en amélioration des plantes. La sélection assistée par marqueurs (SAM) est essentiellement utilisée pour la sélection de gènes majeurs, mais peut aussi aider à l'amélioration de caractères quantitatifs.

3.1.1. L'introgression d'un gène assistée par marqueurs

La sélection classique sur le phénotype permet, relativement aisément, d'introgresser un caractère à déterminisme monogénique dans une variété agronomiquement intéressante, mais la SAM peut faciliter le processus d'introgression à trois niveaux. Tout d'abord, la SAM permet le suivi du gène sans évaluation phénotypique. Cette étape nécessite cependant de disposer de marqueurs étroitement liés au gène et cartographiés de part et d'autre. Ensuite, l'utilisation de marqueurs génétiquement indépendants du gène permet d'accélérer le retour vers le parent récurrent. Enfin, on peut sélectionner les individus recombinés au plus près du gène à introgresser à l'aide de marqueurs liés au gène. Ceci évite l'introduction d'un fragment important du parent donneur, potentiellement porteur de gènes défavorables. Différentes stratégies de sélection sont discutées par Hospital *et al.* (1992) afin de maximiser l'efficacité de la sélection sur le fond génétique et la réduction de la taille du fragment à introgresser.

Young et Tanksley (1989) ont été parmi les premiers à montrer l'efficacité de la SAM pour sélectionner la résistance au TMV chez la tomate. En sélection classique, des fragments de 4 à 51 cM du génome de *Lycopersicon peruvianum* apportant le gène *Tm-2* ont été introduits dans différents cultivars (*L. esculentum*). Young et Tanksley estiment que ces fragments auraient pu être considérablement réduits à l'aide de deux ou trois rétrocroisements assistés par marqueurs. Chez le riz, différents gènes de résistance ont été marqués par des marqueurs moléculaires étroitement liés, en particulier les gènes *Gm4t* et *Gm2* qui confèrent la résistance à *Orseolia oryzae* (Nair *et al.*, 1995 ; Mohan *et al.*, 1997) et des gènes de résistance à la pyriculariose (Naqvi et Chattoo, 1996) ; ces marqueurs pourront être utilisés ultérieurement en SAM. Récemment, Huang *et al.* (1997a) ont utilisé

la SAM pour cumuler dans une même variété de riz quatre gènes de résistance à *X. oryzae* pv *oryzae* (*Xa-4*, *xa-5*, *xa-13*, *Xa-21*) à l'aide de marqueurs PCR.

3.1.2. Sélection pour un caractère quantitatif

La SAM peut également être utilisée pour sélectionner des QTL dans un processus de sélection pour un caractère polygénique. Si le caractère est contrôlé par un faible nombre de QTL à effet fort, des stratégies comparables à celles utilisées pour la sélection de gènes majeurs peuvent être utilisées. Cependant si le caractère est contrôlé par de nombreux QTL, l'ensemble des QTL détectés n'explique jamais 100% de la variabilité du caractère, une sélection uniquement sur marqueurs risque donc de conduire à la perte de QTL mineurs. De plus, si l'effet de certains QTL est dépendant du fond génétique, la sélection sur marqueurs risque de conduire à la perte totale de l'effet des QTL concernés. Il est donc préférable d'effectuer à la fois une sélection sur le génotype et sur le phénotype. Par exemple, Lande et Thompson (1990) ont suggéré d'utiliser comme critère de sélection un indice qui tient compte à la fois du génotype au niveau de certains marqueurs et du phénotype. Ce type de sélection est d'autant plus efficace que le caractère est peu héritable, ce qui suppose donc que des moyens importants aient été développés pour la recherche de QTL, puisque la faible héritabilité réduit le nombre de QTL détectés.

Dans certains cas, il peut être difficile de cumuler dans une même variété l'ensemble des QTL qui ont un effet favorable sur le caractère à améliorer. Il est parfois préférable de faire un choix *a priori* des QTL à sélectionner. La connaissance des QTL, de leur effet et de leur répartition sur le génome, est un atout considérable pour faire ce choix. Le choix d'un QTL peut résulter de son interaction avec l'environnement. Nous avons vu que, dans différents environnements, des jeux de QTL différents peuvent être impliqués dans l'expression du même caractère. Lors de la construction d'une variété, on peut préférer sélectionner des QTL « généralistes » qui seront efficaces dans une large gamme d'environnements, ou au contraire privilégier des QTL « spécialistes » grâce auxquels la variété présentera une bonne adaptation à un environnement particulier. Par ailleurs, le choix d'un QTL peut résulter de son effet sur plusieurs caractères. En raison de l'effet pléiotrope d'un QTL sur plusieurs caractères ou d'une liaison génétique entre deux QTL, il est parfois difficile de sélectionner pour un caractère sans modifier la valeur de la plante pour un autre caractère. Si une région a un effet favorable sur un caractère et défavorable sur un autre, il peut être préférable de ne pas la sélectionner ou, en cas de liaison génétique, de mettre en œuvre des moyens importants pour rompre la liaison. Si au contraire la même région du génome a un effet positif sur deux caractères, on peut la privilégier aux dépens d'une autre qui aurait un effet favorable sur un seul caractère.

3.1.3. La sélection assistée par marqueurs en pratique

En pratique, la SAM a été encore peu utilisée en raison du coût de développement des marqueurs moléculaires et de l'absence de marqueurs suffisamment liés au gène. Les améliorations techniques en marquage moléculaire devraient permettre à la SAM de se développer dans les années à venir. D'une part, le développement de marqueurs comme les marqueurs AFLP devrait permettre de saturer rapidement les régions portant des gènes à sélectionner et ainsi d'obtenir des marqueurs suffisamment liés au gène pour envisager la SAM. D'autre part, le développement des marqueurs PCR permet de gagner en rapidité et en coût dans un processus de sélection ou la caractérisation rapide d'un très grand nombre d'individus par marqueurs moléculaires est nécessaire.

La SAM se développera d'autant plus qu'elle apportera un avantage important sur la sélection phénotypique. En général, la sélection indirecte sur les marqueurs est avantageuse lorsque le gène à sélectionner est récessif ou s'exprime tardivement, ou lorsque le dispositif d'évaluation phénotypique est lourd et difficile à mettre en œuvre. Dans le cas de la sélection de gènes de résistance aux maladies, Melchinger (1990) a récapitulé différentes situations où la SAM présente un avantage évident sur la sélection classique sur la base du phénotype ; par exemple, la SAM permet de sélectionner pour la résistance à des pathogènes de quarantaine ou de cumuler dans une variété des gènes de résistance dont les effets peuvent mutuellement se masquer.

3.2. Vers une meilleure connaissance des gènes de résistance

La cartographie d'un gène peut également précéder son clonage. Au cours des dernières années, plusieurs gènes de résistance ont été clonés à l'aide de deux approches différentes. La mutagenèse d'insertion a permis, par exemple, de cloner les gènes *Hml* chez le maïs (Johal et Briggs, 1992), *Cf9* chez la tomate (Jones *et al.*, 1994), *L6* chez le lin (Lawrence *et al.*, 1995) et *N* chez le tabac (Whitham *et al.*, 1994) tandis que le clonage positionnel a notamment été utilisé pour le clonage des gènes *Pto* (Martin *et al.*, 1993) chez la tomate, *RPS2* chez *A. thaliana* (Bent *et al.*, 1994) et le gène *Xa-21* chez le riz (Song *et al.*, 1995).

Le principe du clonage positionnel est basé sur l'isolement du gène à partir de marqueurs qui lui sont liés. La première étape est l'identification de marqueurs moléculaires liés au gène étudié. Ces marqueurs sont ensuite utilisés pour identifier des clones (YAC, BAC ou cosmides) porteurs du gène. Initialement, en l'absence de marqueurs étroitement liés au gène, la « marche chromosomique » permettait de rechercher des clones de plus en plus proches du gène. Maintenant, le développement des marqueurs moléculaires et de la cartographie fine permet de détecter des marqueurs qui sont à une distance physique du gène étudié de l'ordre de grandeur des clones YAC ou BAC ; ainsi l'identification des clones porteurs du gène peut se faire directement. Une fois que de tels clones ont été sélectionnés, des gènes candidats peuvent être identifiés à partir de la séquence des clones si elle

est connue, de la recherche d'ADNc hybridant avec ces clones ou par transformation de plantes à l'aide de ces clones. Dans une dernière étape, la validation des gènes candidats est en général basée soit sur la cartographie fine de ces gènes, soit sur la transformation et la complémentation. Le séquençage des gènes clonés permet de faire des hypothèses sur leur fonction, comme cela a été détaillé précédemment.

Cette stratégie nécessite une carte génétique très complète de l'espèce cible et les progrès réalisés sur la majorité des espèces végétales d'intérêt agronomique laissent envisager que cette approche va considérablement se développer. En particulier, la cartographie génétique et physique du riz et l'alignement de YAC en « contigs » devraient rapidement permettre la cartographie d'un grand nombre de gènes de résistance. Déjà, deux gènes de résistance à *X. oryzae* pv *oryzae* *Xa-21* (Song et al., 1995) et *Xa-1* (Yoshimura et al., 1996 ; Yoshimura et al., 1998) ont été clonés chez le riz, et le gène de résistance à la pyriculariose *Pi-b* est en voie de l'être (Monna, 1997).

Le séquençage des premiers gènes de résistance clonés a mis en évidence des séquences de type NBS (Nucleotide Binding Site), LRR (Leucine Rich Repeat) ou spécifiques de kinases communes à différents gènes. Des séquences consensus peuvent ainsi être déterminées à partir des gènes connus et être utilisées pour définir des amorces PCR dégénérées afin d'amplifier des séquences homologues chez d'autres espèces végétales. Cette approche a permis de révéler chez le soja des familles multigéniques contenant des séquences homologues à des séquences de gènes de résistance. Certaines de ces familles sont localisées dans des régions où des gènes de résistance à des potyvirus et des pathogènes fongiques ont été cartographiés (Kanazin et al., 1996 ; Yu et al., 1996). De même chez le riz, des homologues de gènes de résistance ont été cartographiés à proximité de gènes de résistance totale à la pyriculariose ou à *X. oryzae* pv *oryzae* sur les chromosomes 4, 8 et 11 (Leister et al., 1998). Chez le piment, certains gènes homologues à des gènes de résistance sont colocalisés avec des gènes de résistance totale mais également avec des QTL de résistance (Pflieger et al., 1998).

L'utilisation des marqueurs moléculaires pour le clonage de gènes reste pour l'instant limitée au clonage de gènes majeurs, de même que l'utilisation des marqueurs en sélection. Le clonage de gènes sous-jacents à des QTL à effet faible est difficilement envisageable et peu intéressant, mais le développement de la cartographie fine et l'utilisation de gènes candidats devraient permettre dans les années à venir le clonage de gènes sous-jacents à des QTL à effet important. Dans le cadre des interactions plante/pathogène, ceci aboutirait à une meilleure connaissance des résistances quantitatives.

4. L'INTERACTION RIZ-RYMV

4.1. Incidence économique et épidémiologie de la panachure jaune

Le virus de la panachure jaune du riz a été mis en évidence pour la première fois en 1970 au Kenya (Bakker). Depuis, sa présence a été rapportée dans d'autres pays d'Afrique de l'Est, dans de nombreux pays d'Afrique de l'Ouest, ainsi qu'à Madagascar (Fauquet et Thouvenel, 1977 ; Rossel *et al.*, 1982 ; Awoderu, 1991) (Fig. 1.6.). La panachure jaune est aujourd'hui considérée comme endémique dans le continent africain mais n'a pour l'instant été mise en évidence sur aucun autre continent.

La présence de la maladie se manifeste tout d'abord par une panachure jaune des feuilles, comme le nom l'indique, puis l'ensemble des feuilles prend une coloration jaune à orangé (Planche 1). La croissance de la plante est freinée, les plantes infectées sont petites, les panicules ne sortent que partiellement des gaines et sont malformées et peu fertiles. Lorsque l'infection est précoce et sévère, les plants peuvent mourir. Des pertes de rendement de 20 à 100% ont été rapportées en fonction de la sensibilité des variétés (Fomba, 1988). Les principales variétés cultivées en conditions irriguées ou de bas-fonds en Afrique de l'Ouest sont sensibles, notamment BG90-2 au Mali ou Bouaké-189 en Côte d'Ivoire. Par exemple, dans la région de Selingue au Mali, des pertes moyennes d'environ 30% ont été constatées sur les années 1994 à 1996 en hivernage (Ouattara, 1996). En cas de forte attaque sur un champ, les rendements sont trop faibles pour compenser les intrants et les paysans préfèrent abandonner le champ en cours de culture.

Le RYMV se multiplie dans les deux espèces de riz cultivé *O. sativa* et *O. glaberrima*, ainsi que dans des espèces de riz sauvage, *O. longistaminata* et *O. breviligulata*, et d'autres graminées sauvages (Bakker, 1974 ; Awoderu, 1991 ; Konate *et al.*, 1997). Ces espèces sauvages constituent des réservoirs naturels et permanents du virus.

La transmission de la maladie est réalisée par des insectes vecteurs, des coléoptères de la famille des Chrysomelidae dont *Chaetocnema* spp., *Sesselia pusilla* et *Trichispa sericea* ou la sauterelle *Conocephalus merumontanus* (Bakker, 1974). La transmission par insecte est réalisée selon un mode semi-persistant non circulant : l'insecte peut encore transmettre le virus un ou plusieurs jours après s'être nourri sur un plant infecté. La transmission mécanique est extrêmement aisée en laboratoire et probablement fréquente en conditions naturelles. D'autres modes de transmission sont également envisageables. En particulier, le virus est présent dans les racines des plantes et la transmission par les racines peut être réalisée expérimentalement (Fargette, non publié), cependant la transmission par l'eau et le sol en conditions naturelles n'est pas démontrée. En revanche, la transmission par la graine ne semble pas possible (Fauquet et Thouvenel, 1977).

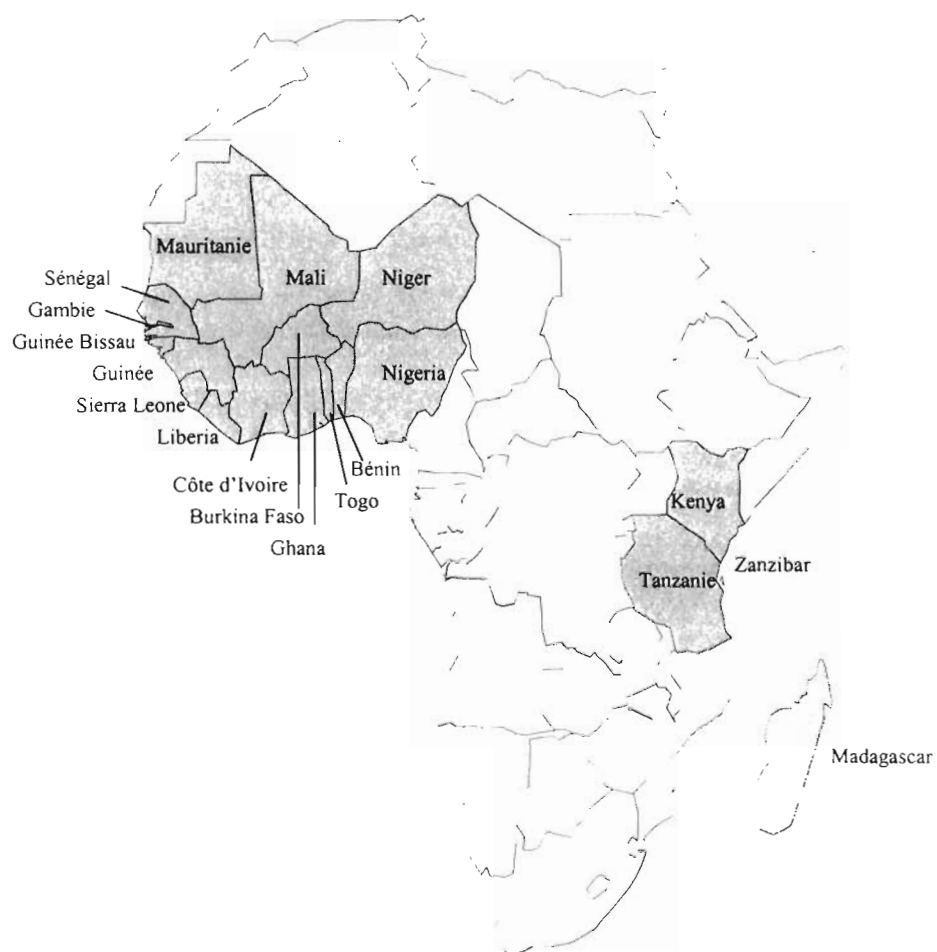


Figure 1.6. Les différents pays d'Afrique où la panachure jaune a été détectée (d'après Abo *et al.*, 1998).

A



B



C



Planche 1. Symptômes occasionnés sur le riz par le virus de la panachure jaune. A. Taches circulaires dans un champ. B. Symptômes caractéristiques sur feuilles, au champ. C. Plants sains (à droite) et inoculés mécaniquement par le RYMV (à gauche), de la variété IR64, un mois après inoculation.

(Photographies A et B : J. L. Notteghem)

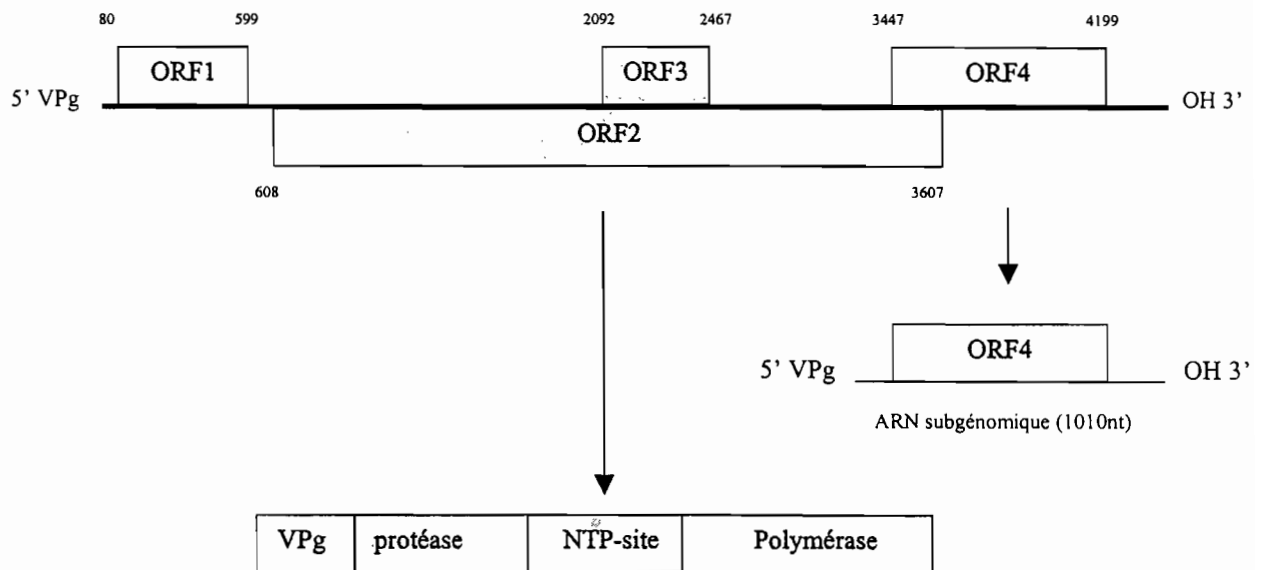


Figure 1.7. Organisation du génome du RYMV. L'ARN du RYMV comprend 4450 nucléotides. L'ORF1 code pour une protéine impliquée dans le mouvement du virus. L'ORF2 code pour une polyprotéine donnant après clivage une protéine Vpg, une protéase et une ARN polymérase ARN dépendante. La fonction de l'ORF3 n'est pas encore connue et l'ORF4 code pour la protéine de capsid.

4.2. L'agent de la panachure jaune : le RYMV

4.2.1. Caractéristiques structurales

Les caractéristiques biologiques, structurales et biochimiques du RYMV ont permis de le classer dans le groupe des sobémovirus dont le virus type est le « southern bean mosaic virus » (Hull, 1988 ; Ngon A Yassi *et al.*, 1994). Un seul ARN viral non polyadénylé est encapsidé par 180 sous-unités protéiques arrangées selon une symétrie de type T=3 pour former un virus icosaédrique de 30 nm de diamètre (Opalka, 1998).

Le génome du RYMV est composé d'un ARN monocaténaire de polarité positive. La séquence nucléotidique d'un isolat de Côte d'Ivoire a été obtenue et caractérisée par Ngon A Yassi *et al.* (1994) : l'ARN est formé de 4450 nucléotides et il est organisé en quatre cadres de lecture (Fig. 1.7.). Dans les virions de certains isolats, Seghal *et al.* (1993) ont mis en évidence un ARN de 210 nucléotides, homologue à l'ARN satellite du « lucerne transient streak sobemovirus ».

Une étude récente a permis de préciser les caractéristiques et la fonction de la protéine P1 (17,8 kDa) codée par le premier cadre de lecture ouvert, ORF1 (Bonneau, 1998). Cette protéine possède un motif homologue à un motif en « doigt de zinc » qui suggère une interaction structurale avec des acides nucléiques. L'ORF1 et la protéine P1 ne sont pas strictement nécessaires à la réplication virale mais des modifications dans l'ORF1 affectent le niveau de réplication virale dans des protoplastes, peut-être en raison d'un effet sur la régulation et/ou la traduction de l'ORF2. La protéine P1 est, en revanche, indispensable au mouvement de cellule à cellule.

L'ORF2 code pour une polyprotéine de 110 kDa. La séquence de cette protéine est la mieux conservée entre les différents sobémovirus séquencés. Les homologies de séquences avec d'autres virus à ARN suggèrent que cette polyprotéine donnerait, après clivage, une protéine VPg (protéine virale liée au génome), une protéase à sérine, un domaine similaire aux sites de fixation des dNTP puriques et une ARN polymérase ARN dépendante (Ngon A Yassi *et al.*, 1994).

L'ORF3 code pour une protéine de 13,7 kDa dont la fonction n'est pas encore déterminée.

Enfin, l'ORF4 code pour la protéine de capside (26 kDa) traduite à partir d'un ARN subgénomique. L'extrémité N-terminale de cette protéine présente un domaine basique potentiellement impliqué dans des liaisons électrostatiques avec des acides nucléiques (Bonneau, 1998). Cette propriété pourrait lui conférer un rôle dans le transport de l'ARN viral vers le noyau et au cours de l'encapsidation. Par ailleurs, Brugidou *et al.* (1995) ont montré, à l'aide de mutations introduites dans l'ORF4, que la protéine de capside était indispensable dans le transport longue distance et probablement impliquée dans le transport de cellule à cellule.

4.2.2. Diversité

La diversité des isolats de RYMV a été étudiée à l'aide d'approches sérologiques, biologiques et moléculaires. Les méthodes sérologiques, les plus largement utilisées, ont mis en évidence plusieurs sérotypes différenciés par leurs réactions à des anticorps polyclonaux et monoclonaux (Mansour et Baillis, 1994 ; Konate *et al.*, 1997 ; N'Guessan *et al.*, 1998). N'Guessan *et al.* ont étudié près de 19 isolats prélevés en Côte d'Ivoire et quelques isolats en provenance d'autres pays d'Afrique. Deux sérotypes, S1 et S2, ont été mis en évidence en Côte d'Ivoire : le sérotype S2 est majoritaire et comprend essentiellement des isolats originaires du centre et du sud du pays, tandis que la plupart des isolats originaires du nord du pays appartiennent au sérotype S1. Certains isolats des pays limitrophes du nord de la Côte d'Ivoire sont également du groupe S1 et les isolats de pays plus éloignés, Afrique de l'Est et Madagascar se distinguent nettement des sérotypes présents en Côte d'Ivoire. La diversité sérologique des isolats apparaît donc, au moins en partie, liée à leur origine géographique. L'amplification de la protéine de capsid d'isolats des deux sérotypes donne des profils différents, indiquant que la variabilité moléculaire de la protéine de capsid et la variabilité sérologique sont liées. Par ailleurs, bien qu'il n'y ait pas de corrélation entre le sérotype et l'accumulation virale ou les symptômes occasionnés, une co-inoculation d'isolats des deux sérotypes a mis en évidence une compétition entre isolats en faveur des isolats du sérotype S2, reflétant des propriétés biologiques différentes.

4.3. Le mouvement du virus dans la plante

Le suivi de l'ARN viral et de la protéine de capsid par Northern-blot et Western-blot, ainsi que des études de microscopie électronique, ont permis de mieux connaître la distribution du RYMV dans la plante (Opalka *et al.*, 1998). L'ARN et la protéine de capsid sont détectés respectivement trois et cinq jours après inoculation, dans les feuilles inoculées, puis après six jours dans les feuilles systémiques. Dans ces dernières, des virions sont présents dans les cellules de l'épiderme, le mésophylle, la gaine périvasculaire et les vaisseaux. Les cellules infectées présentent des modifications ultrastructurales des organelles, telles qu'une désorganisation des membranes chloroplastiques et la présence de matériel dense aux électrons dans le cytoplasme et le noyau.

Aucune particule virale n'a été observée dans les feuilles inoculées, l'encapsidation du génome pourrait donc ne pas être nécessaire au mouvement de cellule à cellule. Bonneau (1998) suggère que ce mouvement se ferait sous la forme d'un complexe ribonucléoprotéique auquel participeraient l'ARN viral, la protéine P1 et/ou la protéine de capsid. Ce complexe pourrait migrer au travers des plasmodesmes.

La présence de virions dans les feuilles infectées de manière systémique suggère que l'encapsidation serait nécessaire au mouvement longue distance. Quatorze jours après inoculation, des

virions s'accumulent en quantité importante dans le xylème et en moindre mesure dans le phloème (Opalka *et al.*, 1998). L'accumulation des virions dans le xylème indique que le parenchyme xylémien pourrait être un des principaux sites de multiplication virale, tandis que les vaisseaux du xylème constitueraient la voie privilégiée pour la migration longue distance. Opalka *et al.* (1998) proposent deux voies d'accès des virions aux vaisseaux du xylème. D'une part, au cours de la différenciation des cellules du parenchyme en éléments vasculaires, les cellules suivent un processus de mort programmée. Les virions, initialement présents dans les cellules du parenchyme, pourraient utiliser cette maturation comme transport passif pour accéder aux vaisseaux. D'autre part, la microscopie électronique a mis en évidence une accumulation de RYMV au niveau des membranes ponctuées qui séparent les vaisseaux du xylème. A ce niveau, la fixation par les particules virales d'ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , présents dans ces membranes, entraînerait à la fois un relâchement membranaire et une stabilisation des particules virales. Le virus pourrait alors plus facilement traverser ces membranes pour migrer dans les vaisseaux.

4.4. Les méthodes de lutte

4.4.1. Les pratiques culturales

Malgré leur sensibilité élevée à la panachure, les variétés BG90-2, Bouaké-189 ou IR1529-680-3 sont les variétés les plus cultivées en conditions irriguées, au Mali, en Côte d'Ivoire et au Niger, en raison de leurs bonnes caractéristiques agronomiques. En l'absence de variétés résistantes qui présenteraient les mêmes caractéristiques, des pratiques culturales appropriées constituent, pour l'instant, la principale méthode de lutte contre la panachure jaune.

Un des principaux objectifs est la limitation des sources d'inoculum. Par exemple, il est important de brûler les pailles de la récolte précédente, d'arracher et d'enfouir les plants atteints. Il faut limiter la présence de riz sauvage et d'adventices à proximité des rizières ; pour cela, les diguettes et les drains entre parcelles doivent être parfaitement nettoyés, et l'inondation de la parcelle labourée avant repiquage empêche le développement des adventices. Afin de protéger les jeunes semis, certains paysans changent la place de la pépinière ou le mode de semis, ainsi le semis direct semble limiter considérablement l'incidence de la panachure. Par ailleurs, il peut être avantageux de changer les dates de semis qui influent sur le développement de la maladie en raison de la présence des insectes vecteurs à certaines périodes de l'année. Par exemple, dans la région de Selingue, au Mali, la maladie est pratiquement inexistante en contre-saison alors qu'elle occasionne des dégâts considérables pendant l'hivernage. Enfin, certains paysans utilisent des insecticides pour limiter la population d'insectes vecteurs.

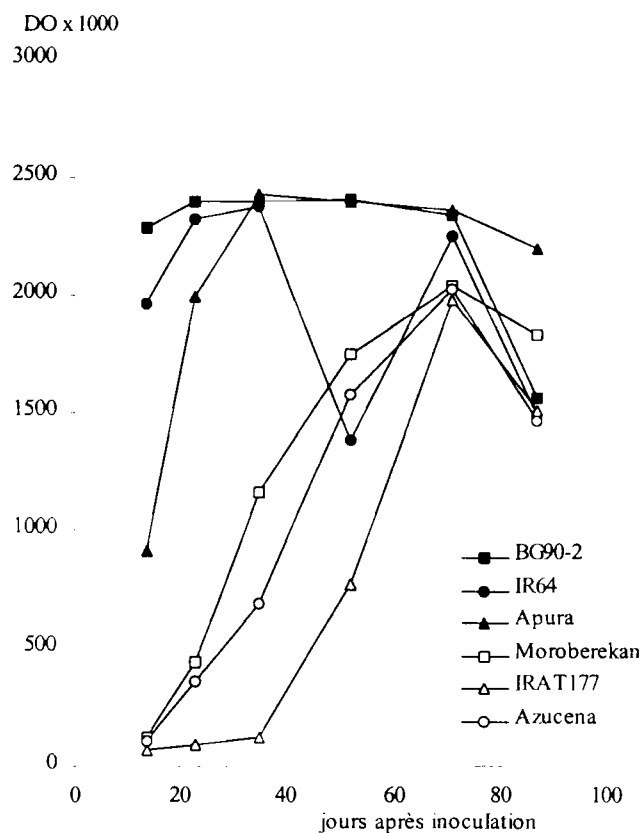


Figure 1.8. Comparaison du contenu en RYMV chez six variétés de riz. Les variétés BG90-2, IR64, Apura (variétés *indica*) et Moroberekan, IRAT177, Azucena (variétés *japonica* pluviales) ont été mécaniquement inoculées 19 jours après semis avec un isolat viral du Burkina Faso. Le contenu en virus a été estimé différentes dates après inoculation par test ELISA. Cinquante jours après inoculation, le faible contenu en virus dans la variété IR64 correspond à des plantes mortes (d'après Albar, 1994).

Ces pratiques sont cependant contraignantes et ne permettent pas de supprimer entièrement l'incidence de la panachure. A plus long terme, des moyens de lutte plus efficaces doivent donc être envisagés.

4.4.2. Les variétés résistantes

L'utilisation des variétés résistantes semble être le moyen le plus prometteur pour lutter efficacement contre le RYMV, comme contre beaucoup d'autres virus. Plusieurs sources de résistance au RYMV ont été mises en évidence chez les espèces de riz cultivé *O. sativa* et *O. glaberrima*. Certaines variétés présentent un niveau de résistance très élevé et multiplient très faiblement le virus, tandis que d'autres présentent une résistance partielle.

Chez *O. glaberrima*, certaines variétés sont très hautement résistantes (Thottappilly et Rossel, 1993). En particulier, suite à une inoculation artificielle, la variété Tog-5681 n'exprime aucun symptôme. Cette variété n'est pourtant pas immune : un broyat de feuilles d'une plante inoculée permet la transmission du virus à un témoin sensible et le virus peut, dans certains cas, être détecté par test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ; Ndjondjop *et al.*, 1998). D'autres variétés d'*O. glaberrima*, en revanche, sont très sensibles à la virose. Chez *O. sativa*, une seule variété présentant le niveau de résistance de Tog-5681 a pour l'instant été identifiée. Cette variété, Gigante, est une variété traditionnelle d'Afrique de l'Est ; elle appartient au groupe des variétés *indica*. L'étude du déterminisme génétique de la résistance de Tog-5681 et Gigante est en cours au laboratoire. Cette résistance semble être sous le contrôle d'un gène récessif majeur (Ndjondjop *et al.*, 1998).

Certaines variétés *O. sativa* expriment une résistance partielle au RYMV. Cette résistance a été initialement mise en évidence dans des variétés de type *japonica* pluvial, cultivées traditionnellement en Afrique, telles que OS6, Lac-23 ou Moroberekan (Awoderu, 1991 ; Thottappilly et Rossel, 1993). Certaines variétés de type pluvial originaires d'Asie présentent aussi le même niveau de résistance (Rasaonary, 1990 ; Awoderu, 1991). Cette résistance partielle semble donc caractériser les variétés pluviales. L'étude comparée de variétés *indica* et de variétés *japonica* pluviales, par test ELISA, a mis en évidence un retard dans l'accumulation virale chez les variétés pluviales mais le contenu du virus semble finalement atteindre un plateau, identique chez les deux types de variétés (Albar, 1994) (Fig. 1.8.).

Ces résistances naturelles de *O. sativa* ou *O. glaberrima* peuvent être exploitées. Des travaux de sélection sont en cours dans des instituts de recherche nationaux et internationaux, en particulier l'IITA (International Institute for Tropical Agriculture, Nigeria) et l'ADRAO pour développer des variétés résistantes, adaptées à la culture irriguée et à haut rendement. Actuellement, trois variétés prometteuses ont été sélectionnées à partir de donneurs partiellement résistants et ont fait l'objet d'évaluations dans différents environnements (Singh, 1995).

Par ailleurs, plusieurs équipes s'intéressent au développement de la résistance dérivée du pathogène. La transformation de plants de riz avec le gène de la protéine de capsid du virus a été envisagée (Kouassi *et al.*, 1995) mais les plants transgéniques exprimant cette protéine n'ont pas montré de résistance au RYMV (Brugidou, communication personnelle). En revanche, les premiers résultats de la transformation de plantes par une séquence contenant un motif de la polymérase sont encourageants (Pinto *et al.*, 1998).

Lorsque le travail présenté dans ce document a été initié, aucune variété résistante ou partiellement résistante au RYMV et adaptée aux conditions de culture irriguée n'était disponible. Aujourd'hui encore, aucune variété résistante n'est largement diffusée en Afrique, même si trois variétés sélectionnées par l'IITA et l'ADRAO sont prometteuses. Il nous a donc semblé important d'étudier les bases génétiques de la résistance partielle au RYMV afin de comprendre les difficultés qui pouvaient être liées à l'introgession de la résistance dans des variétés *indica* et permettre la définition de stratégies de sélection adaptées.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL VEGETAL

1.1. La collection variétale

Un échantillonnage de variétés de riz a été constitué pour étudier la relation entre la résistance au RYMV et la diversité génétique au sein de l'espèce *O. sativa*.

Cet échantillonnage est fondé sur deux collections. La première collection est une collection de référence de 288 variétés ; elle a été établie à l'IRRI (International Rice Research Institute) et constitue un sous-ensemble représentatif des 1688 variétés classées en six groupes iso-enzymatiques (Glazmann, 1987). Ces 288 variétés ont été retenues sur la base de différentes caractéristiques telles que leur origine géographique, leur position dans la classification iso-enzymatique ou leur adaptation aux différents types de culture. Ces variétés ont été caractérisées sur le plan agro-morphologique, et leur résistance à la maladie du Tungro, à la bactériose causée par *X. oryzae* pv *oryzae* et à la pyriculariose a été évaluée (Glazmann *et al.*, 1996). La deuxième collection comprend 148 variétés de riz sélectionnées par Second afin de décrire la diversité génétique d'*O. sativa* sans l'associer *a priori* à la diversité d'intérêt agronomique. Cet échantillonnage inclut des variétés de la collection précédente et la complète par d'autres variétés. Un effort particulier a été apporté pour y intégrer les variétés à l'origine de l'amélioration variétale entreprise en Asie ces trente dernières années par l'IRRI. Cette collection a été caractérisée avec 200 sondes RFLP cartographiées et deux sondes cytoplasmiques pour préciser la diversité et l'organisation *indica/japonica* chez *O. sativa* (Second et Ghesquière, 1995).

Nous avons sélectionné les variétés à évaluer pour leur résistance au RYMV afin de bénéficier au mieux des données disponibles sur ces collections (Tab. 2.1.). Ainsi, notre collection comprend :

- les variétés communes aux deux collections,
- les variétés évaluées sur la base des marqueurs RFLP, pour lesquelles des semences étaient disponibles,
- un complément de variétés de la collection de référence établie à l'IRRI dont une majorité de variétés pluviales puisque ces variétés semblent constituer les principales sources de résistance au RYMV

Tableau 2.1. Récapitulatif des variétés sélectionnées. Ces variétés ont été sélectionnées parmi les variétés de la collection de référence de l'IRRI, évaluées à l'aide de marqueurs iso-enzymatiques, et les variétés retenues par Second et Ghesquière (1995), étudiées à l'aide de marqueurs RFLP.

	<i>indica</i> (groupe I)	groupe II	groupe V	<i>japonica</i> tempéré (groupe VI)	<i>japonica</i> pluvial (groupe VI)
Variétés communes (RFLP + iso-enzymes)	25	5	6	9	10
Evaluation RFLP	23			10	
Evaluation iso-enzymatique	2	6	4	8	24
Autre	1				
Total (133)	51	11	10	27	34

- la variété Gigante, de type *indica*, n'appartenant à aucune des deux collections mais sélectionnée en raison de sa résistance très élevée au RYMV.

Les 133 variétés retenues comprennent des variétés des deux principaux groupes génétiques *indica* et *japonica* en proportion équilibrée et quelques variétés des groupes iso-enzymatiques secondaires (groupe II, comprenant des variétés apparentées aux variétés *indica* et groupe V, comprenant des variétés basmati plus proches du groupe *japonica*). Au sein des variétés du groupe *japonica*, l'échantillonnage permet de confronter les variétés tropicales pluviales et les variétés irriguées des régions tempérées. La liste complète des variétés est donnée dans l'annexe 1.

Ces variétés ont été multipliées en serre. Des semences conservées en chambre froide au CIRAD ou issues d'une multiplication en Guadeloupe, par le CIRAD, ont été utilisées pour les variétés de la collection de référence. Des semences récoltées sur les plantes à l'origine de l'évaluation RFLP ont été utilisées pour les variétés de la deuxième collection. La diversité génétique au sein de ces accessions a été contrôlée à l'aide de neuf marqueurs microsatellites (Patry, travaux en cours au laboratoire). Ce contrôle nous a permis d'écarter quelques variétés pour lesquelles la classification *indica/japonica* sur la base des marqueurs microsatellites n'était pas cohérente avec la classification basée sur les marqueurs RFLP ou iso-enzymatiques.

1.2. Les populations de lignées haploïdes doublées

La cartographie de QTL de résistance a été réalisée sur les populations de lignées HD IR64/Azucena et IRAT177/Apura. IR64 et Apura sont des variétés de type *indica*. Apura est une variété du Surinam et IR64 est une variété de l'IRRI, cultivée sur la majorité des surfaces irriguées ; elle porte le gène de semi-nanisme *sd-1*, introduit dans les variétés améliorées à l'origine de la révolution verte dans les années 1960. IRAT177 et Azucena sont des variétés *japonica* pluviales ; Azucena est une variété traditionnelle des Philippines et IRAT177 dérive, par mutations, d'une variété cultivée au Sénégal. Les lignées HD ont été obtenues à partir de culture d'anthères d'hybrides F1. Le croisement IR64 x Azucena a été réalisé à l'IRRI (Guiderdoni *et al.*, 1992), 181 lignées HD sont disponibles. Le croisement IRAT177 x Apura a été réalisé au CIRAD (Guiderdoni *et al.*, 1988) et 75 lignées HD sont disponibles.

La population IR64/Azucena est une population de référence étudiée par de nombreuses équipes (IRRI, Université Cornell, CIRAD, ORSTOM). Des cartes RFLP (Huang *et al.*, 1997b), microsatellites (Chen *et al.*, 1997) et AFLP (Maheswaran *et al.*, 1997) ont été obtenues à partir de 135 lignées HD. En outre, ce croisement servira à établir la carte de référence du riz dans le programme européen de cartographie comparée des graminées (EGRAM). De nombreux caractères sont en ségrégation dans cette population. Des QTL impliqués dans la hauteur, la forme du grain, la morphologie racinaire, des gènes et QTL de résistance à la pyriculariose et à des insectes et un gène

majeur impliqué dans l'arôme ont été cartographiés sur la base des marqueurs RFLP (Ghesquière *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 1996 ; Lorieux *et al.*, 1996 ; Huang *et al.*, 1997b ; Yadav *et al.*, 1997).

La descendance IRAT177/Apura a été caractérisée pour de nombreux marqueurs RFLP (McCouch, 1990). Cependant, le faible nombre d'individus, le faible niveau de polymorphisme et des distorsions de ségrégation ont rendu difficile la construction d'une carte génétique.

Ces lignées HD ont été multipliées à l'ORSTOM de Montpellier, en serre. En raison d'une stérilité pollinique sur certaines lignées, et afin d'éviter les intercroisements, certaines panicules ont été ensachées. Des graines issues d'autofécondation contrôlée ont été utilisées pour la cartographie. Par contre, en raison de la quantité de semence nécessaire, des graines issues de fécondation non contrôlée ont parfois été utilisées pour les évaluations de résistance.

2. EVALUATION DE LA RESISTANCE

Plusieurs critères de résistance au RYMV ont été estimés sur la collection variétale et les populations de lignées HD. Dans cette partie, nous allons détailler le principe des différentes méthodes d'évaluation et les différents essais mis en place. Afin d'avoir une vision globale des différentes variables mesurées, le lecteur pourra se référer au tableau 2.3. et au tableau 2.5. qui résument les caractères mesurés respectivement sur la collection variétale et sur les populations de lignées HD.

2.1. Isolats viraux et méthode d'inoculation

Plusieurs isolats viraux ont été utilisés au cours des différents essais mis en place pour évaluer la résistance. Lors des essais réalisés au champ, à Sikasso, Mali, et à Bouaké, Côte d'Ivoire, des isolats locaux ont été utilisés afin d'éviter l'introduction d'isolats extérieurs sur le lieu d'expérimentation. A Montpellier, des isolats viraux provenant du Mali et du Burkina Faso ont été utilisés. L'isolat du Mali utilisé à Montpellier est distinct de l'isolat local utilisé lors des expérimentations réalisées à Sikasso. L'isolat du Burkina Faso est le plus agressif des isolats disponibles au laboratoire (Rasaonary, 1990 ; Albar, 1994). Il a été choisi pour la majorité des expérimentations en conditions contrôlées car il permet d'observer rapidement les symptômes et d'obtenir, une semaine après inoculation, une concentration virale élevée dans les plantes.

Les isolats sont multipliés sur des variétés sensibles de type *indica* (BG90-2 ou Bouaké-189). Au champ, les feuilles de plantes infectées servant de source d'inoculum, sont récoltées au moment de leur utilisation. En conditions contrôlées, les plantes sur lesquelles le virus est multiplié sont récoltées 15 à 20 jours après inoculation et conservées à -80°C pour être utilisées ultérieurement. Pour une même série d'expérimentations, des lots homogènes de feuilles virosées issues de la même multiplication, sont utilisés afin de limiter les variations dans la concentration de l'inoculum ou une dérive éventuelle du virus.

Les inoculations sont réalisées mécaniquement. Pour cela, 1 g de feuilles virosées sont broyées dans 30 ml de tampon d'inoculation (KH_2PO_4 / Na_2HPO_4 0,1M, pH 7,2) en conditions contrôlées et dans 10 ml d'eau au champ. Un abrasif (poudre de verre ou carborundum) est ajouté au broyat obtenu. Le frottement des doigts trempés dans cette solution est suffisant pour contaminer les plantes.

2.2. Evaluation de l'impact de la maladie sur des caractères agro-morphologiques

2.2.1. Méthode d'estimation

L'expression « résistance au champ » fera référence, au cours de ce travail, à la capacité des plantes à limiter l'impact de la virose sur leur développement, leur morphologie et leur rendement. Ces critères de résistance sont estimés en comparant les performances des plantes inoculées aux performances des plantes saines.

Afin de mesurer ces performances, les plantes sont cultivées au champ et chaque parcelle élémentaire est constituée de deux lignes de plantes, disposées dans un même prolongement et séparées par une allée. Une ligne est inoculée avec le virus, tandis que l'autre sert de contrôle. L'allée entre les plantes saines et les plantes inoculées empêche les contaminations accidentelles des plantes saines à partir des plantes infectées. La hauteur et le tallage à différentes dates, certaines composantes de rendement et la durée du cycle sont notés plante à plante. Pour chaque parcelle élémentaire, l'impact de la maladie sur un caractère est évalué par le rapport :

$$(\text{moyenne des plantes inoculées}) / (\text{moyenne des plantes saines})$$

Chaque parcelle est ainsi caractérisée par ses composantes morphologiques mesurées sur plantes saines et sur plantes inoculées, et l'impact de la maladie sur chaque composante.

Par ailleurs, les symptômes sont notés d'après l'échelle suivante :

- note 1 absence totale de symptômes sur des plantes infectées,
- note 3 présence de légers spots chlorotiques et de panachures éparses,
- note 5 panachure nette sur des feuilles très vertes,
- note 7 coloration jaune généralisée et nécroses de l'extrémité des feuilles,
- note 9 coloration orangée et nécroses sévères, ou plantes mortes.

Les symptômes apparaissent en général une à deux semaines après inoculation sur les plantes les plus sensibles et restent clairement visibles pendant quatre à cinq semaines. Il est difficile de les distinguer d'éventuels problèmes physiologiques sur des plantes plus âgées.

2.2.2. Essai réalisé au Mali

Le niveau de résistance de lignées HD de la population IR64/Azucena a été évalué au champ, à la station IER/CIRAD de Sikasso, Mali, sous la responsabilité de N. Ahmadi, de juillet à octobre 1996.

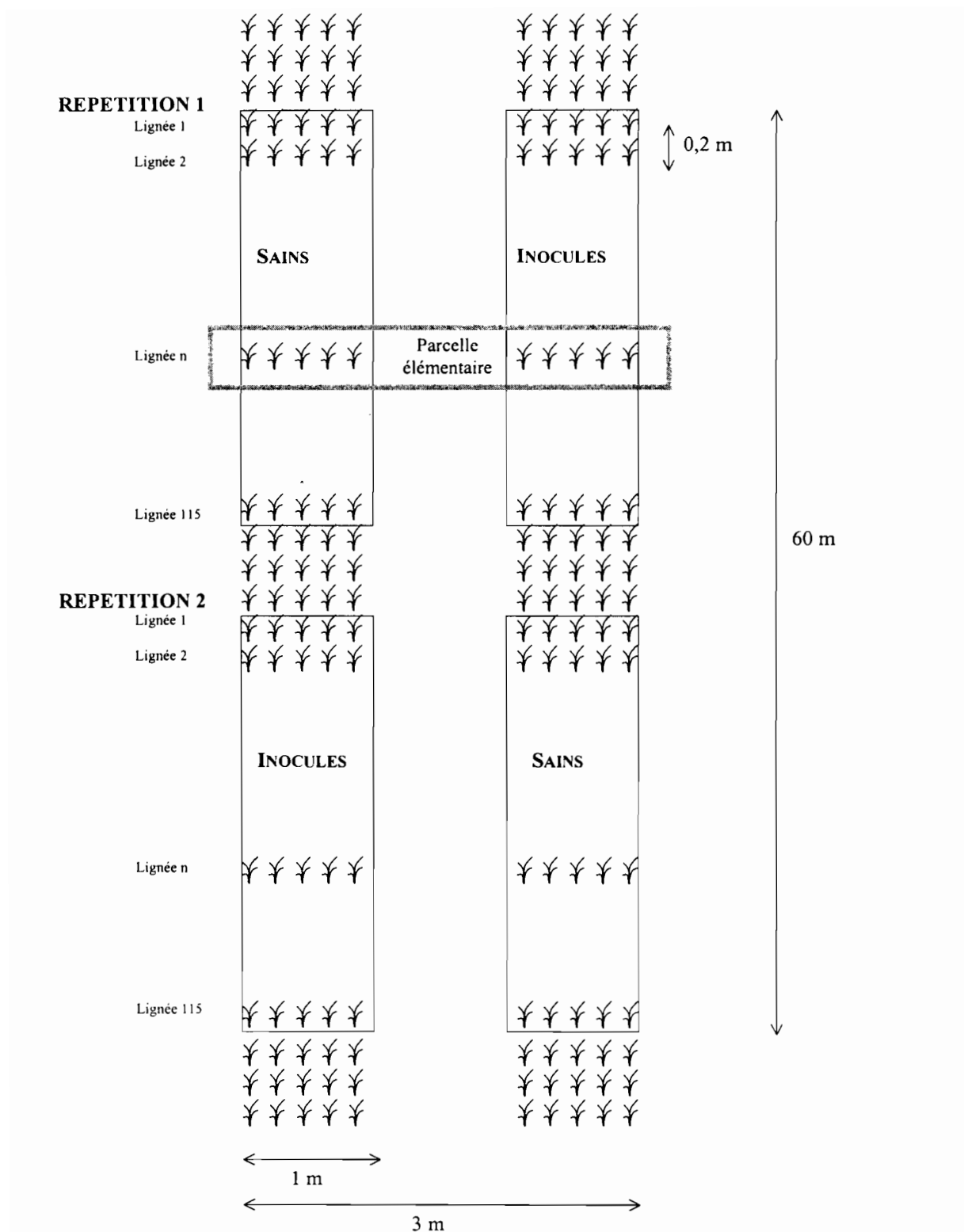


Figure 2.1. Dispositif de culture des lignées HD de la population IR64/Azucena au Mali. L'essai est constitué de deux blocs comprenant 115 lignées. La parcelle élémentaire est constituée de cinq plantes saines et cinq plantes inoculées. Trois lignes de variétés (témoins de sensibilité et de résistance) sont disposées entre les deux répétitions et aux extrémités. Pour chaque caractère, une note moyenne est calculée pour les plantes saines et les plantes inoculées de chaque parcelle et ces notes permettent d'estimer l'impact de la maladie.

Lors d'une mission à Sikasso, j'ai prélevé des échantillons pour réaliser ensuite des tests ELISA au Laboratoire de Pathologie Végétale de l'ADRAO, Bouaké, Côte d'Ivoire.

a) Conditions de culture et dispositif

Cent quinze lignées HD de la population IR64/Azucena ont été sélectionnées parmi les lignées les mieux caractérisées à l'aide de marqueurs RFLP, en fonction de la disponibilité des semences. Le dispositif de culture était constitué de deux blocs, à l'intérieur desquels, pour des raisons pratiques, les HD ont été disposées en fonction de leur numéro de lignée (Fig. 2.1.). La parcelle élémentaire était composée de cinq plantes inoculées quatre semaines après semis et cinq plantes non-inoculées, issues d'un semis en poquet et démarquées 20 jours après semis.

b) Notations des symptômes et des caractères agro-morphologiques

En cours de culture, la hauteur et le tallage ont été mesurés huit et dix semaines après semis. La date d'épiaison a été notée ; la hauteur, le nombre de talles fertiles, le poids total des grains et le poids des grains pleins ont été mesurés à maturité. Les mesures de hauteur et tallage relevées huit et dix semaines après semis étant étroitement corrélées (coefficients de corrélation $r > 0,9$), nous n'avons retenu pour l'analyse que les données obtenues huit semaines après semis. De même, en raison d'un coefficient de corrélation élevé ($r = 0,99$) entre le poids total des grains et le poids des grains pleins, seule cette dernière variable a été étudiée.

Les symptômes des plantes ont été notés huit et onze semaines après semis, soit quatre et sept semaines après inoculation. Seules les notations effectuées huit semaines après semis ont été retenues pour les analyses, la notation des symptômes étant difficile et imprécise par la suite.

2.2.3. Essai réalisé en Côte d'Ivoire

Une deuxième évaluation de la résistance au champ a été conduite sur certaines lignées de la population IR64/Azucena à la Station de Pathologie Végétale de l'ADRAO, Bouaké, Côte d'Ivoire, lors d'un séjour de quatre mois que j'ai effectué sur place.

a) Conditions de culture et dispositif

Quatre-vingt seize lignées HD de la population IR64/Azucena ont été sélectionnées. Les plantes ont été semées en pot et repiquées dans des abris « insect proof » quatre semaines après semis. Les plantes ont été réparties dans quatre abris en fonction de leur taille, mesurée au cours d'une précédente étude (Huang *et al.*, 1996), afin d'éviter une compétition pour la lumière. Sous chaque abri, 28 lignes, soit 24 lignées HD et quatre variétés témoins (IR64, Azucena, Bouaké-189, BG90-2) ont été aléatoirement disposées. Chaque parcelle élémentaire était constituée de 14 plantes inoculées et six plantes non-inoculées. Les plantes ont été inoculées 12 jours après repiquage soit 40 jours après semis.

b) Difficultés rencontrées et notations des symptômes

Les plantes ont exprimé des symptômes très intenses de toxicité ferrique, dus à la nature du sol. Cette toxicité a entraîné la mort d'un nombre important de plantes dans deux abris où l'essai a été abandonné. En revanche, l'essai a été poursuivi dans les deux abris où des symptômes de toxicité ferrique plus faibles ont été observés.

Les symptômes ont été notés à différentes dates. La notation effectuée trois semaines après inoculation sera exploitée par la suite en comparaison avec les résultats de l'essai réalisé au Mali. En revanche, en raison du biais lié à la toxicité ferrique et du faible nombre d'individus conservés, les caractères agro-morphologiques mesurés au cours de cet essai n'ont pas été pris en compte lors de l'analyse des résultats.

Les différentes variables mesurées au champ sur les lignées de la population IR64/Azucena et leurs abréviations sont récapitulées dans le tableau 2.5..

2.3. Evaluation du contenu en virus

Le contenu en virus a été estimé dans les variétés de la collection et dans les lignées HD des populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura dans diverses conditions de test. Au cours des paragraphes suivants, nous allons présenter la technique du test ELISA puis, pour chaque expérimentation, nous détaillerons les dispositifs mis en œuvre.

2.3.1. Principe et technique du test ELISA

a) Principe

Le dosage du virus dans les plants a été effectué à l'aide de la technique immunoenzymatique DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ; Clark et Adams, 1977), à moins de précisions complémentaires. Ce test est basé sur la reconnaissance du virus par des anticorps et comprend plusieurs étapes :

- un anticorps polyclonal dirigé contre le virus est adsorbé sur une plaque de microtitration ;
- le virus, contenu dans le broyat de plante, est incubé dans la plaque de microtitration et se lie à l'anticorps ;
- un anticorps couplé à la phosphatase alcaline se lie ensuite au virus ;
- enfin, le complexe anticorps-antigène-anticorps couplé est dosé grâce à la réaction colorimétrique du para-nitrophenylphosphate (pNPP) catalysée par la phosphatase alcaline : cette réaction est proportionnelle à la quantité de virus liée à l'anticorps et donc à la quantité de virus présente dans le broyat de plante.

b) Préparation des anticorps

Un sérum de lapin a été produit contre des isolats viraux du Mali et de Madagascar, à l'aide du protocole de Fauquet et Thouvenel (1977). Les anticorps polyclonaux ont été purifiés à partir du sérum par précipitation au sulfate d'ammonium et passage sur colonne échangeuse d'ions (Hampton *et al.*, 1990). Le conjugué est préparé par couplage des anticorps polyclonaux avec la phosphatase alcaline grâce au glutaraldehyde (protocole donné en annexe 2). Pour chaque nouvelle préparation d'anticorps et de conjugué, des tests préliminaires permettent de définir les dilutions de travail.

Les anticorps polyclonaux dirigés contre l'isolat du Mali et contre l'isolat de Madagascar reconnaissent également les quatre isolats viraux utilisés au cours des différentes expérimentations. Pour chaque série d'expérimentation, un même anticorps, choisi en fonction de sa disponibilité, a été utilisé.

c) Protocole du test ELISA

Les plantes testées en ELISA sont broyées dans du tampon PBS-T (annexe 3) à des dilutions allant de 1 g de matériel végétal pour 1000 ml de tampon à 1 g de matériel végétal pour 100000 ml de tampon. L'anticorps dilué dans le tampon d'adsorption (Na_2CO_3 15 mM ; NaHCO_3 34 mM ; pH 9,6) est déposé dans les plaques de microtitration (Maxisorp, Nunc), à raison de 100 μl /puits. Les plaques sont incubées 2 h à 37°C. Après une étape de lavage qui permet d'éliminer les anticorps non adsorbés (un lavage rapide et deux lavages de 3 mn, tampon PBS-T), les sites de fixation sont saturés par 200 μl de lait écrémé à 3% dilué dans du PBS-T et incubé 1 h minimum à 37°C. Après lavage, 100 μl /puits d'antigène sont déposés et incubés 2 h à 37°C. Les plaques sont lavées, puis 100 μl d'anticorps conjugué à la phosphatase alcaline dilué dans le PBS-T sont incubés une nuit à 4°C. Après une dernière étape de lavage, 100 μl de substrat (pNPP, Sigma, 10mg/ml, di-éthanolamine 98ml/l ; pH 9,8) sont déposés dans les puits. Des lectures de densité optique (DO) à 405 nm sont réalisées à intervalles réguliers (généralement entre 30 mn et 120 mn), jusqu'à l'obtention d'une valeur de DO maximale comprise entre 2 et 3.

d) Précautions d'utilisation

Différentes précautions doivent être prises afin que le test ELISA donne des résultats reproductibles.

L'intensité de la réponse étant fonction de la position des puits sur la plaque, et, en particulier, la DO étant en général significativement plus élevée en bordure, 60 puits seulement sont utilisés sur les plaques ELISA en comprenant 96 et du tampon est déposé dans les puits extérieurs. Chaque échantillon est déposé dans deux puits. Un échantillon de plante saine permet d'estimer le bruit de fond ; celui-ci est généralement très faible ($\text{DO} \sim 0,05$) dans nos conditions de test.

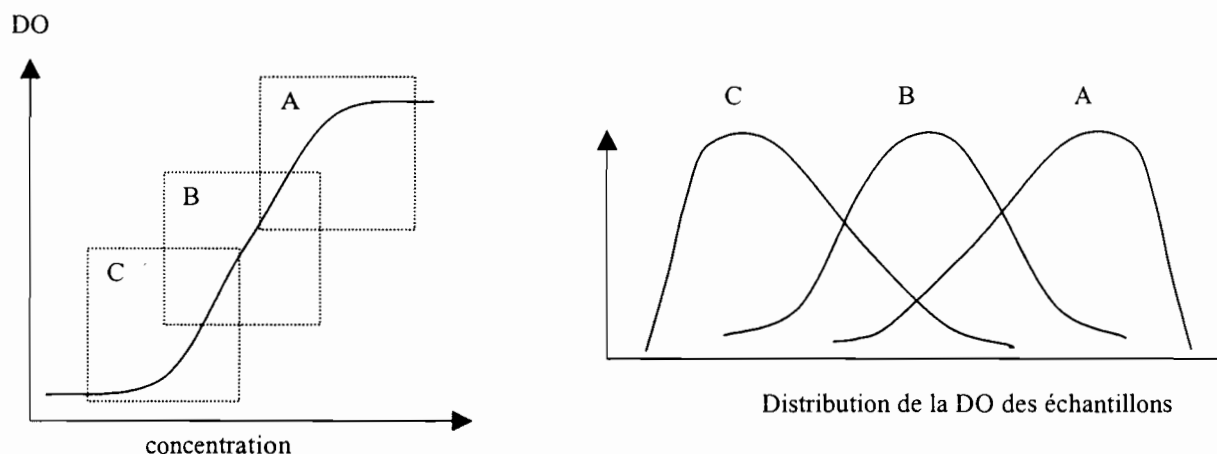


Figure 2.2. Relation entre la concentration virale et la DO obtenue en test ELISA. A trop faible concentration (cas C) ou trop forte concentration (cas A), le test ELISA ne permet pas d'évaluer correctement la concentration à partir de la DO. En outre, la distribution des échantillons sera décalée vers la droite dans le cas A et vers la gauche dans le cas C. Il est donc souhaitable de s'assurer que la concentration virale des échantillons testés correspond à la zone de proportionnalité entre la DO et la concentration (cas B). Pour cela, plusieurs dilutions ont généralement été testées (éventuellement lors de tests préliminaires) et une gamme étalon de virus purifié a permis de déterminer la zone de proportionnalité.

Par ailleurs, le test ELISA ne donne une réponse linéaire que dans une certaine gamme de concentrations. Jensen *et al.* (1985) conseillent de travailler à plusieurs dilutions et de ne retenir que les dilutions donnant des valeurs de DO comprises dans la zone où la DO est proportionnelle à la concentration (Fig. 2.2.). En raison du nombre important d'échantillons au sein de chaque expérimentation, nous n'avons pu tester en général qu'une à trois dilutions par échantillon. Pour chaque série d'expérimentation, des tests préliminaires sur des plantes témoins ont permis de choisir la (ou les) dilution(s) optimale(s). Lors des expérimentations en conditions contrôlées, une gamme de dilutions de virus a été déposée sur chaque plaque. Elle permet d'une part de délimiter la zone de proportionnalité entre la DO et la concentration et de vérifier que les échantillons sont distribués dans cette zone, d'autre part de contrôler l'effet « plaque » et éventuellement de le corriger.

2.3.2. Evaluation de la collection en conditions contrôlées

a) Dispositif

Le niveau de résistance de 110 variétés de la collection a été évalué au cours de deux expérimentations. Les variétés ont été réparties dans la première expérimentation ou la seconde en fonction de la disponibilité des graines lors du premier test. Pour corriger l'effet expérimentation, onze variétés témoins de niveaux de résistance variables ont été incluses dans les deux essais.

Au sein de chaque expérimentation, chaque variété a été répétée sur deux lignes. Les graines ont été semées dans des terrines (30 cm x 45 cm), à raison de 12 à 18 graines par ligne et 10 lignes par terrine. Les plantes ont été cultivées en chambre de culture en conditions contrôlées de photopériode et de température : la température est maintenue entre 28 et 30°C pendant le jour et entre 24 et 26°C pendant la nuit et la photopériode est de 12 heures. Les plantes étant observées pendant près de huit semaines, de l'engrais et des éléments minéraux ont été apportés régulièrement à partir de la deuxième semaine. Les plantes ont été inoculées 10 jours après semis avec l'isolat viral du Burkina Faso.

b) Conditions de réalisation des tests ELISA

Des prélèvements de plantes ont été réalisés une semaine et trois semaines après inoculation pour évaluer le contenu en virus. Lors du premier test (ELISA1), six à huit plantes ont généralement été récoltées et toute la partie aérienne des plantes a été broyée (dilution finale : 1g / 2500 ml de tampon). Lors du deuxième test, la dernière ou les deux dernières feuilles déployées de cinq plantes ont été broyées (dilution finale : 1 g / 50000 ml de tampon).

Pour chaque expérimentation, la transformation suivante a été effectuée sur les DO obtenues :

$$ELISA = B \times \ln (DO + A) + C$$

Dans un premier temps, la transformation $\ln (DO + A)$ a permis de corriger un biais lié à des problèmes techniques rencontrés lors de la première expérimentation. Ces problèmes sont

Tableau 2.2. Transformations réalisées sur les DO obtenues par test ELISA lors de l'évaluation de la collection variétale. Le test ELISA1 a été effectué une semaine après inoculation et le test ELISA2 trois semaines après inoculation. Des transformations de type $ELISA = B \times \ln(DO+A) + C$ ont été effectuées pour corriger l'effet de l'expérimentation.

	Expérimentation 1	Expérimentation 2
ELISA1	$0,772 \times \ln(DO + 100) + 2,441$	$\ln(DO+200)$
ELISA2	$1068,5 \times \ln(DO + 500) - 6389$	DO ¹

¹ L'absence de transformation logarithmique est équivalente à une transformation $\ln(DO+A)$ avec A très grand.

Tableau 2.3. Récapitulatif des critères de résistance estimés sur la collection variétale. Les plantes ont été inoculées avec un isolat viral du Burkina Faso dix jours après semis et le contenu en virus et les symptômes ont été estimés à différentes dates.

Caractère	Abréviation	Date de mesure
Contenu en virus	ELISA1	7 jai ^a
Contenu en virus	ELISA2	21 jai
Aire sous la courbe de progression des symptômes	AUSPC	10, 25 et 45 jai

^a jai : jours après inoculation

responsables d'un manque de proportionnalité entre la DO et la concentration, malgré la réalisation de tests préliminaires pour définir la dilution de travail. Le coefficient A a été déterminé de proche en proche pour chaque test de telle sorte que la variance soit indépendante de la moyenne ($-0,1 < r < 0,1$). Cette transformation permet d'observer des distributions de même allure pour les deux expérimentations. Dans un deuxième temps, les coefficients B et C ont été déterminés à partir d'une régression linéaire entre les valeurs obtenues pour les 11 variétés témoins lors de la première et de la deuxième expérimentation. Cette transformation a permis de corriger l'effet de l'expérimentation, significatif au seuil $p < 0,05$. Les différentes valeurs des coefficients A, B et C sont récapitulées dans le tableau 2.2..

Pour plus de simplicité dans la présentation des résultats, les variables ELISA1 et ELISA2 ont été centrées et réduites pour réaliser les tableaux et les figures présentés dans le chapitre suivant.

c) Notation des symptômes

Les symptômes S_1 , S_2 et S_3 ont été notés respectivement 10 jours, 25 jours et 45 jours après inoculation suivant l'échelle de notation décrite précédemment (§ 2.2.1.). L'aire sous la courbe de progression des symptômes (AUSPC) a été calculée à partir de ces trois notations :

$$AUSPC = \sum [(S_i + S_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i) / 2]$$

où S_i correspond aux symptômes à la date t_i . On considère que lors de l'inoculation ($t=0$), les symptômes ont la valeur 1 (plante infectée sans symptômes apparents). Donc, dans notre cas :

$$AUSPC = (1 + S_1) \times 5 + (S_1 + S_2) \times 7,5 + (S_2 + S_3) \times 10$$

L'effet expérimentation a été testé par analyse de variance sur les variétés témoins. Il est non significatif (au seuil $p < 0,05$) et aucune correction n'a donc été effectuée.

Les différents critères d'évaluation de la résistance sur cette collection de variétés sont résumés dans le tableau 2.3..

2.3.3. Evaluation des populations HD avec le test « précoce », en conditions contrôlées

a) Mise au point des conditions de test

Toutes les lignées HD disponibles des populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura ont été évaluées à un stade jeune, à l'aide d'un test que nous qualifierons par la suite de « précoce ».

Les plantes ont été inoculées dix jours après semis avec l'isolat viral du Burkina Faso. Des tests préliminaires nous ont permis de choisir la date d'évaluation permettant à la fois de maximiser les différences de concentration virale entre les plantes et, pour des raisons pratiques, de réduire la durée du test. Ces tests ont mis en évidence que, lorsque les plantes sont inoculées 10 jours après semis, les

Tableau 2.4. Contenu en virus chez les variétés IR64, Azucena, IRAT177 et Apura à différentes dates après l'inoculation. Les plantes ont été inoculées 10 jours après semis et le contenu en virus a été estimé une et deux semaines plus tard par test ELISA. Les valeurs de DO obtenues pour les différentes variétés ont été comparées, pour chaque test, par analyse de variance ; des DO non significativement différentes sont suivies d'une même lettre. Des différences significatives sont observées entre IR64 et Azucena une et deux semaines après inoculation, tandis qu'aucune différence n'est observée entre IRAT177 et Apura une semaine après inoculation.

Variétés	DO à 1 sai ^a	DO à 2 sai
IR64 (<i>indica</i>)	2,600 ^a	2,145 ^a
Azucena (<i>japonica</i> pluvial)	0,598 ^b	0,473 ^c
IRAT177 (<i>japonica</i> pluvial)	0,483 ^b	0,336 ^c
Apura (<i>indica</i>)	0,241 ^b	1,862 ^b

^a sai : semaines après inoculation

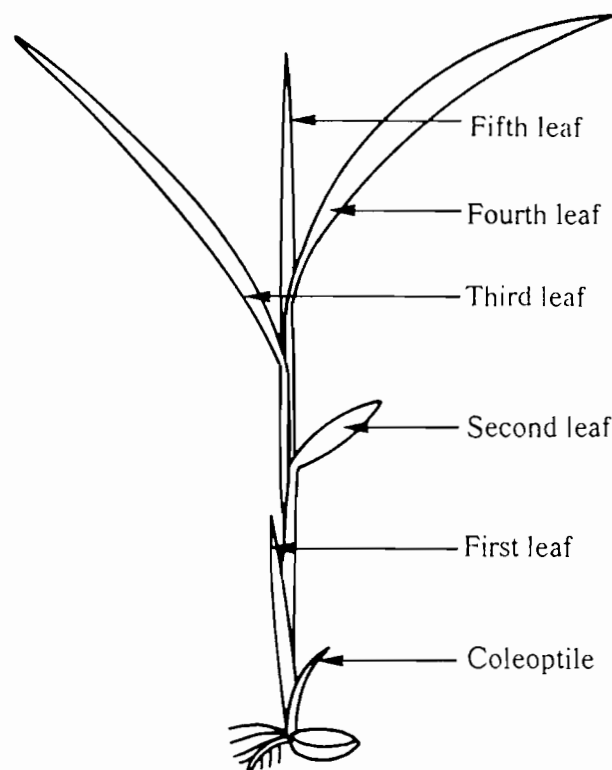


Figure 2.3. Nomenclature des étages foliaires chez le riz (d'après Hoshikawa, 1993). Cette nomenclature a été utilisée pour repérer les feuilles inoculées et récoltées pour les tests ELISA.

différences entre IR64 et Azucena sont significatives une semaine plus tard, tandis que les différences entre IRAT177 et Apura ne sont significatives que deux semaines après inoculation (Tab. 2.4.). Nous avons donc choisi de réaliser le test ELISA une semaine après inoculation pour la population IR64/Azucena et deux semaines après inoculation pour la population IRAT177/Apura.

La date d'inoculation, dix jours après semis, correspond dans nos conditions de culture au stade « troisième feuille » suivant la nomenclature de Hoshikawa (1993) (Fig. 2.3.). Lors de certaines expérimentations, la vitesse de croissance des plantes a été légèrement plus lente les premiers jours et l'inoculation a été retardée de 1 à 2 jours de façon à être effectuée toujours au même stade.

Lors des tests ELISA, toute la partie aérienne des plantes a été récoltée et broyée. Deux dilutions de broyat ont été utilisées : 1 g pour 10000 ml de tampon et 1 g pour 100000 ml de tampon.

b) Dispositif expérimental

Le nombre de lignées HD testées au sein de chaque population était trop élevé pour que toutes les lignées soient testées simultanément et plusieurs expérimentations ont été mises en place. Sept expérimentations ont permis d'évaluer la résistance de 168 lignées de la population IR64/Azucena et trois expérimentations, 66 lignées de la population IRAT177/Apura. Les lignées HD étant en cours de multiplication lors de la réalisation de ces tests, la répartition des lignées entre les différentes expérimentations n'a pas été aléatoire mais dépendante de la disponibilité des graines.

Dans chaque expérimentation, 60 lignes de 15 graines ont été réparties aléatoirement dans six terrines. Douze lignes de variétés témoins, à raison de quatre lignes pour chacune des variétés IR64, Azucena et Tox-3219, ont permis de tester et de corriger l'effet expérimentation. La variété Tox-3219 a été choisie en raison d'un niveau de résistance intermédiaire entre IR64 et Azucena (Rasaonary, 1990). Les 48 lignes restantes comprenaient deux répétitions de 24 lignées HD lors de l'évaluation de la population IR64/Azucena, et de 22 lignées HD et des variétés IRAT177 et Apura lors de l'évaluation de la population IRAT177/Apura.

c) Traitement des résultats

Trois corrections ont été effectuées successivement sur les DO obtenues avec le test ELISA afin (1) de corriger l'effet « plaque » à partir d'une gamme étalon de virus purifié, (2) de corriger l'effet « expérimentation » à partir des variétés témoins et (3) de normaliser les distributions à l'aide d'une transformation logarithmique.

La gamme de virus purifié sur chaque plaque a donc permis, tout d'abord, d'exprimer les résultats en quantité de virus par gramme d'échantillon et de corriger un éventuel effet plaque, trois plaques de microtitration étant utilisées pour une expérimentation. La relation liant la DO au contenu en virus (CV*) est de type :

$$\log (CV_a) = A \times \log (DO) + B$$

Les coefficients A et B ont été déterminés, pour chaque plaque, par le logiciel BioLinx (Dynatech). Des coefficients de régression entre la DO et la concentration virale dans les échantillons de la gamme étalon sont supérieurs à 0,99 pour la majorité des plaques.

Ensuite, l'effet « expérimentation » a été testé sur les variétés témoins (et éventuellement IRAT177 et Apura) par analyse de variance à l'aide d'un modèle prenant en compte l'effet variété et l'effet expérimentation. L'analyse de variance a mis en évidence un effet expérimentation (au seuil $p < 0,05$). Cet effet est proportionnel à la concentration virale dans la plante : il est faible pour les variétés Azucena et IRAT177 qui multiplient peu le virus et plus important chez Apura, Tox-3219 et IR64 qui multiplient beaucoup le virus. Pour corriger l'effet de l'expérimentation, la transformation suivante a été effectuée :

$$CV_b = CV_a \times CV_t / CV_{te}$$

où CV_{te} est le contenu moyen en virus des témoins de toutes les expérimentations et CV_t le contenu moyen en virus des témoins de l'expérimentation considérée.

Enfin, la variance étant proportionnelle à la moyenne et afin de normaliser les distributions, une transformation logarithmique a été effectuée :

$$CV_0 = \ln(CV_b + 100)$$

Enfin, comme pour la collection de variétés, cette variable a été centrée et réduite lors de la présentation des résultats.

Ces transformations permettent d'optimiser l'exploitation des données. Les principaux résultats décrits par la suite ont été obtenus à partir de la variable transformée CV_0 mais sont généralement mis aussi en évidence directement avec les DO, avec des effets toutefois moins significatifs.

2.3.4. Evaluation des populations HD avec le test « tardif », en conditions contrôlées

Nous avons également utilisé les résultats des évaluations de résistance réalisées par Rasonary (1990) sur 72 lignées de la population IRAT177/Apura et par Lecomte (1993) sur 68 lignées de la population IR64/Azucena. Ces tests ELISA réalisés sur des plantes de cinq semaines seront dénommés tests « tardifs ».

Quatre à douze plantes par lignées ont été semées en conditions contrôlées. Les plantes ont été inoculées mécaniquement 19 jours après semis avec un isolat viral du Mali et le contenu en virus a été évalué 14 jours après inoculation dans la dernière feuille développée. Cette feuille est la deuxième feuille développée après l'inoculation.

Le test ELISA utilisé lors de cette expérimentation n'était pas de type DAS-ELISA mais de type ACP-ELISA (Antigen Coated Plate), c'est à dire que l'antigène a été adsorbé directement sur la plaque

de microtitration. Le protocole exact est donné dans l'article de Ghesquière *et al.* (1997), présenté en annexe 5.

Une évaluation de 29 lignées complémentaires de la population IR64/Azucena a été conduite en 1997. Deux répétitions de 10 plantes ont été semées en conditions contrôlées. L'inoculation a été réalisée avec l'isolat viral du Burkina Faso. L'inoculation et les tests ELISA ont été réalisés au même stade que lors de l'expérimentation de 1993. Le test ELISA utilisé dans ce cas était de type DAS-ELISA.

Une transformation logarithmique a été effectuée sur les densités optiques :

$$CV_1 = \ln (DO)$$

Puis la variable CV_1 a été centrée et réduite afin de simplifier la présentation des résultats.

Ce test a également été utilisé pour évaluer le niveau de résistance dans des descendance en ségrégation. Dans ce cas, les plantes ont été cultivées en pots, avec une plante par pot. Les plantes ont été inoculées et testées comme précisé précédemment mais les évaluations ont été réalisées sur des plantes individuelles.

2.3.5. Evaluation de la population IR64/Azucena au champ

a) Expérimentation réalisée au Mali

Lors de l'expérimentation réalisée au Mali, des fragments des dernières feuilles déployées ont été prélevés 11 semaines après semis sur chacune des cinq plantes inoculées d'une parcelle. Ces fragments ont été mélangés de façon à ne constituer finalement qu'un échantillon par ligne. Plusieurs plaques de microtitration ont été utilisées pour tester l'ensemble des lignées. Un effet plaque a été mis en évidence par analyse de variance ($p < 0,05$). En l'absence de gamme étalon, une correction a été effectuée à partir de la moyenne des DO des échantillons d'une plaque (DO_{mp}) :

$$CV_2 = DO / (DO_{mp})$$

La variance de la variable CV_2 est indépendante de la moyenne et la distribution de CV_2 n'est pas différente d'une distribution normale. Cette variable a donc été exploitée sans transformation logarithmique. La variable CV_2 a été centrée et réduite lors de la présentation des résultats.

b) Expérimentation réalisée en Côte d'Ivoire

Des échantillons de feuilles ont été prélevés trois semaines et sept semaines après inoculation dans les deux abris les plus faiblement affectés par la toxicité ferrique. Pour chaque ligne, une feuille jeune récemment déployée a été prélevée sur chaque plante et ces feuilles ont été mélangées de manière à ne tester qu'un échantillon par ligne.

Tableau 2.5. Récapitulatif des caractères mesurés sur les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura et abréviations utilisées. Au champ, au Mali, des composantes agromorphologiques ont été mesurées sur plantes non inoculées et le niveau de résistance a été estimé par le rapport des performances des plantes inoculées et des plantes non inoculées.

Caractère	Abréviations		Date d'inoc.	Date de test	Isolat viral
	Morphologie	Résistance			
<u>Population IR64/Azucena</u>					
Conditions contrôlées					
Contenu en virus		CV ₀	10 jas ^a	17 jas	BF
Contenu en virus		CV ₁	19 jas	34 jas	BF ou M ^c
Champ (Mali)					
Hauteur	H8c	H8r	4 sas ^b	8 sas	local
Hauteur	HMc	HMr	4 sas	maturité	local
Nombre de talles	T8c	T8r	4 sas	8 sas	local
Nombre de talles fertiles	TMc	TMr	4 sas	maturité	local
Durée semis-épiaison	SEc	SEr	4 sas		local
Poids des grains pleins	PGc	PGr	4 sas	maturité	local
Symptômes		S2	4 sas	8 sas	local
Contenu en virus		CV ₂	4 sas	11 sas	local
Champ (Côte d'Ivoire)					
Symptômes		S3	6 sas	9 sas	local
Contenu en virus		CV _{3a}	6 sas	9 sas	local
Contenu en virus		CV _{3b}	6 sas	13 sas	local
<u>Population IRAT 177/Apura</u>					
Conditions contrôlées					
Contenu en virus		CV ₀ '	10 jas ^a	17 jas	BF
Contenu en virus		CV ₁ '	19 jas	34 jas	M

^a jas : jours après semis

^b sas : semaines après semis

^c les isolats viraux utilisés en conditions contrôlées sont originaires du Burkina Faso (BF) ou du Mali (M) mais l'isolat M est différent de l'isolat local utilisé lors de l'essai réalisé à la Station IER/CIRAD du Mali

Au sein de chaque abri, les valeurs de symptômes et de DO ont été corrigées en fonction des données obtenues sur les variétés témoins :

$$CV_3 = DO \times DO_t / DO_{ta}$$

où DO_{ta} est la moyenne des variétés témoins de l'abri et DO_t la moyenne des variétés témoins des deux abris. La variable CV_{3a} correspond à la mesure effectuée trois semaines après inoculation et la variable CV_{3b} à la mesure effectuée sept semaines après inoculation.

Les différentes estimations du contenu en virus dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura sont récapitulées dans le tableau 2.5..

3. TECHNIQUES DE MARQUAGE MOLECULAIRE

La composition des solutions courantes mentionnées dans les paragraphes suivants est indiquée dans l'annexe 3.

3.1. Extraction d'ADN

La méthode d'extraction choisie est celle décrite par Hoisington *et al.* (1994). Les feuilles de riz peuvent être lyophilisées et broyées dans un moulin à café, ou congelées à -80°C et broyées dans de l'azote liquide. Pour obtenir environ 50 μg d'ADN, 1,5 g de feuilles fraîches (ou 300 mg de feuilles lyophilisées), broyées, sont mises en suspension dans 9 ml de tampon d'extraction (Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M ; NaCl 0,7 M ; EDTA pH 8, 50 mM ; MATAB 1% ; β -mercaptoéthanol 0,14 M). Le mélange est incubé deux ou trois heures à 65°C et agité régulièrement. Les protéines et les composés hydrophobes sont éliminés par une extraction avec 4,5 ml de mélange chloroforme/isoamylalcool (24/1). Le mélange est agité quelques minutes, centrifugé 10 mn à 2400 g et la phase aqueuse est prélevée. Après une deuxième extraction au chloroforme/isoamylalcool, l'ARN est dégradé par l'action de 45 μl de RNase A à 10 mg/ml, pendant 30 mn à température ambiante. L'ADN est ensuite précipité par ajout de 6 ml d'isopropanol. On agite doucement jusqu'à l'apparition de la pelote d'ADN que l'on prélève à l'aide d'un crochet en verre. Cette pelote est lavée 20 mn dans 3 ml de lavage 1 (éthanol 76%, acétate de sodium 0,2 M) puis quelques minutes dans du lavage 2 (éthanol 76%, acétate d'ammonium 10 mM). Après séchage au « speed-vac », l'ADN est repris dans du tampon TE.

La concentration d'ADN est évaluée grâce à un dosage sur gel d'agarose par comparaison avec de l'ADN témoin (λ digéré par Hind III et Eco RI). Ce type de dosage permet, en outre, de vérifier que l'ADN n'est pas dégradé. Deux dilutions d'ADN pour chaque échantillon, généralement déterminées empiriquement en fonction de la taille de la pelote obtenue, sont déposées sur mini-gel d'agarose (0,8%, dans du TAE) avec l'ADN témoin. Après migration à 50 V dans du tampon TAE, l'ADN est

révélé au bromure d'éthidium. La comparaison de l'intensité de la coloration de l'ADN extrait et des différentes bandes du marqueur de taille permet d'évaluer la quantité d'ADN.

3.2. Marqueurs RFLP

3.2.1. Principe

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) résulte des variations dans la distribution des sites de restriction le long d'une séquence d'ADN. Ces variations peuvent être dues à des mutations ponctuelles au niveau des sites de restriction ou à des insertions et des délétions entre deux sites.

L'ADN est digéré avec une endonucléase qui reconnaît spécifiquement un site constitué le plus souvent de 4 à 6 paires de bases. Les fragments d'ADN ainsi obtenus sont séparés en fonction de leur poids moléculaire par une électrophorèse en gel d'agarose. L'ADN est transféré du gel vers une membrane qui peut être conservée et utilisée plusieurs fois. Une sonde d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire est hybridée à la membrane et reconnaît spécifiquement une séquence d'ADN. Le marquage de la sonde permet de révéler sa position et donc la taille du fragment auquel elle s'est hybridée.

Les sondes peuvent être marquées chimiquement ou par radioactivité. Le premier système est plus souple d'utilisation, les produits sont stables au cours du temps, les sondes peuvent être recyclées ; de plus il donne un résultat plus rapidement que la radioactivité (1 à 2 h d'exposition des films contre plusieurs jours en radioactivité). Cependant, davantage de facteurs doivent être maîtrisés et une irrégularité dans la qualité du signal nous a conduit à utiliser le marquage radioactif dans certains cas.

La caractérisation d'individus par marqueurs RFLP résulte en général d'une approche en deux étapes. Dans une première étape, l'ADN d'un nombre limité d'individus (les parents pour la cartographie d'une population) est digéré avec plusieurs enzymes. L'hybridation des membranes obtenues avec les différentes sondes permet de sélectionner les enzymes qui seront utilisées, dans une deuxième étape, pour caractériser l'ensemble des individus.

3.2.2. Préparation des membranes

L'ADN génomique, initialement à une concentration de 0,5 µg/µl, est digéré dans un volume final de 22 µl avec 2,5 unités d'enzyme par µg selon le protocole conseillé par le fournisseur (Boehringer Mannheim, Promega ou Appligène selon les enzymes). La quantité d'ADN digéré correspond à 5 µg d'ADN par piste et éventuellement 1 µg supplémentaire pour certains individus qui seront utilisés pour vérifier la qualité de la digestion par migration sur mini-gel d'agarose.

Les fragments d'ADN sont séparés sur gel d'agarose (0,8% dans du tampon TBE) par une migration de 8 cm à 30 V. L'ADN est coloré au bromure d'éthidium pour visualiser le profil de digestion. Le gel est placé dans un bain d'acide chlorhydrique (0,25 N) pendant 20 mn. Cette étape permet de couper les fragments d'ADN de grande taille par dépurination partielle afin de faciliter leur transfert. L'ADN est ensuite dénaturé dans de la soude (0,4 M) puis il est transféré par capillarité sur membranes de Nylon chargées positivement (Hybond+, Boehringer Mannheim). Le montage utilisé pour le transfert est inspiré de la méthode de Southern (1975). Le gel est placé sur une éponge gorgée de soude (0,4 M) et la membrane est disposée sur le gel. Du papier absorbant au-dessus de la membrane crée, par capillarité, un flux de soude qui entraîne l'ADN du gel vers la membrane. Des caches en plastique, découpés à la taille du gel et de la membrane, permettent de restreindre le flux de soude à la surface de la membrane. Après 24 h de transfert, les membranes sont neutralisées par un bain rapide dans du SSC 2X, elles sont séchées sur papier Whatmann puis l'ADN est fixé par irradiation aux ultra-violets.

3.2.3. Provenance, conservation et marquage des sondes

Les sondes RFLP utilisées proviennent des laboratoires de l'Université Cornell, Ithaca, NY, USA et du « Rice Genome Program », Tsukuba, Japon. Ce sont des ADN génomiques de riz et des ADN complémentaires de riz, d'orge ou d'avoine (Tab. 2.6.). Ces sondes nous sont parvenues sous la forme d'inserts dans différents plasmides contenant un gène de résistance à l'ampicilline et sont conservées à -80°C. Ces plasmides sont utilisés pour transformer la souche DH5α d'*Escherichia coli* à l'aide du protocole décrit dans l'annexe 4. Les bactéries transformées sont conservées dans 50% de glycérol, à -80°C.

Afin de marquer les sondes, les bactéries sont mises en culture dans du milieu LB. Environ 2 ml de milieu de culture sont centrifugés et le culot d'ADN est repris dans 100 µl d'eau. L'insert est amplifié par PCR à partir d'amorces universelles (5'CAGGAAACAGCTATGAC3' et 5'GTAAAACGACGGCCAGT3'). Ces amorces s'hybrident à l'ADN plasmidique de part et d'autre du « polylinker » où est insérée la sonde. La solution d'amplification est constituée de 5 µl de solution plasmidique, 100 µM de chaque dXTP, 0,625 µM de chaque amorce, 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), du tampon (Promega) à la concentration 1X et 0,4 µl de Taq Polymérase (Promega), le tout ajusté à 50 µl avec de l'eau Millipore. Le programme PCR est le suivant : 4 mn de dénaturation initiale à 94°C, 35 cycles comprenant 1 mn 30 s de dénaturation à 94°C, 1 mn 30 s d'hybridation à 50°C, 2 mn d'élongation à 72°C ; après une élongation finale de 4 mn à 72°C, l'ADN est conservé à 4°C.

Le marquage des sondes pour une révélation chimique est réalisé par incorporation d'UTP marqué à la digoxygénine (Boehringer) au cours de l'amplification de l'insert (10 µM de dig-UTP).

Tableau 2.6. Provenance des sondes RFLP utilisées. Les marqueurs RFLP mis en évidence par les sondes de l'Université Cornell sont généralement cartographiés sur la carte interspécifique de Causse *et al.* (1994) et les marqueurs révélés par les sondes du RGP (« Rice Genome Program ») sont cartographiés sur la carte *indica/japonica* de Harushima *et al.* (1998).

nom	laboratoire d'origine	espèce source	type de sonde
RG	Université Cornell, USA	riz	génomique
RZ	Université Cornell, USA	riz	ADNc
CDO	Université Cornell, USA	avoine	ADNc
BCD	Université Cornell, USA	orge	ADNc
G	RGP, Japon	riz	génomique
R	RGP, Japon	riz	ADNc (racine)
C	RGP, Japon	riz	ADNc (cal)
Y	RGP, Japon	riz	extrémité de clone YAC

Le marquage radioactif est réalisé par « random priming ». Afin de séparer la sonde de l'ADN plasmidique et d'autres fragments amplifiés suite à une amplification classique, la solution d'amplification et 5 µl de bleu sont déposés sur un gel d'agarose « low melting ». Ce gel est préparé avec du TAE contenant uniquement 0,1 mM d'EDTA pour ne pas inhiber la polymérase de Klenow utilisée par la suite. Après migration (TAE 0,1 mM EDTA, 50 V) et coloration au bromure d'éthidium, le fragment d'agarose contenant la sonde est isolé et conservé à -20°C. Au moment de l'utilisation, des molécules de α -dCTP-32 sont incorporées par « random priming » à l'aide du kit de marquage « Ready to go™ DNA Labelling Beads(-dCTP) » (Pharmacia Biotech) et selon le protocole conseillé par le fournisseur. La réaction de marquage comprend une dénaturation de l'ADN, puis une réaction de polymérisation grâce à la polymérase de Klenow et des amorces de séquences aléatoires qui permet l'incorporation de α -dCTP-32.

3.2.4. Hybridation et révélation des marqueurs RFLP

Quel que soit le système de marquage utilisé le principe d'hybridation des sondes est identique. La membrane est préhybridée pour saturer les sites de fixation non spécifiques puis hybridée une nuit avec la sonde. Des lavages de différentes stringences permettent d'éliminer la sonde fixée de manière aspécifique. Puis le signal est révélé, directement en sonde radioactive, ou en plusieurs étapes pour la détection chimique.

a) Protocole d'hybridation et de révélation en marquage chimique

Le protocole d'hybridation et de révélation utilise les produits Boehringer Mannheim et se base sur le protocole conseillé par le fournisseur.

Les membranes sont préhybridées avec 20 ml de DigEasy™ par tube, dans un four à hybridation à axe rotatif, à 40 °C, pendant au minimum 1 h. Pendant ce temps, la sonde est dénaturée. Pour une sonde neuve, le produit d'amplification marqué à la digoxygénine est dénaturé 5 mn à 95°C sur thermocycleur, puis immédiatement refroidi dans de la glace. Pour une sonde recyclée, le mélange sonde/DigEasy™, récupéré à l'issue de l'hybridation précédente, est placé à 68°C pendant 30 mn.

Après l'étape de préhybridation, la sonde neuve est ajoutée au DigEasy™, ou le liquide de préhybridation est remplacé par le mélange sonde recyclée/DigEasy™. Les tubes sont incubés une nuit à 40°C. Les membranes sont ensuite lavées pour éliminer la sonde fixée aspécifiquement. Deux lavages de 5 mn avec une solution SSC 2 X, SDS 0,1% sont réalisés à température ambiante dans des bacs contenant 1 l de liquide. Puis deux lavages de 15 mn sont effectués à 65°C dans des tubes contenant 30 ml d'une solution SSC 0,5 X, SDS 0,1%.

Afin de révéler le signal, un anticorps dirigé contre la digoxygénine et couplé à la phosphatase alcaline est utilisé. Toutes les étapes suivantes se déroulent à température ambiante. Tout d'abord, les membranes sont équilibrées dans du tampon 1 (Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M ; NaCl 0,15 M) par deux bains

de 5 mn en bacs. Les membranes sont saturées avec de l'agent bloquant (1% dilué dans du tampon 1) lors d'une incubation de 30 mn en tubes contenant 20 ml de solution. L'anticorps anti-digoxygénine couplé est ensuite ajouté à la solution à raison de 2 μ l/tube. Après 30 mn, l'anticorps non fixé est éliminé grâce à quatre bains de 5 mn en bacs avec du lavage 3 (tampon 1 ; SDS 0,1%). Puis les membranes sont rincées par quatre bains de 5 mn dans du tampon 1. Elles sont ensuite équilibrées 5 mn dans du tampon 3 (Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5 ; NaCl 0,1 M ; MgCl₂ 0,05 M) et incubées 10 mn en tube avec du CDPstarTM (1/500 dilué dans du tampon 3). Les membranes sont enfin enveloppées dans du Saran-Wrap et disposées dans des cassettes. Les films autoradiographiques sont exposés une ou deux heures puis révélés.

b) Protocole d'hybridation et de révélation en marquage radioactif

Les membranes sont préhybridées en tubes avec 20 ml de solution de préhybridation (Tris 50 mM ; EDTA 10 mM ; SSC 5 X ; Denhart 1 X ; SDS 0,2% ; 0,1 mg/l d'ADN de sperme de hareng dénaturé 10 mn au bain marie bouillant). Les tubes sont incubés 5 h au four à hybridation à 65°C.

A la fin du temps de préhybridation des membranes, les sondes sont dénaturées 10 mn à 100 °C puis plongées dans la glace pour éviter la renaturation. Les sondes sont ensuite mélangées à la solution de préhybridation et les tubes sont incubés dans le four à hybridation, à 65°C. Après une nuit, la sonde fixée de manière aspécifique est éliminée par plusieurs lavages (SSC 0,5 X ; SDS 0,1%). Quatre lavages de 5 mn sont effectués avec 20 ml de solution, à température ambiante, et deux lavages de 30 mn sont effectués avec 80 ml de solution à 65°C.

Les membranes sont ensuite enveloppées dans du Saran-Wrap, mises en cassettes de plomb et conservées à -80°C. Les films autoradiographiques sont révélés après une semaine d'exposition environ.

3.2.5. Déshybridation et conservation des membranes

Les membranes peuvent être utilisées sept ou huit fois en moyenne. Entre chaque utilisation, la sonde, marquée radioactivement ou avec la digoxygénine, est décrochée par une étape de déshybridation. Les membranes sont plongées dans une solution de SDS 0,1% à 80°C pendant 30 mn. Elles sont ensuite rincées dans une solution de SSC 2X et conservées à 4°C dans une solution de SSC 2 X contenant de l'azide de sodium.

3.3. Marqueurs RAPD

3.3.1. Principe

Le principe des marqueurs RAPD consiste à amplifier des fragments d'ADN à partir d'amorces de séquence arbitraire de dix paires de bases (Williams *et al.*, 1990). Si deux amorces s'hybrident sur

des sites suffisamment proches, le fragment d'ADN compris entre les deux sites d'hybridation sera amplifié. La mise en évidence des fragments amplifiés est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose. Le polymorphisme est en général un polymorphisme d'absence/présence d'une bande.

3.3.2. Protocole d'amplification

Le milieu réactionnel, de 25 µl, est constitué d'environ 5 ng d'ADN, de 150 µM de chaque nucléotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), de 0,5 unité de Taq polymérase (Appligène), de tampon 1X (Appligène) et de 0,2 ou 0,4 µM d'amorces (Opéron ou Eurogentec). Le programme d'amplification est le suivant : une dénaturation préliminaire de 4 mn à 95 °C, trois cycles comprenant une dénaturation de 1 mn à 95°C, une hybridation de 1 mn à 35°C et une élongation de 2 mn à 72°C, 43 cycles comprenant une dénaturation de 1 mn à 93°C, une hybridation de 1 mn à 35°C et une élongation de 2 mn à 72°C, et enfin une étape de terminaison des élongations de 6 mn à 72°C.

L'amplification terminée, 3 µl de bleu sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange est déposé sur un gel d'agarose à 1,8%. La migration s'effectue dans du tampon TBE 1X, à environ 90 V. Après une migration de 10 cm environ, le gel est coloré 20 mn au bromure d'éthidium et observé sous éclairage ultra-violet après rinçage.

3.3.3. Isolement d'un fragment pour réaliser une sonde RFLP

En raison du manque de reproductibilité de la méthode RAPD, nous avons transformé un marqueur RAPD, cartographié dans une région du génome particulièrement intéressante pour notre étude, en sonde RFLP. Pour cela, la bande amplifiée a été découpée à partir du gel d'agarose. Puis le fragment d'agarose a été déposé sur un gel « low-melting » et après migration, l'isolement de la sonde et le marquage radioactif ou chimique ont été effectués comme pour les autres sondes.

4. ANALYSE DE DONNEES

4.1. Analyse descriptive du phénotype

Les analyses descriptives des caractères (moyennes, variances, corrélations) ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica (V5.0). La normalité des distributions a été testée avec le test W de Shapiro et Wilk ; la normalité a été rejetée au seuil $p < 0,05$. L'héritabilité des différentes variables a été calculée à partir de la relation :

$$h^2 = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + \sigma^2_e / n)$$

où σ^2_G et σ^2_e sont respectivement les variances génotypiques et environnementales et n le nombre de répétitions. Cependant, dans notre dispositif expérimental, les lignées n'ont pas pu être réparties de manière aléatoire et les héritabilités sont donc biaisées. Nous les avons estimées pour donner une

approximation des héritabilités réelles mais, afin de distinguer ces estimations des héritabilités réelles, nous les avons notées avec un signe « * ».

Des comparaisons de moyennes ont été effectuées à l'aide de différents tests afin de comparer soit des expérimentations, soit des groupes de plantes. Ces analyses ont été effectuées sur le logiciel Statistica (V5.0) par analyse de variance ou à l'aide de tests non paramétriques lorsque l'effectif était faible ou que les conditions d'utilisation de l'analyse de variance n'étaient pas respectées. Les tests de Mann-Whitney et de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer respectivement deux et plusieurs moyennes.

4.2. Cartographie génétique

A partir de la caractérisation des individus d'une descendance en ségrégation avec un grand nombre de marqueurs moléculaires, il est possible d'établir la carte génétique de la population. La cartographie des marqueurs est généralement réalisée à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance sur des logiciels informatiques dont le plus utilisé est Mapmaker (Lander *et al.*, 1987). Dans une première étape, les groupes de liaison sont constitués en recherchant les marqueurs liés deux à deux à l'aide du LOD score, logarithme décimal du rapport des vraisemblances de deux hypothèses : l'hypothèse de liaison entre deux marqueurs et l'hypothèse d'indépendance entre ces marqueurs. Théoriquement, il y a autant de groupes de liaison que de chromosomes. Dans un deuxième temps, les marqueurs sont ordonnés les uns par rapport aux autres au sein de chaque groupe de liaison à l'aide d'analyses multipoints. Enfin, les distances entre les marqueurs, exprimées en centimorgans, sont déterminées à partir des taux de recombinaison. Nous avons calculé les distances à partir de la fonction de Kosambi qui prend en compte la présence de doubles recombinaisons et l'existence d'interférences limitant les recombinaisons dans deux intervalles adjacents.

Huang *et al.* (1997b) ont établi une carte génétique de la population IR64/Azucena à partir 135 lignées HD caractérisées pour 180 marqueurs. Les groupes de liaison et l'ordre entre les marqueurs RFLP ont été établis avec un LOD score supérieur à 5 et un taux de recombinaison inférieur à 0,4. L'orientation de la carte est basée sur l'orientation déterminée par Singh *et al.* (1996) avec le bras court des chromosomes vers le haut. Au cours de ce travail, les nouveaux marqueurs ont été attribués aux différents groupes de liaison, à l'aide du logiciel Mapmaker 3.0, avec un LOD score supérieur à 3 et un taux de recombinaison inférieur à 0,4. Lorsque peu de marqueurs nouveaux ont été ajoutés sur un chromosome, ils ont été cartographiés sur la carte déjà disponible. Lorsqu'un grand nombre de marqueurs ont été ajoutés, la carte du chromosome a été entièrement reconstruite.

Les lignées HD de la population HD IRAT177/Apura ont été caractérisées pour 180 marqueurs à l'Université Cornell (McCouch, 1990) et environ dix marqueurs au cours de ce travail. Il n'a pas toujours été possible de définir les groupes de liaison avec un LOD score supérieur à 3 et un taux de

recombinaison inférieur à 0,4. Seuls les marqueurs cartographiés dans le croisement interspécifique (Causse *et al.*, 1994) ou le croisement IR64 x Azucena ont été utilisés et attribués aux différents chromosomes en fonction de ces cartes de référence. Les marqueurs liés ont été ordonnés en utilisant Mapmaker 3.0 et les marqueurs non liés à l'aide de la carte interspécifique ou de la carte de la population IR64/Azucena.

4.3. Recherche de QTL

Plusieurs méthodes et plusieurs logiciels ont été utilisés pour cartographier des QTL dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura.

Tout d'abord, la liaison entre un marqueur et un caractère a été recherchée à l'aide de la méthode d'analyse de variance ou du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Ces méthodes consistent à comparer les moyennes phénotypiques des deux classes d'individus pour chaque marqueur (génotype AA et génotype aa). Des moyennes significativement différentes permettent de conclure qu'un QTL en ségrégation se trouve au voisinage du marqueur considéré. Les analyses de variance ont été réalisées sur le logiciel SAS (procédure GLM, type III) et le test de Kruskal-Wallis sur le logiciel MapQTL 2.4 (van Ooijen, 1992). Ces analyses ont été utilisées dans une première approche et ne seront exploitées que dans quelques cas particuliers. En raison du nombre important d'analyses effectuées (environ 200 marqueurs sur la carte de la population IR64/Azucena), un seuil $p < 0,05$ pour déclarer un marqueur significatif conduirait à retenir un nombre important de faux positifs. Pour cette raison des seuils beaucoup plus sévères sont généralement utilisés. Au cours de cette étude, nous avons retenu les QTL au seuil $p < 0,001$.

La majorité des analyses qui seront présentées ont été réalisées sur le logiciel Mapmaker/QTL à l'aide de la méthode de cartographie d'intervalle par le maximum de vraisemblance (Lincoln *et al.*, 1993). Cette méthode estime le logarithme du rapport des vraisemblances de la présence et de l'absence d'un QTL en un point donné du génome. Les QTL ont été retenus au seuil $LOD > 2,6$, ce qui correspond approximativement à un risque global de première espèce $p < 0,05$ pour une longueur de carte et un intervalle moyen entre marqueurs tels que ceux obtenus sur la population IR64/Azucena (Lander et Botstein, 1989). Nous avons procédé en plusieurs étapes :

- dans un premier temps, les QTL détectés avec un LOD score supérieur ou égal à 2,6 ont été retenus ; le modèle global incluant tous les QTL détectés de cette manière a conduit à un LOD score de valeur « LOD_1 » ;
- dans un deuxième temps, ces QTL ont été fixés afin d'augmenter la puissance de détection et une nouvelle recherche de QTL a été conduite : de nouveaux QTL ont été retenus avec un LOD score supérieur ou égal à $(LOD_1 + 2,6)$;

- dans un troisième temps, nous avons validé les QTL en vérifiant que chaque QTL permettait d'augmenter le LOD score obtenu avec le modèle multi-QTL d'une valeur minimale de 2 par rapport au LOD score obtenu sans ce QTL.

Le logiciel MQTL a également été utilisé (Tinker et Mather, 1995). Ce logiciel utilise la cartographie d'intervalle avec cofacteurs (« composite interval mapping ») ou sans cofacteurs (« simple interval mapping ») et les méthodes de régression linéaire initialement développées par Haley et Knott (1992). Nous avons utilisé la méthode de « composite interval mapping » afin de préciser la localisation de certains QTL. Afin d'étudier la localisation d'un QTL sur le chromosome 1, par exemple, nous avons sélectionné comme cofacteurs les marqueurs liés aux QTL détectés sur les autres chromosomes et des marqueurs régulièrement répartis sur le chromosome 1. Nous avons comparé les résultats obtenus avec cofacteurs et sans cofacteurs sur le chromosome analysé. En « simple interval mapping », la valeur du test statistique (TS) utilisé par MQTL est proportionnelle au LOD score estimé par Mapmaker/QTL :

$$\text{LOD score} = \text{TS} / (2 \times \ln(10)) = 0,22 \times \text{TS}$$

Enfin, des interactions entre marqueurs ont été recherchées. Nous avons utilisé pour cela le modèle d'analyse de variance à deux facteurs, avec interaction, du logiciel SAS (procédure GLM, type III).

CHAPITRE III

EVALUATION DE LA RESISTANCE AU RYMV

CHAPITRE III :

EVALUATION DE LA RESISTANCE AU RYMV

1. RESISTANCE ET DIVERSITE GENETIQUE

Sur la base de la diversité génétique (Glaszmann, 1987) et de l'adaptation à différentes conditions de culture, il est possible de distinguer au sein de l'espèce *O. sativa* différents groupes de variétés dont les groupes *indica* (groupe iso-enzymatique I), *japonica* pluvial et *japonica* tempéré (groupe VI) qui regroupent la majorité des variétés. Par ailleurs, la recherche de variétés résistantes au RYMV a mis en évidence que des sources de résistance partielle étaient préférentiellement trouvées dans le groupe *japonica* pluvial (Rasaonary, 1990 ; Awoderu, 1991 ; Thottapilly et Rossel, 1993). Nous avons voulu, au cours de cette étude, confirmer et préciser le niveau de résistance au RYMV de différents groupes de variétés afin de mieux comprendre les bases génétiques de la résistance.

Pour cela, une collection de variétés a été constituée à partir de variétés évaluées sur la base de marqueurs iso-enzymatiques (Glaszmann, 1987) et/ou RFLP (Second et Ghesquière, 1995). Cette collection comporte essentiellement des variétés des groupes *indica*, *japonica* pluvial et *japonica* tempéré ainsi que quelques variétés des groupes iso-enzymatiques II et V. Le niveau de résistance a été étudié à l'aide de trois critères : l'évolution des symptômes au cours du temps (AUSPC) et le contenu en virus une semaine (ELISA1) et trois semaines (ELISA2) après inoculation. Ces critères de résistance ont été estimés au cours de deux expérimentations réalisées en conditions contrôlées. Chaque caractère a été estimé par deux répétitions par lignée, incluses dans une expérimentation. Des variétés témoins présentes dans les deux expérimentations ont permis de tester et éventuellement de corriger l'effet « expérimentation ».

1.1. Validation des méthodes utilisées pour estimer le niveau de résistance

Les trois méthodes d'évaluation de la résistance donnent des résultats répétables et cohérents. Les héritabilités sont élevées quelle que soit la méthode d'évaluation de la résistance. Au sein d'une expérimentation et sur la base de toutes les variétés testées, la part de variance expliquée par le génotype est d'environ 80% pour les trois critères de résistance. Entre les deux expérimentations et sur la base des variétés témoins répétées dans les deux expérimentations, la part de variance expliquée par le génotype est d'environ 60%.

Tableau 3.1. Symptômes (AUSPC) et contenu en virus (ELISA1 et ELISA2) dans les groupes de variétés *indica*, *japonica* tempérées et *japonica* pluviales et les groupes iso-enzymatiques II et V. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$), d'après le test de Mann-Whitney.

Groupe génétique	Effectif	AUSPC	ELISA1	ELISA2
<i>Japonica</i> pluvial (VI)	33	194 ^a	-1,05 ^a	-1,05 ^a
<i>Japonica</i> tempéré (VI)	24	213 ^b	-0,18 ^b	-0,30 ^b
<i>Indica</i> (I)	50	248 ^c	0,44 ^c	0,57 ^c
Groupe iso-enzymatique V	9	227 ^b	1,00 ^d	0,41 ^c
Groupe iso-enzymatique II	11	252 ^c	0,84 ^c	0,86 ^c

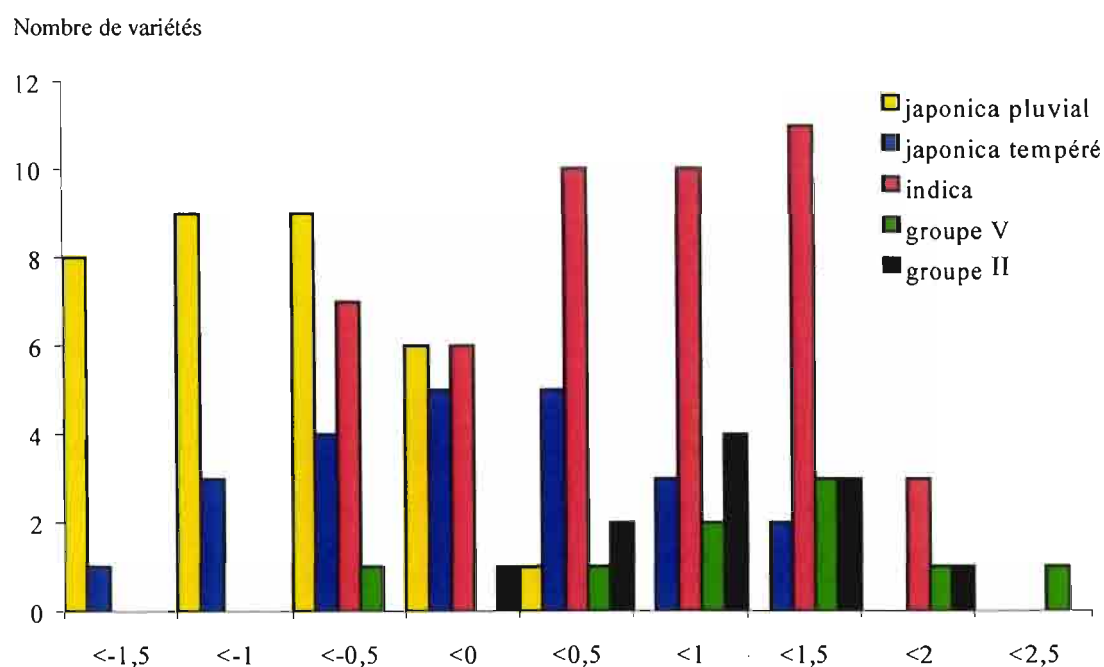


Figure 3.1. Distribution du contenu en virus une semaine après inoculation (ELISA1) au sein des variétés des groupes *indica*, *japonica* tempéré, *japonica* pluvial et des groupes iso-enzymatiques II et V.

Les résultats obtenus avec les différentes méthodes sont corrélés : les coefficients de corrélation entre les variables AUSPC, ELISA1 et ELISA2 sont compris entre 0,65 et 0,72. Les variétés les plus résistantes ont à la fois des symptômes plus faibles et un contenu en virus moins élevé aux deux stades de mesure. Ces résultats d'une part valident les méthodes utilisées pour évaluer la résistance en conditions contrôlées, d'autre part précisent la nature de la relation entre les symptômes et le contenu en virus : des symptômes peu intenses sont généralement liés à un contenu en virus peu élevé et donc à de la résistance vraie et non pas à de la tolérance. La tolérance s'exprimerait par des symptômes peu intenses dans des variétés multipliant beaucoup le virus.

1.2. Relation entre le groupe génétique et le niveau de résistance

L'effet du groupe génétique sur le niveau de résistance a été testé par analyse de variance et, en raison d'effectifs déséquilibrés entre les groupes de variétés, il a été confirmé par le test non paramétrique de Kruskal et Wallis. Cinq groupes de variétés ont été considérés : *indica*, *japonica* pluvial, *japonica* tempéré, groupe iso-enzymatique II et groupe iso-enzymatique V. Malgré une variabilité importante du niveau de résistance intra-groupe (Fig. 3.1.), l'effet du groupe génétique est hautement significatif ($p < 0,001$) pour les trois critères de résistance.

Nous avons étudié les différences deux à deux entre les groupes de variétés à l'aide du test paramétrique de Newman et Keuls et du test non paramétrique de Mann-Whitney. Les deux méthodes donnent des résultats identiques pour les groupes *indica*, *japonica* pluvial et *japonica* tempéré. En revanche, de légères différences ont été obtenues pour les tests impliquant les groupes iso-enzymatiques II et V ; en raison du faible nombre de variétés dans ces deux groupes, nous avons choisi de présenter les résultats obtenus avec la méthode non paramétrique (Tab 3.1.). Pour les trois critères de résistance utilisés, les groupes *indica*, *japonica* pluvial et *japonica* tempéré sont significativement différents ($p < 0,05$) : les variétés de type *japonica* pluvial sont les plus résistantes, les variétés *indica* sont les plus sensibles et les variétés *japonica* tempérées ont une résistance intermédiaire (Tab 3.1., Fig. 3.1.). Les variétés du groupe iso-enzymatique II ne sont pas significativement différentes des variétés *indica*, quel que soit le critère de résistance considéré. Les variétés du groupe V ont un niveau de résistance comparable à celui des variétés tempérées sur la base des symptômes mais non différent de celui des variétés *indica* sur la base des tests ELISA.

Sur l'ensemble des variétés testées, le contenu en virus trois semaines après inoculation (ELISA2) est corrélé au contenu en virus une semaine après inoculation (ELISA1). Cependant, lorsqu'on étudie séparément les trois principaux groupes génétiques, on constate que l'évolution du contenu en virus est différente d'un groupe à l'autre (Fig. 3.2.). Le coefficient de corrélation entre les valeurs obtenues avec les deux tests ELISA est significatif pour les variétés pluviales ($r = 0,78$; $p < 0,001$), et les variétés tempérées ($r = 0,53$; $p = 0,009$) et non significatif pour les variétés *indica* ($r = 0,25$; $p = 0,25$). Cette observation correspond probablement à une stabilisation du contenu en virus.

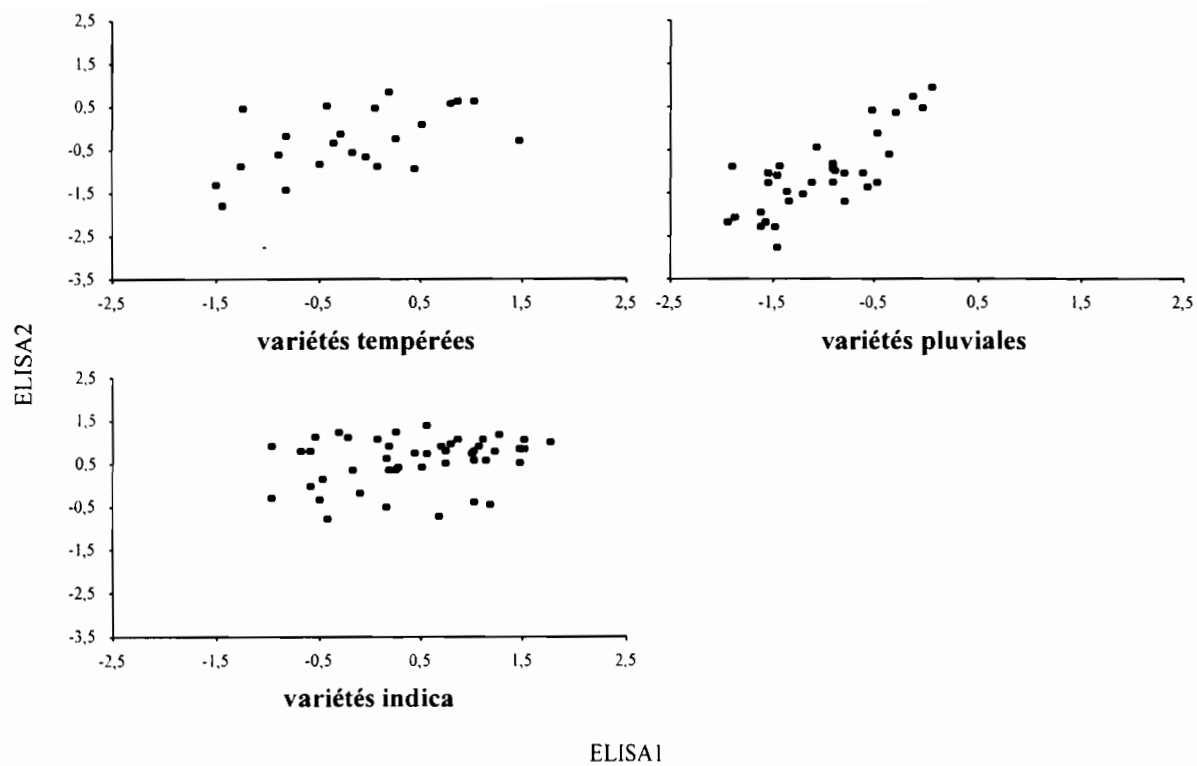


Figure 3.2. Corrélations entre le contenu en virus une semaine après inoculation (ELISA1) et le contenu en virus trois semaines après inoculation (ELISA2) dans les trois principaux groupes variétaux. La corrélation est significative dans le groupe *japonica* pluvial (coefficient de corrélation $r=0,78$, $p<0,001$) et le groupe *japonica* tempéré ($r=0,53$, $p=0,009$) et non significative dans le groupe *indica* ($r=0,25$, $p=0,25$).

Une gamme étalon de virus purifié sur les plaques ELISA a permis de vérifier que ce seuil n'était pas un artefact lié à une saturation du test ELISA, mais bien une stabilisation de l'accumulation virale dans la plante. Ainsi, lors du deuxième test ELISA, ce plateau est atteint chez les variétés les plus sensibles, les variétés *indica* et certaines variétés *japonica* tempérées. En revanche, le contenu en virus continue probablement à augmenter chez les variétés les plus résistantes.

1.3. Conclusion

Cette étude nous a permis de préciser la relation entre la diversité génétique et le niveau de résistance au RYMV. Conformément aux observations antérieures (Rasaonary, 1990 ; Awoderu, 1991 ; Thottapilly et Rossel, 1993), les variétés *japonica* pluviales sont apparues les plus résistantes ; en outre, nous avons mis en évidence des différences entre les variétés *japonica* tempérées et les variétés *indica*, les plus sensibles. Malgré ces différences entre les groupes génétiques, une forte variabilité intra-groupe est constatée. Ces observations suggèrent qu'une composante majeure de la résistance est présente uniquement dans certains groupes génétiques, tandis qu'une composante mineure est présente chez certaines variétés indépendamment du groupe génétique. En raison des importantes différences de niveau de résistance entre les variétés *indica* et les variétés *japonica* pluviales, un croisement de type *indica* x *japonica* pluvial est sans doute le mieux adapté pour caractériser les bases génétiques de la résistance partielle au RYMV chez *O. sativa*.

Par ailleurs, ces résultats suggèrent que la résistance partielle du riz au RYMV ne résulte pas d'une adaptation de la plante au RYMV puisque les variétés *japonica* pluviales résistantes sont cultivées traditionnellement en Afrique comme en Asie où le RYMV est absent. Ce sont des caractères agro-morphologiques qui ont initialement permis de différencier les variétés *indica* des variétés *japonica*, et au sein de ces dernières, les variétés tempérées des variétés pluviales (Matsuo, 1952 ; Oka, 1958). Il est donc probable que ces différences de morphologie et d'adaptation à différents milieux de culture soient impliquées dans la résistance au RYMV. Dans la suite de ce travail, nous nous efforcerons donc de préciser l'impact de la morphologie sur le niveau de résistance.

2. LA RESISTANCE DANS DEUX POPULATIONS *INDICA* X *JAPONICA*

Afin d'étudier les bases génétiques de la résistance et de cartographier des QTL de résistance, nous avons évalué la résistance de deux populations de lignées HD issues de croisements entre une variété *indica* et une variété *japonica* pluviale : IR64 x Azucena et IRAT177 x Apura. D'une part, les symptômes et l'impact de la maladie sur des caractères agro-morphologiques (ultérieurement désigné par le terme « résistance au champ ») ont été notés dans la population IR64/Azucena cultivée au champ. D'autre part, l'accumulation du virus dans les plantes a été estimée dans des plantes cultivées au champ (population IR64/Azucena) ou en conditions contrôlées (populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura).

Tableau 3.2. Caractéristiques des variables agro-morphologiques observées dans la population IR64/Azucena sur des plantes saines cultivées au champ, au Mali. La probabilité (p) que la distribution de chaque caractère soit normale a été évaluée à l'aide du test W de Shapiro-Wilks ; h^2* est l'héritabilité.

Caractère		Moyenne	Ecart type	h^2*	Normalité (p)
Hauteur à 8 semaines (cm)	H8c	56	8	0,81	0,461
Hauteur à maturité (cm)	HMc	86	16	0,88	0,005
Nombre de talles à 8 semaines	T8c	10,0	3,0	0,70	0,047
Nombre de talles fertiles	TMc	4,6	1,52	0,45	0,281
Durée du cycle semis-épiaison(jours)	SEc	94	8	0,91	0,229
Poids des grains (g/plante)	PGc	5,0	2,6	0,56	0,001

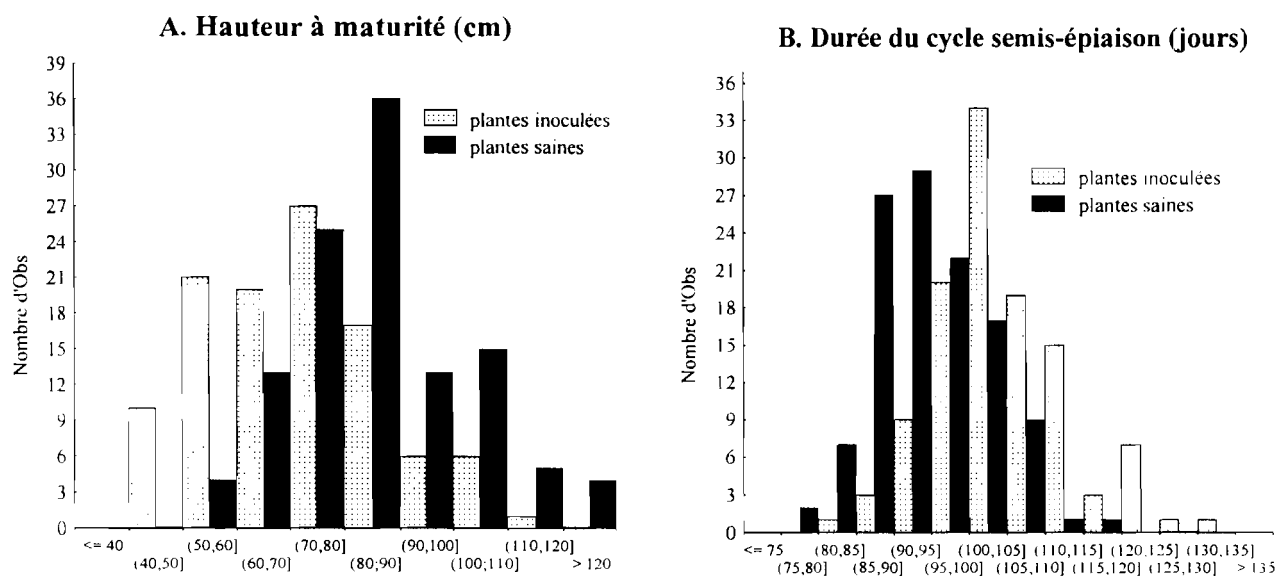


Figure 3.3. Distribution de la hauteur à maturité, HMc (A), et de la durée du cycle semis-épiaison, SEc (B), dans la population IR64/Azucena. HMc et SEc ont été mesurés sur les plantes saines et les plantes inoculées, lors d'un essai réalisé au champ au Mali. Les distributions suggèrent un déterminisme polygénique des différents caractères. Par ailleurs, l'infection par le RYMV est responsable d'une taille réduite de 12 cm et d'un retard d'épiaison de 10 jours, en moyenne.

Les résultats obtenus précédemment sur la collection de variétés suggérant une relation entre la résistance et la morphologie, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la morphologie des plantes saines de la descendance IR64/Azucena.

2.1. La morphologie dans la population IR64/Azucena

Au cours d'une expérimentation réalisée au champ, au Mali, six caractères agro-morphologiques ont été analysés sur 115 lignées HD non-inoculées de la population IR64/Azucena :

- la hauteur huit semaines après semis (H8c) et à maturité (HMc),
- le tallage huit semaines après semis (T8c) et le tallage fertile (TMc)
- la durée du cycle semis-épiaison (SEc),
- le poids des grains pleins (PGc).

Les principales caractéristiques de ces variables (moyenne, écart-type, héritabilité et normalité au sein de la descendance) sont récapitulées dans le tableau 3.2..

Une importante variabilité est observée au sein des lignées HD pour les différents caractères. Cette variabilité reflète les importantes différences agro-morphologiques, notamment de hauteur, de tallage et de durée du cycle, observées entre les parents, IR64 (*indica*) et Azucena (*japonica* pluvial). La variation observée pour le poids des grains dépend à la fois du poids de chaque grain et du nombre de grains pleins qui est lié au niveau de stérilité, fréquemment élevé dans des descendance *indica* x *japonica*. Dans notre étude, malgré un fort taux de stérilité observé en serre sur certaines lignées de cette population, la stérilité au champ a été réduite par les inter-croisements et toutes les lignées sont au moins partiellement fertiles.

La normalité des distributions a été testée à l'aide du test W de Shapiro-Wilks. Les distributions de H8c, TMc et SEc ne sont pas différentes de distributions normales (au seuil $p < 0,05$) et les distributions de HMc et T8c peuvent être normalisées par une transformation logarithmique (Fig. 3.3.). La distribution de PGc n'est pas normale, ni directement ni après transformation logarithmique, mais elle est cependant continue. Ces distributions suggèrent un déterminisme polygénique des caractères correspondants. En particulier, bien qu'un gène de semi-nanisme, *sd-1*, apporté par le parent IR64, soit en ségrégation dans cette population, la distribution de la hauteur à maturité indique la présence de gènes ou QTL mineurs expliquant probablement une part importante de la variabilité.

Nous avons estimé les héritabilités des différents caractères (h^2 *) malgré un dispositif susceptible d'entraîner un biais dans ces estimations. Ces héritabilités sont généralement élevées ($h^2 \geq 0,7$) pour quatre des six caractères étudiés. En revanche, TMc et PGc ont des héritabilités plus faibles ($h^2 \leq 0,56$) que les autres caractères, probablement en raison d'une forte influence de l'environnement sur ces deux composantes du rendement.

Tableau 3.3. Corrélations phénotypiques entre les différents caractères agro-morphologiques mesurés sur les plantes saines de la population IR64/Azucena. Les corrélations significatives sont indiquées par * ($p < 0,05$) ou ** ($p < 0,01$).

Caractère		H8c	HMc	T8c	TMc	SEc
Hauteur à maturité	HMc	0,66**				
Tallage à 8 semaines	T8c	0,05	-0,15			
Tallage fertile	TMc	0,04	-0,28**	0,70**		
Durée du cycle	SEc	-0,21*	0,31**	-0,21*	-0,43**	
Poids des grains	PGc	0,37**	0,27**	0,32**	0,47**	-0,08

Les corrélations phénotypiques entre les différents caractères agro-morphologiques ont été calculées. Des corrélations significatives (au seuil $p < 0,05$) sont observées entre différentes variables (Tab. 3.3.). En particulier, les corrélations entre les deux mesures de hauteur ($r=0,66$) et les deux mesures de tallage ($r=0,7$) sont particulièrement élevées. Par ailleurs, les différents caractères observés à maturité sont corrélés : un tallage important est associé à une petite taille et un cycle semis-épiaison court. Le sens de ces corrélations est conforme à celui attendu si l'on suppose que ces caractères ne sont pas génétiquement indépendants : Azucena est une variété de grande taille, qui talle peu et dont le cycle est plus long que celui de IR64, une variété semi-naine qui talle beaucoup.

2.2. La résistance au champ et les symptômes dans la population IR64/Azucena

En parallèle des mesures réalisées sur plantes saines, les différents caractères agro-morphologiques ont été mesurés sur des plantes infectées mécaniquement par le RYMV et les symptômes ont été observés huit semaines après semis (S2).

Le niveau d'expression des symptômes observés au Mali indique que l'infection a été peu sévère : certaines lignées n'ont pas exprimé de symptômes (note 1) et aucune lignée ne présente une note moyenne de 9, qui correspondrait à des plantes mortes ou très sévèrement nécrosées. L'effet de la maladie est cependant nettement visible sur les caractères agro-morphologiques : les plantes inoculées sont plus petites et tallent moins que les témoins sains, ont un cycle semis-épiaison plus long et un rendement inférieur. Par exemple, la maladie induit, en moyenne, un retard d'épiaison de dix jours et les plantes inoculées mesurent, en moyenne, 12 cm de moins que les plantes saines (Fig. 3.3.). L'effet de la virose a été testé sur chacun des caractères mesurés en comparant les valeurs obtenues sur plantes saines et les valeurs obtenues sur plantes inoculées par analyse de variance à deux facteurs (lignées, inoculation). L'impact de la maladie apparaît très hautement significatif ($p < 0,001$) sur tous les caractères excepté le tallage à maturité ; pour ce caractère, l'impact de la maladie n'est significatif qu'avec la probabilité $p=0,03$.

Par la suite, l'impact de l'infection virale sur les caractères agro-morphologiques sera exprimé par le rapport entre les performances obtenues sur plantes saines et les performances obtenues sur plantes inoculées pour chacun des caractères. Ainsi, la « résistance au champ » sera estimée par les variables :

- impact de la virose sur la hauteur huit semaines après semis (H8r) et à maturité (HMr),
- impact de la virose sur le tallage huit semaines après semis (T8r) et le tallage fertile (TMr)
- impact de la virose sur la durée du cycle semis-épiaison (SEr),
- impact de la virose sur le poids des grains pleins (PGr).

En moyenne, H8r, HMr, T8r, TMr et PGr sont inférieurs à 1 puisque la maladie est responsable d'une croissance réduite et d'une perte de rendement et SEr est supérieur à 1 puisque la maladie induit

Tableau 3.4. Caractéristiques des estimateurs de la résistance au champ et des symptômes, dans la population IR64/Azucena. La probabilité (p) que la distribution soit normale a été estimée à l'aide du test W de Shapiro-Wilks.

Caractère		Moyenne	Ecart type	h ² *	p
Impact du RYMV sur :					
la hauteur à 8 semaines	H8r	0,84	0,08	0,37	0,232
la hauteur à maturité	HMr	0,82	0,09	0,57	0,396
le tallage à 8 semaines	T8r	0,70	0,19	0,19	0,106
le tallage fertile	TMr	0,93	0,43	0,31	0,181
la durée du cycle	SEr	1,11	0,07	0,62	0,443
le poids des grains	PGr	0,40	0,39	0,47	0,411
Symptômes	S2	3,7	1,3	0,48	0,50

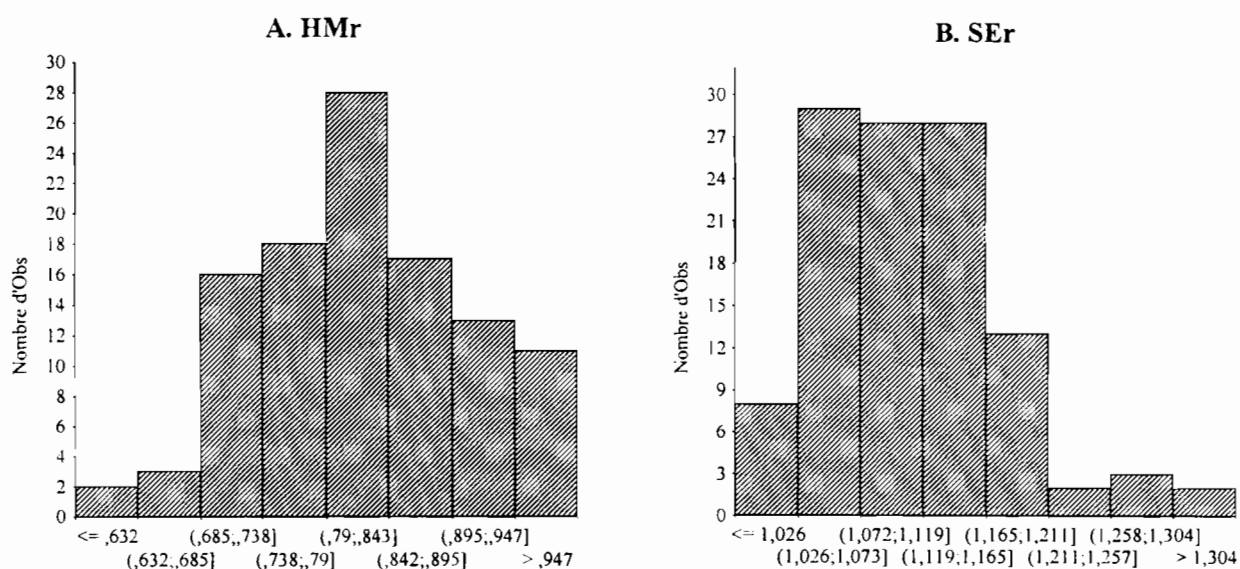


Figure 3.4. Distribution de l'impact de l'infection sur la hauteur (HMr) et sur la durée du cycle semis-épiaison (SEr) dans la population IR64/Azucena. HMr et SEr ont été estimés lors d'un essai réalisé au champ, au Mali. Ces distributions suggèrent un déterminisme polygénique des deux caractères.

un retard d'épiaison. Le tableau 3.4. résume les caractéristiques des estimateurs de la résistance au champ et des symptômes (S2).

Les estimateurs de la résistance au champ présentent des héritabilités plus faibles que les caractères agro-morphologiques correspondants, mesurés sur plantes saines. Les héritabilités sont cependant assez élevées pour l'impact de la maladie sur la hauteur et la durée du cycle et pour les symptômes ($0,37 \leq h^2 \leq 0,62$), mais les héritabilités sont plus faibles pour l'impact de la maladie sur le tallage ($h^2 = 0,19$ pour T8r et $h^2 = 0,31$ pour TMr). Pour environ 45% des lignées, le tallage moyen des plantes inoculées est supérieur au tallage moyen des plantes saines. Sur quelques lignées concernées, un test non paramétrique de Mann-Whitney a été réalisé pour voir si cette différence de tallage était significative. Cette augmentation s'est généralement avérée non significative. Probablement, un effet peu important de la maladie sur le tallage fertile et une faible héritabilité de ce caractère sont responsables de cette observation.

Lorsqu'on compare l'effet de la maladie sur les différents caractères et les héritabilités des différents estimateurs de résistance, l'impact de la maladie sur la hauteur à maturité (HMr) et sur la durée du cycle (SEr) ainsi que les symptômes (S2) semblent être les meilleurs critères d'évaluation de la résistance au champ.

La normalité des distributions des différents caractères a été testée à l'aide du test W de Shapiro-Wilks ($p < 0,05$) : aucun caractère ne présente une distribution significativement différente d'une distribution normale (Fig. 3.4.). La résistance au champ et l'expression des symptômes sont donc probablement sous un contrôle polygénique.

2.3. Le contenu en virus estimé par test ELISA

2.3.1. Le contenu en virus dans les populations HD

Le contenu en virus dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura a été estimé au cours de trois types d'expérimentation :

- CV_0 et CV_0' représentent le contenu en virus estimé respectivement dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura avec un test ELISA, dit « précoce », sur des plantes cultivées en conditions contrôlées, inoculées dix jours après semis et testées une ou deux semaines plus tard ;
- CV_1 et CV_1' représentent le contenu en virus estimé dans les deux populations, avec un test ELISA, dit « tardif », sur des plantes cultivées en conditions contrôlées, inoculées trois semaines après semis et testées deux semaines plus tard ;
- CV_2 représente le contenu en virus dans la population IR64/Azucena, estimé 11 semaines après semis sur les plantes cultivées au champ.

Tableau 3.5. Héritabilité (h^2 *) du contenu en virus dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura et normalité des distributions. La probabilité (p) que la distribution soit normale a été estimée à l'aide du test W de Shapiro-Wilks.

Population	Test	Caractère	h^2 *	normalité (p)
IR64/Azucena	Précoce	CV_0	0,92	0,14
IRAT177/Apura	Précoce	CV_0'	0,91	0,18
IR64/Azucena	Tardif	CV_1	0,92	0,00
IRAT177/Apura	Tardif	CV_1'	-	0,04
IR64/Azucena	Champ	CV_2	0,60	0,86

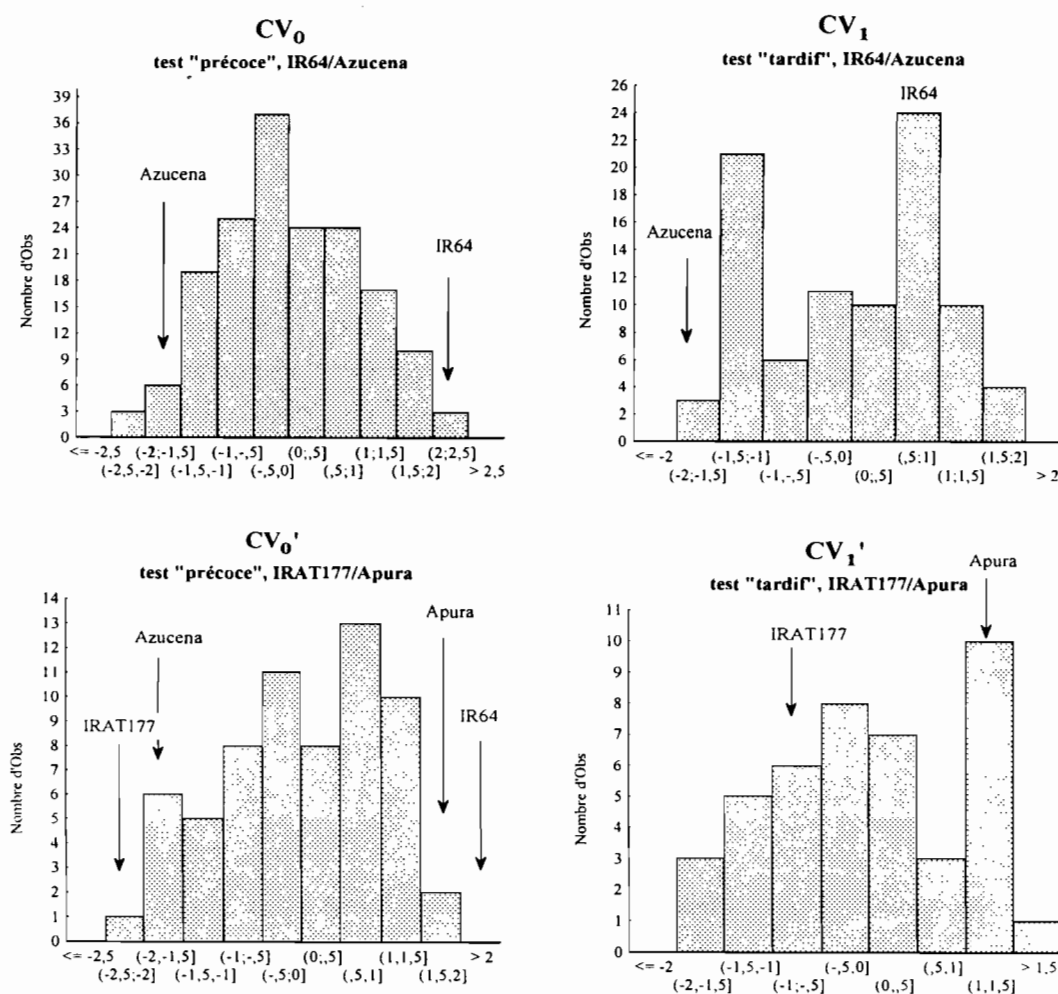


Figure 3.5. Distribution du contenu en virus dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura. Le contenu en virus a été estimé par test ELISA sur des plantes cultivées en conditions contrôlées, inoculées 10 jours après semis et testées une semaine plus tard (test « précoce »), ou inoculées trois semaines après semis et testées deux semaines plus tard (test « tardif »). Les distributions suggèrent un déterminisme polygénique du contenu en virus estimé avec le test « précoce » et la présence d'un QTL majeur expliquant le contenu en virus estimé avec le test « tardif ».

Au champ comme en conditions contrôlées, les tests ELISA indiquent que toutes les lignées HD multiplient le virus. Ceci confirme que la résistance des variétés Azucena et IRAT177 ne correspond pas à une immunité mais à une limitation ou un retard dans la progression de la maladie.

Les évaluations de contenu en virus sont plus héritables que les symptômes ou les estimateurs de la résistance au champ (Tab. 3.5.). En particulier, l'héritabilité du test « précoce », au sein d'une expérimentation, en conditions contrôlées est très élevée ($h^2 \sim 0,9$), sans doute grâce aux conditions homogènes et standardisées du milieu (température, photopériode, nature du substrat) et au plus grand nombre de plantes par répétition (10 à 15 plantes par répétition en conditions contrôlées contre 5 plantes au champ). Cette héritabilité ne représente cependant pas l'héritabilité réelle de la mesure sur l'ensemble de la population ; en effet, plusieurs expérimentations ont été mises en place et les deux répétitions d'une lignée ont été testées au sein d'une même expérimentation.

Les distributions du contenu en virus estimé avec le test ELISA « précoce » comme avec le test ELISA « tardif », sont similaires dans les deux populations (Tab. 3.5. et Fig. 3.5.). Les distributions de CV_0 , CV_0' et CV_2 ne sont pas différentes de distributions normales et suggèrent un déterminisme polygénique de la résistance. En revanche, des distributions bimodales sont observées pour les caractères CV_1 et CV_1' et suggèrent la présence d'un QTL majeur expliquant ce caractère et dont l'effet serait modulé par la présence de QTL mineurs. Par ailleurs, lors des tests réalisés en conditions contrôlées, les parents ont été inclus aux essais et leur niveau de résistance a été comparé à celui des lignées HD. Lors du test « précoce », les parents se situent aux extrêmes des distributions dans les deux populations, indiquant que les principaux facteurs génétiques de résistance sont apportés par les parents résistants Azucena et IRAT177. En revanche, les variables CV_1 et CV_1' estimées chez les variétés parentales et les lignées HD suggèrent que des facteurs de résistance expliquant ces variables pourraient être apportés par Apura et des facteurs de sensibilité par Azucena. Le contenu en virus semble donc être sous un contrôle génétique complexe, dépendant des conditions d'expérimentation.

La résistance s'avère plus élevée dans la population IRAT177/Apura que dans la population IR64/Azucena. Déjà, les tests préliminaires réalisés sur les parents (Chapitre II, §2.3.3.) avaient mis en évidence un niveau de résistance supérieur chez IRAT177 par rapport à Azucena et chez Apura par rapport à IR64. La distribution du contenu en virus lors du test « précoce » (CV_0 et CV_0') sur l'ensemble de la population IRAT177/Apura confirme ces résultats : plusieurs lignées sont plus résistantes que la variété Azucena, tandis qu'aucune lignée n'est aussi sensible que la variété IR64.

2.3.2. Le contenu en virus dans des descendance F1 et F2

Des tests ELISA ont été réalisés sur une descendance F1 et une descendance F2, issues respectivement des croisements Moroberekan x BG90-2 et IR64 x Azucena. Moroberekan est une variété *japonica* pluviale dont le niveau de résistance est très proche de celui d'Azucena et BG90-2 est

Tableau 3.6. Evaluation du contenu en virus dans des descendance F1 et F2. Ces descendance sont issues de croisements entre une variété *indica* (IR64 ou BG90-2) et une variété *japonica* pluviale (Azucena ou Moroberekan). La résistance est estimée par le logarithme népérien de la densité optique obtenue avec le test ELISA « précoce ». Des valeurs homogènes sont suivies d'une même lettre a, b ou c. Le niveau de résistance des plantes F1 et F2 suggère que la résistance s'hérîte de manière dominante ou additive.

Plantes	ln (DO)
Azucena	0,087 ^a
IR64	0,922 ^c
F1 (BG90-2 x Moroberekan)	0,140 ^b
F2 (IR64 x Azucena)	0,246 ^b

Tableau 3.7. Corrélations entre les différents critères de résistance estimés au champ et en conditions contrôlées dans la population IR64/Azucena. Les corrélations ont été calculées à partir des estimateurs de résistance ou de leur opposé, de telle sorte qu'une augmentation de la variable corresponde à une augmentation du niveau de sensibilité. Les corrélations impliquant les caractères mesurés en Côte d'Ivoire (S3, CV_{3a} et CV_{3b}) et le contenu en virus estimé avec le test « tardif » (CV₁) sont basées sur 40 lignées environ, tandis que les autres corrélations sont basées sur 110 lignées environ. Les corrélations significatives sont indiquées par * (p<0,05) ou ** (p<0,01).

	-H8r	-HMr	-T8r	-TMr	SEr	-PGr	S2	CV ₀	CV ₁	CV ₂
-HMr	0,44**									
-T8r	0,58**	0,29**								
-TMr	0,22*	0,44**	0,43**							
SEr	0,47**	0,51**	0,54**	0,50**						
-PGr	0,31**	0,59**	0,24**	0,49**	0,36**					
S2	0,41**	0,20	0,53**	0,21*	0,37**	0,24**				
CV ₀	0,29**	0,27**	0,35**	0,09	0,32**	0,21*	0,38**			
CV ₁	0,46**	0,07	0,52**	0,06	0,21	0,08	0,47**	0,36*		
CV ₂	0,35**	0,31**	0,41**	0,34**	0,36**	0,27**	0,23*	0,24*	0,04	
S3	0,37**	0,25	0,47**	0,08	0,53**	0,26	0,53**	0,49**	0,19	0,33
CV _{3a}	0,25	0,11	0,30	0,06	0,43**	0,08	0,32	0,55**	0,25	0,27
CV _{3b}	0,22	0,25	0,40*	0,06	0,25	0,07	0,21	0,25	0,01	0,44**

une variété *indica*, aussi sensible que IR64 (Albar, 1994). La résistance a été estimée à l'aide du test ELISA « précoce » : les plantes ont été inoculées dix jours après semis et testées une semaine plus tard. Trois répétitions ont été effectuées par famille ou variété.

Dans ces deux descendance, le contenu en virus est faible (Tab. 3.6.). En raison du petit nombre d'échantillons, les contenus en virus dans la variété Azucena, la variété IR64, les plantes F1 et la famille F2 ont été comparés avec le test de Kruskal-Wallis. La descendance F1 et la famille F2 ont un niveau de résistance élevé ; elles ne sont pas significativement différentes, en revanche, elles sont toutes deux différentes de IR64 et d'Azucena. Bien que ces deux descendance soient plus sensibles qu'Azucena, le faible contenu en virus suggère que la résistance s'hérite selon un mode dominant ou additif.

2.4. Comparaison des différentes méthodes d'évaluation de la résistance

Dans la population IR64/Azucena, le niveau de résistance a été estimé par l'impact de la maladie sur six caractères agro-morphologiques, les symptômes et le contenu en virus évalué dans plusieurs conditions. Les corrélations phénotypiques entre ces différents caractères ont été étudiées. De manière générale, quelle que soit la méthode, les conditions ou le stade d'évaluation, les différents estimateurs de la résistance sont corrélés (Tab. 3.7.).

Le contenu en virus dans les plantes cultivées au champ et en conditions contrôlées, est corrélé aux symptômes. Ceci est conforme aux résultats obtenus sur la collection variétale. Par ailleurs, le contenu en virus évalué en conditions contrôlées avec le test « précoce » (CV_0) est corrélé aux différents critères de résistance estimés sur des plantes cultivées au champ, à l'exception de la variable TMr. L'absence de corrélation entre CV_0 et TMr peut s'expliquer par les caractéristiques propres du tallage fertile, caractère dont l'héritabilité est faible et qui est peu affecté par la virose. Les corrélations entre CV_0 et la résistance au champ ainsi que l'héritabilité élevée du test ELISA, confirment l'intérêt de l'évaluation de la résistance par test ELISA, dans notre étude et dans un contexte plus général : d'une mise en œuvre moins lourde qu'une expérimentation sur le terrain, le test ELISA sur plantes jeunes permet une estimation précise du niveau de résistance et reflète en grande partie la résistance au champ, exprimée par la plante entière.

L'ensemble des résultats suggère un effet important du stade de mesure sur le niveau de résistance et une évolution du niveau de résistance au cours du temps. Le contenu en virus mesuré en conditions contrôlées sur des plantes âgées de trois et cinq semaines (CV_0 et CV_1) est davantage corrélé aux variables H8r, T8r et S2, mesurées au champ sur des plantes âgées de huit semaines qu'aux variables HMr, TMr, SEr, PGr et CV_2 , mesurées plus tardivement. En outre, au champ, les meilleures corrélations sont obtenues entre des variables mesurées au même stade, huit semaines après semis ou à maturité, telles que T8r, H8r et S2 d'une part ou HMr, TMr et PGr d'autre part.

Tableau 3.8. Corrélations entre les caractères morphologiques, mesurés sur des plantes saines cultivées au champ, et les critères de résistance, dans la population IR64/Azucena. Les corrélations ont été calculées à partir des estimateurs de résistance ou de leur opposé, de telle sorte qu'une augmentation de la variable utilisée corresponde à une augmentation du niveau de sensibilité. Les corrélations significatives sont indiquées avec * ($p < 0,05$) ou ** ($p < 0,01$). La majorité des critères de résistance sont corrélés au tallage.

	H8c	HMc	T8c	TMc	SEc
-H8r	0,24*	-0,03	0,24*	0,24*	-0,21*
-HMr	-0,03	-0,17	-0,02	0,23*	-0,17
-T8r	0,06	-0,10	0,39**	0,45**	-0,26**
-TMr	0,08	0,01	0,03	0,32**	-0,08
SEr	-0,00	-0,22*	0,32**	0,49**	-0,41**
-PGr	-0,21*	-0,17	-0,06	0,19	0,02
S2	-0,09	-0,17	0,23*	0,32**	-0,10
CV ₀	-0,21*	-0,26**	0,25**	0,24*	-0,13
CV ₁	0,27	0,17	0,26	0,23	0,01
CV ₂	-0,05	-0,28**	0,10	0,29**	-0,35**

Nous avons également étudié les corrélations entre les critères de résistance décrits précédemment et les symptômes et le contenu en virus en Côte d'Ivoire. L'essai conduit en Côte d'Ivoire sur la population IR64/Azucena n'a pu être que très partiellement exploité en raison de problèmes physiologiques des plantes dus à une toxicité ferrique. Sans doute en raison de cette toxicité ferrique, peu de corrélations significatives sont observées entre les critères de résistance estimés en Côte d'Ivoire et les autres critères de résistance. Cependant, les symptômes (S3) et le contenu en virus (CV_{3a}) estimés en Côte d'Ivoire trois semaines après inoculation sont corrélés aux symptômes estimés quatre semaines après inoculation au Mali (S2) et au contenu en virus estimé avec le test « précoce » (CV₁). De même, le contenu en virus (CV_{3b}) estimé en Côte d'Ivoire sept semaines après inoculation est corrélé au contenu en virus estimé au Mali sept semaines après inoculation (CV₂). Le contenu en virus ou les symptômes observés dans des conditions différentes mais à des stades proches sont donc corrélés. Cette observation confirme l'importance du stade d'évaluation de la résistance.

2.5. Relation entre la résistance et la morphologie

Une relation entre le niveau de résistance et la morphologie des plantes étant suspectée, les corrélations phénotypiques entre les différents critères de résistance et les caractères agro-morphologiques mesurés dans la population IR64/Azucena ont été calculées. Ces corrélations sont présentées dans le tableau 3.8..

Parmi les différents critères de résistance utilisés, la résistance au champ (H8r, HMr, T8r, TMr, SEr, PGr) n'a pas été mesurée indépendamment des caractères agro-morphologiques observés sur plantes saines. Pour cette raison, les corrélations entre un caractère et l'impact de la maladie sur ce caractère peuvent être liées aux méthodes utilisées et nous ne chercherons pas à les interpréter. Par ailleurs, les corrélations entre le poids des grains et la résistance n'ont pas été étudiées car le poids des grains n'est pas un critère de différenciation entre les variétés *indica*, sensibles, et les variétés *japonica* pluviales, résistantes.

Des corrélations sont observées entre certaines composantes morphologiques et la résistance. Ainsi, tous les critères de résistance, exceptés PGr et CV₁, apparaissent significativement corrélés au tallage ($p < 0,05$) : un tallage élevé est associé à une plus grande sensibilité au RYMV. En particulier, le contenu en virus en conditions contrôlées estimé avec le test « précoce » (CV₀) est significativement corrélé au tallage huit semaines après semis et à maturité, en l'absence de toute corrélation environnementale entre ces deux caractères. Par ailleurs, les corrélations entre la résistance et la hauteur sont significatives pour certains estimateurs de résistance ; en particulier le contenu en virus dans les plantes, cultivées au champ ou en conditions contrôlées, est corrélé à la hauteur : les lignées de grande taille multiplient moins le virus que les lignées de petite taille.

2.6. Conclusion

L'étude du niveau de résistance dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura nous a permis de confirmer que la résistance partielle des variétés *japonica* pluviales s'exprimait par une moindre accumulation du virus dans les plantes ainsi que des symptômes et un impact du RYMV sur différents caractères morphologiques moins importants que chez les variétés *indica*, IR64 et Apura. Les différents critères de résistance sont corrélés. En particulier les symptômes sont corrélés au contenu en virus dans les plantes ; cette observation est cohérente avec ce qui a été observé sur la collection variétale et suggère l'absence de mécanismes de tolérance. Par ailleurs, les corrélations de la résistance au champ et du contenu en virus dans les plantes soulignent l'intérêt du test ELISA, plus héritable et plus facile à mettre en œuvre qu'une expérimentation au champ.

La distribution de la plupart des critères de résistance sont en faveur d'un contrôle polygénique de la résistance. On observe cependant une distribution bimodale du contenu en virus estimé avec le test ELISA « tardif » suggérant qu'un QTL majeur pourrait contrôler ce caractère. En outre, le niveau de résistance est apparu dépendant du stade des plantes au moment de l'évaluation. Le déterminisme génétique de la résistance est donc complexe et dépendant des critères de résistance ou des conditions de test. Par ailleurs des corrélations entre certaines composantes de la morphologie, en particulier le tallage, et la résistance ont été mises en évidence. Elles permettent de supposer une liaison génétique entre les QTL contrôlant les deux types de caractères ou un effet de certains QTL de morphologie sur la résistance. L'approche de cartographie qui sera développée dans le chapitre suivant nous permettra de vérifier ces hypothèses.

CHAPITRE IV

CARTOGRAPHIE DES QTL DE RESISTANCE

CHAPITRE IV :

CARTOGRAPHIE DES QTL DE RESISTANCE

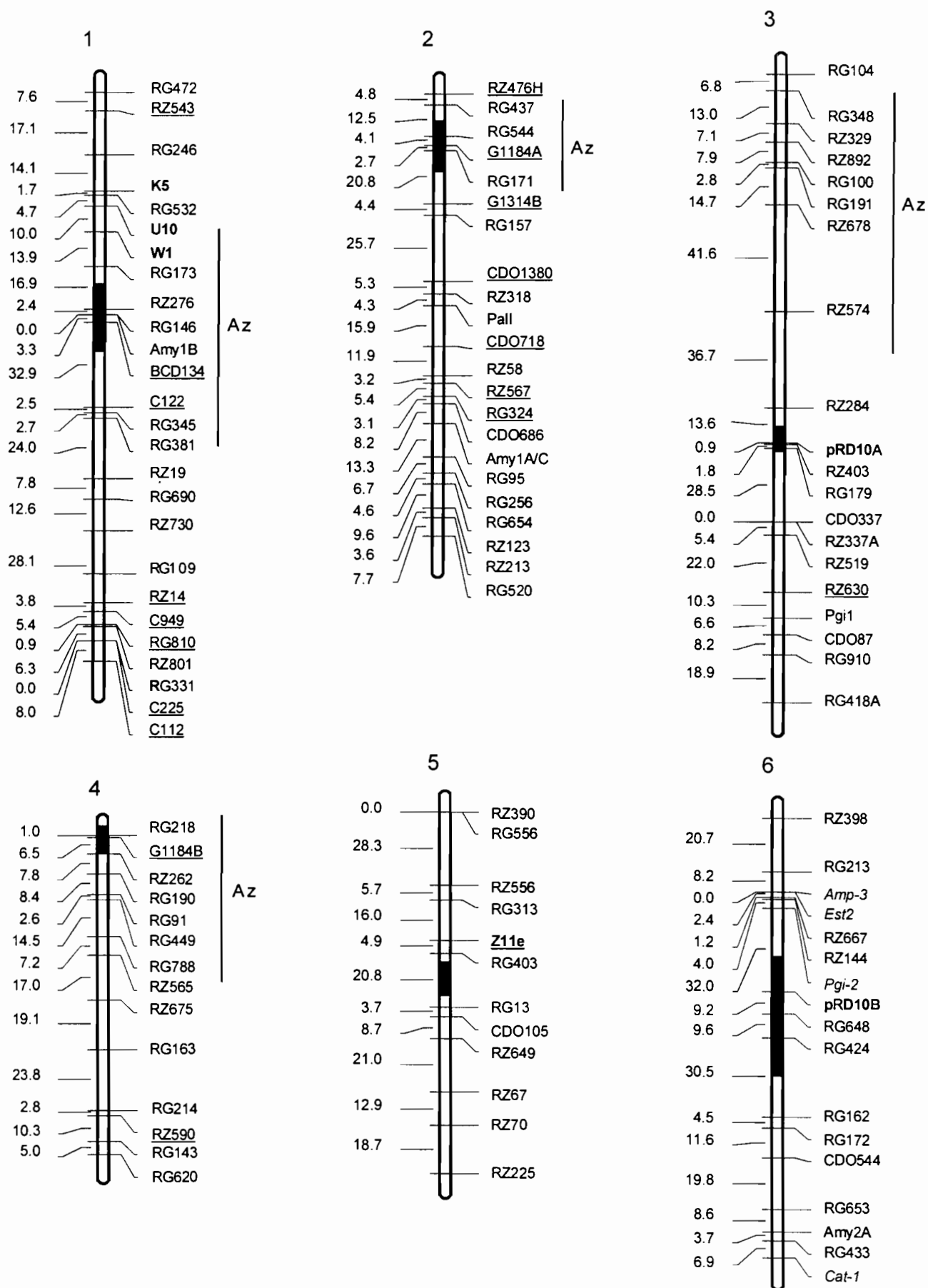
Nous avons présenté dans le chapitre précédent différents caractères mesurés dans les populations de lignées HD IR64/Azucena et IRAT177/Apura. Des caractères morphologiques, l'impact du RYMV sur ces caractères, les symptômes et le contenu en virus ont été mesurés dans la population IR64/Azucena lors d'essais réalisés au champ. Par ailleurs, des tests ELISA ont été réalisés à un stade « précoce » et un stade « tardif » sur les lignées des deux populations, cultivées en conditions contrôlées. Ces différents caractères vont nous permettre maintenant de localiser des QTL impliqués dans la morphologie et dans la résistance sur les cartes génétiques des deux populations. Dans une première partie, nous décrirons les cartes génétiques obtenues. Dans une deuxième partie, nous présenterons la cartographie des QTL. Enfin, dans une troisième partie, nous étudierons plus finement un QTL de résistance dont les caractéristiques nous sont apparues particulièrement intéressantes.

1. LES CARTES GENETIQUES DES POPULATIONS DE LIGNEES HD

Les lignées des deux populations ont été caractérisées avec un certain nombre de marqueurs moléculaires, à l'IRRI pour la population IR64/Azucena (Huang *et al.*, 1997b) et à l'Université Cornell pour la population IRAT177/Apura (McCouch, 1990) ; ces données ont permis d'établir une carte génétique sur la première population (Huang *et al.*, 1997b). Au cours de ce travail, nous avons étudié le génotype pour des marqueurs et/ou sur des lignées complémentaires puis nous avons complété la carte de la population IR64/Azucena et essayé d'établir une carte pour la population IRAT177/Apura.

1.1. Carte génétique de la population IR64/Azucena

Cent trente cinq lignées de la population IR64/Azucena ont été cartographiées à l'IRRI avec 180 marqueurs (Huang *et al.*, 1997b) : huit iso-enzymes (Amp-2, Amp-3, Cat-1, Est-2, Est-9, Pgi-1, Pgi-2, Sdh-1), 14 marqueurs RAPD, 12 marqueurs RFLP dérivés de gènes clonés et 146 autres marqueurs RFLP. Les gènes clonés sont des gènes d'alcool-deshydrogénase (Adh1 et Adh2), des gènes d'alpha-amylase (Amy1A, Amy1B, Amy1C, Amy2A, Amy2B, Amy3B, Amy3C, Amy3D, Amy3E) et le gène de la phenylalanine ammonia-lyase (PalI). Parmi ces marqueurs, seuls 135 étaient disponibles au début de notre étude.



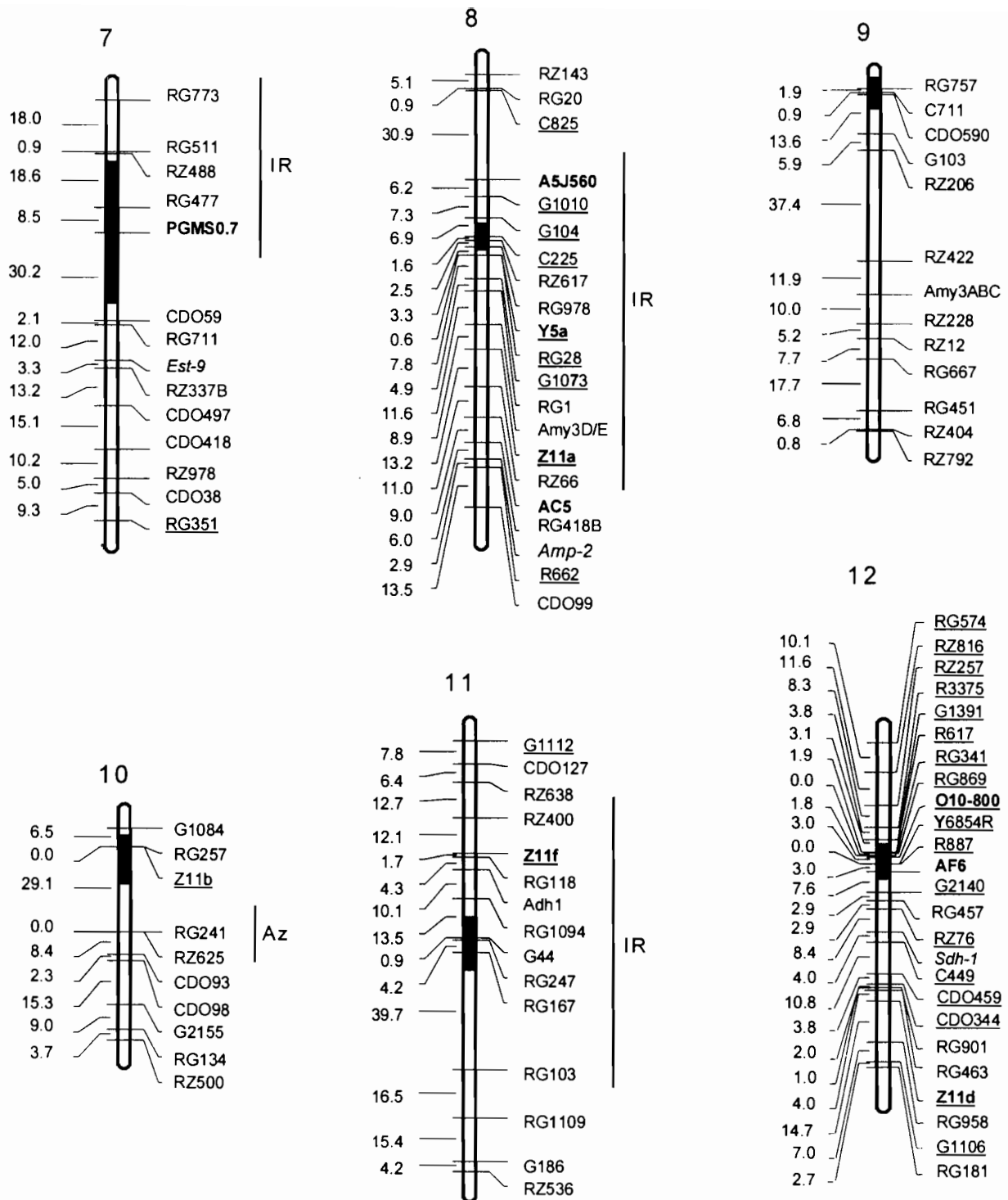


Figure 4.1. Carte génétique de la population de lignées HD IR64/Azucena. Différents types de marqueurs sont cartographiés : des marqueurs RFLP, des marqueurs iso-enzymatiques, des marqueurs RAPD (en gras). Les sondes RFLP proviennent d'ADN génomique de riz (RG, G), d'ADN complémentaire de riz (RZ, C, R), d'avoine (CDO) et d'orge (BCD), d'extrémités de clones YAC (Y) ou de gènes clonés. Les marqueurs utilisés à Montpellier pour caractériser la totalité de la population (181 lignées) sont soulignés. Les distances entre marqueurs sont exprimées en centimorgans et calculées à partir de la fonction de Kosambi. Les régions centromériques déterminées approximativement à partir des résultats de Singh *et al.* (1996) sont colorées en noir. Les régions chromosomiques présentant des distorsions de ségrégation significatives ($p < 0,01$), en faveur des allèles de IR64 (IR) ou d'Azucena (Az), sont indiquées par un trait vertical.

Après une recherche préliminaire de QTL de résistance au RYMV, nous avons complété la carte dans des régions du génome susceptibles d'être liées à la résistance, afin d'augmenter la puissance de détection des QTL et de préciser leur localisation. D'une part, certains marqueurs déjà cartographiés sur 135 lignées et liés à la résistance ont été cartographiés sur l'ensemble des 181 lignées disponibles. D'autre part, de nouveaux marqueurs ont été cartographiés dans les régions concernées de manière à saturer la carte si nécessaire et à réduire les intervalles entre marqueurs. La recherche de polymorphisme a été effectuée à l'aide de huit enzymes de restriction. Environ 70% des sondes testées se sont avérées polymorphes avec au moins une enzyme. Finalement, les 181 lignées HD ont été caractérisées avec sept marqueurs RFLP déjà cartographiés sur 135 lignées, 35 nouveaux marqueurs RFLP et sept marqueurs RAPD. Pour le marqueur RAPD O10₈₀₀, le génotype des lignées a été contrôlé en hybridant le fragment amplifié sur les membranes. Ces marqueurs sont essentiellement répartis sur les chromosomes 1, 2, 8 et 12.

La carte établie par Huang *et al.* (1997b) a servi de base pour cartographier les nouveaux marqueurs. En raison de données hétérozygotes sur certaines plantes, parmi les 181 lignées HD nous en avons supprimé quinze dont neuf avaient déjà été éliminées lors de la construction de la carte initiale. Par ailleurs, huit marqueurs cartographiés par Huang *et al.* présentant un nombre anormalement élevé de données manquantes et d'hétérozygotes, et allongeant considérablement la carte, n'ont pas été cartographiés dans notre étude.

La carte obtenue couvre une longueur totale de 1853 cM (Fig. 4.1.). L'intervalle moyen entre marqueurs est de 10 cM mais en raison d'un effort de cartographie accentué sur certaines régions, l'intervalle entre marqueurs est variable suivant les chromosomes. Huit régions de 30 à 42 cM sans marqueurs sont présentes. Lorsqu'on compare la carte obtenue avec les cartes de Causse *et al.* (1994) et de Kurata *et al.* (1994), les extrémités de certains chromosomes apparaissent incomplètes : des régions d'environ 30 cM ne sont pas cartographiées aux extrémités des bras courts des chromosomes 2 et 7, ainsi que des régions de 15 à 20 cM aux extrémités des bras courts des chromosomes 6, 9 et 10 et à l'extrémité du bras long du chromosome 10. Cette population ne présente pas de biais vers l'un ou l'autre des parents sur l'ensemble des marqueurs ; cependant, ponctuellement, plusieurs distorsions de ségrégation sont significatives au seuil $p < 0,01$. Les distorsions les plus importantes sont localisées sur les chromosomes 8 et 11 ($p < 0,001$).

1.2. Carte génétique de la population IRAT177/Apura

Les lignées HD de la population IRAT177/Apura ont été caractérisées avec environ 180 marqueurs RFLP et iso-enzymes (McCouch, 1990). Cependant, en raison de distorsions de ségrégation, d'un polymorphisme faible entre les parents et d'un nombre limité d'individus (75 lignées), la construction d'une carte n'a pas été directement réalisable à partir de ces données. Seuls 90 marqueurs ont permis de constituer des groupes de liaison cohérents avec les liaisons réellement

détectées entre ces marqueurs et leur cartographie sur la carte interspécifique (Causse *et al.*, 1994) ou la carte de la population IR64/Azucena.

Par ailleurs, nous avons recherché du polymorphisme pour de nouveaux marqueurs cartographiés dans des régions du génome où des QTL ont été détectés dans la population IR64/Azucena, notamment le bras long du chromosome 1 et le bras court du chromosome 12. Huit enzymes de restriction ont été utilisées pour rechercher du polymorphisme ; 50% des sondes testées ont révélé du polymorphisme avec au moins une enzyme de restriction. Cependant aucun polymorphisme n'a été mis en évidence pour les marqueurs RG810, C949, RZ14, RZ19 du chromosome 1 et les marqueurs RG574, RZ816 et RZ257 du chromosome 12. L'absence de polymorphisme n'est probablement pas un hasard mais révèle des régions du génome peu variables entre IRAT177 et Apura.

Toutes les lignées disponibles ayant été précédemment caractérisées pour 180 marqueurs, et l'établissement d'une carte plus complète s'avérant difficile en raison du manque de polymorphisme de certaines régions, nous avons choisi de ne pas approfondir le travail de cartographie sur cette population. Seuls neuf nouveaux marqueurs ont été cartographiés.

Finalement, la carte obtenue sur cette population couvre 1072 cM (Fig. 4.2.). Fréquemment, les liaisons entre marqueurs ne sont pas statistiquement significatives (au seuil $LOD > 3$) et ont été « imposées » lors de la construction de la carte. Cependant, malgré quelques liaisons imposées, les distances génétiques entre marqueurs sont équivalentes à celles obtenues sur la carte de la population IR64/Azucena. Cette bonne conservation des distances génétiques confirme la position des marqueurs sur la carte IRAT177/Apura. La comparaison de cette carte et de la carte de la population IR64/Azucena met en évidence d'importantes régions non cartographiées : le bras long du chromosome 1, les bras courts des chromosomes 6 et 12 et des régions importantes des chromosomes 3 et 8. Très peu de marqueurs sont cartographiés sur les chromosomes 9 et 10 et le chromosome 4 est fragmenté. La comparaison avec la carte de Causse *et al.* (1994) indique que le chromosome 2, bien qu'il ne comprenne que très peu de marqueurs, est cartographié dans son intégralité. Par ailleurs, on observe dans cette population des distorsions de ségrégation dans plusieurs régions du génome. Sur les chromosomes 8 et 11, ces distorsions sont localisées au niveau des mêmes marqueurs que dans la population IR64/Azucena.

1.3. Conclusion

La comparaison des cartes génétiques des populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura met en évidence une bonne conservation des distances génétiques entre marqueurs dans les deux populations. Ce résultat est conforme à celui obtenu par Antonio *et al.* (1996) sur cinq populations issues de croisements *indica* x *japonica*. Peu de polymorphisme a été mis en évidence entre IRAT177 et Apura dans certaines régions du génome, et sans l'appui des cartes des populations IR64/Azucena et

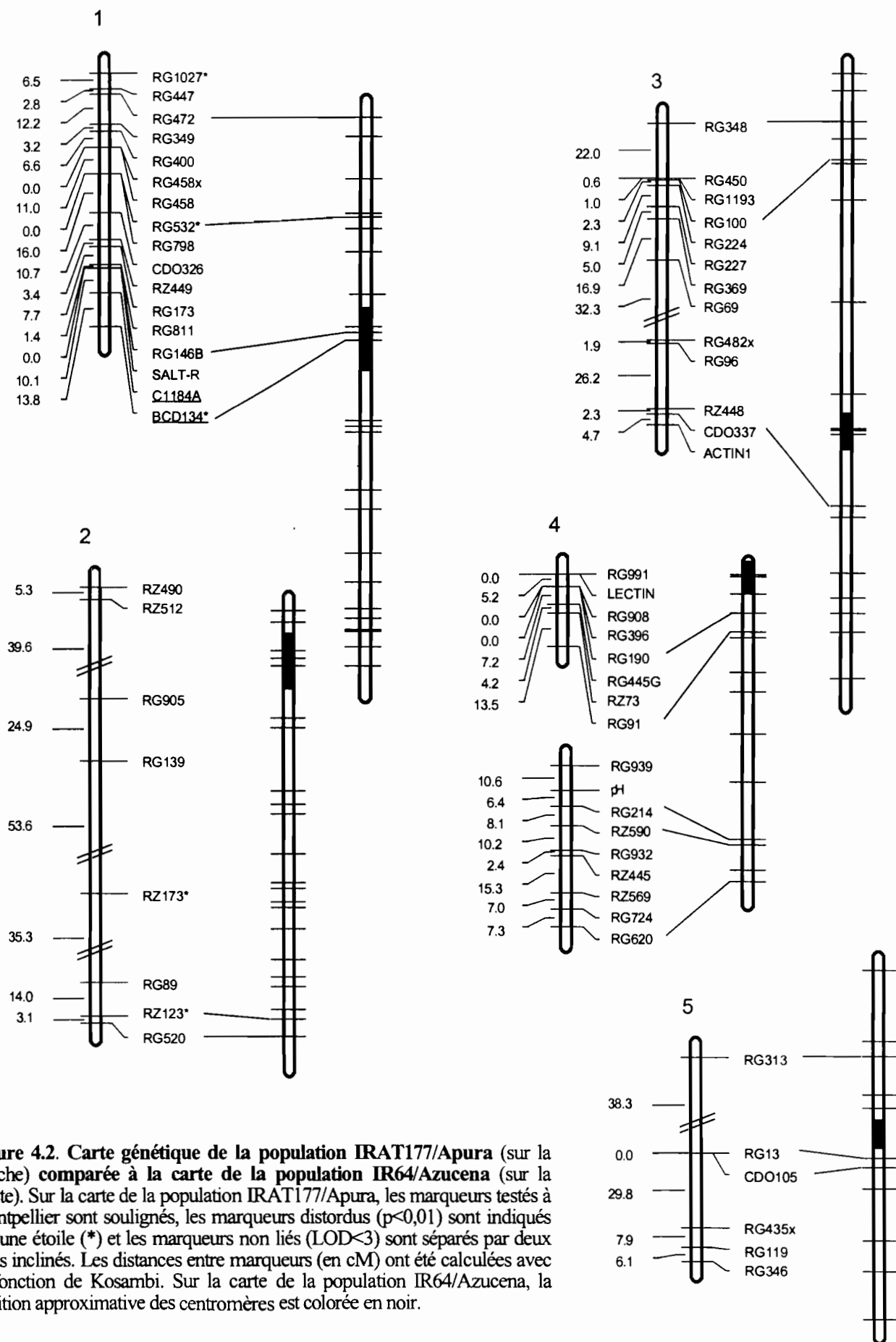
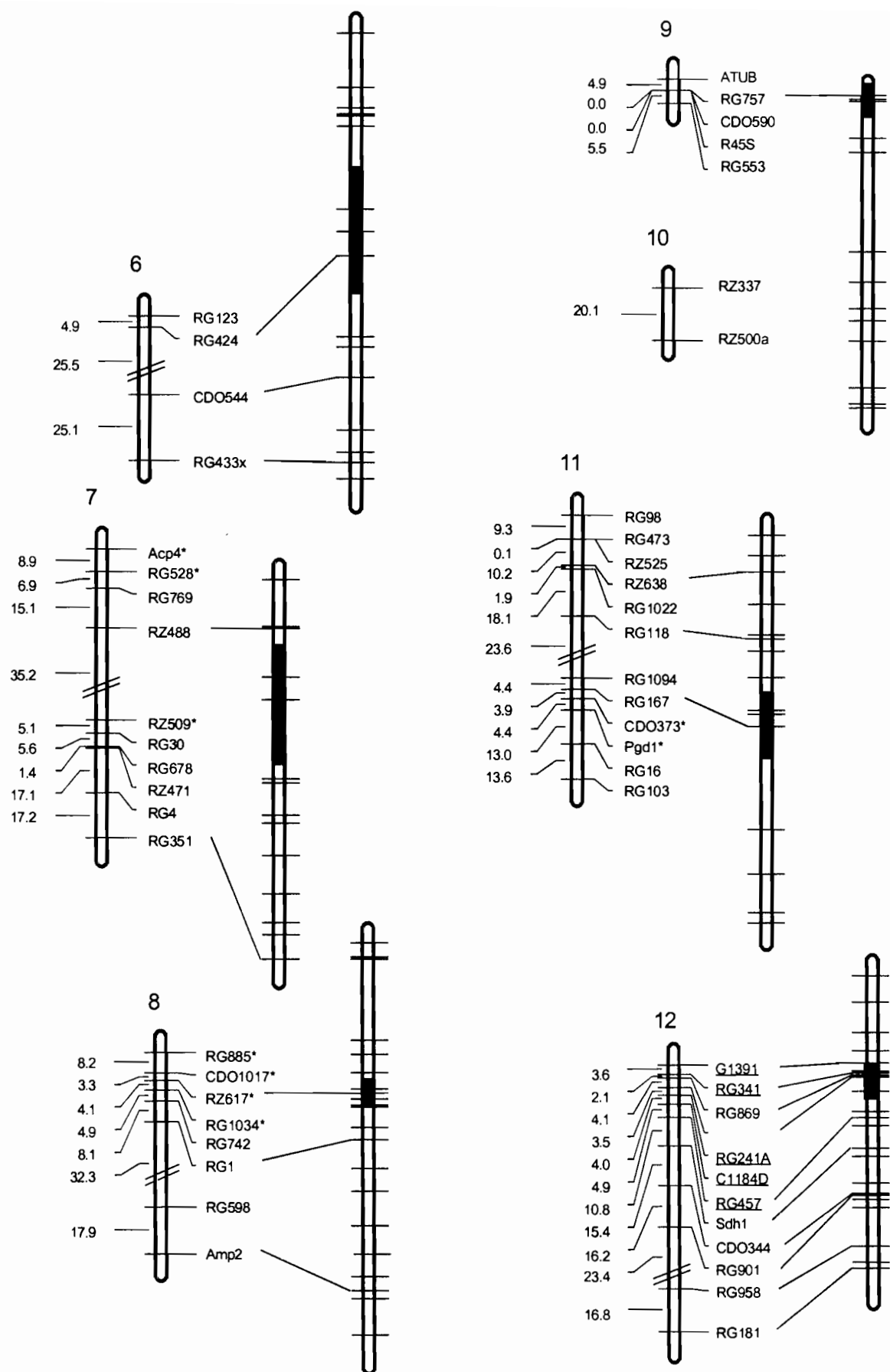


Figure 4.2. Carte génétique de la population IRAT177/Apura (sur la gauche) comparée à la carte de la population IR64/Azucena (sur la droite). Sur la carte de la population IRAT177/Apura, les marqueurs testés à Montpellier sont soulignés, les marqueurs distordus ($p < 0,01$) sont indiqués par une étoile (*) et les marqueurs non liés ($LOD < 3$) sont séparés par deux traits inclinés. Les distances entre marqueurs (en cM) ont été calculées avec la fonction de Kosambi. Sur la carte de la population IR64/Azucena, la position approximative des centromères est colorée en noir.



interspécifique (Causse *et al.*, 1994), aucune carte génétique n'aurait pu être construite pour la population IRAT177/Apura. Le manque de polymorphisme entre les variétés IRAT177 et Apura pourrait être lié à un manque de polymorphisme entre la variété Apura et les variétés *japonica* en général.

Des distorsions de ségrégation ont été observées dans les deux populations. De telles distorsions sont très fréquentes dans les croisements *indica* x *japonica* et souvent attribuées à des gènes de stérilité (Xu *et al.*, 1997). En particulier, les deux principales distorsions sur les chromosomes 8 et 11, significatives aux seuils $p < 0,001$ dans la population IR64/Azucena et $p < 0,01$ dans la population IRAT177/Apura, sont probablement liées aux gènes gamétophytiques cartographiés à proximité des marqueurs Amp-2 (chromosome 8) et Pgd-1 (chromosome 11) (Lin *et al.*, 1992). Ces distorsions modifient la longueur de la carte ; mais, Lorieux *et al.* (1996) ont cartographié le chromosome 8 de la population IR64/Azucena en tenant compte des distorsions et ils ont vérifié que l'ordre des marqueurs n'était pas modifié par la présence de ces distorsions. Elles pourront cependant influencer sur la détection des QTL et devront éventuellement être prises en considération.

L'état de la carte de la population IRAT177/Apura sera limitante pour la recherche de QTL puisqu'aucun QTL ne pourra être mis en évidence sur d'importantes régions du génome non cartographiées. En revanche, malgré quelques régions pauvres en marqueurs, l'ensemble du génome de la population IR64/Azucena apparaît suffisamment bien cartographié pour permettre une recherche de QTL satisfaisante ; en effet, d'après Darvasi *et al.* (1993), la puissance de détection des QTL en cartographie d'intervalle est peu affectée par la distance entre les marqueurs.

2. CARTOGRAPHIE DE QTL

A partir des cartes génétiques des populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura, des QTL expliquant les caractères phénotypiques décrits dans le chapitre précédent ont été recherchés. L'objectif de ce travail est d'identifier les bases génétiques de la résistance au RYMV, mais, en raison des corrélations détectées entre la morphologie et la résistance, nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la cartographie de QTL impliqués dans certaines composantes de la morphologie.

2.1. Méthode de détection des QTL

Pour la majorité des caractères, la mise en évidence des QTL a été réalisée grâce à une approche en trois étapes, à l'aide du logiciel Mapmaker/QTL (Lincoln *et al.*, 1993). Tout d'abord, les QTL détectés avec un LOD score supérieur ou égal à 2,6 ont été retenus ; le modèle incluant ces QTL a conduit à un LOD score de valeur « LOD₁ ». Ensuite, ces QTL ont été fixés et une nouvelle recherche de QTL a été conduite ; de nouveaux QTL ont été retenus avec un LOD score supérieur ou égal à (LOD₁ + 2,6). Enfin, nous avons validé les QTL en vérifiant que chaque QTL permettait d'augmenter

le LOD score obtenu avec le modèle incluant tous les QTL d'une valeur minimale de 2 par rapport au LOD score obtenu sans ce QTL. Le pourcentage de variance expliqué par un QTL ou par le modèle multi-QTL a été calculé avec le logiciel Mapmaker/QTL. Sur les figures 4.3. et 4.4., la position des QTL est représentée par l'intervalle à l'intérieur duquel le LOD score est supérieur à la valeur (LOD score maximum du QTL -1).

Par ailleurs, nous avons également recherché les QTL à l'aide d'une analyse de variance et du test non paramétrique de Kruskal-Wallis afin de comparer les différentes méthodes. A l'exception d'un QTL, tous les QTL détectés par analyse de variance ou test de Kruskal-Wallis sont également mis en évidence par la procédure décrite précédemment. En revanche, certains QTL à effet mineur ont été mis en évidence avec Mapmaker/QTL alors qu'ils n'étaient pas significatifs en ANOVA à un facteur ou avec le test de Kruskal-Wallis.

Les QTL seront dénommés en fonction de leur position sur le génome et du caractère qu'ils expliquent. Ainsi, un QTL cartographié sur le chromosome 1 et impliqué dans le caractère CV₀ sera nommé QTL1(CV₀). Lorsque deux régions nettement différenciées d'un chromosome seront impliquées dans un ou plusieurs caractères, elles seront distinguées par les lettres « h » et « b » avec h pour le « haut » du chromosome (vers l'extrémité du bras court) et b pour « bas » du chromosome (vers l'extrémité du bras long).

2.2. Cartographie de QTL de morphologie chez IR64/Azucena

La recherche de QTL a été effectuée pour les différentes composantes agro-morphologiques présentées dans le Chapitre III : hauteur huit semaines après semis (H8c) et à maturité (HM_c), tallage huit semaines après semis (T8c) et tallage fertile (TM_c), durée du cycle semis-épiaison (SE_c) et poids des grains pleins (PG_c).

Seize QTL ont été détectés pour expliquer les six caractères étudiés. Le tableau 4.1. est un récapitulatif des différents QTL et de leurs caractéristiques et la figure 4.3. permet de préciser la répartition de ces QTL sur le génome.

2.2.1. Nombre et effets des QTL

Dans une première analyse, tous les caractères morphologiques étudiés ont mis en évidence au moins un QTL, à l'exception du tallage huit semaines après semis (T8c). Comme ce caractère n'est pas distribué normalement et que la cartographie d'intervalle est sensible à la non-normalité, nous avons recherché des QTL à partir du logarithme népérien de T8c, ln(T8c), normalement distribué. Un QTL expliquant 13% de la variance a été détecté sur le chromosome 7 en cartographie d'intervalle. En revanche, en analyse de variance, un QTL expliquant ln(T8c) est détecté sur le chromosome 8, tandis que le QTL du chromosome 7 reste non significatif. Le QTL8(T8c) est cartographié dans une région

Tableau 4.1. Les QTL de morphologie détectés dans la population IR64/Azucena. Les principales caractéristiques des QTL sont indiquées : localisation (chromosome, position en cM à partir du premier marqueur du chromosome, marqueurs encadrant le LOD maximum), LOD score maximum, variété parentale qui contribue à augmenter la valeur du caractère et pourcentage de variance expliqué par chaque QTL (%) et par le modèle multi-QTL (% total). Le LOD score obtenu pour certains QTL est inférieur à 2,6. Ces QTL ont été détectés après avoir fixé les QTL majeurs et l'augmentation du LOD score liée à l'introduction du nouveau QTL dans le modèle, est indiquée entre parenthèses.

Caractère	Nom	Chr.	Posit.	Intervalle	Parent	LOD	%	% total
H8c	QTL2b	2	135	CDO686-Amy1A/C	IR64	1,1 (2,7)	5	57
	QTL3b	3	226	CDO87-RG910	Azucena	4,6	24	
	QTL9h	9	18	G103-RZ206	Azucena	2,56 (3)	15	
	QTL12b	12	90	Z11d-RG958	Azucena	5,4	23	
HMc	QTL1	1	207	RZ14-C949	Azucena	10,7	38	77
	QTL3b	3	231	RG910-RG418A	Azucena	1,9 (3,8)	11	
	QTL4b	4	113	RZ590-RG143	Azucena	1,2 (2,6)	7	
	QTL9h	9	42	RZ206-RZ422	Azucena	2,1 (3,3)	23	
ln (T8c) ^a	QTL7	7	128	RZ978-CDO418	IR64	2,7	13	
	QTL8	8	141	R662	IR64	$p=0,0003$	11	
TMc	QTL1	1	213	C949-RG810	IR64	4,2	17	31
	QTL7	7	136	RG978-CDO38	IR64	3,2	20	
SEc	QTL1	1	213	C949-RG810	Azucena	4,3	19	47
	QTL3h	3	9	RG144-RG348	Azucena	4,2	23	
	QTL4h	4	24	RG190-RG91	IR64	1,7 (2,7)	8	
PGc	QTL9h	9	18	G103-RZ206	Azucena	3,1	16	26
	QTL12b	12	51	Sdh1-C449	Azucena	2,3 (2,8)	10	

^a ln(T8c) a permis de mettre en évidence le QTL7 en cartographie d'intervalle et le QTL8 en analyse de variance ; le QTL8 est considéré comme un QTL potentiel et nous n'avons pas calculé le pourcentage de variance expliqué par un modèle incluant les deux QTL.

présentant une importante distorsion de ségrégation qui pourrait influencer sur la détection de ce QTL en cartographie d'intervalle. Toutefois, compte tenu de la méthode et des seuils choisis pour déclarer un QTL présent, seul le QTL7(T8c) a été indiqué sur la figure 4.3. mais nous considérerons le QTL8(T8c) comme un QTL potentiel.

Les différents caractères permettent de mettre en évidence de un à quatre QTL. Le pourcentage de variance expliqué par ces différents QTL est variable. Parmi les seize QTL détectés, un QTL explique 38% de la variation d'un caractère, neuf QTL expliquent de 13 à 25 % de la variation et cinq QTL expliquent moins de 13% de la variation. On note que ces cinq derniers QTL ne sont détectés que lorsqu'on fixe les QTL majeurs, confirmant que cette approche augmente la puissance de détection des QTL et permet de mettre en évidence des QTL à effet faible. Finalement, les modèles multi-QTL retenus expliquent de 13% à 77% de la variance (13% pour le tallage huit semaine après semis et 77% pour la hauteur à maturité). Les trois caractères ayant l'héritabilité la plus faible (T8c, TMc, PGc) sont ceux pour lesquels les QTL détectés expliquent la plus faible part de la variance.

Pour la majorité des QTL, l'allèle provenant du parent *japonica* pluvial, Azucena, est associé à une taille élevée, un tallage faible, un cycle semis-épiaison long et un poids des grains important. Pour la hauteur, la taille et la longueur du cycle, cette observation est conforme aux différences agromorphologiques observées entre Azucena et IR64. Cependant, l'allèle d'Azucena au niveau du QTL2b(H8c) est associé à une plus petite taille, et de même, l'allèle d'Azucena au QTL4b(SEc) est associé à une durée du cycle réduite. Ces deux QTL expliquent une faible part de la variation. En revanche, bien qu'Azucena soit une variété traditionnelle et IR64 une variété élite sélectionnée pour un bon rendement, les allèles provenant d'Azucena sont associés à une augmentation de rendement pour les deux QTL impliqués dans le poids des grains.

2.2.2. Localisation des QTL

Les seize QTL détectés pour expliquer les différents caractères morphologiques sont cartographiés dans neuf régions du génome, réparties sur sept chromosomes. Trois régions sont impliquées dans l'expression d'un seul caractère, trois régions sont impliquées dans l'expression de deux caractères et deux régions expliquent trois caractères.

Un QTL majeur expliquant 38 % de la variation de la hauteur à maturité a été mis en évidence sur le chromosome 1. Nous avons essayé de cartographier ce QTL comme un gène majeur, à partir des 20 lignées les plus grandes et des 20 lignées les plus petites. Pour cela, nous avons considéré que les lignées les plus grandes avaient un allèle et les lignées les plus petites l'autre allèle, et nous avons cartographié le caractère présence/absence du gène sur Mapmaker, de même qu'un marqueur moléculaire. Il se cartographie entre les marqueurs RG109 et RZ14, à 5 cM de RG109. Précédemment, Cho *et al.* (1994) ont cartographié à proximité de RG109 le gène de semi-nanisme *sd-1*. Ce gène étant

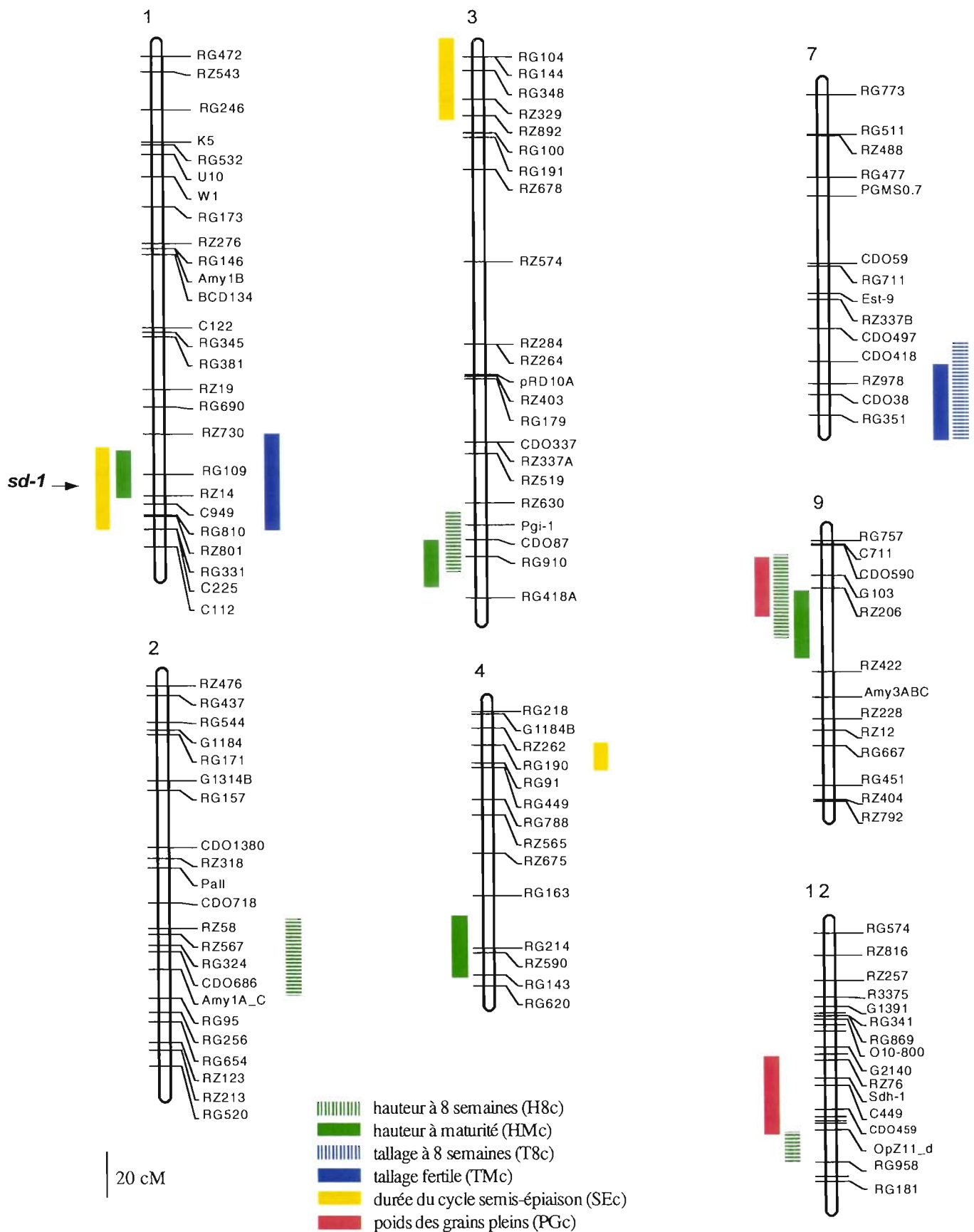


Figure 4.3. Cartographie de QTL impliqués dans l'expression de caractères agro-morphologiques dans la population IR64/Azucena. Les QTL sont représentés par l'intervalle au niveau duquel la valeur du LOD score est supérieure à (LOD score maximum du QTL - 1). Ils sont indiqués sur la gauche des chromosomes si l'allèle qui augmente la valeur du caractère provient de la variété Azucena et sur la droite s'il provient de la variété IR64. Le gène de semi-nanisme *sd-1* a été cartographié sur le chromosome 1 au niveau d'un QTL majeur de hauteur, à partir des 20 lignées les plus grandes et des 20 lignées les plus petites.

en ségrégation dans la population IR64/Azucena, nous considérerons par la suite que le QTL1(HMc) correspond à *sd-1*.

Nous avons détecté, à proximité du gène de semi-nanisme *sd-1*, un QTL de tallage et un QTL impliqué dans la durée du cycle. La précision de la carte et les méthodes utilisées ne permettent pas de dire si cette colocalisation correspond à une liaison génétique entre les QTL et *sd-1* ou à l'effet de *sd-1* sur le tallage et la durée du cycle. En revanche, aucun QTL expliquant la hauteur huit semaines après semis n'est détecté à proximité de *sd-1*. Ceci est cohérent avec l'effet de *sd-1* : *sd-1* agit sur l'allongement des entre-nœuds (Hu, 1973) qui n'intervient qu'après l'initiation paniculaire, donc après la mesure de H8c.

De même, deux QTL expliquant le poids des grains, cartographiés sur les chromosomes 9 et 12, sont localisés dans les mêmes régions que des QTL contrôlant la hauteur. Sur le chromosome 12, bien que les intervalles de confiance des QTL, tels qu'ils ont été représentés sur la figure 4.3., soient chevauchants, les valeurs maximales de LOD score sont obtenues pour des locus distants de 39 cM, cette observation est en faveur d'une liaison génétique. Sur le chromosome 9, aucun élément ne permet de privilégier l'hypothèse de liaison génétique ou l'hypothèse de pléiotropie.

D'autres colocalisations de QTL ont été mises en évidence. En particulier, sur les chromosomes 3 et 9, des QTL expliquant la hauteur huit semaines après semis et à maturité ont été détectés, et sur le chromosome 7, des QTL impliqués dans le tallage huit semaines après semis et à maturité ont été mis en évidence. Dans ces deux cas, les caractères considérés sont identiques mais mesurés à des dates différentes. Il est probable qu'un seul QTL explique l'expression du caractère aux deux dates de mesure.

2.3. Cartographie de QTL de résistance

Après avoir mis en évidence des QTL impliqués dans des caractères morphologiques, nous avons recherché des QTL expliquant les différents estimateurs de résistance présentés dans le Chapitre II :

- les symptômes (S2) et l'impact de la maladie sur la hauteur huit semaines après semis (H8r), sur la hauteur à maturité (HMr), sur le tallage huit semaines après semis (T8r), sur le tallage fertile (TMr), sur la durée du cycle semis-épiaison (SEr) et sur le poids des grains pleins (PGr), dans la population IR64/Azucena ;
- le contenu en virus estimé dans la population IR64/Azucena au champ (CV₂) et en conditions contrôlées avec le test « précoce » (CV₀) et le test « tardif » (CV₁), et dans la population IRAT177/Apura en conditions contrôlées avec ces deux mêmes tests (CV₀' et CV₁').

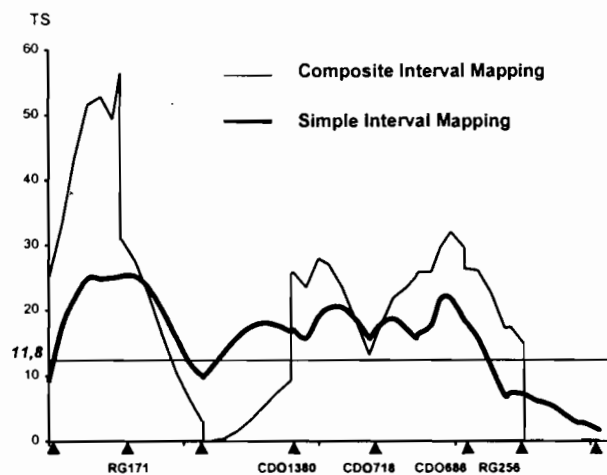


Figure 4.4. Cartographie des QTL du chromosome 2 impliqués dans le contenu en virus au stade « précoce » (CV_0) en « Simple Interval Mapping » et « Composite Interval Mapping ». La valeur du test statistique (TS) estimé par MQTL en « Simple Interval Mapping » est proportionnelle au LOD score estimé par Mapmaker/QTL ; un LOD score de 2,6 correspond à $TS=2,6/0,22=11,8$. Les marqueurs sélectionnés comme cofacteurs en « Composite Interval Mapping » sont indiqués par des pointes de flèches noires. La méthode de « Composite Interval Mapping » met en évidence plusieurs QTL.

Les caractéristiques des QTL détectés sont récapitulées dans le tableau 4.2. et leur localisation est indiquée sur la figure 4.5..

2.3.1. Détection des QTL

Tous les caractères mettent en évidence au moins un QTL, à l'exception de l'impact de la maladie sur le tallage à maturité (TMr) dans la population IR64/Azucena. La variable TMr étant peu héritable et peu affectée par la virose (Chapitre III, §2.2.), ce résultat n'est pas surprenant.

Pour la majorité des caractères, la méthode choisie pour rechercher des QTL permet sans ambiguïté de déclarer significatifs les différents QTL présentés. Nous détaillerons donc uniquement les méthodes développées pour confirmer certains QTL et les résultats ambigus obtenus avec un caractère.

a) Contenu en virus estimé avec le test « précoce » dans la population IR64/Azucena

Le contenu en virus, estimé en chambre de culture avec le test ELISA « précoce » (CV_0) met en évidence au moins quatre QTL sur les chromosomes 1, 2, 8 et 12. Sur le chromosome 2, le LOD score est élevé sur la majeure partie du chromosome (Fig. 4.4.). Afin de déterminer si un ou plusieurs QTL sont présents sur ce chromosome, nous avons utilisé la méthode de « Composite Interval Mapping » simplifiée, proposée par le logiciel MQTL (Tinker et Mather, 1995). Les marqueurs localisés à proximité des QTL1(CV_0), QTL8(CV_0) et QTL12h(CV_0) ont été choisis comme cofacteurs, ainsi que huit marqueurs régulièrement répartis sur le chromosome 2. Cette méthode met en évidence au moins deux QTL sur le chromosome 2 (Fig. 4.4.). Le QTL2h(CV_0) se cartographie à proximité du marqueur RG171. Le QTL2b(CV_0) est détecté entre les marqueurs CDO1380 et RG256 avec un LOD score maximum obtenu à proximité du marqueur CDO686. La figure 4.4. suggère que ce dernier QTL pourrait en fait être composé de deux QTL : l'un dans l'intervalle CDO1380-CDO718 et l'autre dans l'intervalle CDO718-RG256.

Par ailleurs, le QTL8(CV_0) est cartographié dans une région où nous avons noté une importante distorsion de ségrégation en faveur du parent IR64. Cette distorsion de ségrégation étant susceptible d'influer sur la détection des QTL, nous avons vérifié que ce QTL restait significatif d'une part avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis (au seuil $p < 0,001$), d'autre part en analyse de variance sur un échantillonnage aléatoire de lignées réalisé de manière à obtenir des effectifs équilibrés dans les deux classes.

b) Contenu en virus estimé avec le test « tardif » dans la population IR64/Azucena

La variable CV_1 regroupe des données obtenues en 1993, en conditions contrôlées, sur certaines lignées, et en 1997 sur d'autres lignées, à l'aide du test ELISA « tardif ». La recherche de QTL expliquant CV_1 a été réalisée à l'aide de deux méthodes : d'une part en analyse de variance à deux

Tableau 4.2. Les QTL de résistance au RYMV détectés dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura. Les principales caractéristiques des QTL sont indiquées : localisation (chromosome, position en cM à partir du premier marqueur du chromosome, marqueurs encadrant le LOD maximum), LOD score, pourcentage de variance expliqué par chaque QTL (%) et par le modèle multi-QTL (% total) et parent qui contribue à augmenter le niveau de résistance. Le LOD score obtenu pour certains QTL est inférieur à 2,6. Ces QTL ont été détectés après avoir fixé les QTL majeurs et l'augmentation du LOD score liée à l'introduction du nouveau QTL dans le modèle, est indiquée entre parenthèses.

Caract.	Nom	Chr.	Position	Intervalle	Parent	LOD	%	% total
<u>Population IR64/Azucena</u>								
H8r	QTL1	1	215	C949-RG810	Azucena	3,2	12	
HMr	QTL1	1	210	RZ14-C949	Azucena	4	17	
T8r	QTL1	1	215	C949-RG810	Azucena	5,6	22	
SEr	QTL1	1	215	C949-RG810	Azucena	3,7	15	
PGr	QTL1	1	210	RZ14-C949	Azucena	2,3 (3,6)	9	31
	QTL4h	4	24	RG190-RG91	Azucena	4,1	19	
S2	QTL2b	2	97	Pall-CDO718	Azucena	2 (3,4)	10	36
	QTL9b	9	88	RZ12-RG667	Azucena	2,3 (2,8)	12	
	QTL12h	12	41	O10 ₈₀₀ -RG869	Azucena	3,7	15	
CV ₀	QTL1	1	215	RG810-RG331	Azucena	4,2	12	54
	QTL2h	2	25	RG171-G1314B	Azucena	4,8	14	
	QTL2b	2	129	CDO686-Amy1A/C	Azucena	4,8	15	
	QTL8	8	139	RG418B-Amp2	Azucena	3,7	12	
	QTL12h	12	39	O10 ₈₀₀ -RG869	Azucena	3	8	
CV ₁	QTL4	4	108	RG214-RZ590	IR64	1,9 (2,8)	12	32
	QTL12h	12	39	RG869-RG341	Azucena	4,1	19	
CV ₂	QTL1	1	211	C949-RG810	Azucena	7,4	29	
<u>Population IRA177/Apura</u>								
CV ₀ '	QTL12h	12	4	RG341-RG869	IRAT177	3,3	23	
CV ₁	QTL12h	12	4	RG341-RG869	IRAT177	3,3	32	

facteurs, le facteur « marqueur » et le facteur « année » en facteur hiérarchisant, d'autre part en cartographie d'intervalle, selon la stratégie utilisée pour les autres variables, sur les données des deux années, centrées et réduites par rapport à la moyenne et à l'écart-type obtenus chacune des années. Nous avons vérifié que les deux approches mettaient les mêmes QTL en évidence.

c) Contenu en virus estimé avec le test « précoce » dans la population IRAT177/Apura

Initialement, dans la population IRAT177/Apura, le caractère CV_0 a mis en évidence, avec un LOD score supérieur à 2,6, deux QTL cartographiés sur le chromosome 12 mais nettement différenciés. Le premier pic de LOD score est obtenu à proximité du marqueur RG869 et le deuxième à proximité du marqueur CDO344. Cependant, le LOD score obtenu avec le modèle multi-QTL est de 4,6 ; ce LOD score ne permet pas de confirmer la présence des deux QTL au seuil que nous avons fixé. Compte tenu des LOD score respectifs des deux QTL, seul le QTL cartographié à proximité de RG869 a été indiqué dans le tableau 4.2., mais on ne peut pas exclure la présence d'un QTL au niveau du marqueur CDO344.

2.3.2. Nombre et effets des QTL

Dans la population IR64/Azucena, les critères de résistance estimés sur des plantes cultivées au champ, à l'exception des variables S2 et PGr, ne mettent en évidence qu'un QTL, malgré une distribution normale des différents caractères. Ces QTL expliquent de 12,5% à 29% de la variance. En revanche, l'impact de la maladie sur le poids des grains (PGr), les symptômes (S2) et le contenu en virus dans des plantes cultivées en conditions contrôlées (CV_0 et CV_1), mettent en évidence de deux à cinq QTL. Le pourcentage de variance expliqué par les modèles multi-QTL est compris entre 32 et 54%. Le contenu en virus estimé avec le test « tardif » en conditions contrôlées (CV_0) est le caractère mesuré sur le plus grand nombre de plantes et un des caractères les plus héréditaires ; on constate que c'est également le seul caractère pour lequel plus de 50% de la variance est expliquée. Dans la population IRAT177/Apura, les deux critères de résistance permettent de détecter un QTL qui explique 23% de la variance pour un caractère et 32% pour l'autre.

L'allèle du parent résistant, Azucena ou IRAT177, est associé à une augmentation du niveau de résistance pour tous les QTL mis en évidence, à l'exception d'un QTL cartographié sur le chromosome 4 et impliqué dans le contenu en virus estimé avec le test « tardif », dans la population IR64/Azucena (CV_1). Ce QTL est susceptible d'expliquer les transgressions observées pour le caractère CV_1 au chapitre précédent (Fig. 3.5.).

2.3.3. Localisation des QTL

Dix-sept QTL localisés sur huit régions du génome ont été cartographiés dans la population IR64/Azucena. Trois régions expliquent plusieurs critères de résistance : sept critères de résistance

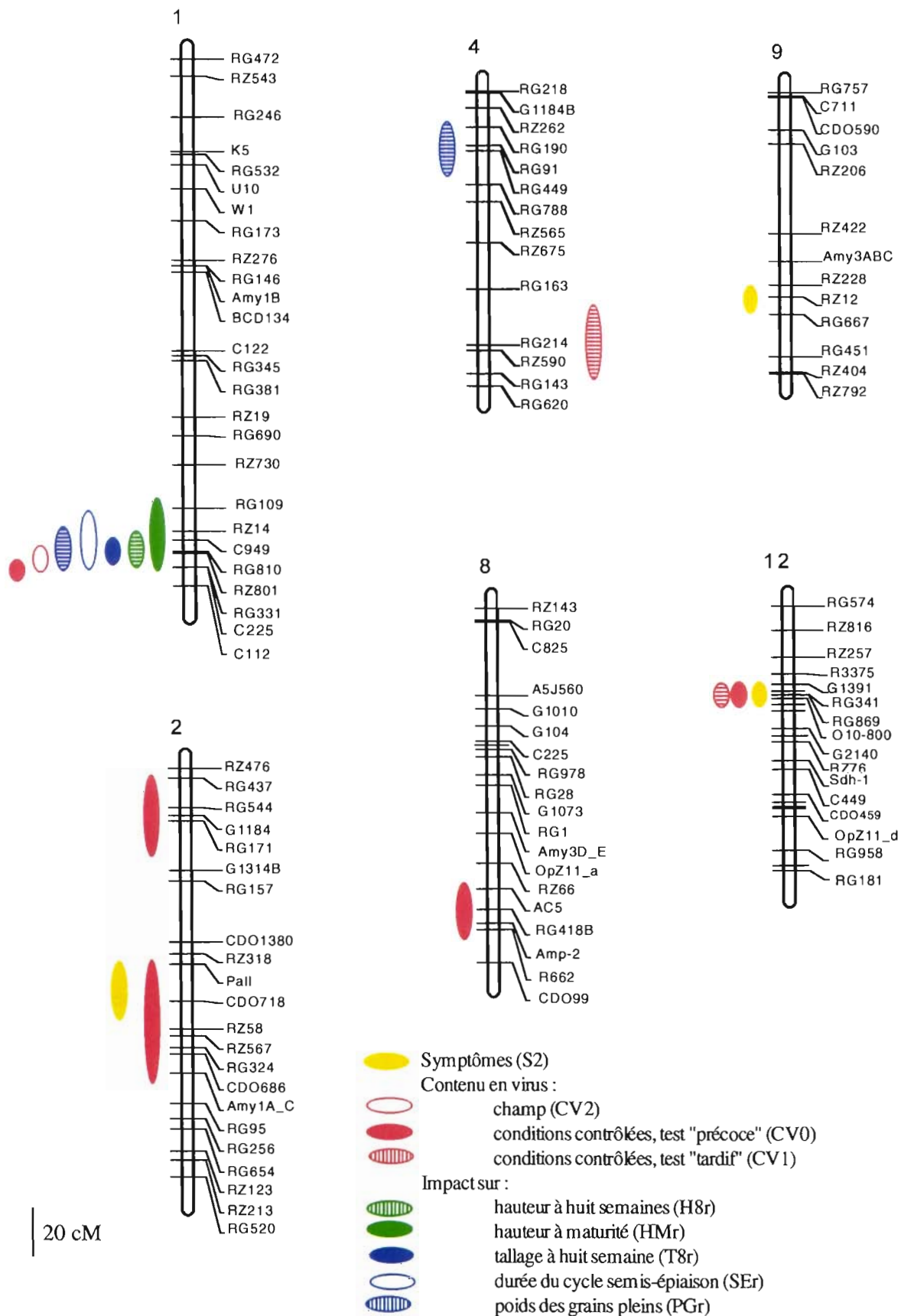


Figure 4.5. Cartographie de QTL impliqués dans l'expression de la résistance au RYMV dans la population IR64/Azucena. Les QTL sont représentés par l'intervalle au niveau duquel la valeur du LOD score est supérieure à (LOD score maximum du QTL - 1). Ils sont indiqués sur la gauche des chromosomes si l'allèle qui augmente le niveau de résistances provient de la variété Azucena et sur la droite s'il provient de la variété IR64.

(résistance au champ, CV₀ et CV₂) mettent en évidence un QTL à l'extrémité du bras long du chromosome 1 ; les symptômes (S2) et le contenu en virus estimé avec le test « précoce » (CV₀) mettent en évidence un QTL sur le chromosome 2, au niveau du marqueur CDO718 ; les symptômes et le contenu en virus en conditions contrôlées (CV₀ et CV₁) mettent en évidence un QTL sur le chromosome 12. Bien que nous ne puissions pas exclure l'hypothèse d'une liaison génétique entre plusieurs QTL, il est très probable qu'un seul facteur de résistance (un gène ou un groupe de gènes) soit sous-jacent à l'identification de plusieurs QTL de résistance colocalisés. En revanche, les QTL2h(CV₀), QTL4h(PGr), QTL4b(CV₁), QTL8(CV₀) et QTL9(S2) n'explique chacun qu'un seul critère de résistance.

Un QTL de résistance a été détecté sur le chromosome 12, au niveau du marqueur RG869, dans la population IRAT177/Apura et dans la population IR64/Azucena (Fig. 4.6.). Dans les deux populations, ce QTL est impliqué dans le contenu en virus estimé en conditions contrôlées avec les tests ELISA « précoce » et « tardif ». Une carte conjointe a été établie à partir des 256 lignées HD des deux populations. La recherche de QTL, pour la variable CV₁, sur cette carte et avec l'ensemble des données phénotypiques a permis de confirmer la position du QTL au niveau des marqueurs RG869 et RG341. Présent dans les deux populations *indica/japonica* étudiées ici, ce QTL pourrait être un facteur de résistance différenciant les variétés *japonica* pluviales des variétés *indica*.

En revanche, dans la population IR64/Azucena, les marqueurs RG91, RZ590 et Amp-2 sont cartographiés au niveau de différents QTL de résistance ; ces marqueurs ont également été cartographiés dans la population IRAT177/Apura mais aucun QTL de résistance n'a été mis en évidence à leur niveau ($p > 0,05$). Par ailleurs, l'extrémité du bras long du chromosome 1 explique la majorité des critères de résistance dans la population IR64/Azucena mais, en l'absence de marqueurs polymorphes, la présence d'un QTL de résistance dans la même région n'a pas pu être testée dans la population IRAT177/Apura.

2.3.4. Les QTL détectés sont-ils spécifiques de certains critères de résistance ?

On peut se demander si les différents QTL de résistance détectés ne sont explicatifs que des caractères pour lesquels ils ont été mis en évidence et si cela reflète une spécificité de l'action de ces QTL, ou si des seuils trop sévères nous ont empêché de les mettre en évidence pour d'autres caractères. En outre, les régions des chromosomes 1, 2 ou 12 sont explicatives de plusieurs critères de résistance et sont donc susceptibles d'expliquer les corrélations phénotypiques observées entre ces différentes variables ; cependant certaines corrélations phénotypiques ne peuvent pas être expliquées de cette façon. Par exemple, les symptômes (S2) et l'impact de la maladie sur le tallage (T8r) sont corrélés alors qu'aucune région chromosomique participant à l'expression des deux caractères n'a été mise en évidence. Deux hypothèses sont susceptibles d'expliquer cette observation : soit la corrélation

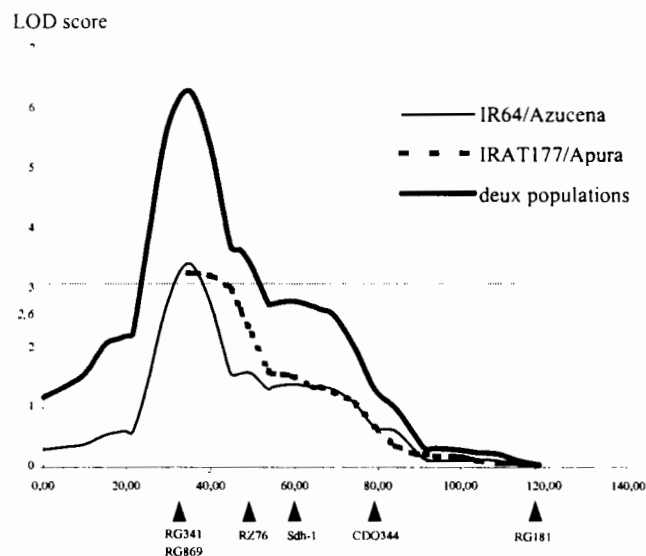


Figure 4.6. Cartographie d'un QTL impliqué dans le contenu en virus estimé avec le test ELISA «tardif» (CV₁ et CV'₁), sur le chromosome 12, dans les populations IR64/Aucena et IRAT177/Apura. Dans un premier temps, le QTL a été cartographié avec le logiciel Mapmaker/QTL sur les cartes des populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura. Dans un deuxième, le QTL a été cartographié sur une carte conjointe établie à partir des lignées des deux populations.

Tableau 4.3. Effet des locus impliqués dans la résistance sur chaque critère de résistance. Les liaisons entre les marqueurs liés aux QTL de résistance détectés et les différents critères de résistance ont été testées par analyse de variance. Les combinaisons locus/caractère pour lesquelles un QTL a été détecté (LOD>2,6) sont indiquées en gris sombre. Les combinaisons locus/caractère pour lesquelles un QTL potentiel est détecté au seuil $p < 0,05$ sont indiquées en gris clair et la probabilité de ne pas avoir de QTL est mentionnée. Des QTL potentiels sont notamment mis en évidence sur les chromosomes 1, 2 et 12.

Caractère	QTL1 RG810	QTL2h RG171	QTL2b Pal/CDO686	QTL4h RG91	QTL4b RZ590	QTL8 R662	QTL9b RZ12	QTL12h RG869
H8r			0.013			0.013		0.024
HMr								
T8r			0.013				0.026	0.018
TMr	0.021							
SEr								0.03
PGr								
S2	0.009							
CV0							0.037	
CV1								
CV2		0.036						
S3	0.014		0.021					
CV3a			0.025					0.033
CV3b			0.003					

phénotypique est due uniquement à la corrélation environnementale, soit des QTL expliquant les deux caractères n'ont pas été détectés en raison de seuils trop sévères.

Par conséquent, nous avons testé par analyse de variance l'effet des marqueurs expliquant au moins un critère de résistance, sur l'ensemble des critères de résistance. Considérant que dix caractères ont été testés pour neuf locus, mais que les tests n'ont pas été effectués pour les combinaisons marqueur/caractère pour lesquels un QTL avait été précédemment mis en évidence, 73 analyses de variance ont été effectuées. Au seuil $p < 0,05$, 3,6 faux positifs en moyenne sont attendus. Onze tests sont significatifs (Tab. 4.3.). En particulier, le QTL du chromosome 1 est susceptible d'expliquer les symptômes (S2) et l'impact de la virose sur le tallage fertile (TMr), pour lesquels aucun QTL n'avait été détecté dans cette région précédemment. Le QTL2h semble impliqué dans le contenu en virus au champ CV₂. De même, le QTL2b, expliquant les caractères CV₀ et S2, pourrait également être impliqué dans la résistance au champ. On constate également que les trois QTL impliqués dans l'expression des symptômes (QTL2b, QTL9b, QTL12h) pourraient aussi agir sur l'impact de la virose sur le tallage à huit semaines (T8r) et, inversement, le QTL1 expliquant notamment T8r pourrait aussi être impliqué dans l'expression des symptômes ; cette observation est susceptible d'expliquer les corrélations phénotypiques observées entre les deux caractères.

Par ailleurs, les estimations du contenu en virus et les symptômes observés sur les plantes cultivées en Côte d'Ivoire n'ont pas permis de mettre en évidence de QTL. Cependant, nous avons testé l'effet des QTL détectés précédemment sur ces caractères. Vingt-sept analyses de variance ont été réalisées sur trois caractères et neuf locus, et les tests ont été déclarés significatifs au seuil $p < 0,05$. On attend 1,3 faux positifs. Quatre tests sont significatifs au niveau de QTL1, QTL2b et QTL12h. On peut remarquer que ces trois QTL sont ceux qui expliquent le plus grand nombre de caractères au Mali et en conditions contrôlées.

En conclusion, parmi les huit QTL détectés, les QTL cartographiés sur les chromosomes 1, 2 et 12 dans différents environnements et avec différents critères de résistance semblent particulièrement importants pour expliquer la résistance partielle au RYMV dans la population IR64/Azucena. En outre, la mise en évidence du QTL cartographié sur le chromosome 12 dans la population IRAT177/Apura souligne l'intérêt de ce QTL.

2.4. Comparaison des QTL de résistance et de morphologie

Lorsqu'on compare la localisation des QTL de résistance et des QTL de morphologie, il apparaît que sur 13 régions impliquées dans l'expression des variables étudiées, quatre, voire cinq, régions sont impliquées à la fois dans la résistance au RYMV et dans les caractères agromorphologiques.

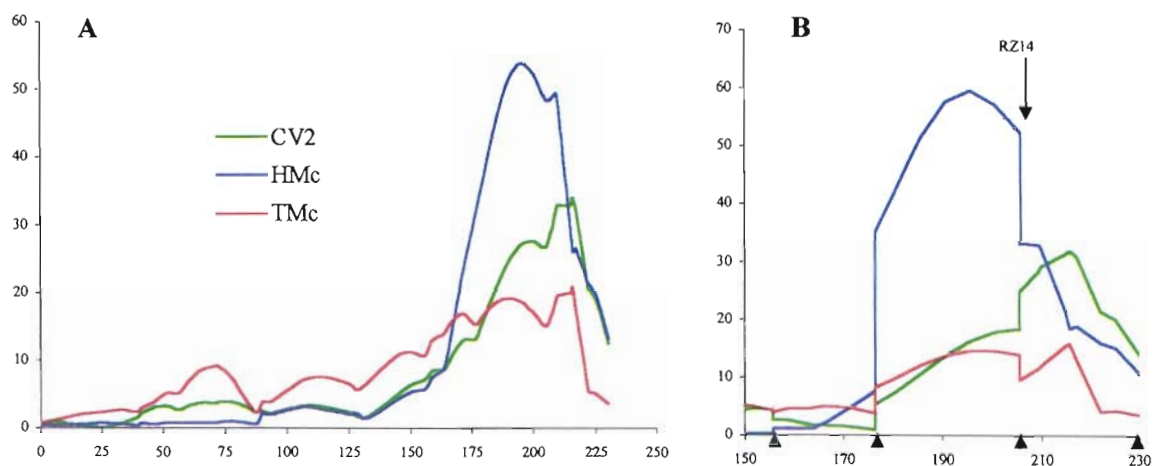


Figure 4.7. Position des QTL impliqués dans la hauteur (HMc) et le tallage (TMc) à maturité et dans le contenu en virus au champ (CV₂) sur le chromosome 1, d'après les méthodes de "Simple Interval Mapping" (A) et "Composite Interval Mapping" (B). La position des QTL est indiquée en cM à partir du premier marqueur du bras court du chromosome (en abscisse). La valeur du test statistique obtenue en "Simple Interval Mapping" avec le logiciel MQTL (en ordonnée) est proportionnelle au LOD score obtenu avec Mapmaker/QTL. Les marqueurs choisis comme cofacteurs en "Composite Interval Mapping" sont indiqués par des pointes de flèches noires sur l'axe des abscisses.

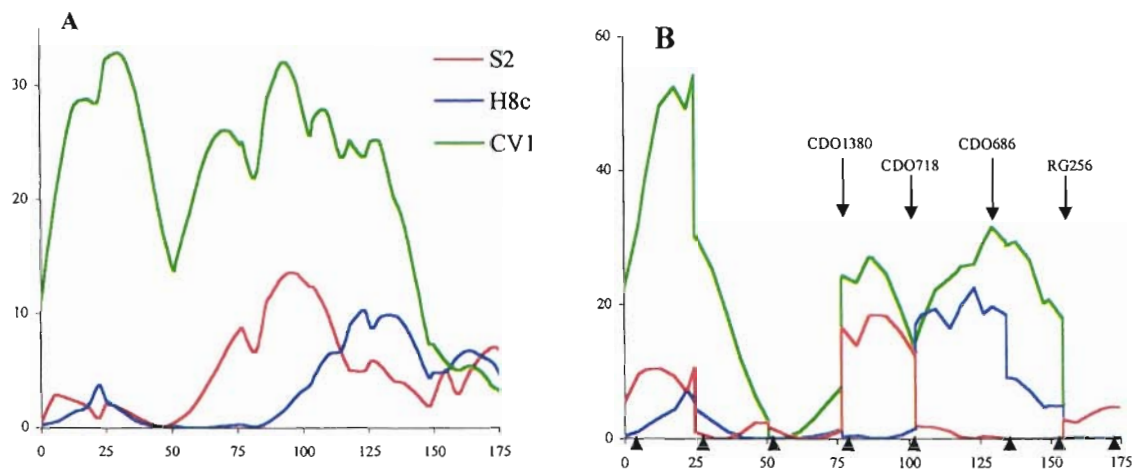


Figure 4.8. Position des QTL contrôlant la hauteur huit semaines après semis (H8c), le contenu en virus estimé avec le test ELISA "tardif" (CV₁) et les symptômes au champ (S2) sur le chromosome 2 d'après les méthodes de "Simple Interval Mapping" (A) et "Composite Interval Mapping" (B). La position des QTL est indiquée en cM à partir du premier marqueur du bras court du chromosome (en abscisse). Les marqueurs choisis comme cofacteurs en "Composite Interval Mapping" sont indiqués par des pointes de flèches noires sur l'axe des abscisses.

La majorité des critères de résistance est expliquée par un QTL cartographié à proximité du gène de semi-nanisme *sd-1*, où ont aussi été détectés des QTL impliqués dans le tallage fertile et la durée du cycle (Fig. 4.7.A). L'allèle d'Azucena au locus concerné est associé à une résistance élevée, une grande taille et un tallage réduit. Nous avons essayé de préciser la position relative des différents QTL en « Composite Interval Mapping ». Pour chaque caractère, les marqueurs cartographiés au niveau des QTL détectés sur les autres chromosomes, ainsi que des marqueurs régulièrement répartis sur le chromosome 1, ont été sélectionnés comme cofacteurs. Avec cette méthode, le QTL de hauteur et le QTL de résistance semblent être localisés de part et d'autre du marqueur RZ14 (Fig. 4.7.B). Bien qu'il soit difficile de positionner précisément le QTL de tallage par rapport au marqueur RZ14, il est probable que le QTL de tallage soit localisé au niveau du QTL de résistance. Ainsi, la hauteur pourrait être contrôlée par un locus et le tallage et la résistance par un autre locus. Une population plus importante serait toutefois nécessaire pour préciser les positions relatives de ces QTL.

Sur le chromosome 2, l'intervalle localisé entre les marqueurs CDO686 et RG256 explique trois caractères : le contenu en virus (CV_1), l'expression des symptômes et la hauteur huit semaines après semis. L'allèle du parent Azucena est associé à une résistance élevée et une taille réduite. Nous avons montré précédemment que deux QTL expliquant CV_0 pourraient être localisés entre CDO1380 et RG256, de part et d'autre du marqueur CDO718. Par ailleurs, en « Simple Interval Mapping » comme en « Composite Interval Mapping », le QTL expliquant l'expression des symptômes apparaît localisé dans l'intervalle CDO1380-CDO718 tandis que le QTL de hauteur apparaît localisé dans l'intervalle CDO718-RG256 (Fig. 4.8.). On ne peut donc pas exclure la présence de deux QTL dans cette région du génome, l'un impliqué dans la hauteur et le contenu en virus et l'autre dans le contenu en virus et l'expression des symptômes.

On note également trois autres colocalisations sur les chromosomes 4 et 8. Sur le bras court du chromosome 4, un QTL impliqué dans l'impact de la maladie sur le poids des grains (PGr) est colocalisé avec un QTL impliqué dans la durée du cycle semis-épiaison (SEc) ; sur le bras long du chromosome 4, un QTL contrôlant le contenu en virus (CV_1) est colocalisé avec un QTL contrôlant la hauteur à maturité (HMc) ; enfin, sur le chromosome 8, un QTL expliquant le contenu en virus (CV_0) est localisé au niveau d'un QTL potentiel de tallage. Pour ces trois colocalisations, les méthodes de cartographie utilisées ne permettent pas de différencier les positions relatives des QTL.

3. ETUDE FINE DU QTL DU CHROMOSOME 12

Le QTL de résistance cartographié sur le chromosome 12, QTL12h, est apparu particulièrement stable dans différents environnements et différents fonds génétiques : il est impliqué dans l'expression des symptômes au champ et dans l'accumulation du virus dans les plantes en conditions contrôlées, et a été mis en évidence dans la population IR64/Azucena et la population IRAT177/Apura. En outre, aucun QTL impliqué dans la morphologie des plantes n'a été détecté dans cette région. Ce QTL constitue donc, *a priori*, un bon candidat pour améliorer le niveau de résistance des variétés de riz de type *indica*, sans modifier leurs caractéristiques agronomiques.

Dans le but d'exploiter ce QTL12h pour augmenter le niveau de résistance des variétés *indica*, nous avons dans un premier temps étudié finement ses interactions avec le reste du génome dans la population IR64/Azucena et dans un deuxième temps initié son introgression dans la variété IR64 par rétrocroisements.

3.1. Etude des interactions entre le QTL du chromosome 12 et le reste du génome

3.1.1. Stratégie utilisée

Nous avons recherché les interactions entre le marqueur RG869, cartographié au niveau du QTL12h, et tous les autres marqueurs du génome. Cette étude a été réalisée, pour chacun des caractères agro-morphologiques et des critères de résistance présentés précédemment, à l'aide du logiciel SAS (Proc GLM, Type III). Les interactions significatives au seuil $p < 0,001$ ont été retenues. Ces interactions ont ensuite été validées en régression multiple selon un modèle prenant en compte les QTL détectés précédemment et les interactions :

$$P = \mu + \sum QTL_i + \sum (RG869 \times QTL_i) + \sum (RG869 \times M_i)_{p < 0,001}$$

où P représente le phénotype,

μ la moyenne du caractère,

$\sum QTL_i$ l'effet des différents QTL mis en évidence,

$\sum (RG869 \times QTL_i)$ l'effet des interactions entre RG869 et les marqueurs liés aux QTL détectés (même si elles sont non significatives au seuil $p < 0,001$),

$\sum (RG869 \times M_i)_{p < 0,001}$ l'effet des interactions entre RG869 et tout autre marqueur du génome significatives au seuil $p < 0,001$.

Dans ce modèle multi-marqueurs, tous les facteurs ne sont généralement pas significatifs. Une régression pas à pas nous a permis de ne conserver que les facteurs (QTL ou interactions) les plus explicatifs, significatifs au seuil $p < 0,05$ dans le modèle multi-marqueurs.

3.1.2. Les interactions retenues

Finalement, aucune interaction impliquant RG869 n'a été détectée pour expliquer l'ensemble des caractères morphologiques et les critères de résistance CV₂, S2, H8r, T8r, TMr. En revanche, des interactions ont été retenues pour expliquer l'impact de la maladie sur la durée du cycle (SEr) et la hauteur à maturité (HMr), ainsi que le contenu en virus estimé avec les tests « précoce » et « tardif » (CV₀ et CV₁).

L'impact de la virose sur la hauteur (HMr) est expliquée par deux interactions entre RG869 et RZ801 (QTL1) d'une part et RG869 et Pgi-2 (chromosome 6) d'autre part (Tab. 4.4.). L'effet additif strict de RZ801 (QTL1) n'est plus significatif dans le modèle global. Le modèle retenu explique 31% de la variance de HMr contre 17% expliqué précédemment par le modèle additif ne prenant en compte que les QTL. L'impact de la virose sur la durée du cycle semis-épiaison (SEr) est expliqué par le marqueur RZ801 (QTL1) et par une interaction entre RZ801 et RG869. Cette interaction est de type dupliquée : les plantes ayant l'allèle du parent Azucena à l'un ou l'autre locus sont résistantes. Le modèle prenant en compte l'interaction explique 36% de la variance, contre 15% pour le modèle ne prenant en compte que les QTL à effet additif. Le contenu en virus CV₀ est expliqué par les QTL mis en évidence précédemment ainsi que par une interaction entre RG171 (QTL2h) et RG869, cette interaction explique toutefois une faible part de la variance (6%). Enfin, le contenu en virus CV₁ est expliqué par le QTL4b (RG214) et une interaction majeure entre RG869 et le marqueur CDO418 cartographié sur le chromosome 7, dans la région du QTL7 impliquée dans le tallage (Tab. 4.4.). Cette interaction explique une part importante de la variance (37%) et elle est de type complémentaire : les plantes ayant l'allèle d'Azucena aux deux locus sont résistantes tandis que les autres sont sensibles. L'effet additif de RG869 n'est plus significatif dans le modèle prenant en compte l'interaction.

En conclusion, plusieurs interactions entre le QTL12h et le reste du génome ont été mises en évidence et pourront influencer sur l'effet de ce QTL. Certaines interactions ont un effet très faible, par exemple l'interaction RG869 x RG171 qui explique le caractère CV₀ ; d'autres interactions sont de type dupliqué, par exemple l'interaction RG869 x RZ801 expliquant SEr. Ces interactions ne compromettent pas *a priori* l'effet du QTL12h sur la résistance, dans un fond génétique IR64. Par contre l'interaction RG869 (QTL12h) x CDO418 (QTL7) expliquant le caractère CV₀ est de type complémentaire : la résistance nécessite la présence de l'allèle du parent Azucena aux deux locus. Cette interaction est importante et devra être prise en compte lors de l'introgession du QTL12h dans la variété IR64.

3.2. Introgression du QTL12 dans IR64

Nous avons débuté la construction de lignées quasi-isogéniques à partir de rétrocroisements successifs entre une lignée donneuse possédant les allèles favorables au niveau des QTL7 et QTL12h,

Tableau 4.4. Mise en évidence d'interactions entre RG869 (QTL12h) et différents locus du génome pour expliquer la résistance au RYMV. Seuls les caractères pour lesquels des interactions impliquant RG869 ont été mises en évidence sont mentionnés dans ce tableau. Les seuils de détection (p) et le pourcentage de variance expliqué (R^2) par les différents facteurs (QTL ou interactions) ont été calculés avec un modèle ne prenant en compte que le facteur étudié et un modèle prenant en compte l'ensemble des facteurs retenus. Les moyennes phénotypiques des différentes classes de lignées sont indiquées.

Caractère	Locus (loc1 ou loc1 x loc2)	Modèle à 1 facteur		Modèle multi-facteurs			Moyennes phénotypiques			
		p	R^2	p	R^2	R^2 total	Allèle IR64 (loc1)		Allèle Azucena (loc1)	
							IR64 (loc2)	Azu (loc2)	IR64 (loc2)	Azu (loc2)
HMr	RG869 (QTL12h) x RZ801 (QTL1)	0,0079	14	0,0011	16	31	0,79	0,87	0,81	0,84
	RG869 (QTL12h) x Pgi-2 (chr. 6)	0,0035 ^a	15	0,0061	12		0,80	0,87	0,88	0,80
SEr	RG869 (QTL12h) x RZ801 (QTL1)	<0,0001	36	<0,0001	18	36	1,16	1,07	1,09	1,09
	RZ801 (QTL1)	<0,0001	17	0,0003	12		1,13		1,08	
CV0	RZ801 (QTL1)	<0,0001	14	<0,0001	14	61	0,26		-0,48	
	CDO686 (QTL2b)	<0,0001	16	<0,0001	19		0,28		-0,29	
	RG171 (QTL2h)	0,003	8	<0,0001	9		0,28		-0,30	
	R662 (QTL8)	<0,0001	9	0,0009	6		0,20		-0,42	
	RG869 (QTL12h)	<0,0001	10	<0,0001	12		0,29		-0,35	
	RG869 (QTL12) x RG171 (QTL2h)	0,0004	16	0,0010	6		0,89	-0,22	-0,12	-0,40
CV1	RG869 (QTL12h) x CDO418 (QTL7)	<0,0001	36	<0,0001	37	47,5	0,21	0,40	0,01	-1,15
	RG214 (QTL4b)	0,0131 ^b	10	0,0046	11		-0,43		0,25	

^a L'interaction RG869 x Pgi-2 est significative au seuil $p < 0,001$ dans une analyse de variance à deux facteurs avec interaction.

^b Le marqueur RG620, à proximité de RG214 est significatif au seuil $p < 0,001$ mais le marqueur RG214 a été retenu car il correspond au LOD score maximum et il est plus explicatif dans le modèle multi-marqueurs.

et la variété IR64. Les principaux objectifs de ce travail sont de confirmer l'effet du QTL12h et l'interaction entre le QTL12h et le QTL7 dans un fond génétique plus homogène de type *indica*, de préciser la localisation du QTL12h à partir de plantes recombinées et à plus long terme, si l'effet des QTL sur la résistance est confirmé, de disposer d'une variété *indica* partiellement résistante au RYMV.

3.2.1. Description du processus d'introgression

Pour initier ce processus d'introgression, nous avons sélectionné une lignée parmi les lignées HD de la population IR64/Azucena en fonction de son niveau de résistance et de son génotype. La lignée P303 a été choisie en raison (1) de son niveau de résistance élevé, (2) de la présence des allèles du parent Azucena aux locus RG869 (QTL12h) et CDO418 (QTL7), (3) de recombinaisons de part et d'autre de RG869 et (4) d'un taux élevé d'allèles provenant du parent IR64 aux autres locus (Fig. 4.9.).

Cette lignée a été croisée avec la variété IR64 et l'hybride F1 obtenu a été rétrocroisé sur IR64. Vingt-huit plantes BC1 ont été obtenues et cultivées en serre. Ces plantes ont tout d'abord été caractérisées avec les marqueurs RG869 (QTL12h) et BNL16-06 (QTL7) afin de sélectionner les plantes possédant l'allèle du parent Azucena pour les deux locus. La sonde BNL16-06 a été utilisée en raison de l'absence de la sonde CDO418 au laboratoire ; BNL16-06 est une sonde génomique de maïs, elle se cartographie sur la population IR64/Azucena à 5,3 cM de CDO418 (Doligez, non publié). Par ailleurs, les plantes BC1 ont été sélectionnées sur la base de cinq autres marqueurs RFLP, deux marqueurs microsatellites et un marqueur phénotypique (gène C, chromogène pour l'anthocyanine, sur le chromosome 6 ; Kinoshita, 1995). Ces marqueurs sont répartis sur les régions du génome pour lesquelles la lignée P303 a le génotype du parent Azucena. La sélection des plantes possédant l'allèle du parent IR64 pour ces marqueurs a pour objectif un retour accéléré au parent IR64.

La plante BC1 303-17 a finalement été sélectionnée pour poursuivre le processus d'introgression : cette plante possède l'allèle d'Azucena aux marqueurs RG869 et BNL16-06 et l'allèle d'IR64 sur six des huit autres locus testés (Fig. 4.9.).

3.2.2. Première étape de la validation de l'interaction RG869 x CDO418

L'effet de l'interaction QTL12h x QTL7 sur le contenu en virus a été testé à partir de la descendance de deux plantes BC1 : la descendance de la plante 303-17, en ségrégation pour les marqueurs RG869 et BNL16-06, et la descendance de la plante 303-0, en ségrégation pour le marqueur RG869 mais fixée au marqueur BNL16-06. Les plantes de ces descendance ont été testées individuellement par test ELISA, suivant le protocole du test « tardif » qui a permis de mettre en évidence l'interaction.

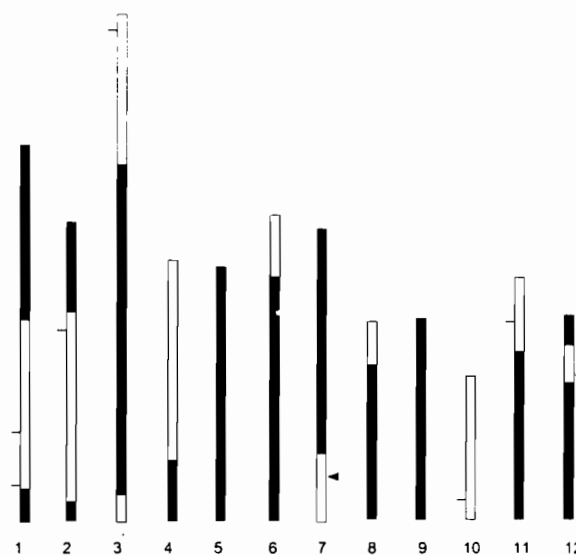


Figure 4.9. Génotype de la lignée HD P303. Les allèles aux marqueurs cartographiés sur les régions indiquées en noir proviennent du parent IR64, tandis que les allèles aux marqueurs cartographiés sur les régions indiquées en blanc proviennent du parent Azucena. Les pointes de flèches noires indiquent les régions des chromosomes 7 et 12 agissant en interaction pour expliquer le contenu en virus. Les traits horizontaux sur la gauche des chromosomes indiquent les marqueurs pour lesquels l'allèle du parent IR64 est présent dans la plante BC1 303-17.

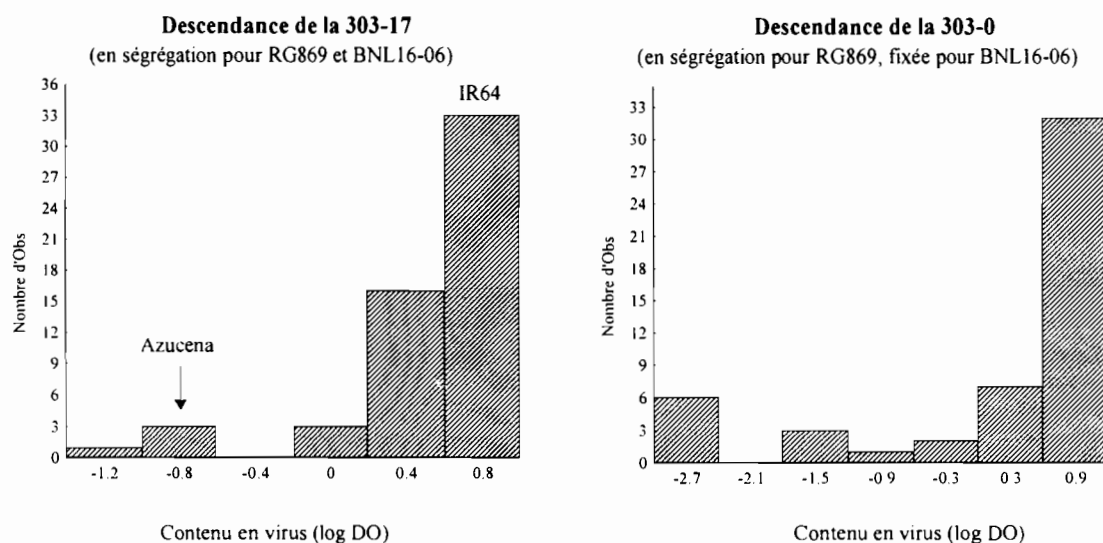


Figure 4.10. Distribution du contenu en virus, estimé avec le test ELISA « tardif », dans les descendance des plantes 303-0 et 303-17. La descendance de la plante 303-17 est en ségrégation pour les marqueurs RG869 et BNL16-06 ; les plantes résistantes sont hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle du parent Azucena aux deux locus, suggérant que, dans cette descendance, la résistance est liée à l'interaction QTL7 x QTL12. La descendance de la plante 303-0 est en ségrégation pour le marqueur RG869 mais fixée pour l'allèle de IR64 au marqueur BNL16-06 ; les plantes résistantes sont quelconques pour le marqueur RG869, suggérant qu'en l'absence de l'allèle d'Azucena au marqueur BNL16-06, le marqueur RG869 n'explique plus le contenu en virus.

Les deux descendance sont en ségrégation pour la résistance ; quelques plantes sont très résistantes tandis que la majorité est sensible (Fig. 4.10.). Les plantes résistantes ont été caractérisées avec le marqueur RG869, ainsi qu'avec le marqueur BNL16-06 pour la descendance de la plante 303-17. Parmi les 12 plantes les plus résistantes de la descendance de la 303-0, la ségrégation de RG869 est quelconque. Ceci suggère qu'en l'absence de l'allèle d'Azucena au locus BNL16-06, la résistance n'est pas liée à la présence de l'allèle du parent Azucena au locus RG869. En revanche, les quatre plantes les plus résistantes de la descendance de la 303-17 sont hétérozygotes ou homozygotes pour l'allèle d'Azucena aux locus RG869 et BNL16-06. Ainsi, lorsque les deux QTL sont en ségrégation, la résistance semble liée à la présence des allèles du parent Azucena aux deux QTL. Ce résultat est en faveur de l'interaction QTL12h x QTL7.

Des expérimentations sont en cours au laboratoire pour confirmer ces résultats sur des effectifs plus importants.

4. DISCUSSION

4.1. Rappel des principaux résultats

La cartographie de QTL de résistance dans deux populations de lignées HD issues de croisements *indica* x *japonica* pluvial nous a permis de préciser les bases génétiques de la résistance partielle au RYMV. Cette étude a mis en évidence la complexité de la résistance : dans la population IR64/Azucena, au moins huit régions du génome sont impliquées dans son expression. L'allèle favorable provient du parent *japonica* pluvial, Azucena, pour tous les QTL à l'exception d'un QTL à effet mineur cartographié sur le chromosome 4. Trois régions des chromosomes 1, 2 et 12 sont impliquées dans l'expression de plusieurs critères de résistance et ont été détectées dans différents environnements. En outre, le QTL cartographié sur le chromosome 12 (QTL12h), à proximité du marqueur RG869, est également présent dans la population IRAT177/Apura. Dans la population IR64/Azucena, des interactions ont été mises en évidence entre le QTL12h et le reste du génome. En particulier, une interaction de type complémentaire avec une région du chromosome 7, QTL7, explique une part importante du contenu en virus estimé avec le test « tardif » en conditions contrôlées. Cette interaction a été prise en compte lors de l'introgession du QTL12h dans un fond génétique IR64 et les premiers résultats confirment son effet. Par ailleurs, plusieurs régions sont impliquées à la fois dans l'expression de la résistance et l'expression de caractères morphologiques. Sur le chromosome 1, en particulier, le gène de semi-nanisme *sd-1* est cartographié dans une région liée à la résistance. En revanche, aucun QTL de morphologie n'a été mis en évidence au niveau du QTL12h.

4.2. Déterminisme génétique de la résistance

La distribution des différents caractères étudiés, à l'exception du contenu en virus estimé avec le test ELISA « tardif », suggère un déterminisme polygénique de la résistance (Chapitre II, §2.2. et §2.3.). Il est donc surprenant de constater qu'un seul QTL a été détecté pour expliquer certains critères de résistance, notamment l'impact du RYMV sur les composantes agro-morphologiques, dans la population IR64/Azucena. Ce résultat est probablement imputable à la présence de QTL à effets faibles ou d'interactions difficiles à détecter pour des caractères parfois peu héritable et avec un effectif limité à environ 100 lignées. Effectivement, le contenu en virus estimé avec le test « précoce » est le caractère le plus héritable et évalué sur le plus grand nombre de lignées, et ce caractère est aussi celui qui permet de détecter le plus grand nombre de QTL. Dans la population IRAT177/Apura, le faible polymorphisme entre les parents et l'état de la carte génétique peuvent également avoir limité la détection de certains QTL. Quoiqu'il en soit, la distribution des caractères et les QTL détectés avec l'ensemble des critères de résistance indiquent un déterminisme génétique complexe.

Des QTL expliquant divers critères de résistance sont cartographiés dans une même région des chromosomes 1, 2 et 12. Bien que nous ne puissions pas exclure l'hypothèse d'une liaison génétique entre plusieurs QTL, nous avons supposé qu'un seul facteur de résistance était sous-jacent à l'identification de ces QTL. Ces QTL apparaissent particulièrement stables avec des critères de résistance différents (contenu en virus, symptômes, impact de la maladie sur des composantes agro-morphologiques) et dans des conditions environnementales différentes. Bien qu'aucune interaction majeure isolat de RYMV x variété n'ait été rapportée, il est intéressant de noter que ces QTL ont été mis en évidence avec deux ou trois isolats viraux différents. Cette observation souligne l'intérêt particulier de ces QTL pour l'étude de la résistance au RYMV. Les QTL2h, QTL4h, QTL4b, QTL8, QTL9b n'ont, en revanche, été détectés qu'avec un seul critère de résistance. Ce résultat n'est pas lié au choix d'un seuil trop sévère puisque, même au seuil $p < 0,05$, ces QTL ne sont pas déclarés significatifs pour expliquer la majorité des critères de résistance. Plusieurs hypothèses sont susceptibles d'expliquer ce résultat : un faible effet de ces QTL, des interactions QTL x environnement ou l'effet spécifique des QTL sur certains critères de résistance. La dernière hypothèse est particulièrement intéressante à étudier pour mieux comprendre les mécanismes de résistance. Ainsi, chez le piment, Lefebvre et Palloix (1996) ont détecté des jeux de QTL différents impliqués dans les différentes étapes de l'interaction avec *P. capsici* ; de même, Danesh *et al.* (1994) ont mis en évidence des QTL de résistance de la tomate à *R. solanacearum* dépendant du mode d'inoculation de la bactérie. Dans notre cas, nous ne pouvons pas exclure que certains QTL soient plus spécifiquement impliqués dans l'expression des symptômes ou dans l'accumulation du virus dans la plante ; cependant, des expérimentations complémentaires seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

L'intérêt particulier du QTL12h nous a amené à l'étudier plus précisément et plusieurs épistasies ont été mises en évidence entre RG869 (QTL12h) et le reste du génome. De nombreux

auteurs se sont demandés pourquoi, contrairement à ce que suggéraient les études de génétique classique, un faible nombre d'interactions entre marqueurs étaient détectées (Edwards *et al.*, 1987 ; Paterson *et al.*, 1988 ; Paterson *et al.*, 1991 ; Stuber *et al.*, 1992 ; Tanksley, 1993). Tanksley (1993) note que la recherche d'épistasie est généralement peu puissante, en raison notamment d'un nombre considérable d'interactions potentielles, recherchées dans des populations de taille limitée ; souvent le nombre d'interactions détectées n'est pas différent du nombre d'interactions dues au hasard. C'est pourquoi, dans notre étude, nous n'avons recherché que les épistasies impliquant RG869 : nous avons détecté des interactions potentielles avec un seuil peu sévère puis, comme ont procédé Li *et al.* (1997), nous les avons confirmées en régression multiple. Cette approche ne nous permet pas de détecter toutes les interactions, mêmes majeures, impliquées dans la résistance, mais elle nous renseigne sur les interactions entre le QTL12h et le fond génétique et donc sur l'intérêt de l'introgression de ce QTL dans un fond génétique *indica*. Parmi les quatre épistasies détectées, la plus importante est de type complémentaire et explique environ 37% du contenu en virus en conditions contrôlées estimé avec le test ELISA « tardif ». Cette épistasie est confirmée par l'étude de la résistance dans la descendance de la plante 303-17. Il peut paraître surprenant que certaines plantes de la descendance de la plante 303-0 soient également résistantes, en l'absence de l'allèle favorable au QTL7 ; probablement, le niveau de résistance élevé de ces plantes doit être lié à la présence d'autres facteurs de résistance, confirmant le caractère polygénique et la complexité de la résistance. En outre, l'épistasie QTL7 x QTL12h n'est détectée que pour un critère de résistance et ceci suggère que le QTL12h conserve un effet additif au moins dans certaines conditions d'évaluation.

4.3. La résistance et la morphologie

La relation entre le niveau de résistance et le groupe génétique des différentes variétés, puis les corrélations phénotypiques observées entre la résistance et certaines composantes morphologiques, nous ont amenés à comparer les bases génétiques de la résistance et les bases génétiques de ces composantes morphologiques.

La localisation des différents QTL expliquant les caractères morphologiques que nous avons étudiés est cohérente avec ce qui a été observé dans d'autres études. En particulier, dans la population IR64/Azucena, Huang *et al.* (1996) ont détecté des QTL de hauteur dans les mêmes régions des chromosomes 1, 2, 3 et 4. De même, dans le croisement *indica* x *japonica* Lemont x Teqing, Li *et al.* (1995b) ont détecté des QTL impliqués dans la durée du cycle et/ou la hauteur des plantes sur les chromosomes 2, 3 et 9, au niveau des QTL que nous avons détectés pour expliquer les mêmes caractères.

Parmi les neuf régions qui expliquent certains caractères agro-morphologiques, cinq sont impliquées dans l'expression de plusieurs caractères, indiquant une liaison génétique entre des QTL ou un effet pléiotrope d'un seul QTL sur plusieurs caractères. Probablement, un seul gène ou groupe de

gènes, sous-jacent à ces QTL, explique des caractères aussi proches que la hauteur (ou le tallage) huit semaines après semis et à maturité. Mais nos résultats ne nous permettent pas de privilégier une des deux hypothèses pour expliquer des colocalisations de QTL impliqués dans l'expression de caractères différents. En revanche, des données bibliographiques peuvent nous apporter quelques informations sur la colocalisation de QTL impliqués dans le tallage et la durée du cycle avec le gène de semi-nanisme *sd-1*. Dans la population F2 issue du croisement entre les variétés Taichung Native 1, qui possède *sd-1*, et Peta, qui ne possède pas *sd-1*, Aquino et Jennings (1966) ne mettent pas en évidence de corrélation significative entre le tallage et la hauteur ($r=0,1$) et la date de floraison et la hauteur ($r=0,11$). De même, Hu (1973) ne note pas un tallage inférieur chez la variété Woo-gen, ne possédant pas *sd-1*, par rapport à la variété Deo-geo-woo-gen, possédant *sd-1* et dérivant probablement de Woo-Gen par mutation spontanée. Ces résultats suggèrent que, dans certains fonds génétiques, *sd-1* n'a pas d'effet pléiotrope sur le tallage et ils sont donc en faveur d'une liaison génétique entre *sd-1* et des QTL expliquant la durée du cycle semis-épiaison et le tallage dans la population IR64/Azucena.

L'étude des caractères agro-morphologiques nous a permis de préciser la relation entre la morphologie et la résistance. Nous avons vu au cours du chapitre précédent que la majorité des critères de résistance étaient corrélés au tallage : plus les plantes tallent, moins elles sont résistantes. En outre, les symptômes et le contenu en virus sont également corrélés à la hauteur des plantes. Dirlewanger *et al.* (1994) ont mis en évidence des bases génétiques communes à différents caractères morphologiques chez le pois et expliquant des corrélations phénotypiques. De même, nous observons des QTL de résistance et des QTL de morphologie colocalisés : cinq ou six régions du génome, cartographiées sur les chromosomes 1, 2, 4, 7 et probablement 8, sont impliquées à la fois dans la résistance et une ou plusieurs composantes morphologiques. Comme précédemment, ces colocalisations peuvent être dues à de la pléiotropie ou à des liaisons génétiques. Nous entendons ici par effet pléiotrope un effet direct d'un gène (ou groupe de gènes) sur une composante morphologique d'une part et la résistance d'autre part, ou un effet d'un gène sur la morphologie qui entraînerait indirectement un effet sur la résistance. Dans notre cas, il est peu probable que toutes les colocalisations observées soient liées à une liaison génétique, certaines colocalisations, au moins, doivent donc être dues à un effet pléiotrope.

Trois QTL de hauteur sont colocalisés avec des QTL de résistance malgré l'absence de corrélation phénotypique significative entre la hauteur et la résistance au champ. La résistance est associée à une plus grande taille au niveau du chromosome 1 et à une plus petite taille au niveau des chromosomes 2 et 4. Par conséquent, il est probable que les trois QTL de hauteur agissent sur la résistance *via* des mécanismes différents. La méthode de « Composite Interval Mapping » suggère que *sd-1* et le QTL de hauteur pourraient correspondre à des locus différents, ainsi, une liaison génétique entre *sd-1* et un QTL de résistance pourrait associer une grande taille à la résistance, tandis qu'une diminution de hauteur pourrait, de manière générale, avoir un effet positif sur la résistance, expliquant les colocalisations observées sur les chromosomes 2 et 4. Ces effets contradictoires de différentes

régions du génome expliqueraient l'absence de corrélation phénotypique entre hauteur et résistance au champ.

Par ailleurs, il semble que le tallage ait un effet défavorable sur la résistance : les deux caractères sont négativement corrélés, des QTL de résistance et de tallage sont colocalisés sur le chromosome 1, et une région du chromosome 7, impliquée dans le tallage, est en interaction avec le QTL12h pour expliquer le contenu en virus. Sur le chromosome 1, la méthode de « Composite Interval Mapping » ne permet pas de distinguer le QTL de tallage et le QTL de résistance, en outre les données bibliographiques sont en faveur d'une liaison génétique entre le QTL de tallage et *sd-1*. Un QTL de tallage, cartographié à proximité de *sd-1* mais distinct de *sd-1*, pourrait donc avoir un effet sur la résistance. L'analyse d'un nombre plus important de lignées recombinées dans cette région du génome ou l'étude d'une population en ségrégation pour *sd-1* mais dans laquelle le tallage est indépendant de la hauteur, comme la population Taichung Native/Peta (Aquino et Jennings, 1966), permettraient de vérifier cette hypothèse.

4.5. Avantages et limites des croisements *indica* x *japonica*

De manière générale, le riz est une espèce peu polymorphe et les populations *indica/japonica* sont largement utilisées en cartographie puisque seules des populations issues de croisements entre variétés éloignées permettent d'établir une carte génétique sans trop de difficultés. Effectivement, la carte génétique de la population IR64/Azucena, issue d'un croisement entre une variété *indica* caractéristique, obtenue à l'IRRI, et une variété *japonica* pluviale traditionnelle, présente peu de régions très pauvres en marqueurs.

Par ailleurs, le niveau de résistance au RYMV étant associé à la diversité génétique présente chez *O. sativa*, les populations issues de croisements *indica/japonica* nous sont apparues les plus favorables pour cartographier des QTL de résistance. Nous avons ainsi mis en évidence de nombreux facteurs de résistance en ségrégation dans la population IR64/Azucena. En outre, étant donné l'homogénéité des variétés au sein des différents groupes, une population *indica/japonica* pluvial est susceptible de refléter les principales caractéristiques de nombreuses populations *indica/japonica* pluvial. Ainsi, la relation entre la résistance au RYMV et la morphologie est très probablement à la base de la résistance partielle de toutes les variétés *japonica* pluviales. De même, le QTL12h, détecté dans deux populations pourrait jouer un rôle majeur dans la résistance partielle des variétés *japonica*. La structure génétique de l'espèce *O. sativa* et l'association d'un caractère à cette structure est donc, en première approche, un atout pour dégager les principales bases génétiques de ce caractère.

Cependant, le nombre important de caractères en ségrégation dans une population *indica/japonica* présente aussi des limites pour une telle étude. Ainsi, c'est sur la base de caractères morphologiques que les deux groupes de variétés ont initialement été distingués et de nombreux caractères morphologiques sont par conséquent en ségrégation dans les populations *indica/japonica*.

La cartographie de QTL de résistance au RYMV dans une telle population est susceptible de privilégier la détection de QTL impliqués dans la morphologie aux dépens de QTL indépendants de la morphologie. Or, les QTL liés à certaines composantes morphologiques sont difficiles à exploiter en sélection car la sélection au RYMV ne doit pas être contradictoire avec la sélection pour un meilleur rendement ou une meilleure adaptation aux conditions de culture. Par ailleurs, la sélection pour un caractère quelconque à partir d'un croisement *indica* x *japonica* est difficile en raison de la stérilité fréquente des hybrides *indica/japonica*, du fardeau génétique ou de la rupture d'associations favorables entre gènes. Il est souvent préférable de sélectionner à partir de croisements intra-groupes. Redoña et Mackill (1996), par exemple, ont préféré cartographier des QTL de vigueur de la plantule dans une population *japonica/japonica* afin de faciliter l'utilisation des QTL identifiés en sélection.

L'étude d'une population *indica/japonica* peut donc apporter des informations essentielles, comme nous l'avons vu ici, et constitue souvent une première étape dans la cartographie de QTL contrôlant un caractère. Il est cependant important d'interpréter les résultats obtenus en tenant compte de la structure *indica/japonica* et éventuellement d'approfondir ces résultats par une étude dans un fond génétique plus homogène, soit, comme nous sommes actuellement en train de le faire, à partir de lignée en voie d'isogénisation, soit grâce à des croisements entre variétés du même groupe génétique.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence une composante majeure de la résistance au RYMV liée à la morphologie. Cette observation est essentielle pour la compréhension des mécanismes de résistance mais suggère qu'il sera difficile d'améliorer le niveau de résistance des variétés *indica* sans modifier leurs caractéristiques agro-morphologiques. Un effort devra donc être entrepris pour identifier des QTL peu ou pas impliqués dans la morphologie. Des QTL identifiés sur les chromosomes 2, 9 et 12 semblent présenter cette caractéristique. Le QTL12h, en particulier, est un des principaux QTL de résistance. Il constitue donc *a priori* un bon candidat pour améliorer le niveau de résistance de certaines variétés et son étude sera poursuivie.

CHAPITRE V
RESISTANCE ET DIVERSITE GENETIQUE

CHAPITRE V :

RESISTANCE ET DIVERSITE GENETIQUE

Dans le chapitre précédent, plusieurs QTL de résistance au RYMV ont été mis en évidence. En particulier, un QTL (QTL12h) a été cartographié sur le chromosome 12. Ce QTL a été détecté dans deux populations et avec plusieurs critères de résistance. En outre, c'est un des seuls QTL de résistance qui ne soit pas colocalisé avec des QTL impliqués dans la morphologie.

Nous avons montré dans le Chapitre III que la résistance au RYMV était étroitement liée à la diversité morphologique chez *O. sativa*. Nous savons par ailleurs que de nombreux marqueurs RFLP reflètent la différenciation *indica/japonica* ; ceci a été montré, en particulier, par Second et Ghesquière (1995) sur une collection de variétés présentant un important noyau commun avec la nôtre. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier précisément la diversité génétique à l'aide de marqueurs cartographiés dans une région de quelques centimorgans au niveau du QTL12h.

Notre objectif est (1) d'analyser la diversité en terme de structuration *indica/japonica* à partir de plusieurs locus cartographiés sur un intervalle de quelques centimorgans, (2) d'étudier si la diversité révélée par des locus très proches, présentant *a priori* peu de recombinaisons, peut apporter des informations complémentaires sur la délimitation du QTL12h et sa distribution au sein de la collection.

1. RAPPEL DE LA STRUCTURE DE LA DIVERSITE RFLP CHEZ *O. SATIVA*

Second et Ghesquière (1995) ont étudié la diversité d'une collection de 148 variétés de riz à l'aide de 200 marqueurs RFLP. Cette étude leur a permis de connaître la répartition des zones monomorphes chez *O. sativa* et de voir comment cette répartition confortait l'hypothèse d'une origine hybride des riz cultivés.

Les variétés avaient été choisies afin de décrire la diversité génétique chez *O. sativa* sans l'associer *a priori* à la diversité d'intérêt agronomique (Chapitre I, §1.1.). Les sondes sélectionnées étaient des sondes cartographiées dans le croisement interspécifique (Causse *et al.*, 1994) et chaque sonde a été hybridée sur l'ADN des différentes variétés, digéré avec une enzyme de restriction. Dans la majorité des cas, l'enzyme retenue pour la cartographie a été utilisée.

Cinquante-quatre marqueurs (soit 26,4%) se sont révélés monomorphes. Parmi les marqueurs polymorphes, la majorité a permis de détecter deux allèles fréquents et éventuellement des allèles

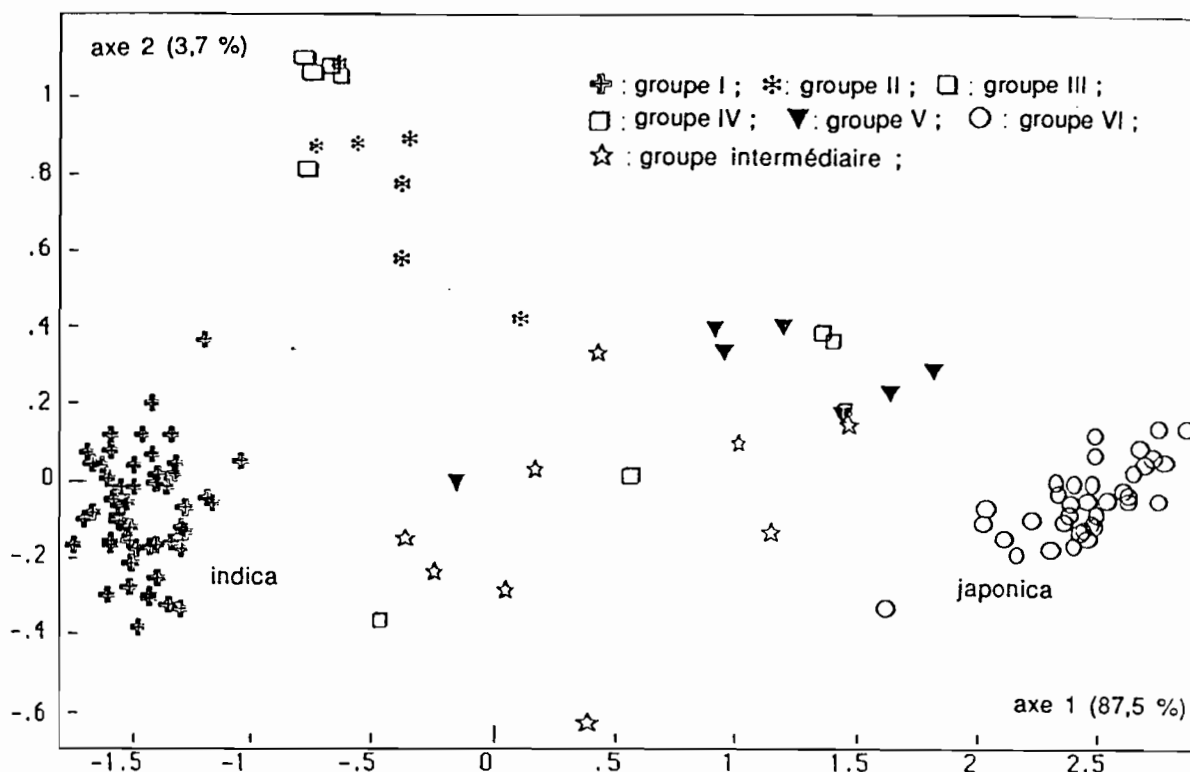


Figure 5.1. Diversité RFLP chez *O. sativa* : axes 1 et 2 d'une analyse en composantes principales réalisée à partir de la matrice de similarité (proportion de bandes communes) entre 147 accessions d'*O. sativa* analysées avec 197 marqueurs RFLP. Les variétés sont classées suivant les six groupes iso-enzymatiques définis par Glazsmann (1987) (d'a près Second et Ghesquière, 1995).

rares. Cette étude a mis en évidence que la distribution des sondes monomorphes sur le génome n'était pas aléatoire mais correspondait probablement à des zones de moindre diversité RFLP chez *O. sativa*. Effectivement, des groupes de sondes monomorphes correspondent à des régions cartographiées dans la carte interspécifique mais non cartographiées dans les premières versions des cartes génétiques établies à partir de croisements intraspécifiques (Saito *et al.*, 1991, cité par Second et Ghesquière, 1995).

Par ailleurs, une analyse en composantes principales a été réalisée à partir de la matrice de similarité (Fig. 5.1.). L'axe 1 rend compte de la quasi totalité de l'inertie (87,5%) et oppose deux groupes principaux auxquels se détachent quelques variétés intermédiaires. Il existe une excellente correspondance entre ces deux groupes extrêmes et les groupes I et VI, respectivement *indica* et *japonica*, définis par Glaszmann (1987) à partir du polymorphisme de 15 locus iso-enzymatiques. La fréquence des différents allèles à chaque locus montre un contraste très net entre les deux groupes : pour la majorité des locus où deux allèles sont observés, un des allèles est fréquent dans un groupe et rare dans l'autre et l'inverse est observé pour le deuxième allèle. Ceci permet de considérer ces allèles comme des allèles « *indica* » ou « *japonica* » suivant qu'ils caractérisent un groupe ou l'autre. Ces résultats sont en accord avec d'autres études de diversité génétique chez le riz ayant également permis de mettre en évidence des marqueurs RFLP différenciant les deux groupes génétiques (Zhang *et al.*, 1992 ; Zheng *et al.*, 1994 ; Qian *et al.*, 1995).

2. ANALYSE DE LA DIVERSITE GENETIQUE SUR LE CHROMOSOME 12

2.1. La stratégie utilisée

2.1.1. Les variétés et les locus étudiés

Nous avons étudié la diversité génétique au niveau du QTL12h sur la collection variétale évaluée pour la résistance (Chapitre II, §1.1. et Chapitre III, §1.). Cette collection comprend 51 variétés *indica*, 61 variétés *japonica* et 21 variétés des groupes iso-enzymatiques II et V. L'appartenance des variétés au groupe *japonica* ou *indica* a été déterminée à partir de l'évaluation de Glaszmann (1987) sur 15 locus iso-enzymatiques et/ou l'évaluation de Second et Ghesquière (1995) à partir de 200 marqueurs RFLP ; ces variétés ont également été caractérisées à l'aide de marqueurs microsatellites (Patry, travaux en cours au laboratoire).

Cette collection de variétés a été étudiée pour le polymorphisme de longueur des fragments de restriction obtenu avec 20 couples enzyme/sonde dans la région du QTL12h : sept enzymes pour la sonde RG869 et trois ou quatre enzymes pour chacune des sondes G1391, RG341, O10₈₀₀ et Y6854r. Pour ces quatre dernières sondes, nous avons choisi en priorité des enzymes révélant du polymorphisme au sein de dix variétés *indica* et *japonica* utilisées lors de tests préliminaires. La

moitié des variétés ont été caractérisées avec 16 couples enzyme/sonde uniquement. Dans la population IR64/Azucena, ces cinq sondes sont cartographiées dans un intervalle de 10 cM au niveau du QTL12h.

Par ailleurs, nous avons exploité les résultats obtenus par Second et Ghesquière (1995) pour 12 sondes RFLP cartographiées sur l'ensemble du chromosome 12. La collection de Second et Ghesquière et notre collection présentent un noyau commun de 88 variétés.

Par la suite, nous considérerons que chaque couple enzyme/sonde définit un locus. Des locus très proches sont mis en évidence par une seule sonde et plusieurs enzymes, et des locus généralement séparés d'au moins 1 cM sont révélés par des sondes différentes.

2.1.2. Les méthodes d'analyse

a) Estimation des déséquilibres de liaison

Nous avons estimé les déséquilibres de liaison normalisés (D_n) entre allèles. Ces déséquilibres de liaisons normalisés ont été calculés pour des locus au niveau desquels deux allèles majoritaires ont été observés et seules les variétés présentant des allèles fréquents aux deux locus considérés ont été prises en compte. Nous nous sommes donc ramenés à des déséquilibres de liaison entre des locus présentant deux allèles. Ces déséquilibres de liaison sont estimés par l'expression :

$$D = p_{AB} \times p_{ab} - p_{Ab} \times p_{aB}$$

$$D_n = D / \sqrt{(p_A \times p_a \times p_B \times p_b)}$$

où A et a sont les deux allèles majoritaires au locus 1,

B et b les deux allèles majoritaires au locus 2,

p la fréquence des variétés présentant le (ou les) allèle(s) indiqué(s) en indice.

D_n prend les valeurs 0 pour des locus indépendants et 1 pour des locus colinéaires. Il se comporte comme un coefficient de corrélations et a été considéré significativement différent de zéro lorsque :

$$D_n^2 > 3,84/n \text{ (au seuil } p < 0,05) \text{ ou } D_n^2 > 6,63/n \text{ (au seuil } p < 0,01)$$

où n est le nombre d'individu pris en considération (Brown, 1975).

b) Estimation de la diversité génétique

Nous avons estimé la diversité génétique au sein d'un groupe x de variétés à l'aide de l'expression (Nei, 1973) :

$$H_x = 1 - \sum f_i^2$$

où f_i est la fréquence de l'allèle i dans le groupe x.

Cette diversité a été déterminée pour le groupe de variétés *indica* (H_{ind}), le groupe de variétés *japonica* (H_{jap}) et l'ensemble de ces deux groupes (H_{ij}).

La diversité moyenne intra-groupe est estimée par :

$$H_{x \text{ moy}} = (n_{ind} \times H_{ind} + n_{jap} \times H_{jap}) / (n_{ind} + n_{jap})$$

où n_{ind} et n_{jap} sont les effectifs des groupes *indica* et *japonica*.

La différenciation entre les groupes *indica* et *japonica* est alors exprimée sous la forme (Nei, 1987) :

$$G_{st} = (H_{ij} - H_{x \text{ moy}}) / H_{ij}$$

Afin de savoir si la différenciation entre les groupes *indica* et *japonica* était significative, nous avons effectué un ré-échantillonnage aléatoire des variétés au sein des groupes, comme l'ont décrit Zhang *et al.* (1992). Nous avons distribué de manière aléatoire les variétés dans deux groupes comprenant respectivement 51 et 61 variétés (de même que les groupes *indica* et *japonica*) et nous avons calculé la différenciation entre les deux groupes pour chaque couple enzyme/sonde. Cette procédure a été répétée 1000 fois. Si une différenciation entre les groupes de variétés randomisées supérieure à la différenciation observée entre les groupes *indica* et *japonica* a été observée dans moins de 1% ou 0,1% des cas, nous avons considéré la différenciation *indica/japonica* significative au seuil $p < 0,01$ ou $p < 0,001$.

c) Analyse factorielle des correspondances

Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été réalisée en utilisant un modèle disjonctif complet sur les allèles mis en évidence par les cinq sondes cartographiées au niveau du QTL12h. Seuls les allèles fréquents, présents chez plus de 6% des variétés, ont été pris en considération. Dans un premier temps, l'AFC a été effectuée à partir des variétés *indica* et *japonica* ne présentant aucune donnée manquante. Dans un deuxième temps, les variétés *indica* et *japonica* présentant des données manquantes ainsi que les variétés des groupes iso-enzymatiques II et V ont été ajoutées en individus supplémentaires. Cette analyse a été réalisée sur le logiciel Statistica V5.0.

Tableau 5.1. Déséquilibres de liaison normalisés entre les différents locus du chromosome 12 utilisés pour caractériser la collection variétale. Seuls les locus révélant deux allèles fréquents ont été pris en considération. Les allèles rares ont été considérés comme données manquantes. Les déséquilibres de liaison, significatifs aux seuils $p < 0,05$ et $p < 0,01$ sont notés respectivement par * et **. Les déséquilibres de liaison entre des locus révélés par une même sonde et différentes enzymes sont notés en gras.

Sondes		RZ816	G1391		RG341		RG869				O10 ₈₀₀			Y6854r		RZ76	RG901
	Enzymes	Xba I	Eco RV	Sca I	Bam HI	Hind III	Sca I	Dra I	Eco RV	Hind III	Dra I	Eco RV	Sca I	Eco RI	Sca I	Eco RV	Xba I
G1391	Eco RV	0,13															
	Sca I	0,49**	0,55**														
RG341	Bam HI	0,43**	0,28**	0,55**													
	Hind III	0,51**	0,22*	0,57**	0,95**												
RG869	Sca I	0,44**	0,39**	0,88**	0,73**	0,68**											
	Dra I	0,51**	0,55**	0,83**	0,65**	0,65**	0,87**										
	Eco RV	0,54**	0,06	0,62**	0,47**	0,53**	0,76**	0,54**									
	Hind III	0,57**	0,34**	0,78**	0,62**	0,65**	0,94**	0,79**	0,80**								
O10 ₈₀₀	Dra I	0,41*	0,46**	0,85**	0,69**	0,69**	0,89**	0,95**	0,69**	0,76**							
	Eco RV	0,36**	0,40**	0,59**	0,51**	0,53**	0,62**	0,62**	0,41**	0,51**	0,95**						
	Sca I	0,29*	0,43**	0,44**	0,34**	0,33**	0,49**	0,47**	0,29**	0,52**	0,55**	0,72**					
Y6854r	Eco RI	0,02	0,23*	0,24*	0,30**	0,35**	0,24*	0,29**	0,08	0,18	0,49**	0,46**	0,17				
	Sca I	0,11	0,25*	0,29**	0,38**	0,39**	0,32*	0,35**	0,11**	0,19	0,49**	0,47**	0,22	1,00**			
RZ76	Eco RV	0,13	0,07	0,06	0,02	0,01	0,03	0,03	0,03	0,02	0,18	0,21	0,05	0,18	0,19		
RG901	Xba I	0,51**	0,19	0,81**	0,68**	0,78**	0,69**	0,72**	0,90**	0,74**	0,61**	0,56**	0,34**	0,09	0,16	0,18	
RG463	Bgl II	0,49**	0,30*	0,75**	0,65**	0,73**	0,70**	0,69**	0,72**	0,77**	0,79**	0,56**	0,44**	0,18	0,24	0,07	0,93**

2.2. Résultats

2.2.1. Estimation des déséquilibres de liaison

Trente couples enzymes/sondes, soit 30 locus localisés sur le chromosome 12, dont 20 dans la région du QTL12h, ont été utilisés. Parmi ces locus, six sont monomorphes chez plus de 90% des variétés. Pour les 24 locus révélant du polymorphisme, deux ou trois allèles fréquents et un ou deux allèles rares sont observés. Les déséquilibres de liaison normalisés ont été estimés. Nous avons comparé les déséquilibres de liaison entre des allèles mis en évidence par une seule sonde et des enzymes différentes, et entre des allèles mis en évidence par des sondes différentes.

Les déséquilibres de liaison normalisés entre des allèles mis en évidence avec une même sonde mais des enzymes différentes sont tous significatifs au seuil $p < 0,01$ (Tab. 5.1.). Par ailleurs, différents locus correspondant à une seule sonde révèlent souvent des profils alléliques proches. Par exemple, on observe un allèle dans le groupe *japonica* et deux allèles dans le groupe *indica* aux deux locus G1391/Bam HI et G1391/Eco RI ou deux allèles dans le groupe *japonica* et un allèle dans le groupe *indica* aux deux locus RG341/Bam HI et RG341/Hind III (ces locus présentant trois allèles fréquents n'ont pas été pris en compte lors du calcul des déséquilibres de liaison). Pour une sonde donnée, le polymorphisme mis en évidence avec une enzyme n'est donc pas indépendant du polymorphisme mis en évidence avec les autres enzymes, ceci est sans doute lié à des sites de restriction très proches limitant les possibilités de recombinaisons. Dans certains cas, on note cependant des déséquilibres de liaison assez faibles, bien que hautement significatifs, entre des allèles révélés avec une même sonde. Ainsi sur dix déséquilibres de liaison, trois sont inférieurs ou égal à 0,55.

Les déséquilibres de liaison normalisés entre des allèles mis en évidence par des sondes différentes sont souvent élevés (Tab. 5.1.). Ainsi, au niveau du QTL12h, les déséquilibres de liaison entre les allèles révélés par les sondes G1391, RG341, RG869 et O10₈₀₀ sont significatifs au seuil $p < 0,01$, malgré des distances génétiques de 7 cM entre G1391 et O10₈₀₀. De même, au niveau du chromosome entier, la majorité des déséquilibres de liaison sont significatifs, malgré des distances génétiques de 25 ou 50 cM entre les locus concernés. Ces déséquilibres de liaison très élevés suggèrent une très forte cohérence de la structure génétique au sein des groupes *indica* et *japonica* dans les régions considérées, et en particulier entre G1391 et O10₈₀₀. En revanche, les allèles aux locus Y6854r/Eco RI et Y6854/Sca I présentent un faible déséquilibre de liaison avec les allèles aux locus cartographiés à proximité du QTL12h ; de même, les allèles au locus RZ76/Eco RV ne sont en déséquilibre de liaison avec aucun des allèles observés aux autres locus.

Tableau 5.2. Diversité génétique au sein de la collection de variétés pour les marqueurs du chromosome 12. Pour chaque locus défini par un couple enzyme/sonde, le nombre de variétés *indica* et *japonica* (N_{ind} et N_{jap}), la diversité dans chaque groupe (H_{ind} et H_{jap}), la diversité totale (H_{ij}) et la différenciation entre les groupes (G_{st}) sont indiqués. Un échantillonnage aléatoire des variétés dans deux groupes a permis de tester si la différenciation entre les groupes *indica* et *japonica* était significative. Pour de nombreux locus du chromosome, et en particulier au niveau du QTL12h, la différenciation *indica/japonica* est très hautement significative.

sonde	enzyme	N_{ind}	H_{ind}	N_{jap}	H_{jap}	H_{ij}	G_{st}
RG574	BglII	65	0	37	0	0	-
CDO127	EcoRV	65	0,36	38	0	0,25	0,1
RZ816	XbaI	64	0,43	36	0	0,49	0,44***
RZ257	ScaI	67	0,21	38	0	0,14	-
RZ397	HindIII	66	0,42	37	0	0,31	0,14
G1391	BamHI	46	0,51	54	0,07	0,60	0,55**
	EcoRI	42	0,54	56	0,25	0,63	0,41**
	EcoRV	44	0,43	56	0,10	0,28	0,12**
	ScaI	45	0,12	57	0,16	0,52	0,72**
RG341	BamHI	46	0,16	54	0,48	0,47	0,28**
	HindIII	41	0,18	47	0,46	0,47	0,31**
	ScaI	41	0,18	53	0,51	0,64	0,43**
RG869	ScaI	67	0,09	38	0,00	0,48	0,89**
	BamHI	46	0,19	55	0,04	0,11	-
	DraI	34	0,06	46	0,12	0,50	0,81**
	EcoRI	31	0,00	20	0,00	0,00	-
	EcoRV	47	0,39	58	0,07	0,54	0,60**
	HindIII	44	0,35	56	0,10	0,47	0,55**
	XbaI	29	0,07	19	0,00	0,04	-
O10₈₀₀	DraI	26	0,21	18	0,28	0,58	0,59**
	EcoRV	47	0,36	58	0,43	0,54	0,27**
	ScaI	46	0,52	55	0,35	0,49	0,13**
Y6854	EcoRI	46	0,50	55	0,60	0,57	0,02
	EcoRV	30	0,06	19	0,27	0,15	-
	ScaI	43	0,50	54	0,60	0,57	0,04
RZ76	EcoRV	66	0,43	37	0,50	0,48	0,04
CDO344	HindIII	67	0,14	38	0	0,09	-
RG901x	XbaI	64	0	36	0,05	0,46	0,96**
RG463	BglII	58	0,03	32	0,12	0,45	0,86**
RG181	XbaI	66	0	37	0	0	-

Significatif au seuil $p < 0,01$ () ou $p < 0,001$ (**)

2.2.2. Différenciation entre les groupes *indica* et *japonica* sur le chromosome 12

a) Analyse de la différenciation entre les variétés *indica* et les variétés *japonica*

Pour chaque locus testé, nous avons étudié la diversité au sein des groupes *indica* et *japonica* et dans l'ensemble des variétés des deux groupes, puis nous avons estimé la différenciation entre les groupes.

Pour les locus polymorphes correspondants aux sondes CDO127, RZ397, Y6854r et RZ76, la diversité totale et la diversité au sein de chaque groupe sont en général élevées et la différenciation entre les groupes *indica* et *japonica* n'est pas significative (au seuil $p < 0,01$) (Tab. 5.2.). Les différents allèles sont donc présents indifféremment dans l'un ou l'autre groupe. En revanche, la différenciation *indica/japonica* est significative pour les autres locus. Dans ce cas, on observe soit deux ou trois allèles, chacun spécifique d'un groupe de variétés (par exemple pour les sondes RG869, RG901 et RG463), soit deux allèles dont l'un est spécifique d'un groupe de variétés et l'autre présent dans les deux groupes (par exemple pour la sonde RZ816). Tous les allèles permettant de différencier les variétés *indica* des variétés *japonica* sont en déséquilibre de liaison, quelle que soit la distance génétique entre les locus correspondants. En revanche, les allèles révélés avec les sondes Y6854r et RZ76, pour lesquels les déséquilibres de liaison avec les autres allèles s'étaient avérés faibles, ne sont pas explicatifs de la structure *indica/japonica*.

Par ailleurs, au sein du groupe de variétés *japonica*, aucun allèle ne permet de distinguer les variétés pluviales des variétés tempérées.

b) Etude de la diversité au niveau du QTL12h en Analyse Factorielle des Correspondances

L'AFC réalisée à partir des allèles fréquents identifiés au niveau du QTL12h confirme que, dans cette région du génome, la majeure partie de la diversité mise en évidence est structurée par les différences *indica/japonica* : l'axe 1 de l'AFC explique plus de 50% de la variabilité et permet de distinguer les variétés *indica* des variétés *japonica*, à l'exception de quelques variétés mal classées ou intermédiaires (Fig. 5.2.). Cet axe est expliqué par de nombreux allèles révélés par les sondes RG869, G1391, O10₈₀₀ et RG341. Par ailleurs, certains allèles mettent en évidence une diversité à l'intérieur des deux groupes principaux. Les allèles obtenus avec la sonde G1391 sont discriminants au sein des variétés *indica* et sont en grande partie explicatifs de l'axe 2 de l'AFC qui représente 15% de l'inertie (Fig. 5.2.). Les allèles obtenus avec la sonde RG341 sont discriminants au sein des variétés *japonica* et sont explicatifs de l'axe 3 (12% de l'inertie). Enfin, l'axe 4 de l'AFC (6% de l'inertie) est expliqué essentiellement par les allèles révélés par la sonde Y6854r. Certains allèles obtenus avec cette sonde sont spécifiques des variétés *japonica* mais les allèles les plus fréquents sont indifféremment répartis entre variétés *indica* et variétés *japonica*.

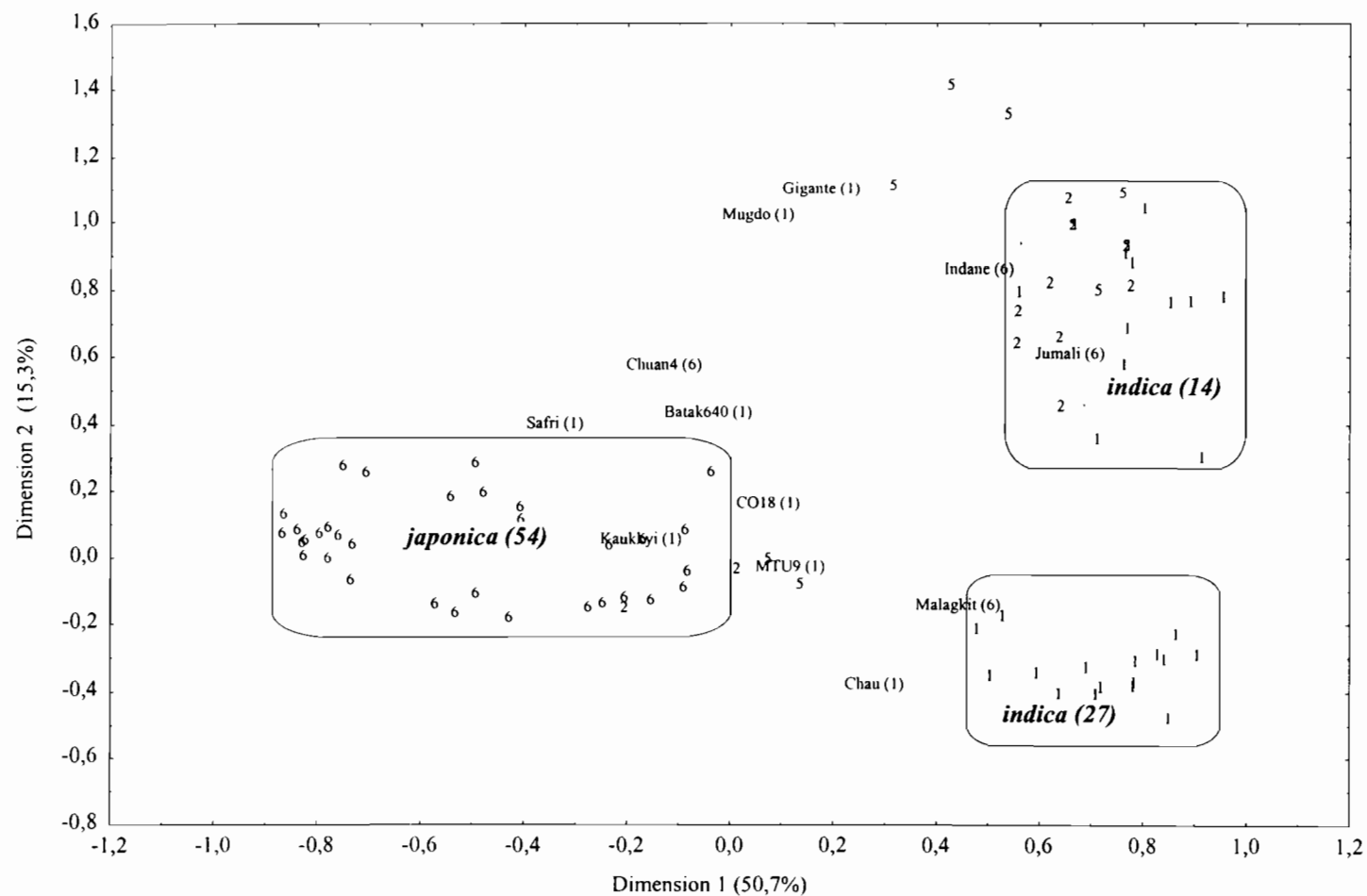


Figure 5.2. Analyse factorielle des correspondances (axes 1 et 2) sur la collection variétale. L'analyse a été réalisée à partir d'un modèle disjonctif incluant les allèles fréquents mis en évidence par les sondes G1391, RG341, RG869, O10₈₀₀ et Y6854r. Soixante-six variétés *indica* et *japonica* sans données manquantes ont été analysées dans un premier temps. Les autres variétés ont été ajoutées en individus supplémentaires. Les variétés sont représentées par le numéro de leur groupe iso-enzymatique, à l'exception des variétés *indica* et *japonica* qui se détachent des groupes principaux et pour lesquelles le nom est indiqué. L'axe 1 sépare nettement les variétés *indica* et les variétés *japonica* et l'axe 2 met en évidence deux groupes parmi les variétés *indica*.

En conclusion, les sondes RG869, G1391, RG341 et en moindre mesure O10₈₀₀ discriminent les variétés *indica* des variétés *japonica*. Une diversité intra-*indica* est mise en évidence grâce à la sonde G1391 et une diversité intra-*japonica* grâce à la sonde RG341. Enfin, la sonde Y6854 révèle un polymorphisme indépendant de la structure *indica/japonica*.

Certaines variétés *indica* ou *japonica* se détachent cependant des groupes principaux. Trois variétés *japonica* (Indane, Jumali et Malagkit-Pirurutong) sont classées parmi les variétés *indica* (coordonnée sur l'axe 1 >0,4), deux variétés *indica* (Kaukkyi-Ani et Safri) sont classées parmi les variétés *japonica* (coordonnées sur l'axe 1 <0) et six variétés *indica* (Gigante, Mugdo, Batak 640, CO 18, MTU 9 et Chau) ont une position intermédiaire sur l'axe 1. La position de ces variétés est due soit à la présence d'allèles rares, soit à la présence d'allèles caractéristiques de l'autre groupe génétique dans la région du QTL12h. Cette position ne remet pas en cause le classement de ces variétés dans les groupes *indica* ou *japonica*, ce classement ayant été établi sur la base de marqueurs répartis sur l'ensemble du génome.

On note que la plupart des variétés des groupes iso-enzymatiques II et V se superposent à un groupe de variétés *indica* séparées des variétés *japonica* suivant l'axe 1 et des autres variétés *indica* suivant l'axe 2. De manière générale, leur position est liée à une majorité d'allèles « *indica* », quelques allèles « *japonica* » et des allèles rares présents plus fréquemment chez ces variétés que chez les variétés *indica* ou *japonica*.

2.3. Conclusion

Pour une sonde donnée, les différentes enzymes ne révèlent pas des profils indépendants. Lorsqu'une enzyme révèle une différenciation *indica/japonica* significative, les autres enzymes mettent également en évidence une différenciation significative. Les résultats obtenus par Second et Ghesquière (1995) avec une enzyme par sonde reflète donc les résultats qui auraient été mis en évidence avec un nombre plus important d'enzymes. Sept sondes, sur 15 utilisées, mettent en évidence une différenciation *indica/japonica* significative. Ceci est en accord avec le nombre important de marqueurs de ce type mis en évidence par Second et Ghesquière (1995) et d'autres auteurs (Zhang *et al.*, 1992 ; Zheng *et al.*, 1994 ; Qian *et al.*, 1995). Les déséquilibres de liaison élevés rendent compte de cette différenciation entre les deux groupes génétiques. Ils peuvent résulter de l'effet conjugué de l'autogamie limitant les recombinaisons et de la présence de gènes co-adaptés conférant une meilleure valeur adaptative dans chacun des groupes, comme l'atteste la stérilité hybride dans les croisements éloignés (Oka, 1974).

Il est possible de schématiser le chromosome 12 à l'aide de fragments qui représentent les différents marqueurs et d'identifier ainsi des régions monomorphes, des régions différenciant les variétés *indica* des variétés *japonica* et des régions au niveau desquelles le polymorphisme n'est pas

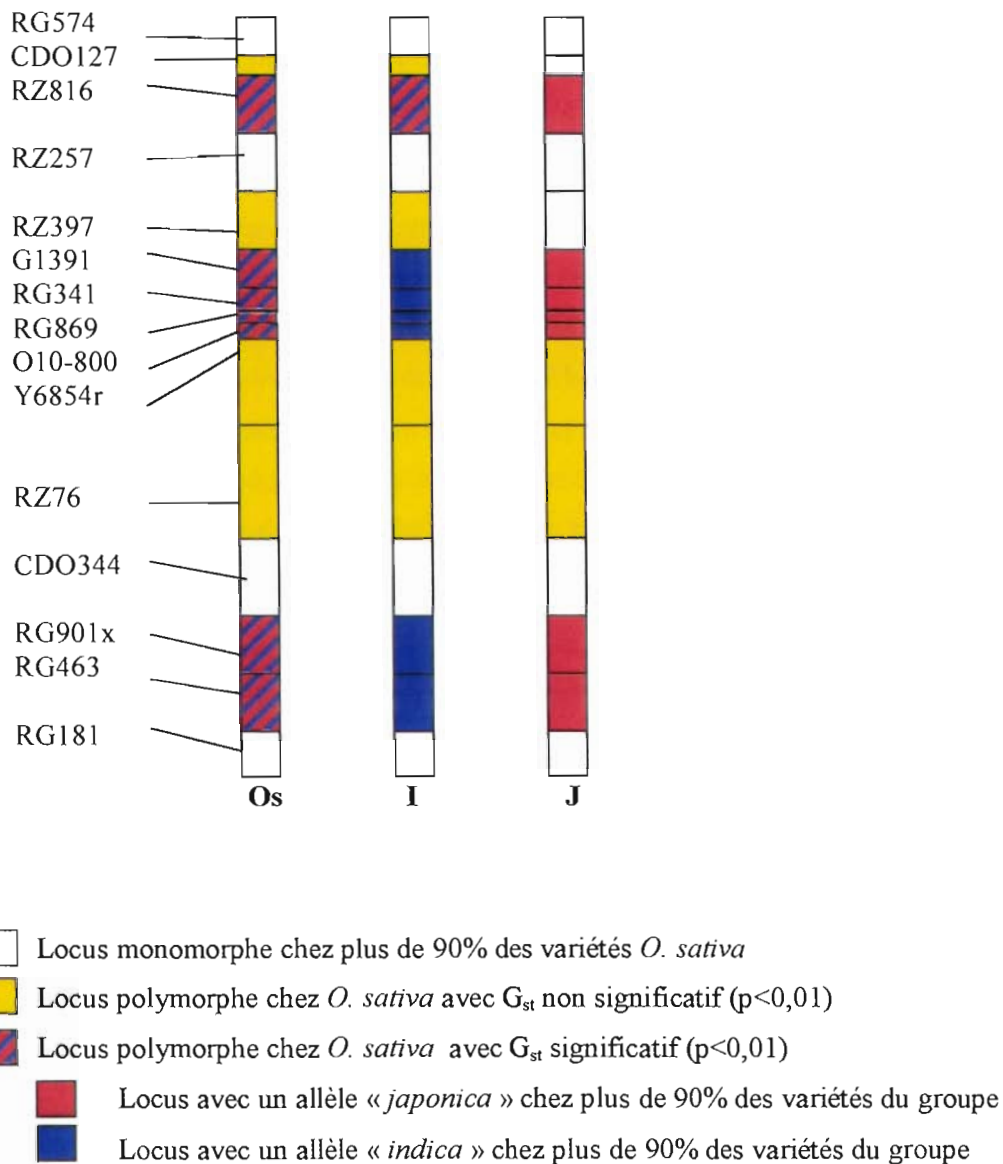


Figure 5.3. Carte du chromosome 12 chez *O. sativa* (Os), dans le groupe *indica* (I) et dans le groupe *japonica* (J). Le chromosome 12 a été représenté par des fragments correspondant aux différents marqueurs. Le polymorphisme révélé par chaque marqueur au sein de l'ensemble des variétés et au sein des deux groupes génétiques *indica* et *japonica* est représenté par des colorations différentes.

lié à la structure *indica/japonica* (Fig. 5.3.). Certains marqueurs représentés sur ce schéma sont séparés par plusieurs centimorgans, on ne peut donc pas être sûr de l'homogénéité des régions comprises entre deux marqueurs ; on observe cependant le regroupement de marqueurs mettant en évidence le même type de polymorphisme, ce qui suggère qu'au moins certaines régions sont homogènes. En particulier, au niveau du QTL12h, les marqueurs G1391, RG341, RG869 et O10₈₀₀ expliquent tous la différenciation *indica/japonica* ; probablement, l'ensemble de l'intervalle G1391-O10₈₀₀ est homogène et explique cette différenciation. On remarque par ailleurs qu'au sein des variétés *japonica*, six sondes hybridant sur des locus du bras court du chromosome ne mettent en évidence aucun polymorphisme : soit ces locus sont monomorphes chez *O. sativa*, soit ils permettent de différencier les groupes *indica* et *japonica* et sont donc monomorphes dans le groupe *japonica*. Cette observation et l'absence de marqueurs cartographiés dans cette région sur la carte *japonica/japonica* réalisée par Redoña et Mackill (1996) suggèrent que l'ensemble de cette région est peu variable chez les variétés *japonica*.

3. DIVERSITE AU NIVEAU DU QTL12H ET NIVEAU DE RESISTANCE

Nous disposons pour la majorité des variétés de notre collection du génotype aux différents locus cartographiés à proximité du QTL12h et du niveau de résistance au RYMV. Le niveau de résistance a été évalué en chambre de culture à l'aide d'un test ELISA réalisé une semaine après inoculation (ELISA1), d'un test ELISA réalisé trois semaines après inoculation (ELISA2) et de l'aire sous la courbe de progression des symptômes (AUSPC) : les variétés *japonica* pluviales sont partiellement résistantes, les variétés *japonica* tempérées ont une résistance intermédiaire et les variétés *indica* et celles des groupes iso-enzymatiques II et V sont sensibles (Chapitre III, §1). Nous avons testé par analyse de variance l'effet du génotype aux différents locus sur la résistance afin de voir si une telle analyse nous permettait d'acquérir des informations complémentaires sur le QTL.

3.1. Relation entre le génotype et le niveau de résistance

3.1.1. Au sein de l'ensemble des variétés

Dans un premier temps, des analyses de variance ont été réalisées pour tester l'effet du génotype sur la résistance pour chaque locus localisé au niveau du QTL12h, sur l'ensemble des variétés. Seul les allèles fréquents ont été pris en considération, les autres étant considérés comme données manquantes.

En raison de la différenciation entre les groupes de variétés *indica* et *japonica* au niveau du QTL12h et de la relation entre le groupe génétique et le niveau de résistance, nous attendions un effet significatif du génotype sur la résistance au niveau de la majorité des locus testés. Effectivement, pour la variable ELISA2, l'effet du génotype est significatif au seuil $p < 0,01$ pour tous les locus testés et les différents locus expliquent de 8% à 60% de la résistance (Tab. 5.3.). Pour les variables ELISA1 et AUSPC, la majorité des locus sont également explicatifs de la résistance.

Tableau 5.3. Effet du génotype aux différents locus cartographiés à proximité du QTL12h sur le niveau de résistance. Pour chaque locus identifié avec les sondes G1391, RG341, RG869, O10₈₀₀ et Y6854r, l'effet du génotype sur le niveau de résistance (estimé par la variable ELISA2) a été testé par analyse de variance au sein de l'ensemble des variétés et au sein de chacun des groupes génétiques. Les allèles rares (fréquence <0,1) n'ont pas été pris en compte.

Sonde	Enzyme	Total		Indica		Japonica tempérés		Japonica pluviaux	
		p ^a	R ^{2b}	p	R ²	p	R ²	p	R ²
G1391	Bam HI	<0,0001	41	0,002	21	-		-	
	Eco RI	<0,0001	32	0,018	15	-		-	
	Eco RV	0,0011	9	0,105		-		-	
	Sca I	<0,0001	43	- ^c		-		-	
RG341	Bam HI	<0,0001	17	-		0,759		0,93	
	Hind III	<0,0001	22	-		0,80		0,20	
	Sca I	<0,0001	42	-		-		-	
RG869	Dra I	<0,0001	46	-		-		-	
	Eco RV	<0,0001	20	-		-		-	
	Hind III	<0,0001	32	0,03		-		-	
O10 ₈₀₀	Dra I	<0,0001	60	-		-		-	
	Eco RV	<0,0001	17	-		0,35		0,276	
	Sca I	0,0028	8	0,227		-		0,108	
Y6854r	Eco RI	0,0089	8	0,049	9	0,023	33	0,90	
	Sca I	0,0009	12	0,005	18	0,0037	43	0,97	

^a p : probabilité que l'effet du polymorphisme sur la résistance soit dû au hasard

^b R² : pourcentage de variance du caractère ELISA2 expliqué par le polymorphisme au locus testé

^c non testé par manque de polymorphisme

Les quatre locus pour lesquels la différenciation *indica/japonica* est la plus faible (G1391/Eco RV, O10₈₀₀/Sca I, Y6854r/Eco RI, Y6854r/Sca I : $G_{st} \leq 0,13$) sont ceux qui expliquent la plus faible part de la variable ELISA2 ($R^2 \leq 12\%$). En outre, sur l'ensemble des locus, on observe une corrélation élevée entre le pourcentage de variance expliqué par un locus et la différenciation *indica/japonica* à ce locus ($r=0,83$) (Fig. 5.4.).

3.1.2. Dans chaque groupe de variétés

Dans un deuxième temps, nous avons testé, dans la mesure du possible, l'effet du génotype sur la résistance au sein de chacun des groupes de variétés *indica*, *japonica* tempérées et *japonica* pluviales. La morphologie des variétés de chaque groupe étant relativement homogène et la diversité sur le reste du génome faible, cette analyse a pour objectif de mettre plus spécifiquement en évidence des différences observées au niveau du QTL12h. Cependant, pour de nombreux couples enzyme/sonde, la majeure partie des variétés d'un même groupe est monomorphe et nous n'avons pas pu tester l'effet du génotype. Sept couples enzyme/sonde ont été testés chez les variétés *indica*, cinq chez les variétés *japonica* tempérées et six chez les variétés *japonica* pluviales (Tab. 5.3.).

Deux couples enzyme/sonde sont significatifs au seuil $p < 0,01$ pour expliquer la variable ELISA2 (Tab. 5.3.). D'une part, la sonde G1391 a mis en évidence du polymorphisme au sein des variétés *indica* et le couple G1391/Bam HI explique 21% de la variance dans ce groupe de variétés. D'autre part, la sonde Y6854r a révélé du polymorphisme au sein des trois groupes de variétés ; le couple Y6854r/Sca I explique 18% du caractère ELISA2 dans le groupe *indica*, 43% dans le groupe *japonica* tempéré, en revanche il n'est pas significatif pour expliquer la résistance dans le groupe *japonica* pluvial. Les couples G1391/Eco RI et Y6854r/Eco RI donnent des résultats comparables mais ne sont significatifs qu'au seuil $p < 0,05$. En ce qui concerne les sondes RG341, RG869 et O10₈₀₀, certains couples enzyme/sonde ont mis en évidence du polymorphisme au sein d'un ou plusieurs des groupes de variétés considérés mais aucun n'est explicatif du niveau de résistance.

Des tests identiques ont été réalisés pour expliquer les critères de résistance ELISA1 et AUSPC au sein des trois groupes de variétés. De manière générale, des résultats similaires sont obtenus (au seuil $p < 0,05$) : G1391/Bam HI et G1391/Eco RI expliquent respectivement 15 et 17% de la variable AUSPC, Y6854r/Sca I explique 10% de la variable AUSPC chez les variétés *indica* et respectivement 36% et 31% des variables ELISA1 et AUSPC chez les variétés *japonica* tempérées.

3.2. Discussion

Divers travaux se sont attachés à l'étude de la diversité génétique dans des régions du génome où des QTL ont été identifiés. Par exemple, chez l'orge, Hayes *et al.* (1997) ont étudié la diversité génétique de différentes variétés en relation avec plusieurs caractères. Des marqueurs discriminants

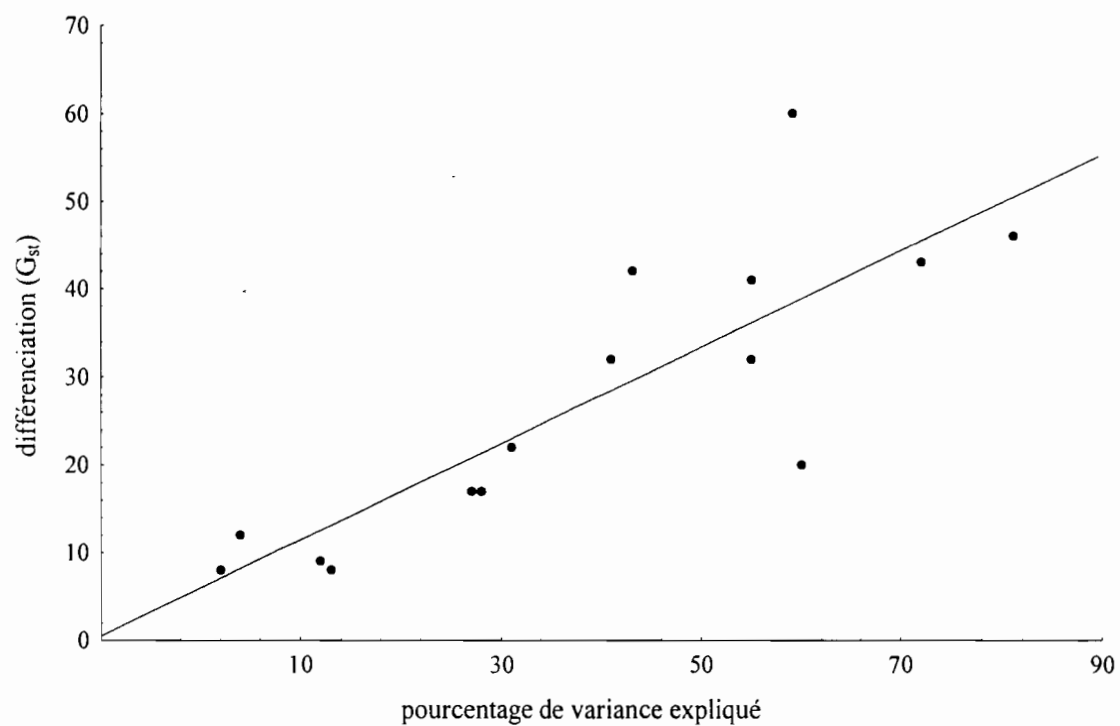


Figure 5.4. Corrélation entre la différenciation *indica/japonica* (G_{st}) et le pourcentage de variance de la variable ELISA2 expliqué par les différents locus (R^2). Les deux variables sont significativement corrélées ($r=0,83$, $p<0,001$).

entre variétés se sont avérés correspondre à des locus où des QTL avaient été précédemment détectés dans plusieurs populations. Ils ont ensuite vérifié sur deux nouvelles populations qu'à cinq des locus concernés, la présence de polymorphisme était associée à la présence de QTL. De même Redoña *et al.* (1998) ont étudié chez 49 variétés de riz le polymorphisme de marqueurs RAPD cartographiés à proximité de QTL impliqués dans la vigueur de la plantule ; ils ont ensuite comparé le phénotype des groupes de variétés constitués sur la base du polymorphisme moléculaire afin d'identifier des groupes de variétés susceptibles de posséder des allèles différents au niveau des gènes impliqués dans la vigueur de la plantule. Nous avons utilisé une approche similaire au niveau du QTL12h. Dans cette étude, l'interprétation des résultats doit prendre en compte la structure génétique de l'espèce *O. sativa* et la relation entre la résistance au RYMV et les groupes génétiques.

Les différents locus étudiés dans la région de RG869 sont très hautement significatifs pour expliquer la résistance partielle au RYMV. Ce résultat peut résulter de la présence du QTL12h dans cette région. En effet, si ce QTL est localisé au niveau de RG869, comme le suggère la cartographie de ce QTL dans les populations HD, il n'est pas surprenant que le génotype aux locus révélés par les sondes G1391, RG341, RG869 et O10₈₀₀, en déséquilibre de liaison, expliquent la résistance.

Cependant, les locus mis en évidence avec ces sondes permettent, comme on l'a vu précédemment, de différencier les variétés *indica* et les variétés *japonica*, et ces locus sont donc en déséquilibre de liaison avec tous les locus du génome qui différencient également les deux groupes génétiques. En raison de ces déséquilibres de liaison, si un marqueur différenciant les deux groupes génétiques explique le niveau de résistance, tous les marqueurs différenciant les deux groupes expliqueront également le niveau de résistance. Par conséquent, la part de variance expliquée par les marqueurs G1391, RG341, RG869 et O10₈₀₀ ne correspond pas à la part de variance réellement expliquée par cette région du génome mais à la part de variance expliquée par l'ensemble des marqueurs différenciant les deux groupes génétiques. La part de variance expliquée par certains locus de cette région est d'ailleurs nettement supérieure à la part de variance expliquée par le QTL12h dans les populations HD. Le fait que ces quatre marqueurs expliquent la résistance ne prouve donc pas la présence d'un QTL dans cette région.

Afin de nous affranchir des différences entre les variétés *indica* et les variétés *japonica* et de comparer des variétés homogènes, nous avons testé l'effet du génotype sur la résistance au sein de chaque groupe morphologique. De nombreux locus étaient monomorphes intra-groupe et n'ont donc pas pu être testés, mais les résultats obtenus sur G1391 et Y6854r suggèrent que le QTL12h pourrait être génétiquement lié à ces deux marqueurs.

En particulier, l'effet de Y6854 sur la résistance est très similaire à l'effet attendu pour le QTL12h. Dans la population IR64/Azucena, le QTL12h est détecté grâce à son seul effet additif mais une interaction entre le QTL12h et le QTL7 explique une part importante du contenu en virus. Dans la

Tableau 5.4. Les facteurs de résistance potentiels participant à la résistance des variétés *indica*, *japonica* pluviales et *japonica* tempérées. Le QTL de résistance détecté sur le chromosome 12 peut correspondre à la présence d'un gène (ou d'un groupe de gènes), lié au marqueur Y6854r et présent indifféremment chez les variétés *indica* et *japonica*, ou à la présence d'un gène (ou d'un groupe de gènes) dont les différentes formes alléliques permettent de distinguer les groupes *indica* et *japonica*. Par ailleurs, différentes régions du génome différenciant les variétés *indica* et *japonica* sont susceptibles de participer à l'expression de la résistance chez les variétés *japonica* et la résistance des variétés pluviales doit pour une grande part être lié à leurs caractéristiques morphologiques.

		<i>indica</i>	<i>japonica</i> tempéré	<i>japonica</i> pluvial
QTL12h	Y6854	+/-	+/-	+/-
	Gène(s) co-adapté(s)	-	+	+
Ensemble du génome	Régions co-adaptées	-	+	+
	Morphologie	-	-	+

collection, les résultats de Second et Ghesquière (1995) suggèrent que la région du chromosome 7 qui interagit avec le QTL12h différencie les variétés *indica* des variétés *japonica*. Autrement dit, la majorité des variétés *japonica* ont le même profil que la variété Azucena dans cette région, tandis que les variétés *indica* ont le même profil que IR64. On constate que chez les variétés *indica*, Y6854r explique une faible part de la résistance (10 à 15% de la variance en moyenne), cet effet pourrait être dû à l'effet additif seul du QTL12h ; il explique une part plus importante de la résistance chez les variétés *japonica* tempérées (20 à 30%), cet effet pourrait être dû à l'interaction avec l'allèle favorable au QTL7. Par ailleurs, la morphologie des variétés *japonica* pluviales pourrait expliquer que ces variétés soient résistantes quel que soit l'état allélique au niveau du QTL12h ; effectivement le génotype au niveau de Y6854r n'explique pas la résistance dans ce groupe de variétés. Nous avons constaté cependant que la variété Apura qui possède l'allèle de sensibilité au QTL12h et la variété IRAT177 qui possède l'allèle de résistance ne sont pas polymorphes au locus Y6854r/Sca I. Par ailleurs, la lignée HD303, utilisée pour introgresser le QTL12h dans un fond génétique *indica*, semble posséder l'allèle de résistance au QTL12h mais présente l'allèle de la variété IR64 au locus Y6854r/Eco RI. Ceci indique la présence de recombinaisons entre Y6854 et le QTL potentiel.

Finalement, ces résultats confirment l'effet de l'intervalle G1391-Y6854r sur la résistance au RYMV. Cet effet peut être dû à la présence d'un (ou plusieurs) gène(s) différenciant les groupes génétiques et/ou à la présence d'un (ou plusieurs) gène(s) indépendant(s) de la structure génétique (Tab. 5.4.). Ces deux types de gènes sont susceptibles d'agir en interaction avec le QTL7. D'une part, nous avons montré comment l'effet du gène potentiel génétiquement lié à Y6854r était cohérent avec l'interaction impliquant le chromosome 7. D'autre part, une interaction complémentaire est aisément concevable entre deux locus qui expliquent la différenciation *indica/japonica*, tels que le QTL7 et la région G1391-O10₈₀₀, et une telle interaction pourrait correspondre à une interaction entre des gènes co-adaptés. Nos résultats ne nous permettent pas de privilégier une hypothèse par rapport à l'autre et nous ne pouvons pas exclure que le QTL12h soit lié à la présence de plusieurs facteurs de résistance. L'étude de croisements entre des variétés judicieusement choisies en fonction de leur groupe génétique et de leur génotype aux différents locus étudiés permettrait certainement d'éclairer ces quelques points. Par exemple, des croisements entre variétés *indica* ou *japonica* tempérées, choisies en fonction de leur génotype au niveau des marqueurs RG869 et Y6854r, pourraient indiquer si l'allèle de résistance au QTL12h est porté exclusivement par les variétés *japonica* ou par des variétés réparties indifféremment dans les deux groupes.

Cette étude était basée sur l'analyse des allèles fréquents aux différents locus mais des allèles rares ont été également observés chez certaines variétés auxquelles il peut être intéressant de s'attacher quelques instants. Ainsi, les variétés Mugdo et Gigante, se détachent nettement des groupes *indica* et *japonica* sur l'AFC, en raison d'un nombre important d'allèles rares, révélés en particulier par les sondes RG341 et RG869. De même, la variété Kaukkyi-Ani présente un nombre important d'allèles

rare communs avec les variétés Gigante et Mugdo. Des marqueurs répartis sur l'ensemble du génome indiquent pourtant clairement l'appartenance de ces variétés au groupe *indica* ; la spécificité de ces variétés est donc liée à la région du génome étudiée. Par ailleurs, la variété Gigante est la seule variété *O. sativa* identifiée jusqu'à présent possédant un gène majeur conférant une résistance presque totale au RYMV (Ndjondjop *et al.*, 1998). L'identification de marqueurs liés à ce gène majeur est en cours, au laboratoire, par la méthode de « Bulk Segregant Analysis » (Michelmore *et al.*, 1991). En raison de la présence d'allèles rares au niveau d'un QTL de résistance, la liaison entre les marqueurs liés au QTL12h et la résistance sera testée en priorité. Une liaison entre le QTL12h et le gène de résistance de la variété Gigante suggérerait la présence d'un cluster de gènes ou d'un gène présentant des formes alléliques conférant différents niveaux de résistance au RYMV. Une telle liaison serait un atout important pour comprendre les mécanismes de résistance et les exploiter, et l'étude de la diversité au niveau du chromosome 12 pourrait servir de base à la recherche d'autres gènes ou d'autres formes alléliques. La différence de niveau de résistance entre la variété Gigante d'une part et les variétés Mugdo et Kaukkyi-Ani d'autre part pourrait être attribuée à des recombinaisons ou des mutations dans la région considérée.

Il est plus difficile en revanche, d'exploiter la diversité, et en particulier les allèles rares, mis en évidence chez les variétés des groupes iso-enzymatiques II et V. En effet, ces variétés ont des caractéristiques morpho-physiologiques qui les différencient des variétés *indica* ou *japonica* et ne permettent pas de les comparer avec elles. En outre, elles présentent des combinaisons originales d'allèles (« *indica* », « *japonica* » ou allèles rares), dans la région du QTL12h mais également sur l'ensemble du génome et ceci rend difficile l'interprétation du génotype à un locus particulier vis à vis de la résistance.

4. CONCLUSION

Cette étude de la diversité au niveau du QTL du chromosome 12 en relation avec la résistance ne nous a pas permis de conclure sur la distribution du QTL chez *O. sativa*, ni de préciser sa localisation. Elle nous a cependant fourni des éléments pertinents qui pourront nous aider à préciser ces différents points. Par exemple, à partir de la caractérisation moléculaire des différentes variétés, des croisements pourront être réalisés et permettre d'étudier la distribution du QTL chez *O. sativa*. En outre, en raison des particularités moléculaires de la variété Gigante, l'éventuelle liaison entre le QTL12h et le gène de résistance de Gigante sera testée dès que possible.

L'étude réalisée par Second et Ghesquière (1995) et la nôtre pourraient être exploitées pour étudier la relation entre la diversité moléculaire et le phénotype pour différents caractères. En particulier, des gènes de résistance à la pyriculariose ont été cartographiés à proximité du marqueur RG869 et une démarche similaire à la nôtre pourrait être utilisée. De manière générale, chez *O. sativa*, la connaissance des régions potentiellement co-adaptées et le nombre limité de recombinaisons, au

moins dans certaines zones du génome, devrait conduire à une meilleure exploitation de la diversité moléculaire, pour la sélection comme pour la connaissance du génome. Ainsi, la connaissance des structures co-adaptées pourrait permettre la rupture de certaines associations et la conservation d'autres associations ; cette approche pourrait générer une nouvelle source de variabilité exploitable en sélection mais ayant très peu de chance d'apparaître en sélection classique. Par ailleurs, l'étude de la diversité allélique au niveau de certains gènes pourrait être envisagée chez *O. sativa* et les espèces proches à partir de la connaissance de la diversité moléculaire. Par exemple, certains allèles rares présents chez les variétés Gigante, Mugdo et Kaukkyi-Ani sont également présents chez *O. nivara*, forme annuelle de l'espèce sauvage à l'origine d'*O. sativa*. Dans le cas d'une liaison entre les marqueurs considérés et le gène qui confère à la variété Gigante un niveau de résistance au RYMV exceptionnel chez les espèces cultivées, il pourrait être intéressant de comparer Gigante et *O. nivara* pour d'autres locus de cette région afin de tester l'hypothèse d'une introgression.

CHAPITRE VI

DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE VI :

DISCUSSION GENERALE

Le travail présenté dans ce document avait pour objet l'étude des bases génétiques de la résistance partielle de certaines variétés de l'espèce *O. sativa* au RYMV. Nous avons représenté dans la figure 6.1. les relations entre les différents éléments que nous avons étudiés et la résistance partielle.

Dans un premier temps, la résistance a été étudiée dans une collection variétale représentative de la diversité génétique trouvée chez *O. sativa*. Nous avons ainsi confirmé que la résistance est associée aux variétés *japonica* de culture pluviale, tandis que les variétés *japonica* tempérées et plus encore les variétés *indica* sont sensibles (Fig. 6.1. ①). Les variétés des groupes iso-enzymatiques mineurs II et V sont également très sensibles.

Dans un deuxième temps, deux populations de lignées HD, issues de croisements entre une variété *indica*, sensible, et une variété *japonica* pluviale, résistante, ont été étudiées. Dans la population IR64/Azucena, la résistance s'est avérée liée à la morphologie et plus particulièrement au tallage ; cette relation a été mise en évidence par des corrélations phénotypiques entre caractères (Fig. 6.1. ②) et elle est confirmée par la cartographie de locus impliqués dans les deux types de caractères (Fig. 6.1. ③ et ④). Au moins huit régions du génome participent à l'expression de la résistance, elles sont réparties sur six chromosomes et ont des effets généralement modérés. La résistance est, en outre, apparue sous le contrôle d'interactions entre plusieurs locus : les caractéristiques d'un QTL cartographié sur le chromosome 12 nous ont amenés à l'étudier plus précisément et une interaction de type complémentaire entre ce QTL et un locus du chromosome 7 explique une part importante du contenu en virus. Par ailleurs, on ne peut exclure que, lié ou non à la morphologie, ce QTL soit un des facteurs de résistance différenciant les variétés *japonica* des variétés *indica*.

Ce travail participe à la connaissance et la compréhension des mécanismes de résistance au RYMV, étudiés à l'aide d'approches tissulaires et cellulaires par d'autres équipes (LPRC CIRAD/ORSTOM, ILTAB ORSTOM/TSRI). Nous verrons dans une première partie de cette discussion comment ce travail s'intègre à ces différentes approches et quel est l'état actuel de la connaissance des mécanismes de cette résistance. Par ailleurs, la recherche des bases génétiques et de marqueurs liés à un caractère quelconque a généralement pour objectif l'aide à l'amélioration variétale pour ce caractère. Dans une deuxième partie, nous discuterons des possibilités de transfert de la résistance partielle vers des variétés *indica* à haut potentiel agronomique.

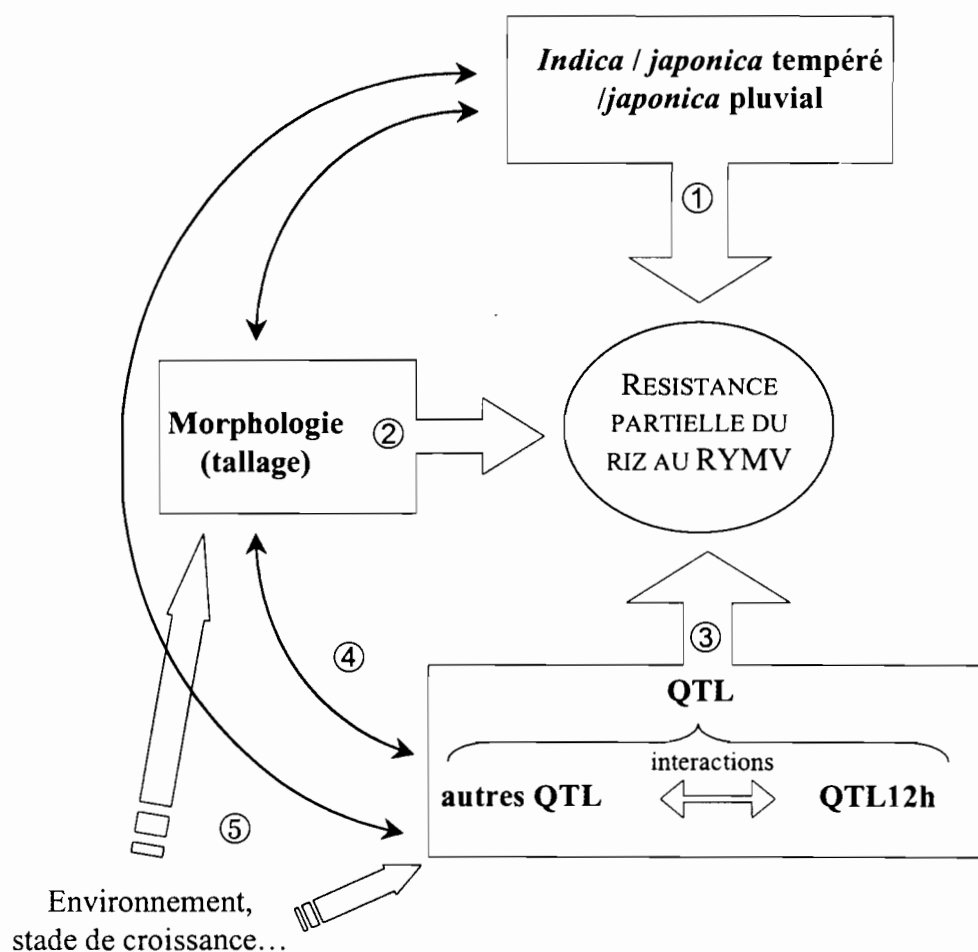


Figure 6.1. Relations entre la résistance partielle au RYMV et différentes caractéristiques génétiques et morphologiques des variétés de riz. Le niveau de résistance au RYMV est étroitement lié à la diversité génétique trouvée chez *O. sativa* (①) et associé à certains caractères morphologiques dans une descendance en ségrégation (②). En outre, parmi les QTL de résistance détectés (③), certains sont également impliqués dans la morphologie (④). Un effet de l'environnement ou du stade de croissance des plantes est susceptible de modifier la résistance (⑤), soit directement en influant sur l'expression des QTL de résistance, soit indirectement en influant sur la morphologie.

1. EXPRESSION ET MECANISMES DE LA RESISTANCE AU RYMV

1.1. La résistance est associée à des caractères morphologiques

Au sein de l'espèce *O. sativa*, la résistance au RYMV apparaît très liée à la diversité génétique. Des relations entre la diversité génétique et la résistance à différentes races de pathogènes ont été précédemment décrites pour les interactions, de type gène pour gène, du riz avec *M. grisea* et *X. oryzae* pv *oryzae* (Busto *et al.*, 1990 ; Glaszmann *et al.*, 1996 ; Morishima, 1969, cité par Glaszmann *et al.*, 1996). De même une relation a été mise en évidence entre la diversité génétique et la résistance à plusieurs pathogènes en l'absence d'interaction gène pour gène : la résistance à la maladie du Tungro est préférentiellement trouvée dans les groupes iso-enzymatiques IV et V (Glaszmann *et al.*, 1996), et la résistance au champignon *Rhynchosporium oryzae* semble associée aux groupes iso-enzymatiques III, IV, V ainsi qu'aux variétés tempérées du groupe VI (Bonman *et al.*, 1990).

Lorsque l'hôte et le pathogène sont présents dans la même zone de culture et plus particulièrement dans le cadre des interactions gène pour gène, une co-évolution entre les deux partenaires est susceptible d'expliquer la relation entre la diversité génétique et la résistance. Cette hypothèse a notamment été avancée pour expliquer la relation entre la diversité trouvée chez *Phaseolus vulgaris* et *Colletotrichum lindemuthianum* dans les trois centres de diversité du haricot (Sicard *et al.*, 1997). Chez le riz, la co-évolution hôte/pathogène pourrait également expliquer en partie la résistance à des pathogènes présents en Asie, centre de diversité de l'espèce *O. sativa*. En revanche, dans l'interaction riz/RYMV, la résistance des variétés pluviales n'est pas liée à une réponse à la pression de sélection appliquée par le RYMV puisque le pathogène est exclusivement présent en Afrique et qu'un grand nombre de variétés *japonica* pluviales sont traditionnellement cultivées en Asie.

Les groupes de variétés *indica*, *japonica* tempérées et *japonica* pluviales représentent des types morphologiques distincts : le groupe *indica* comprend des variétés tropicales adaptées à la riziculture aquatique ; le groupe *japonica* comprend des variétés aquatiques des régions tempérées et des variétés tropicales adaptées à la culture pluviale. Une grande part de la résistance partielle des variétés *japonica* pluviales est donc probablement liée à des caractéristiques adaptatives morphologiques ou physiologiques, qui différencient les différents groupes variétaux et dont l'expression peut être sous le contrôle de gènes co-adaptés (Fig. 6.1. ④).

Cette relation entre des caractéristiques morphologiques des plantes et le niveau de résistance au RYMV est confirmée par l'étude de la population IR64/Azucena. En effet, des corrélations entre le niveau de résistance et certaines composantes de la morphologie, en particulier le tallage, ont été mises en évidence, et des colocalisations de QTL contrôlant les deux types de caractères ont été détectées. Ces colocalisations peuvent être dues à des liaisons génétiques entre QTL, mais, comme nous l'avons

vu précédemment, le nombre de QTL colocalisés est en faveur d'un effet pléiotrope de certains QTL sur la morphologie et sur la résistance.

Des colocalisations de QTL impliqués dans la morphologie, en particulier la hauteur, et la résistance ont été mises en évidence dans plusieurs études consacrées aux interactions plante/pathogène. Par exemple, dans deux études, des QTL de résistance à *R. solani* se sont avérés liés à la hauteur des plantes, sans toutefois que les auteurs en attribuent la raison à un même mécanisme. Ainsi, Li *et al.* (1995a), chez le riz, expliquent cette colocalisation par le critère de mesure choisi, la proportion de la plante infectée, qui pour une même vitesse de progression de l'infection sera moins importante chez un individu de grande taille. Chez le haricot, Jung *et al.* (1996) attribuent cette colocalisation à un effet de l'architecture de la plante sur l'épidémiologie du champignon : une plante de haute taille et avec un nombre limité de ramifications occasionnera un microclimat aéré peu favorable au développement du pathogène. Ni l'une, ni l'autre de ces interprétations n'est susceptible d'expliquer la relation entre la morphologie et la résistance au RYMV. En effet, dans notre étude, certains QTL de résistance colocalisés avec des QTL de morphologie sont impliqués dans le contenu en virus ; ce caractère étant estimé indépendamment de la morphologie, ceci exclut un artefact dû au critère de mesure. Par ailleurs, les critères de résistance que nous avons mesurés ne prennent pas en compte l'épidémiologie de la maladie puisque l'inoculation était artificielle. La morphologie a donc un effet sur l'interaction plante/virus proprement dite.

Des QTL à effet mineur associent la résistance à une faible taille tandis qu'au niveau du gène de semi-nanisme *sd-1*, la résistance est associée à une taille élevée. Cette contradiction apparente suggère soit que certaines colocalisations sont dues à une liaison génétique tandis que d'autres sont dues à une pléiotropie, soit que les différents QTL de hauteur agissent sur la morphologie *via* des mécanismes différents et peuvent avoir des effets opposés sur le niveau de résistance.

En revanche, l'ensemble de nos résultats suggère qu'un tallage élevé est lié à une augmentation de la sensibilité. Le tallage est un des caractères morphologiques qui différencient les groupes de variétés chez *O. sativa*. Les variétés de type *japonica* tempéré ont des talles nombreuses et érigées, les variétés de type *japonica* pluvial ont des talles peu nombreuses et érigées et les variétés de type *indica* ont des talles nombreuses et étalées (Matsuo, 1952). Ces différences suggèrent que certaines caractéristiques associées au tallage pourraient expliquer la relation entre la diversité génétique et la résistance. Le tallage a été étudié de manière approfondie sur les variétés IR64 et Azucena (Jaffuel, non publié). Cette étude confirme que la variété IR64 émet davantage de talles que la variété Azucena. Azucena n'émet que des talles primaires (issues du brin maître), tandis que IR64 émet des talles secondaires (issues des talles primaires) et tertiaires. En outre, la mise en place des feuilles du brin maître et la mise en place des talles sont liées et beaucoup plus rapides chez IR64. Il est difficile de relier ces observations à la résistance mais peut-être peut-on suspecter la vitesse de croissance des variétés et la multiplication cellulaire d'influer sur la multiplication virale ou sur le mouvement du

virus de cellule à cellule, ou l'organisation du système vasculaire et les flux de sève entre les talles d'influer sur le mouvement longue distance du virus.

En fait, l'effet de la morphologie sur la résistance est probablement complexe. Certains travaux ont en effet mis en évidence des relations entre les deux caractères différentes de celles que nous avons détectées. Ainsi, Lett (1997) a observé que certaines feuilles, de rang immédiatement supérieur à la feuille inoculée, échappent à l'infection par le virus, au moins dans les premiers temps suivant l'inoculation. Ce comportement pourrait être dépendant de la migration longue distance du virus et du flux de sève dans les feuilles, et s'apparenter à la « résistance développementale » décrite par Leisner *et al.* (1993) dans l'interaction *A. thaliana*/« cauliflower mosaic virus ». Ce phénomène, lié à la vitesse de croissance des plantes, est plus marqué chez IR64 que chez Azucena. Par ailleurs, au champ, il a été noté que certaines variétés sensibles et dont le tallage est particulièrement important, peuvent produire des talles exemptes de virus. Ces effets de la morphologie, qui favorisent IR64 par rapport à Azucena, sont très mineurs puisque finalement la variété IR64 est beaucoup plus affectée par la maladie que ne l'est Azucena. Toutefois, la comparaison de ces observations et de nos résultats souligne les effets complexes des caractères morphologiques sur la résistance.

1.2. Un retard dans la progression de l'infection

Bien que les mécanismes impliqués dans la relation morphologie/résistance ne soient pas connus, les connaissances acquises sur l'interaction riz/RYMV permettent de préciser à quels niveaux de l'interaction riz/RYMV intervient la résistance partielle.

Tout d'abord, au cours des différents essais réalisés, nous avons inoculé mécaniquement les plantes. Cette méthode d'inoculation est sans doute la mieux appropriée pour étudier la résistance du riz au RYMV car, contrairement à d'autres virus, le RYMV peut être transmis à la fois par plusieurs espèces de vecteurs, par frottement entre les plantes et peut-être par le sol ou l'eau d'irrigation ; il est donc préférable d'étudier des mécanismes généraux de résistance qui ne sont pas spécifiques du mode de transmission. En outre, la présence de taches circulaires de panachure dans les rizières suggère que la transmission mécanique entre plants est en grande partie responsable des contaminations secondaires. La composante de la résistance que nous avons étudiée reflète donc la capacité du virus à se multiplier et/ou à occasionner des dégâts dans la plante une fois qu'il a pénétré dans l'hôte ; elle ne prend pas en compte la résistance à la transmission.

Ensuite, l'impact de la maladie sur des critères agro-morphologiques, l'expression des symptômes et le contenu en virus sont corrélés. Dans certaines interactions plante/virus les plantes développent une réaction de tolérance qui limite les symptômes et l'incidence économique de la maladie malgré un taux élevé de virus dans les plantes (Kuhn *et al.*, 1981). La résistance partielle au RYMV, au contraire, ne résulte probablement pas de mécanismes de tolérance mais d'une réduction effective de l'accumulation du virus dans la plante.

Schématiquement, la résistance peut intervenir à trois étapes de l'interaction plante/virus : la réplication virale, le mouvement de cellule à cellule et le mouvement vasculaire. Nos résultats excluent l'inhibition totale d'une de ces étapes. En effet, le virus est détecté chez toutes les variétés partiellement résistantes et en particulier dans les feuilles infectées de manière systémique ; il n'est localisé ni aux cellules inoculées, ni à la feuille inoculée. La résistance peut donc être attribuée soit à un blocage temporaire d'une des étapes du cycle viral qui entraînerait un retard de quelques jours dans le processus d'infection, soit à une moindre multiplication ou à un mouvement plus lent.

Une étude réalisée sur des protoplastes de différentes variétés indique que, dans les protoplastes de la variété Azucena, l'accumulation virale n'est pas différente de celle observée dans les protoplastes de la variété IR64 et d'autres variétés sensibles de type *indica* (Ndjiondjop, non publié). La résistance ne semble donc pas intervenir au niveau de la réplication virale. Par ailleurs, Lett (1997) a estimé le contenu en virus dans les différentes feuilles, à différentes dates après inoculation, chez les variétés IR64 et Azucena. Une différence d'accumulation virale a été mise en évidence dans les feuilles inoculées des deux variétés, en faveur de la variété Azucena. En outre, dans certaines conditions, le déplacement systémique du virus est détecté plus tôt chez Azucena que chez IR64. L'acteur principal de la résistance de la variété Azucena est donc plus probablement un ralentissement du mouvement de cellule à cellule qu'un ralentissement du mouvement longue distance. Toutefois, la résistance étant polygénique, il est probable que plusieurs facteurs ralentissent le déplacement du virus et éventuellement que la réplication ou le mouvement longue distance soient également affectés.

Chez les variétés très hautement résistantes Gigante et Tog-5681, la réplication du virus dans des protoplastes a également été mise en évidence et la résistance semble aussi intervenir au niveau du mouvement du virus de cellule à cellule (Ndjiondjop, non publié). Le mouvement du virus est beaucoup plus ralenti chez les variétés Tog-5681 et Gigante qu'il ne l'est chez Azucena, ce qui pourrait expliquer le niveau plus élevé de résistance de ces variétés. Comme nous l'avons mentionné précédemment, il sera intéressant de comparer la localisation du gène majeur, identifié par Ndjiondjop *et al.* (1998), présent chez ces variétés, et les QTL détectés dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura. Une colocalisation suggérerait qu'un même gène ou cluster de gènes, et probablement des mécanismes de résistance similaires, sont impliqués dans les deux types de résistance.

Des expérimentations complémentaires vont être effectuées afin de compléter les travaux déjà réalisés. Ces expérimentations devront s'attacher à différencier les facteurs morphologiques de facteurs éventuellement indépendants de la morphologie et essayer de comprendre le rôle du tallage, ou des caractères qui lui sont associés, sur la résistance. En particulier, nos résultats suggèrent que le QTL12h pourrait être indépendant de la morphologie. Ceci devrait être rapidement vérifié sur la base des lignées quasi-isogéniques en cours d'obtention. Si ces lignées expriment un bon niveau de résistance malgré un tallage important et une petite taille, des expérimentations au niveau tissulaire,

cellulaire et éventuellement au niveau des protoplastes devraient permettre de préciser les sites d'action du QTL.

2. BASES GENETIQUES DE LA RESISTANCE ET CONSEQUENCES POUR L'AMELIORATION

Un des objectifs de cette étude était la connaissance des bases génétiques de la résistance partielle au RYMV dans le but de faciliter l'amélioration des variétés *indica* pour ce caractère. Les caractéristiques de la résistance mises en évidence nous permettent maintenant d'évaluer les possibilités de transfert de la résistance des variétés *japonica* pluviales vers les variétés *indica*.

2.1. Résistance partielle polygénique ou résistance monogénique ?

Deux types de résistance au RYMV ont été mis en évidence. Nous avons montré au cours de ce travail que les variétés de type *japonica* pluvial de l'espèce *O. sativa* présentent une résistance partielle et polygénique. Par ailleurs, quelques variétés de l'espèce *O. glaberrima*, dont Tog-5681, et la variété Gigante de l'espèce *O. sativa* sont très hautement résistantes au RYMV. Parmi les différentes interactions plantes/virus considérées par Khetarpal *et al.* (1998), 78% des résistances sont sous un contrôle monogénique. L'interaction entre Tog-5681 ou Gigante et le RYMV est sous un contrôle monogénique récessif (Ndjondjop *et al.*, 1998) et correspond donc au cas le plus fréquent. Par ailleurs, même lorsque la résistance est sous un contrôle polygénique, un QTL majeur et des QTL à effets faibles sont le plus souvent mis en évidence : c'est notamment le cas pour la résistance du concombre au CMV (Baudracco-Arnas, 1995), la résistance du maïs au MSV (Pernet *et al.*, 1998a ; Pernet *et al.*, 1998b) et la résistance du piment à certaines souches de PVY et au potyvirus E (Caranta, 1995). En revanche, même si certains critères de résistance n'ont permis la détection que d'un ou deux QTL, la résistance partielle au RYMV est contrôlée par plusieurs QTL à effet modéré. Ce déterminisme génétique est comparable à celui impliqué dans la résistance du piment à la multiplication du CMV, caractère contrôlé par au moins six QTL dont les effets sont modérés et variables selon les expérimentations (Caranta, 1995).

La résistance identifiée chez Gigante et Tog-5681 est *a priori* plus facilement exploitable en sélection que la résistance partielle. Il faut cependant considérer que les résistances totales sont fréquemment contournées par les pathogènes (Fraser, 1990 ; Tresh, 1990). Fraser (1990) note 38 interactions où un isolat viral virulent a été identifié contre 11 interactions où aucun isolat virulent n'a été mis en évidence. La détection d'isolats virulents est plus fréquente lorsque le gène de résistance est dominant mais plusieurs gènes récessifs ont également été contournés (Salchuzzaman et Wilkins, 1984 ; Khetarpal *et al.*, 1990) . Par conséquent, quels que soient les avantages immédiats liés à l'utilisation du (ou des) gène(s) de résistance des variétés Tog-5681 et Gigante, et même si ces gènes sont efficaces contre les neuf isolats viraux contre lesquels ils ont été testés jusqu'à présent

(Ndjiondjop, non publié), il est possible qu'une utilisation intensive et prolongée de ces gènes soit limitée par l'émergence d'isolats virulents. Malgré les difficultés liées à la sélection d'un caractère quantitatif, il est donc essentiel de ne pas négliger l'importance de la résistance partielle, d'approfondir son étude et d'envisager son exploitation.

2.2. Stabilité des QTL dans différentes conditions d'évaluation

Avant d'envisager l'utilisation de QTL de résistance en sélection, il est important de connaître l'effet de ces QTL dans différentes conditions environnementales afin de sélectionner, en connaissance, des QTL efficaces dans une large gamme d'environnements, ou au contraire des QTL qui s'expriment plus spécifiquement dans certaines conditions. Dans plusieurs études, en effet, les jeux de QTL détectés se sont avérés dépendants de l'environnement (Paterson *et al.*, 1991 ; Zhuang *et al.*, 1997), des conditions d'évaluation (Danesh *et al.*, 1994) ou des isolats ou races de pathogènes (Caranta *et al.*, 1997a). En général, les QTL ayant un effet fort sont stables tandis que les QTL dont les effets sont faibles sont spécifiques de certaines conditions d'évaluation.

Dans notre étude, l'effet de certains QTL est variable suivant les critères de résistance utilisés et d'autres QTL ne sont détectés qu'avec un critère de résistance. En raison du nombre de QTL détectés et du faible effet de chacun d'eux, il n'est pas surprenant de trouver des QTL spécifiques de certains critères de résistance. Les conditions méthodologiques (nombre de lignées évaluées, héritabilité de certains caractères...) peuvent être invoquées pour expliquer que certains QTL n'aient pas été détectés dans toutes les évaluations mais la relation entre la morphologie et la résistance suggère que le niveau de résistance doit fortement dépendre du stade de développement et des conditions physiologiques des plantes. On peut ainsi penser que certains QTL de résistance, détectés par exemple avec le test ELISA « précoce » réalisé en conditions contrôlées, sont dépendants de facteurs morphologiques s'exprimant précocement qui n'ont pas d'effet sur des plantes plus âgées, et ne sont donc pas impliqués dans la résistance estimée avec le test ELISA « tardif » ou au champ.

Les QTL du chromosome 1, du chromosome 12 et un QTL du chromosome 2 sont cependant apparus stables avec différents critères de résistance ; on peut les qualifier de QTL « généralistes ». On observe en particulier qu'ils sont impliqués dans la résistance à différents stades de croissance de la plante et à plusieurs isolats viraux. Le QTL12h, par exemple, est détecté avec un isolat viral du Mali et un isolat du Burkina Faso, malgré une différence d'agressivité notable entre ces deux isolats (Albar, 1994) et des différences sérologiques (Fargette, non publié). Malgré le caractère polygénique et la complexité des bases génétiques de la résistance partielle, il semble donc possible de sélectionner des composantes de la résistance efficaces dans une large gamme d'environnements. C'est notamment en raison de ces caractéristiques que le QTL du chromosome 12 a été choisi pour initier l'introgession de la résistance partielle dans un fond génétique *indica*.

2.3. Effet du fond génétique

Avant de commencer l'introgession du QTL12h dans la variété IR64, nous avons recherché des épistasies entre ce QTL et le reste du génome. En effet, certaines études suggèrent que des épistasies expliquent probablement une variation importante de nombreux caractères quantitatifs (Li, 1998). Ainsi Doebley *et al.* (1995) ont mis en évidence que l'effet de QTL impliqués dans l'architecture des plants de maïs et de teosinte pouvait être fortement modifié en fonction du fond génétique. Par conséquent, avant d'envisager l'introgession d'un QTL dans un fond génétique différent du fond génétique dans lequel il a été mis en évidence, il est important d'étudier ses interactions avec d'autres régions du génome. Le QTL12h s'est effectivement avéré agir en interaction avec plusieurs autres locus et plus de 30% de la variance de deux critères de résistance semble contrôlée par des interactions entre ce QTL et des régions des chromosomes 1 et 7.

Des épistasies semblent, de manière générale, avoir un rôle important dans le contrôle génétique des maladies. La recherche d'épistasies entre tous les marqueurs du génome a été entreprise à l'INRA d'Avignon dans le cadre de plusieurs interactions plante/pathogène. Des épistasies ont ainsi été détectées pour expliquer la résistance du piment à *P. capsici* (Lefebvre et Palloix, 1996) et à des potyvirus (Caranta *et al.*, 1997a) et la résistance du concombre au CMV (Baudracco-Arnas, 1995). Le nombre d'interactions détectées suggère que, malgré des faux positifs liés aux seuils de détection choisis, certaines interactions sont effectives. Caranta *et al.* (1997a) notent toutefois que des populations de taille supérieure seraient nécessaires pour les confirmer. D'autres auteurs ont testé uniquement les interactions entre les QTL détectés ; Wang *et al.* (1994), par exemple, ont mis en évidence de telles interactions pour expliquer la résistance du riz à la pyriculariose. Il est intéressant de noter qu'une de ces interactions est détectée entre le marqueur RG869 et le marqueur RG351, cartographiés respectivement dans les régions des chromosomes 12 et 7 impliquées dans la principale interaction contrôlant la résistance au RYMV, mais Wang *et al.* ne précisent pas les combinaisons d'allèles favorables.

Le type d'interaction est important à considérer car les interactions n'auront pas toutes le même impact sur la sélection des QTL. Ainsi, l'interaction entre le QTL1 et le QTL12h expliquant l'impact de la maladie sur la hauteur à maturité et la durée du cycle est de type dupliquée : les plantes ayant au moins un des deux QTL sont résistantes. Ce type d'interaction, conduisant à la sélection de plantes possédant indifféremment l'un et/ou l'autre des QTL, n'aura donc qu'un effet limité. En revanche, l'interaction entre le QTL12h et le QTL7 est de type complémentaire, les allèles de résistance aux deux locus sont nécessaires pour améliorer notablement le niveau de résistance. En supposant que seule cette interaction contrôle la résistance, la sélection assistée par marqueurs du QTL12h seul conduirait dans la moitié des cas à la perte du QTL7 et donc à la sélection de plantes très peu résistantes.

Lark *et al.* (1995) ont détecté des interactions de type complémentaire pour expliquer la hauteur de plants de soja. Ils notent que des interactions favorables de ce type entre des locus localisés sur des groupes de liaison différents peuvent se maintenir aisément dans des espèces autogames. En particulier, dans l'espèce *O. sativa*, les modèles de stérilité hybride dus à des gènes gamétophytiques dupliqués et la restriction des recombinaisons dans des croisements éloignés (Oka, 1974) peuvent refléter des co-adaptations entre locus pour différents caractères morphologiques ou physiologiques. De même, nous avons vu précédemment que la diversité au niveau du QTL7 et éventuellement au niveau du QTL12h était liée à la structure *indica/japonica* (Second et Ghesquière, 1995 ; Chapitre V) et que l'interaction QTL12h x QTL7 pouvait correspondre à une interaction entre gènes co-adaptés. Si tel est le cas, ces locus ne sont pas co-adaptés pour conférer la résistance au virus puisque nous avons vu que cette résistance ne résultait pas d'une co-évolution hôte/pathogène, mais pour d'autres caractères, peut-être de type morphologique.

2.4. Liaison avec des caractères défavorables

La relation entre les QTL de résistance et les QTL de morphologie est essentielle à prendre en compte dans la sélection de variétés résistantes. Fréquemment, en effet, l'amélioration d'un caractère peut être limitée par son association avec des caractères défavorables, soit en raison d'une liaison génétique entre des QTL, soit en raison de l'effet pléiotrope de certains QTL sur les deux caractères. Dans l'interaction riz/RYMV, la relation résistance/morphologie est susceptible d'être limitante pour l'exploitation de la résistance. En effet, l'amélioration génétique des variétés de culture irriguée a conduit à l'adoption d'un type morphologique optimal, qu'il semble difficile de modifier pour améliorer la résistance au RYMV sans que cela ait un impact sur l'adaptation aux conditions de culture et sur la récolte. Des efforts devront donc être réalisés pour sélectionner des variétés résistantes sans modifier leur morphologie.

Parmi les différents QTL mis en évidence au cours de cette étude, le QTL le plus prometteur est le QTL du chromosome 12. Aucun QTL de morphologie « défavorable » n'a en effet été mis en évidence au même endroit. Cependant, la différenciation *indica/japonica* au niveau de ce QTL et la détection d'une interaction complémentaire, suggérant la présence de gènes co-adaptés, soulignent l'importance d'une étude approfondie de l'effet du QTL12h sur la morphologie et l'adaptation au milieu. Cette étude sera prochainement entreprise sur les lignées quasi-isogéniques en cours d'obtention : les plantes seront évaluées à la fois pour leur niveau de résistance au RYMV et pour certaines composantes morphologiques, dont le tallage.

De même, le QTL identifié sur le chromosome 1 a un effet important sur la résistance, mais son intérêt en amélioration est directement lié à la nature exacte de la relation entre ce QTL et le gène de semi-nanisme *sd-1*. La contre-sélection du gène *sd-1* entraînerait, en effet, des pertes importantes de rendement. Il serait donc souhaitable de développer une stratégie permettant de préciser la relation

entre le QTL de résistance et *sd-1*. Par exemple, la cartographie fine de cette région du génome pourrait être envisagée à partir du croisement IR64 x Azucena et des lignées complémentaires en cours d'obtention dans le cadre du programme européen de cartographie comparée des graminées. Une autre approche pourrait s'appuyer sur l'étude d'une population en ségrégation pour *sd-1* mais dans laquelle le tallage est indépendant de la hauteur, telle que la population Peta/Taichung Native, précédemment étudiée par Aquino et Jennings (1966).

3. CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de préciser les bases génétiques de la résistance partielle au RYMV. Les résultats obtenus soulignent le caractère polygénique de cette résistance et indiquent qu'elle résulte, pour une grande part, de facteurs morphologiques et de facteurs liés à la structure *indica/japonica* et à des gènes co-adaptés. Toutefois, on ne peut exclure que des facteurs indépendants de la structure génétique ou indépendants de la morphologie participent également à l'expression de la résistance. Ces différentes composantes permettent d'expliquer le niveau de résistance observé dans les différents groupes de variétés. Ainsi, des facteurs de résistance indépendants de la structure *indica/japonica*, seuls facteurs présents chez les variétés *indica*, expliquent le faible niveau de résistance de ces variétés. Les variétés *japonica* tempérées bénéficient en plus de gènes co-adaptés au sein du groupe génétique *japonica* ; ces deux éléments expliquent la résistance intermédiaire de ces variétés. Quant aux variétés *japonica* pluviales, elles possèdent les deux facteurs de résistance présents chez les variétés tempérées mais leur principal atout face à la panachure jaune est sans doute leur morphologie.

Les différents facteurs de résistance que nous avons mis en évidence expliquent que l'amélioration du niveau de résistance partielle des variétés *indica* à haut potentiel agronomique soit difficile. Cependant, même si le gène de résistance majeur de la variété Gigante est rapidement transféré dans des variétés agronomiquement intéressantes, il est nécessaire de poursuivre l'étude de la résistance partielle. Ceci permettra d'anticiper l'émergence potentielle d'un isolat viral surmontant la résistance de Gigante et de mieux maîtriser les mécanismes de résistance afin de mieux les exploiter. La sélection assistée par marqueurs de tous les QTL identifiés n'est pas envisageable, mais les marqueurs liés aux QTL de résistance pourraient permettre de faciliter ponctuellement certaines étapes de la sélection pour la résistance partielle. Ainsi, ces marqueurs peuvent être utilisés pour faciliter l'introgession d'un QTL d'un intérêt particulier, comme nous le faisons actuellement pour le QTL12h. Par ailleurs, si l'hypothèse de liaison génétique entre des QTL de résistance et des QTL de morphologie était démontrée dans certains cas, les marqueurs moléculaires pourraient également être utiles en sélection multi-caractères pour rompre ces liaisons. Prochainement, l'effet du QTL du chromosome 12 dans un fond génétique *indica* sera testé grâce aux lignées quasi-isogéniques en cours

d'obtention. Si l'effet du QTL est confirmé, ceci constituerait une avancée importante pour l'exploitation de la résistance partielle.

Par ailleurs, le couple riz/RYMV constitue un modèle intéressant pour l'étude des interactions plante/virus. Le riz est une plante modèle dont l'étude présente de nombreux avantages et intérêts et les caractéristiques du RYMV, en particulier sa capacité à être transmis mécaniquement, sa grande stabilité et son très haut pouvoir infectieux, en font un bon modèle viral. En outre, ce couple permet d'étudier à la fois une résistance très élevée et monogénique et une résistance partielle polygénique, et une relation originale a été mise en évidence entre la résistance et la morphologie. Dès à présent, les résultats acquis dans cette étude ainsi que par d'autres approches développées au LPRC (CIRAD/ORSTOM) et à l'ILTAB (ORSTOM/TSRI) permettent de mieux comprendre les mécanismes de la résistance du riz au RYMV. Ces approches (dosage de la protéine de capsid et des ARN viraux dans différents tissus végétaux, étude de la réplication des protoplastes) pourront prochainement être utilisés sur les lignées quasi-isogéniques pour caractériser l'effet du QTL12h. L'ensemble des résultats obtenus permettra de progresser dans la connaissance de l'interaction riz/RYMV et participera à la compréhension des interactions plante/virus en général.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abo ME, Sy AA, Alegbejo MD** (1998) Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) in Africa : evolution, distribution, economic significance on sustainable rice production and management strategies. *Journal of Sustainable Agriculture* 11 (2-3) : 85-111.
- Agrios GN** (1998) *Plant Pathology*. Fourth edition. Academic Press.
- Albar L** (1994) Evaluation de la concentration virale dans deux populations haploïdes doublées et recherche de marqueurs de résistance au virus de la panachure jaune du riz (RYMV). Rapport de DEA, Université Paris XI.
- Antonio BA, Inoue T, Kajiya H, Nagamura Y, Kurata N, Minobe Y, Yano M, Nakagahra M, Sasaki T** (1996) Comparison of genetic distance and order of DNA markers in five populations of rice. *Genome* 39 : 946-956.
- Aquino RC, Jennings PR** (1966) Inheritance and significance of dwarfism in an *indica* rice variety. *Crop Science* 6 : 551-554.
- Arumuganathan K, Earle ED** (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9 (3) : 208-218.
- Awoderu VA** (1991) Rice Yellow Mottle virus in West Africa. *Tropical Pest Management* 37 (4) : 356-362.
- Baker CJ, Orlandi EW** (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33 : 299-321.
- Bakker W** (1970) Rice Yellow Mottle Virus, a mechanically transmissible virus disease of rice in Kenya. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 76 : 53-63.
- Bakker W** (1974) Characterisation and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya. Thèse de doctorat, Université de Wageningen.
- Baudracco-Arnas S** (1995) Cartographie génétique du melon (*Cucumis melo L*) et recherche de QTL de la résistance au virus de la mosaïque du concombre et de quelques caractères morphologiques. Thèse de doctorat, Université Paris XI.
- Beavis WD, Grant D** (1991) A linkage map based on information from four F2 populations of maize (*Zea mays L.*). *Theoretical and Applied Genetics* 82 : 636-644.
- Bent AF, Kunkel BN, Dahlbeck D, Brown KL, Schmidt R, Giraudat J, Leung J, Staskawicz BJ** (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana* : a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265 : 1856-1860.
- Berzal-Herranz A, de la Cruz A, Tenllado F, Diaz-Ruiz JR, Lopez L, Sanz AI, Vaquero C, Serra MT, Garcia-Luque I** (1995) The *Capsicum L3* gene-mediated resistance against the tobamoviruses is elicited by the coat protein. *Virology* 209 : 498-505.

- Bonman JM, Mackill AO, Glaszmann JC** (1990) Resistance to *Gerlachia oryzae* in rice. *Plant Disease* 74 (4) : 306-309.
- Bonman JM, Khush GS, Nelson RJ** (1992) Breeding rice for resistance to pests. *Annual Review of Phytopathology* 30 : 507-528.
- Bonneau C** (1998) Etude cytologique et moléculaire du mouvement du virus de la panachure jaune du riz (RYMV) dans le riz. Thèse de doctorat, Université Paris XI.
- Brown AHD** (1975) Sample sizes required to detect linkage disequilibrium between two or three loci. *Theoretical Population Biology* 8 : 184-201.
- Brugidou C, Holt C, Ngon A Yassi M, Zhang S, Beachy R, Fauquet C** (1995) Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of rice yellow mottle virus and mutagenesis of the coat protein. *Virology* 206 : 108-115.
- Bubeck DE, Goodman MM, Beavis WD, Grant D** (1993) Quantitative trait loci controlling resistance to gray leaf spot in maize. *Crop Science* 33 : 838-847.
- Busto GA, Ogawa T, Endo N, Tabien RE, Ikeda R** (1990) Distribution of genes for resistance to bacterial blight of rice in Asian countries. *Rice Genetics Newsletter* 7 : 126-128.
- Caranta C** (1995) Dissection génétique de résistances complexes à plusieurs virus chez le piment (*Capsicum annuum* L.) à l'aide de marqueurs moléculaires : organisation des facteurs de résistance sur le génome. Thèse de doctorat, Université de la Méditerranée.
- Caranta C, Lefebvre V, Palloix A** (1997a) Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10 (7) : 872-878.
- Caranta C, Palloix A, Lefebvre V, Daubèze AM** (1997b) QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper : restriction of virus installation in host-cells. *Theoretical and Applied Genetics* 94 : 431-438.
- Causse MA, Fulton TM, Cho YG, Ahn SN, Chunwongse J, Wu K, Xiao J, Yu Z, Ronald PC, Harrington SE, Second G, McCouch SR, Tanksley SD** (1994) Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. *Genetics* 138 : 1251-1274.
- Chen M, San Miguel P, Bennetzen JL** (1998) Sequence organization and conservation in *sh2/al*-homologous regions of sorghum and rice. *Genetics* 148 : 435-443.
- Chen X, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, McCouch SR** (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 95 : 553-567.
- Cho YG, Eun MY, McCouch SR, Chae YA** (1994) The semidwarf gene, *sd-1*, of rice (*Oryza sativa* L.). II. Molecular mapping and marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* 89 : 54-59.
- Clark MF, Adams RN** (1977) Characteristics of the microplate method of Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34 : 475-483.
- Dahal G, Hibino H, Cabunagan RC, Tiongco ER, Flores ZM, Aguiro VM** (1990) Changes in cultivar reactions to Tungro due to changes in virulence of the leafhopper vector. *Phytopathology* 80 (7) : 659-665.
- Danesh D, Aarons S, McGill GE, Young ND** (1994) Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7 (4) : 464-471.
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH** (1996) Death don't have no mercy : cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell* 8 : 1793-1807.

- Darvasi A, Weinreb A, Minke V, Weller JI, Soller M** (1993) Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134 : 943-951.
- de Vienne D, Causse, M** (1998) La cartographie et la caractérisation des locus contrôlant la variation des caractères quantitatifs. *In* : Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales, de Vienne D (ed), INRA Editions, 89-118.
- Devos KM, Gale MD** (1997) Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology* 35 : 3-15.
- Dirlewanger E, Isaac PG, Ranade S, Belajouzza M, Cousin R, de Vienne D** (1994) Restriction fragment length polymorphism analysis of loci associated with disease resistance genes and developmental traits in *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* 88 : 17-27.
- Dixon MS, Jones DA, Keddle JS, Thomas CM, Harrison K, Jones JDG** (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* 84 : 451-459.
- Doebley J, Stec A, Gustus C** (1995) *teosinte branched1* and the origin of maize : evidence for epistasis and the evolution of dominance. *Genetics* 141 : 333-346.
- Edwards MD, Stuber CW, Wendel JF** (1987) Molecular markers facilitated investigations of QTL in maize. I. Number, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116 : 113-125.
- Farrara BF, Illott TW, Michelmore RW** (1987) Genetic analysis of factors for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in species of lettuce (*Lactuca sativa* and *L. serriola*). *Plant Pathology* 36 : 499-514.
- Fauquet C, Thouvenel JC** (1977) Isolation of the rice yellow mottle virus in Ivory Coast. *Plant Disease Reporter* 61 : 443-446.
- Flor HH** (1955) Host-parasite interaction in flax rust. Its genetic and other implications. *Phytopathology* 45 : 680-685.
- Fomba SN** (1988) Screening or seedling resistance to rice yellow mottle virus in some cultivars in Sierra Leone. *Plant Disease* 72 : 641-642.
- Fraser RS** (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28 : 179-200.
- Fraser RSS** (1998) Biochemistry of resistance to plant viruses. *In* : Plant virus disease control, Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H (eds), APS Press, pp 56-64.
- Fraser RSS, Loughlin SAR** (1980) Resistance to tobacco mosaic virus in tomato : effects of the *Tm-1* gene on virus multiplication. *Journal of General Virology* 48 : 87-96.
- Freyemark PJ, Lee M, Woodman WL, Martinson CA** (1993) Quantitative and qualitative trait loci affecting host-plant response to *Exserohilum turcicum* in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 87 : 537-544.
- Ghesquière A** (1988) Diversité génétique de l'espèce sauvage de riz *Oryza longistaminata* A. Chev. et Roehr et dynamique des flux géniques au sein du groupe *Sativa* en Afrique. Thèse d'Etat, Université Paris XI.
- Ghesquière A, Lorieux M, Roumen E, Albar L, Fargette D, Huang N, Notteghem JL** (1996) *Indica/japonica* doubled haploid population as a model for mapping rice yellow mottle virus and blast resistance genes. *International Rice Research Notes* 21 (2-3) : 47-49.
- Ghesquière A, Albar L, Lorieux M, Ahmadi N, Fargette D, Huang N, McCouch SR, Notteghem JL** (1997) A major quantitative trait locus for rice yellow mottle virus resistance maps to a cluster of blast resistance genes on chromosome 12. *Phytopathology* 87 (12) : 1243-1249.

- Gianinazzi S, Martin C, Vallée JC (1970) Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. CR Académie des Sciences de Paris 270, série D, pp 2383-2386.
- Gilbertson RL, Lucas WJ (1996) How do viruses traffic on the "vascular highway" ? Trends in Plant Science 1 (8) : 260-268.
- Glaszmann JC (1987) Isozyme and classification of Asian rice varieties. Theoretical and Applied Genetics 74 : 21-30.
- Glaszmann JC, Mew T, Hibino H, Kim CK, Vergel de Dios-Mew TI, Vera Cruz CH, Notteghem JL, Bonman JM (1996) Molecular variation as a diverse source of disease resistance. In : Rice Genetics III. Proceedings of the third international rice genetics symposium, Khush GS (ed) International Rice Research Institute Manila, Philippines.
- Goodrick BJ, Kuhn CW, Hussey RS (1991) Restricted systemic movement of cowpea chlorotic mottle virus in soybean with nonnecrotic resistance. Phytopathology 81 (11) : 1426-1431.
- Grant MR, Godiard L, Straube E, Ashfield T, Lewald J, Sattler A, Innes RW, Dangl JL (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. Science 269 : 843-846.
- Guiderdoni E, Courtois B, Glazmann JC (1988) Use of isozyme markers to monitor recombination and assess gametic selection in anther culture derivatives of remotes crosses of rice (*Oryza sativa* L.). In : Review in advances of plant biotechnology, 1985-1988, International Symposium of Genetic Manipulation Crops, 2nd, Mujeeb-Kasi A, Sitch L (eds) International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT) Mexico D.F., Mexico.
- Guiderdoni E, Galinato E, Luistro J, Vergara G (1992) Anther culture of tropical *japonica* x *indica* hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 62 : 219-224.
- Haley CS, Knott SA (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. Heredity 69 : 315-324.
- Hammond-Kosack KE, Jones JD (1997) Plant disease resistance genes. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48 : 575-607.
- Hampton R, Ball E, De Boer S (1990) Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. APS Press, St Paul, Minnesota, USA.
- Harushima Y, Kurata N, Yano M, Nagamura Y, Sasaki T, Minobe Y, Nakagahra M (1996) Detection of segregation distortions in an *indica-japonica* rice cross using a high-resolution molecular map. Theoretical and Applied Genetics 92 : 145-150.
- Harushima Y, Yano M, Shomura A, Sato M, Shimano T, Kuboki Y, Yamamoto T, Lin SY, Antonio BA, Parco A, Kajiya H, Huang N, Yamamoto K, Nagamura Y, Kurata N, Khush GS, Sasaki T (1998) A high-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F2 population. Genetics 148 : 479-494.
- Hayes PM, Cereno J, Witsenboer H, Kuiper M, Zabeau M, Sato K, Kleinhofs A, Kudrna D, Kilian A, Saghai-Marroof M, Hoffman D (1997) Characterizing and exploiting genetic diversity and quantitative traits in barley (*Hordeum vulgare*) using AFLP markers. Journal of Quantitative Trait Loci 3 (2) .
- Heun M (1992) Mapping quantitative powdery mildew resistance of barley using a restriction fragment length polymorphism map. Genome 35 : 1019-1025.
- Hibino H (1996) Biology and epidemiology of rice viruses. Annual Review of Phytopathology 34 : 249-274.
- Hibino H, Daquiaoag RD, Mesina EM, Aguiro VM (1990) Resistances in rice to tungro-associated viruses. Plant Disease 74 : 923-926.

- Hoisington D, Khairallah M, Gonzalez-de-Léon D** (1994) Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Second Edition. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), El Batán, Mexico D.F., Mexico.
- Hoshikawa K** (1993) Morphology and development of vegetative organs. *In* : Science of the rice plant. Volume one : morphology, Hoshikawa K, Matsuo T (eds), Food and Agricultural Policy Research Center, pp 91-294.
- Hospital F, Chevalet C, Mulsant P** (1992) Using markers in gene introgression breeding programs. *Genetics* 132 : 1199-1210.
- Hu CH** (1973) Evaluation of breeding semidwarf rice induced mutation and hybridization. *Euphytica* 22 : 562-574.
- Huang N, Courtois B, Khush G, Lin H, Wang G, Wu P, Zheng K** (1996) Association of quantitative trait loci for plant height with major dwarfing genes in rice. *Heredity* 77 : 130-137.
- Huang N, Angeles ER, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadivel N, Bennett J, Khush GS** (1997a) Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice : marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theoretical and Applied Genetics* 95 : 313-320.
- Huang N, Parco A, Mew T, Magpantay G, McCouch SR, Guiderdoni E, Xu J, Subudhi P, Angeles ER, Khush GS** (1997b) RFLP mapping of isozymes, RAPD and QTLs for grain shape, brown planthopper resistance in a doubled haploid rice population. *Molecular Breeding* 3 : 105-113.
- Hulbert SH, Michelmore RW** (1985) Linkage analysis of genes for resistance to downy mildew (*Bremia lactucae*) in lettuce (*Lactuca sativa*). *Theoretical and Applied Genetics* 70 : 520-528.
- Hull R** (1988) The sobemovirus group. *In* : The Plant viruses. III. Polyedral virions with monopartite RNA genomes, Koenig R (ed), Plenum Press, pp 113-146.
- Inoue T, Zhong HS, Miyao A, Ashikawa I, Monna L, Fukuoka S, Miyadera N, Nagamura Y, Kurata N, Sasaki T, Minobe Y** (1994) Sequence-tagged sites (STSs) as standart landmarks in the rice genome. *Theoretical and Applied Genetics* 89 : 728-794.
- Islam MR, Shepherd KW, Mayo GM** (1989) Recombination among genes at the *L* group in flax conferring resistance to rust. *Theoretical and Applied Genetics* 77 : 540-546.
- Jacquot M, Arnaud M** (1979) Classification numérique de variétés de riz. *Agronomie Tropicale* 34 (2) : 157-173.
- Jansen RC** (1993) Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135 : 205-211.
- Jensen SG, Palomar MK, Ball EM, Samson R** (1985) Factors influencing virus titer in maize dwarf mosaic virus-infected sorghum. *Phytopathology* 75 : 1132-1136.
- Johal GS, Briggs SP** (1992) Reductase activity encoded by the *Hm1* disease resistance gene in maize. *Science* 258 : 985-987.
- Jones DA, Thomas CM, Hammond-Kosack KE, Balint-Kurti PJ, Jones JDG** (1994) Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 266 : 789-793.
- Jones ES, Liu CJ, Gale MD, Hash CT, Witcombe JR** (1995) Mapping quantitative trait loci for downy mildew resistance in pearl millet. *Theoretical and Applied Genetics* 91 : 448-456.
- Jung M, Weldekidan T, Scaff D, Paterson A, Tingey S, Hawk J** (1994) Generation means analysis and quantitative trait locus mapping of anthracnose stalk rot genes in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 89 : 413-418.

- Jung G, Coyne DP, Skroch PW, Nienhuis J, Arnaud-Santana E, Bokosi J, Ariyaratne HM, Steadman JR, Beaver JS, Kaeppler S** (1996) Molecular markers associated with plant architecture and resistance to common blight, web blight, and rust in common beans. *Journal of American Society of Horticultural Science* 121 (5) : 794-803.
- Kanazin V, Marek LF, Schoemaker RC** (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93 : 11746-11750.
- Kesseli R, Witsenboer H, Stanghellini M, Vandermark G, Michelmore R** (1993) Recessive resistance to *Plasmopara lactucae-radialis* maps by bulked segregant analysis to a cluster of dominant disease resistance genes in lettuce. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6 (6) : 722-728.
- Khetarpal RK, Maury Y, Cousin R, Burghofer A, Varma A** (1990) Studies on resistance of pea to pea seed-borne mosaic virus and new pathotypes. *Annual Applied Biology* 116 : 297-304.
- Khetarpal RK, Maisonneuve B, Maury Y, Chalhoub B, Dinant S, Lecoq H, Varma A** (1998) Breeding for resistance to plant viruses. *In* : Plant viruses disease control, Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H (eds), APS Press, pp 14-32.
- Khush GS** (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology* 35 : 25-34.
- Kilian A, Kudrna DA, Kleinhofs A, Yano M, Kurata N, Steffenson B, Sasaki T** (1995) Rice-barley synteny and its application to sturition mapping of the barley *Rpg1* region. *Nucleic Acids Research* 23 (14) : 2729-2733.
- Kinoshita T** (1995) Report of committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genetics Newsletter* 12 : 9-153.
- Konate G, Traore O, Coulibaly MM** (1997) Characterization of rice yellow mottle virus isolates in Sudano-Sahalian areas. *Archives of Virology* 142 : 1117-1124.
- Kouassi N, Brugidou C, Chen L, Ngon A Yassi M, Beachy RN, Fauquet C** (1995) Towards rice transgenic plants expressing the RYMV coat protein gene. *In* : First International Symposium on Rice Yellow Mottle Virus (RYMV), 18-22 septembre, Mbé/Bouaké, Côte d'Ivoire.
- Kuhn CW, Wyatt SD, Brantley BB** (1981) Genetic control of symptoms, movement and virus accumulation in cowpea plants infected with cowpea chlorotic mottle virus. *Phytopathology* 71 (12) : 1310-1315.
- Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, Harushima Y, Sue N, Wu J, Antonio BA, Shomura A, Shimizu T, Lin S, Inoue T, Fukuda A, Shimano T, Kuboki Y, Toyama T, Miyamoto Y, Kirihaara T, Hayasaka K, Miyao A, Monna L, Zhong HS, Tamura Y, Wang ZX, Momma T, Umehara Y, Yano M, Sasaki T, Minobe Y** (1994) A 300 kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* 8 : 365-372.
- Kurata N, Umehara Y, Tanoue H, Sasaki T** (1997) Physical mapping of the rice genome with YAC clones. *Plant Molecular Biology* 35 : 101-113.
- Lande R, Thompson R** (1990) Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124 : 743-756.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE, Newburg L** (1987) MAPMAKER : An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1 : 174-181.
- Lander ES, Botstein D** (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121 : 185-199.
- Landry BS, Hubert N, Crete R, Chang MS, Lincoln SE, Etoh T** (1992) A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome* 35 : 409-420.

- Lark KG, Chase K, Adler F, Mansur LM, Orf JH** (1995) Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92 : 4656-4660.
- Lawrence GJ, Finnegan EJ, Ayliffe MA, Ellis JG** (1995) The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell* 7 : 1195-1206.
- Lecomte N** (1993) Study of the pathogenicity of certain rice yellow mottle virus (RYMV) strains and the resistance of a number of rice cultivar (*Oryza sativa*) to RYMV. Rapport de DEA, Université Montpellier II.
- Lefebvre V, Palloix A** (1996) Both epistatic and additive effects of QTLs are involved in polygenic induced resistance to disease : a case study, the interaction pepper - *Phytophthora capsici* Leonian. *Theoretical and Applied Genetics* 93 : 503-511.
- Leisner SM, Turgeon R, Howell SH** (1993) Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of cauliflower mosaic virus in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 5 : 191-202.
- Leister D, Kurth J, Laurie DA, Yano M, Sasaki T, Devos K, Graner A, Schulze-Lefert P** (1998) Rapid reorganization of resistance gene homologues in cereal genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95 : 370-375.
- Leonards-Schippers C, Gieffers W, Schafer-Pregl R, Ritter E, Knapp SJ, Salamini F, Gebhardt C** (1994) Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato : a case study for QTL mapping in allogamous species. *Genetics* 137 : 67-77.
- Lett JM** (1997) Approche histopathologique de la résistance du riz (*Oryza sativa*) au virus de la panachure jaune du riz (RYMV). Rapport de DEA, Université Paris VI, Université Paris XI, INAPG, ENSAM.
- Li Z** (1998) Molecular analysis of epistasis affecting complex traits. *In* : Molecular dissection of complex traits, Paterson AH (ed), CRC Press, pp 119-130.
- Li Z, Pinson SR, Marchetti MA, Stansel JW, Park WD** (1995a) Characterization of quantitative trait loci (QTLs) in cultivated rice contributing to field resistance to sheath blight (*Rhizoctonia solani*). *Theoretical and Applied Genetics* 91 : 382-388.
- Li Z, Pinson SR, Stansel JW, Park WD** (1995b) Identification of quantitative trait loci (QTLs) for heading date and plant height in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 91 : 374-381.
- Li Z, Pinson SR, Park WD, Paterson AH, Stansel JW** (1997) Epistasis for three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics* 145 : 453-465.
- Lin HX, Qian HR, Zhuang JY, Lu J, Min SK, Xiong ZM, Huang N, Zheng KL** (1996) RFLP mapping of QTLs for yield and related characters in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 92 : 920-927.
- Lin SY, Ikehashi IH, Yanagihara S, Kawashima K** (1992) Segregation distortion via male gametes in hybrids between *indica* and *japonica* or wide compatibility varieties of rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 84 : 812-818.
- Lincoln SE, Daly MJ, Lanini B** (1993) Mapping genes controlling quantitative traits with MAPMAKER/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual (2nd ed). Whitehead Institute for Biomedical Research Techniques Report, Cambridge, Mass.
- Lorieux M, Petrov M, Huang N, Guiderdoni E, Ghesquière A** (1996) Aroma in rice : genetic analysis of a quantitative trait. *Theoretical and Applied Genetics* 93 : 1145-1151.

- Lu C, Shen L, Tan Z, Xu Y, He P, Chen Y, Zhu L** (1997) Comparative mapping of QTLs for agronomic traits of rice across environments by using a doubled-haploid population . *Theoretical and Applied Genetics* 94 : 145-150.
- Mackill DJ, Colowit PM, Oster JJ** (1998) An AFLP marker linked to stem rot resistance in rice. *In* : *Plant Animal Genome VI*, 18-22 janvier, San Diego, CA.
- Maheswaran M, Subudhi PK, Nandi S, Xu JC, Parco A, Yang DC, Huang N** (1997) Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theoretical and Applied Genetics* 94 : 39-45.
- Mansour AN, Baillis KW** (1994) Serological relationships among rice yellow mottle virus isolates. *Annual applied Biology* 125 : 133-140.
- Martin GB** (1994) Analysis of the molecular basis of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistance in tomato. *Euphytica* 79 : 187-193.
- Martin G, Brommonschenkel SH, Chunwongse J, Frary A, Ganai MW, Spivey R, Wu T, Earle ED, Tanksley SD** (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262 : 1432-1435.
- Matsuo T** (1952) Genecological studies on cultivated rice. *Bulletin of National Institution of Agricultural Science of Japan* D 3 : 1-111.
- Mayo GM, Shepherd KW** (1980) Studies of genes controlling specific host-parasite interactions in flax and its rust. *Heredity* 44 : 211-227.
- McCouch SR** (1990) Construction and application of a molecular linkage map of rice based on restriction fragment length polymorphism (RFLP). Thèse de doctorat, Université Cornell, Ithaca, NY.
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD** (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical and Applied Genetics* 76 : 815-829.
- McCouch SR, Nelson RJ, Tohme J, Zeigler RS, Leong SA, Teng PS** (1994) Mapping of blast resistance genes in rice. *In* : *Rice Blast Disease*, Zeigler RS, Leong SA, Teng PS (eds), IRRI, CAB International, pp 167-186.
- McMullen MD, Simcox KD** (1995) Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8 : 811-815.
- Melchinger A** (1990) Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant breeding* 104 : 1-19.
- Michelmore R** (1995) Molecular approaches to manipulation of disease resistance genes. *Annual Review of Phytopathology* 15 : 393-427.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV** (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88 : 9828-9832.
- Milligan SB, Bodeau J, Yaghoobi J, Kaloshian I, Zabel P, Williamson VM** (1998) The root knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *The Plant Cell* 10 : 1307-1319.
- Mohan M, Nair S, Bentur JS, Rao UP, Bennett J** (1994) RFLP and RAPD mapping of the rice *Gm2* gene that confers resistance to biotype 1 of gall midge (*Orseolia oryzae*). *Theoretical and Applied Genetics* 87 : 782-788.

- Mohan M, Sathyanarayanan PV, Kumar A, Srivastava MN, Nair S** (1997) Molecular mapping of a resistance-specific PCR-based marker linked to a gall midge resistance gene (*Gm4t*) in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 95 : 777-782.
- Monna L, Miyao A, Zhong HS, Yano M, Iwamoto M, Umehara Y, Kurata N, Hayasaka H, Sasaki T** (1997) Saturation mapping with subclones of YACs: DNA marker production targeting the rice blast disease resistance gene, *Pi-b*. *Theoretical and Applied Genetics* 94 : 170-176.
- Morishima H** (1969) Differentiation of pathogenic races of *Pyricularia oryzae* into two groups, "indica" and "japonica". *SABRAO Newsletter* 1 (2) : 81-94.
- N'guessan P, Pinel A, Caruana ML, Frutos R, Sy A, Ghesquière A, Fargette D** (1998) Evidence of two serotypes of rice yellow mottle virus in Côte d'Ivoire. *Phytopathology* (soumis) .
- Nair S, Bentur JS, Prasada Rao U, Mohan M** (1995) DNA markers tightly linked to a gall midge resistance gene (*Gm2*) are potentially useful for marker-aided selection in rice breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 91 : 68-73.
- Naqvi NI, Chattoo BB** (1996) Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. *Genome* 39 : 26-30.
- Ndjondjop M-N, Albar L, Fargette D, Fauquet C, Ghesquière A** (1998) Genetic basis of the very high resistance to Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) in some varieties of the two cultivated rice species. *Plant Disease* (soumis).
- Nei M** (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 70 : 3321-3323.
- Nei M** (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press.
- Nelson RR** (1978) Genetics of horizontal resistance to plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 16 : 359-378.
- Ngon A Yassi M, Ritzenthaler C, Brugidou C, Fauquet C, Beachy RN** (1994) Nucleotide sequence and genome characterisation of rice yellow mottle virus RNA. *Journal of General Virology* 75 : 249-257.
- Nodari RO, Tsai SM, Gilbertson RL, Gepts P** (1993) Toward an integrated linkage map of bean. 3. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. *Genetics* 134 : 341-350.
- Nono-Womdim R, Gebre-Selassie K, Marchoux G** (1993) Migration des virus dans la plante. *Revue bibliographique. Agronomie* 13 : 785-813.
- Oka HI** (1958) Intervarietal variation and classification of cultivated rice. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding* 18 : 78-89.
- Oka HI** (1974) Analysis of genes controlling F1 sterility in rice by the use of isogenic lines. *Genetics* 77 : 521-534.
- Opalka N** (1998) Structure et effets cytopathologiques du virus de la panachure jaune du riz (RYMV). Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal.
- Opalka N, Brugidou C, Bonneau C, Nicole M, Beachy RN, Yeager M, Fauquet C** (1998) Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95 : 3323-3328.
- Ouattara M** (1996) Impact économique de la panachure jaune. Atelier de formation sur le diagnostic et le contrôle du RYMV, ADRAO, Bouaké, Côte d'Ivoire, 1-4 septembre.
- Padgett HS, Beachy RN** (1993) Analysis of a tobacco mosaic virus strain capable of overcoming *N* gene mediated resistance. *Plant Cell* 5 : 577-586.

- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE, Tanksley SD** (1988) Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335 : 721-726.
- Paterson AH, Damon S, Hewitt JD, Zamir D, Rabinowitch HD, Lincoln SE, Lander ES, Tanksley SD** (1991) Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato : comparison across species, generations, and environments. *Genetics* 127 : 181-197.
- Pernet A, Hoisington D, Dintinger J, Jewell D, Jiang C, Khairallah M, Letourmy P, Marchand J-L, Glaszmann JC, Gonzales de Leon D** (1998) Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. II Resistance in line CIRAD390 and stability across germplasm. *Theoretical and Applied Genetics* (soumis) .
- Pernet A, Hoisington D, Franco J, Isnard M, Jewell D, Jiang C, Marchand J-L, Reynaud B, Glaszmann JC, Gonzales de Leon D** (1998) Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. I Resistance in line D211 and stability against different virus clones. *Theoretical and Applied Genetics* (soumis) .
- Pflieger S, Lefebvre V, Blattes A, Caranta C, Daubèze AM, Nemouchi G, Phaly T, Palloix A** (1998) Disease-resistance genes analogs as candidates for genes and QTLs involved in pepper/pathogens interactions. *In : Plant and Animal Genome VI*, 18-22 january, San Diego, CA.
- Pinto Y, Kok R, Baulcombe DC** (1998) Pathogen-derived resistance to rice yellow mottle virus. *In : Seventh International Congress of Plant Pathology*, 9-16 août, Edinburgh, Ecosse.
- Ponz F, Glascock CB, Bruening G** (1988) An inhibitor of polypeptide processing with the characteristics of a natural virus resistance factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1 (1) : 25-31.
- Qian HR, Zhuang JY, Lin HX, Lu J, Zheng KL** (1995) Identification of a set of RFLP probes for subspecies differentiation in *Oryza sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics* 90 : 878-884.
- Rasaony M** (1990) Application d'un test immunoenzymatique à l'étude de la résistance au rice yellow mottle virus. Rapport de stage, CNEARC Montpellier.
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe D** (1997) A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276 : 1558-1560.
- Ray JD, Yu L, McCouch SR, Champoux MC, Wang G, Nguyen HT** (1996) Mapping quantitative trait loci associated with root penetration ability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 92 : 627-636.
- Redoña ED, Mackill DJ** (1996) Molecular mapping of quantitative trait loci in *japonica* rice. *Genome* 39 : 395-403.
- Redoña ED, Ocampo T, Manangkil O, Pacada I** (1998) QTL-based classification of rice cultivars for direct-seeding. *In : Plant Genome VI*, 18-22 janvier, San Diego, CA.
- Rossel HW, Thottappilly G, Buddenhagen IW** (1982) Occurrence of rice yellow mottle in two important rice-growing areas of Nigeria. *FAO Plant Protection Bulletin* 30 : 137-139.
- Saghai-Marouf MA, Zhang Q, Biyashev RM** (1994) Molecular marker analysis of powdery mildew resistance in barley. *Theoretical and Applied Genetics* 88 : 733-740.
- Saito AM, Yano M, Kishimoto N, Nakagahra M, Yoshimura A, Saito K, Kuhara S, Ukai Y, Kawase M, Nagamine T, Yoshimura S, Ideta O, Oshawa R, Hayano Y, Iwata N, Sugiura M** (1991) Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Japanese Journal of Breeding* 41 : 665-670.
- Salchuzzaman M, Wilkins PW** (1984) Components of resistance to ryegrass mosaic virus in a clone of *Lolium perenne* and their strain specificity. *Euphytica* 33 : 411-12.

- Sebastian LS, Ikeda R, Huang N, Imbe T, Coffman WR, McCouch SR** (1996) Molecular mapping of resistance to rice tungro spherical virus and green leafhopper. *Phytopathology* 86 (1) : 25-30.
- Second G** (1991) Molecular markers in rice systematics and the evaluation of genetic resources. *In* : *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol 14 Rice, Bajaj YP (ed), Springer-Verlag, pp 468-494.
- Second G, Ghesquière A** (1995) Cartographie des introgressions réciproques entre les sous-espèces *indica* et *japonica* de riz cultivé (*Oryza sativa* L.). *In* : *Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires*, 29-31 mars 1994, Montpellier, Berville A, Tersac M (eds), INRA Editions, pp 83-93.
- Sehgal OP, Abou Haidar MG, Gellatly DL, Ivanov I, Thottappilly G** (1993) An associated small RNA in rice yellow mottle sobemovirus homologous to the satellite RNA of lucerne transient streak sobemovirus. *Molecular Plant Pathology* 83 (12) : 1309-1311.
- Sicard D, Michalakakis Y, Dron M, Neema C** (1997) Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centers of diversity of its host, *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 87 (8) : 807-813.
- Singh BN** (1995) Breeding for RYMV resistance. *In* : *First International Symposium on Rice Yellow Mottle Virus (RYMV)*, 18-22 septembre, Mbé/Bouaké, Côte d'Ivoire.
- Singh K, Ishii T, Parco A, Huang N, Brar DS, Khush GS** (1996) Centromere mapping and orientation of the molecular linkage map of rice (*Oryza sativa* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93 : 6163-6168.
- Soller M, Brody T, Genizi A** (1976) On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 47 : 35-39.
- Song W, Wang G, Chen L, Kim H, Pi L, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W, Zhu L, Fauquet C, Ronald P** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa-21*. *Science* 270 : 1804-1806.
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98 : 503-517.
- Sticher L, Mauch-Mani B, Métraux JP** (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35 : 235-270.
- Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedmann-Medinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B** (1993) Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75 : 687-706.
- Stuber CW, Lincoln SE, Wolff DW, Helentjaris T, Lander ES** (1992) Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132 : 823-839.
- Tanksley SD** (1993) Mapping polygenes. *Annual Review of Genetics* 27 : 205-233.
- Thottappilly G, Rossel HW** (1993) Evaluation of resistance to rice yellow mottle virus in *Oryza* species. *Indian Journal of Virology* 9 (1) : 65-73.
- Tinker NA, Mather DE** (1995) MQTL : software for simplified composite interval mapping of QTL in multiple environments. *Journal of Quantitative Trait Loci* 1 (2) .
- Tresh JM** (1990) Plant virus epidemiology : the battle of the genes. *In* : *Recognition and response in plant-virus interactions*, Fraser RSS (ed), Springer-Verlag, pp 93-121.
- van Ooijen JW** (1992) Accuracy of mapping quantitative trait loci in autogamous species. *Theoretical and Applied Genetics* 84 : 803-811.

- Wang ZY, Tanksley SD** (1989) Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. *Genome* 32 : 1113-1118.
- Wang ZY, Second G, Tanksley SD** (1992) Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 83 : 565-581.
- Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ** (1994) RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance of blast in a durably resistant cultivar. *Genetics* 136 : 1421-1426.
- Watanabe Y** (1993) Classification and morphological characters of plants in genus *Oryza*. In : Science of the rice plant. Volume one : morphology, Hoshikawa K, Matsuo T (eds), Food and Agricultural Policy Research Center, pp 23-34.
- Weber H, Schultze S, Pfitzner AJP** (1993) Two amino acid substitutions in the tomato mosaic virus 30-kilodalton movement protein counter the ability to overcome the *Tm-2²* resistance gene in tomato. *Journal of Virology* 67 : 6432-6438.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B** (1994) The product of tobacco mosaic virus resistance gene *N* : similarity to Toll and the Interleukine-1 receptor. *Cell* 78 : 1101-1115.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalsky JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18 (22) : 6531-6535.
- Wu P, Zhang G, Huang N, Ladha JK** (1995) Non-allelic interaction conditioning spikelet sterility in an F2 population of *indica/javanica* cross in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 91 : 825-829.
- Wu P, Zhang G, Huang N** (1996) Identification of QTLs controlling quantitative characters in rice using RFLP markers. *Euphytica* 89 : 349-354.
- Wu P, Lou A, Zhu J, Zhang L, Wu Y, Huang N, Senedhira D** (1998) Molecular markers linked to genes for tolerance to ferrous toxicity in rice seedlings. *Rice Genetics Newsletter* 14 : 90-92.
- Xiao J, Li J, Yuan L, Tanksley SD** (1995) Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice as revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics* 140 : 745-754.
- Xu Y, Zhu L, Xiao J, Huang N, McCouch SR** (1997) Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular and General Genetics* 253 : 535-545.
- Yadav R, Courtois B, Huang N, McLaren G** (1997) Mapping genes controlling root morphology and root distribution in a doubled-haploid population of rice. *Theoretical and Applied Genetics* 94 : 619-632.
- Yang GP, Saghai-Maroo MA, Xu CG, Zhang Q, Biyashev RM** (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Molecular and General Genetics* 245 : 187-194.
- Yoshimura A, Ideta O, Iwata N** (1997) Linkage map of phenotype and RFLP markers in rice. *Plant Molecular Biology* 35 : 49-60.
- Yoshimura S, Umehara Y, Kurata N, Nagamura Y, Sasaki T, Minobe Y, Iwata N** (1996) Identification of a YAC clone carrying the *Xa-1* allele, a bacterial blight resistance gene in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 93 : 117-122.
- Yoshimura S, Yamanouchi U, Katayose Y, Toki S, Wang Z-X, Kono I, Kurata N, Yano M, Iwata N, Sasaki T** (1998) Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95 : 1663-1668.

- Young ND (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. Annual Review of Phytopathology 34 : 479-501.
- Young ND, Tanksley SD (1989) RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. Theoretical and Applied Genetics 77 : 353-359.
- Young ND, Danesh D, Menancio-Hautea D, Kumar L (1993) Mapping oligogenic resistance to powdery mildew in mungbean with RFLPs. Theoretical and Applied Genetics 87 : 243-249.
- Yu LX, Nguyen HT (1994) Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). Theoretical and Applied Genetics 87 : 668-672.
- Yu YG, Buss GR, Saghai-Maroo MA (1996) Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93 : 11751-11756.
- Yu ZH, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Guiderdoni E, Notteghem JL, Tanksley SD (1996) Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). Theoretical and Applied Genetics 93 : 859-863.
- Zamir D, Ekstein-Michelson I, Zakay Y, Navot N, Zeidan M, Sarfatti M, Eshed Y, Harel E, Pleban T, van-Oss H, Kedar N, Rabinowitch HD, Czosnek H (1994) Mapping and introgression of a tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, *Ty-1*. Theoretical and Applied Genetics 88 : 141-146.
- Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics 136 : 1457-1468.
- Zhang HB, Wing RA (1997) Physical mapping of the rice genome with BACs. Plant Molecular Biology 35 : 115-127.
- Zhang Q, Saghai-Maroo MA, Lu TY, Shen BZ (1992) Genetic diversity and differentiation of *indica* and *japonica* rice detected by RFLP analysis. Theoretical and Applied Genetics 83 : 495-499.
- Zheng K, Qian H, Shen B, Zhuang J, Lin H, Lu J (1994) RFLP-based phylogenetic analysis of wide compatibility varieties in *Oryza sativa* L. Theoretical and Applied Genetics 88 : 65-69.
- Zheng KL, Zhuang JY, Qian HR, Lin HX (1996) Identification of DNA markers tightly linked to blast resistance genes in rice. In : Rice Genetics III. Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, Khush GS (ed), International Rice Research Institute Manila, Philippines.
- Zhuang JY, Lin HX, Lu J, Qian HR, Hittalmani S, Huang N, Zheng KL (1997) Analysis of QTL x environment interaction for yield components and plant height in rice. Theoretical and Applied Genetics 95 : 799-808.
- Zink FW, Duffus JE (1973) Inheritance and linkage of turnip mosaic virus and downy mildew (*Bremia lactucae*) reaction in *Lactuca serriola*. Journal of the American Society of Horticultural Science 98 : 49-51.

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Exemples de populations de riz ayant permis la cartographie de QTL contrôlant des caractères d'intérêt agronomique	18
Tableau 1.2. Quelques gènes de résistance clonés et leurs fonctions ou leurs homologues avec des domaines protéiques de fonction connue	24
Tableau 1.3. Quelques exemples de QTL de résistance mis en évidence dans différentes interactions plante/pathogène	32
Tableau 2.1. Récapitulatif des variétés sélectionnées.....	52
Tableau 2.2. Transformations réalisées sur les DO obtenues par test ELISA lors de l'évaluation de la collection variétale	62
Tableau 2.3. Récapitulatif des critères de résistance estimés sur la collection variétale.....	62
Tableau 2.4. Contenu en virus chez les variétés IR64, Azucena, IRAT177 et Apura à différentes dates après l'inoculation.....	64
Tableau 2.5. Récapitulatif des caractères mesurés sur les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura et abréviations utilisées	68
Tableau 2.6. Provenance des sondes RFLP utilisées.....	72
Tableau 3.1. Symptômes et contenu en virus dans les groupes de variétés <i>indica</i> , <i>japonica</i> tempérées et <i>japonica</i> pluviales et les groupes iso-enzymatiques II et V	80
Tableau 3.2. Caractéristiques des variables agro-morphologiques observées dans la population IR64/Azucena sur des plantes saines cultivées au champ, au Mali.....	84
Tableau 3.3. Corrélations phénotypiques entre les différents caractères agro-morphologiques mesurés sur les plantes saines de la population IR64/Azucena.....	86
Tableau 3.4. Caractéristiques des estimateurs de la résistance au champ et des symptômes, dans la population IR64/Azucena.....	88
Tableau 3.5. Héritabilité du contenu en virus dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura et normalité des distributions	90
Tableau 3.6. Evaluation du contenu en virus dans des descendance F1 et F2.....	92
Tableau 3.7. Corrélations entre les différents critères de résistance estimés au champ et en conditions contrôlées dans la population IR64/Azucena	92
Tableau 3.8. Corrélations entre les caractères morphologiques, mesurés sur des plantes saines cultivées au champ, et les critères de résistance, dans la population IR64/Azucena	94

Tableau 4.1. Les QTL de morphologie détectés dans la population IR64/Azucena	106
Tableau 4.2. Les QTL de résistance au RYMV détectés dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura	112
Tableau 4.3. Effet des locus impliqués dans la résistance sur chaque critère de résistance	116
Tableau 4.4. Mise en évidence d'interactions entre RG869 (QTL12h) et différents locus du génome pour expliquer la résistance au RYMV	122
Tableau 5.1. Déséquilibres de liaison normalisés entre les locus du chromosome 12 utilisés pour caractériser la collection variétale	136
Tableau 5.2. Diversité génétique au sein de la collection de variétés pour les marqueurs du chromosome 12	138
Tableau 5.3. Effet du génotype aux différents locus cartographiés à proximité du QTL12h sur le niveau de résistance.....	144
Tableau 5.4. Les facteurs de résistance potentiels participant à la résistance des variétés <i>indica</i> , <i>japonica</i> pluviales et <i>japonica</i> tempérées	148

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Les groupes iso-enzymatiques chez <i>O. sativa</i>	16
Figure 1.2. Types morphologiques et groupes iso-enzymatiques chez <i>O. sativa</i>	16
Figure 1.3. Le cycle du virus dans la plante et les sites d'action potentiels des mécanismes de résistance	26
Figure 1.4. Principe de la mise en évidence de QTL dans une descendance F2 avec une recherche sur marqueurs individuels	30
Figure 1.5. Organisation des gènes et des QTL de résistance aux maladies et aux insectes cartographiés chez le riz.....	34
Figure 1.6. Les différents pays d'Afrique où la panachure jaune a été détectée	42
Figure 1.7. Organisation du génome du RYMV.....	44
Figure 1.8. Comparaison du contenu en RYMV chez six variétés de riz.....	48
Figure 2.1. Dispositif de culture des lignées HD de la population IR64/Azucena au Mali.....	56
Figure 2.2. Relation entre la concentration virale et la DO obtenue en test ELISA	60
Figure 2.3. Nomenclature des étages foliaires chez le riz	64
Figure 3.1. Distribution du contenu en virus une semaine après inoculation au sein des variétés des groupes <i>indica</i> , <i>japonica</i> tempéré, <i>japonica</i> pluvial et des groupes iso-enzymatiques II et V ...	80
Figure 3.2. Corrélations entre le contenu en virus une semaine après inoculation et le contenu en virus trois semaines après inoculation dans les trois principaux groupes variétaux	82

Figure 3.3. Distribution de la hauteur à maturité et de la durée du cycle semis-épiaison, dans la population IR64/Azucena.....	84
Figure 3.4. Distribution de l'impact de l'infection sur la hauteur et la durée du cycle semis-épiaison dans la population IR64/Azucena	88
Figure 3.5. Distribution du contenu en virus dans les populations IR64/Azucena et IRAT177/Apura 90	
Figure 4.1. Carte génétique de la population de lignées HD IR64/Azucena	99
Figure 4.2. Carte génétique de la population IRAT177/Apura comparée à la carte de la population IR64/Azucena.....	102
Figure 4.3. Cartographie de QTL impliqués dans l'expression de caractères agro-morphologiques dans la population IR64/Azucena.....	108
Figure 4.4. Cartographie des QTLs du chromosome 2 impliqués dans le contenu en virus au stade « précoce » en « Simple Interval Mapping » et « Composite Interval Mapping ».....	110
Figure 4.5. Cartographie de QTL impliqués dans l'expression de la résistance au RYMV dans la population IR64/Azucena.....	114
Figure 4.6. Cartographie d'un QTL impliqué dans le contenu en virus estimé avec le test ELISA « tardif », sur le chromosome 12, dans les populations IR64/Aucena et IRAT177/Apura	116
Figure 4.7. Position des QTL impliqués dans la hauteur et le tallage à maturité et dans le contenu en virus au champ sur le chromosome 1	118
Figure 4.8. Position des QTL contrôlant la hauteur huit semaines après semis , le contenu en virus estimé avec le test ELISA "tardif" et les symptômes au champ sur le chromosome 2	118
Figure 4.9. Génotype de la lignée HD P303	124
Figure 4.10. Distribution du contenu en virus, estimé avec le test ELISA « tardif », dans les descendances des plantes 303-0 et 303-17	124
Figure 5.1. Diversité RFLP chez <i>O. sativa</i>	132
Figure 5.2. Analyse factorielle des correspondances (axes 1 et 2) sur la collection variétale	140
Figure 5.3. Carte du chromosome 12 chez <i>O. sativa</i> (Os), dans le groupe <i>indica</i> (I) et dans le groupe <i>japonica</i> (J).....	142
Figure 5.4. Corrélation entre la différenciation <i>indica/japonica</i> et le pourcentage de variance de la variable ELISA2 expliqué par les différents locus.....	146
Figure 6.1. Relations entre la résistance partielle au RYMV et différentes caractéristiques génétiques et morphologiques des variétés de riz	154
Planche 1. Symptômes occasionnés sur le riz par le virus de la panachure jaune	43

ANNEXES

ANNEXE 1. Les variétés de la collection : groupe génétique et niveau de résistance.

Le groupe des différentes variétés de la collection a été déterminé en fonction des données iso-enzymatiques (Glazman, 1987), de leurs coordonnées sur l'axe 1 de l'ACP réalisée sur la base de marqueurs RFLP par Second et Ghesquière (1995) et des données connues sur leur écotype. Le niveau de résistance au RYMV de ces variétés a été évalué par l'expression des symptômes (AUSPC) et à l'aide de tests ELISA réalisés une semaine (ELISA1) et trois semaines (ELISA2) après inoculation.

Variété	Groupe*	Groupe iso-enz.	Axe 1 ACP	Ecotype**	ELISA1	ELISA2	AUSPC
AI-CHIAO-HONG	<i>ind</i>	1	-1,524	A	-0,2	1,1	228
AKAI-MAI	<i>ind</i>		-1,316	A	-0,4	-0,7	243
ASD-1	<i>ind</i>	1	-1,423	I	-0,7	0,8	221
BATAK-640	<i>ind</i>		0,16	A	-0,5	-0,3	203
BG90-2	<i>ind</i>					1,3	238
C-5444	<i>ind</i>		-0,307	A	1,5	1,1	254
CARREON	<i>ind</i>	1	-1,299	A	-0,3	1,2	242
CERE-AIR	<i>ind</i>	1	-1,612	A	0,2	0,4	265
CHAU	<i>ind</i>	1		U	1,3	1,2	246
CHINSURAH-BORO-1	<i>ind</i>		-0,359	A	-0,1	-0,2	265
CO-18	<i>ind</i>	1	-1,358	I	0,2	-0,5	236
DGWG	<i>ind</i>		-1,412	A	0,8	1,0	238
GOWDALU-(HS21)	<i>ind</i>		-1,483	A	1,5	0,9	260
GUAN-YIN-TSAN	<i>ind</i>	1	-1,312	A	0,7	-0,7	238
GUICHOW	<i>ind</i>		-1,443	A	1,2	0,8	264
HEUKJEKDO	<i>ind</i>		-0,89	A		-1,1	
IL IS AIR	<i>ind</i>	1	-1,539	A	1,0	0,6	253
IR-36	<i>ind</i>		-1,691	A	1,5	0,6	257
IR-42	<i>ind</i>		-1,656	A	1,0	0,9	243
IR-53960-219-2-1-3-1	<i>ind</i>		-1,353	A	0,4	0,8	266
IR-56381-139-2-2	<i>ind</i>		-1,551	A	1,1	1,1	272
IR-56381-77-1-2	<i>ind</i>		-1,583	A	1,1	0,6	277
IR-56450-4-2-2	<i>ind</i>		-1,316	A	1,0	0,8	251
IR-64	<i>ind</i>		-1,429	A	0,8	1,1	286
IR-8-366	<i>ind</i>	1	-1,623	A	0,2	0,7	250
IR-5	<i>ind</i>	1	-1,387	RL	-0,5	0,2	241
IR-8-115	<i>ind</i>	1	-1,73	A	-0,6	0,8	256
IRAT-121	<i>ind</i>		-0,381	A	1,0	0,8	233
JC-117	<i>ind</i>	1	-1,48	A	-0,2	0,4	233
JC-120	<i>ind</i>	1	-1,418	A	0,7	0,8	
KAUKKYI-ANI	<i>ind</i>	1	-1,059	A		-0,2	
KAW-DAWK-MALI-105	<i>ind</i>	1	-1,45	RL	-0,6	0,0	265
KAW-LUYOENG	<i>ind</i>	1	-1,447	I	0,3	1,2	247
KWANG-CHANG-AI	<i>ind</i>	1	-1,779	A	0,5	1,4	250
LATISAIL	<i>ind</i>		-1,721	A	1,8	1,1	319
LEUANG-PRATEW	<i>ind</i>	1	-1,579	A	1,5	0,9	243
MTU-9	<i>ind</i>	1		UI	-1,0	0,9	229
MUGDO	<i>ind</i>		-1,408	A	0,1	1,1	253
NAM-SAGUI-19	<i>ind</i>	1	-1,563	RLDW	0,2	0,9	256
PATIK	<i>ind</i>	1	-1,631	A	0,7	0,6	236

* Les variétés ont été classées en cinq groupes : les groupes *indica*, *japonica* tempéré et *japonica* pluvial et les groupes iso-enzymatiques II et V.

**U : culture pluviale ; I : irrigation contrôlée ; RL : culture aquatique non contrôlée, traditionnel de bas-fonds ; DW : culture d'immersion profonde ; A : culture aquatique au sens large, si pas d'autres spécifications.

Variété	Groupe génétique	Groupe iso-enz.	Axe 1 ACP	Ecotype	ELISA1	ELISA2	AUSPC
PETA	<i>ind</i>	1	-1,333	A	0,5	0,8	266
PTB-9	<i>ind</i>	1	-1,35	I	-1,0	-0,2	215
S-624-(AC-398)	<i>ind</i>	1	-1,558	A	0,3	0,5	243
SAFRI	<i>ind</i>		-1,219	A	1,0	-0,4	243
SINNA-SITHINA-KALI	<i>ind</i>	1	-1,443	U	-0,5	1,2	223
T-719	<i>ind</i>		-1,314	A	1,2	-0,4	240
TANGKAI-ROTAN	<i>ind</i>		-1,535	A	0,7	0,9	255
TETEP	<i>ind</i>	1	-1,363	A	0,2	0,4	253
TKM- 6	<i>ind</i>		-1,182	A	0,7	0,9	247
TONGIL	<i>ind</i>		-0,898	A	0,5	0,4	235
DA-9	<i>ind</i>	1	-1,614	A			
GIGANTE	<i>ind</i>						
63-104	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,6	-2,2	190
ARIAS	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,2	-1,5	224
AZUCENA	<i>jap pluv</i>	6	2,476	U	-0,9	-1,2	200
BICQ-BRANDO	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,9	-2,1	193
BINULAWAN	<i>jap pluv</i>	6	2,328	U	-1,4	-1,5	233
CANA-ROXA	<i>jap pluv</i>	6		U	-0,9	-0,9	187
CHUAN-4	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,1	-0,4	212
CHUAN-3	<i>jap pluv</i>	6		U	0,0	1,0	243
DAM	<i>jap pluv</i>	6	2,695	U	-1,1	-1,2	205
DOURADO-AGULHA	<i>jap pluv</i>	6		U	-0,8	-1,6	190
DOURADO-PRECOCE-	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,6	-2,3	168
GOGO-LEMPUK	<i>jap pluv</i>	6		U	-0,5	-0,1	209
GOTAK-GATIK	<i>jap pluv</i>	6	2,625	U	-0,3	0,4	213
HAIFUGOYA	<i>jap pluv</i>	6	2,859	U	-0,5	0,5	216
HAWM-OM	<i>jap pluv</i>	6	2,368	U	-0,9	-0,8	206
IAC-25	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,5	-2,7	155
IGUAPE-CATETO	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,6	-1,9	193
INDANE	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,4	-0,9	180
IRAT-13	<i>jap pluv</i>	6	2,745	U	-1,5	-2,3	184
KHAO-DAM	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,9	-0,9	
KHAO-KAP-XANG	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,6	-1,2	205
KINANDANG-PATONG	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,6	-1,0	205
LAC-23	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,5	-1,1	205
MOROBEREKAN	<i>jap pluv</i>	6	2,598	U	-0,8	-1,0	205
OIRAN	<i>jap pluv</i>	6		U	-0,6	-1,0	219
OS-4	<i>jap pluv</i>	6	2,532	U	-0,5	-1,2	212
PALAWAN	<i>jap pluv</i>	6	2,314	U	-0,9	-0,9	193
RATHAL-1	<i>jap pluv</i>	6		U	-0,1	0,8	216
RATHAL-2	<i>jap pluv</i>	6		U	0,0	0,5	233
REXORO	<i>jap pluv</i>	6	2,009	U	-0,4	-0,6	218
RIKUTO-KEMOCHI	<i>jap pluv</i>	6		U	-0,6	-1,3	205
RT-1031-69	<i>jap pluv</i>	6		U	-2,0	-2,2	180
SENG	<i>jap pluv</i>	6		U	-1,4	-1,7	201
PRATAO	<i>jap pluv</i>	6		U			
57-11-8-4 (F5)	<i>jap temp</i>		0,966	A		-1,1	202
AICHI-ASAHI	<i>jap temp</i>	6	2,341	I	0,0	0,5	243
CAROLINA-GOLD	<i>jap temp</i>	6	2	A	-0,8	-0,1	193
CI-5319	<i>jap temp</i>		2,39	A	-0,4	0,5	210
CICIH-BETON	<i>jap temp</i>	6	2,674	A	-0,3	-0,1	205
DAVAO	<i>jap temp</i>	6		A	-1,5	-1,8	180
DEOKJEOKJODO	<i>jap temp</i>	6		A	0,8	0,6	266

Variété	Groupe génétique	Groupe iso-enz.	Axe 1 ACP	Ecotype	ELISA1	ELISA2	AUSPC
HAGINOMAE-MOCHI	<i>jap temp</i>	6		A	1,0	0,6	238
HEI-CHIAO-CHUI-LI-HS.	<i>jap temp</i>	6		A	1,5	-0,3	205
HILL-RICE-MISHIMA	<i>jap temp</i>		2,208	A	-0,9	-0,6	205
HONDURAS	<i>jap temp</i>		2,447	A	-1,3	-0,8	201
JUMALI	<i>jap temp</i>	6		A	0,5	0,1	275
JUMULA-2	<i>jap temp</i>	6	0,366	A	0,0	-0,6	215
KARASUKARA-SUR.	<i>jap temp</i>	6		A	-1,2	0,5	221
LEMONT	<i>jap temp</i>		2,396	A	0,4	-0,9	206
MALAGKIT-PIR.	<i>jap temp</i>	6		A	-0,2	-0,5	233
NABESHI	<i>jap temp</i>	6		A	-0,4	-0,3	215
PAGAIYAHAN	<i>jap temp</i>	6	-0,259	A			
PATE-BLANC-MNI	<i>jap temp</i>	6	0,035	A	-0,5	-0,8	228
REXMONT	<i>jap temp</i>			A	-1,5	-1,3	219
SHAN-KIU-JU	<i>jap temp</i>	6	2,469	A	0,9	0,7	238
SHOEMED	<i>jap temp</i>		2,476	A	-0,8	-1,4	211
T-571	<i>jap temp</i>		2,769	A	0,3	-0,2	226
TAICHUNG-65	<i>jap temp</i>		2,418	A	0,2	0,9	253
TREMBESE	<i>jap temp</i>	6	1,599	A	0,1	-0,8	205
T-564	<i>jap temp</i>			A			
TA-HUNG-KU	<i>jap temp</i>	6		A			
BLACK-GORA(NCS-12)	II	2		U	0,9	1,0	260
DA-16	II	2		URL	0,2	1,4	244
DA-28	II	2		URL	1,2	1,2	267
DULAR	II	2	-0,76	U	0,8	1,0	245
FR-13-A	II	2	-0,668	DW	0,2	0,8	241
JHONA-349	II	2	-0,582	A	1,1	0,5	251
LAMBAYEKE-1	II	2	-0,392	U	1,0	0,4	261
N-22	II	2	-0,392	U	1,9	0,5	242
PTB-30	II	2		U	1,3	1,7	236
SURJAMKUHI	II	2		U	0,9	0,4	255
TCHAMPA-32362	II	2		U	-0,4	0,7	258
ARC 13829	V	5	1,791	A	-0,5	-0,3	238
VATI-370	V	5	0,895	I	0,4	0,0	234
DOM-SOFID	V	5	1,617	A	2,2	0,5	230
FARANGEY	V	5		U	0,7	0,1	201
JC-157	V	5	1,424	A	1,3	1,1	239
PANKHARI-203	V	5	0,93	A	1,3	0,5	233
PHUDUGEY	V	5		U	0,7	0,5	206
T-26	V	5	-0,169	A	1,5	0,9	245
TCHAMPA-32368	V	5		U	1,5	0,3	243
ABRI	V	5		U			

ANNEXE 2. Protocole de préparation des anticorps monoclonaux couplés à la phosphatase alcaline.

- ajouter 100 µl de phosphatase alcaline (10 mg/ml, Boehringer) à 1 ml d'anticorps purifié (1 mg/ml)
- dialyser 5 h à température ambiante contre 500 ml de PBS + 0,06% de glutaraldehyde
- éliminer l'excès de glutaraldéhyde par 3 dialyses de 3 heures chacune, à 4°C, contre 500 ml de PBS (NaCl 1360 mM ; Na₂HPO₄ 80 mM ; KH₂PO₄ 14 mM ; KCl 26 mM ; pH 7,4)
- le conjugué est conservé à -20°C après ajout de 5 mg/ml de sérum albumine bovine et dilution au ½ dans du glycérol

ANNEXE 3. Solutions courantes.

- Tampon PBS-T : NaCl 1360 mM ; Na₂HPO₄ 80 mM ; KH₂PO₄ 14 mM ; KCl 26 mM ; Tween 20 5 ml/l ; pH 7,4
- Tampon TE : Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8
- Tampon TAE : Tris 40 mM, EDTA 1 mM, 0,11% d'acide acétique glacial, pH 8
- Tampon TBE : Tris 18 mM, EDTA 0,4 mM, acide borique 18 mM, pH 8
- SSC 2X : NaCl 0,3 M, citrate de sodium 30 mM, pH 7
- Bleu : glycérol 30%, bleu de bromophénol 0,25%, EDTA 0,1 M, pH 8
- Bromure d'éthidium : 2,5 mg/l dans de l'eau Millipore
- Rnase A : dissoudre la Rnase A à une concentration de 10 mg/ml dans une solution d'acétate de sodium 0,01 M, pH 5,2. Chauffer cette solution au bain-marie à 100°C, pendant 15 mn. Lorsque la solution est revenu à température ambiante, ajuster le pH en ajoutant 0,1 volume de Tris-HCl 1 M, pH 7,4.
- Denhart 100 X : dissoudre par agitation magnétique 20 g de Ficoll, 20 g de PVP 40 et 20 g de BSA dans 800 ml d'eau stérile. Filtrer au travers d'un papier Whatmann, aliquoter et conserver à -20°C.
- Milieu LB : tryptone (ou peptone) 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l

ANNEXE 4. Transformation bactérienne (méthode PEG).

Préparation des cellules compétentes :

- préparer une préculture de la souche d'*Escherichia coli* DH5 α
- ensemencer un erlen de 30 ml (milieu LB) avec 100 μ l de solution de bactéries
- mettre à 37°C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une DO comprise entre 0,3 et 0,6 (600 nm)
- centrifuger 10 mn à 4°C à 1000 g
- éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 3 ml de TSB (LB + 10% de PEG, 10 mM de MgCl₂ et 10 mM de MgSO₄) à 4°C, contenant 5% de DMSO
- placer les bactéries 140 mn à 4°C
- utiliser immédiatement ou aliquoter dans des Eppendorfs plongés dans l'azote liquide et conserver à -80°C

Transformation

- ajouter 10 à 100 ng de plasmide à 100 μ l de bactéries compétentes
- placer les bactéries 15 mn dans la glace
- ajouter 0,9 ml de TSB et 20 μ l de glucose 1 M
- placer 1 h à 37°C sous agitation
- les bactéries peuvent être étalées sur boites

**A STUDY OF THE GENETIC BASIS OF PARTIAL RESISTANCE
OF RICE TO YELLOW MOTTLE VIRUS (RYMV)
Molecular Mapping and Relationship with Genetic Diversity**

Summary :

The genetic basis of the partial resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) have been studied using a collection of 130 varieties, representative of the genetic and the morphological diversity in *Oryza sativa*. Symptoms and virus content estimated with ELISA test indicate that *japonica* varieties are more resistant than *indica* ones and that, in the *japonica* group, tropical varieties are more resistant than temperate ones.

Virus content, symptoms and RYMV impact on morphological traits at field level have been studied in doubled-haploid populations obtained from *indica* x tropical *japonica* crosses (IR64/Azucena and IRAT177/Apura). Our results underline the polygenic character of partial resistance of rice to RYMV and show a relationship between resistance and morphology. Phenotypic correlations have been detected between resistance and tillering, and resistance and plant height. QTLs have been mapped on eight genomic regions, some of which are also implicated in morphology. In particular, the semi-dwarf gene *sd-1* is localised in a region involved in resistance. On chromosome 12, a QTL of resistance, which seems independent of morphology, has been detected in the two populations. In the population IR64/Azucena, the QTL of chromosome 12 is involved in interactions with other regions of the genome. Its introgression in the variety IR64 is being made to confirm its effect in an *indica* genetic background. Genetic diversity in the collection of varieties has been studied using molecular markers mapped in the region of the QTL of chromosome 12 : polymorphism in this region is closely linked both to resistance level and to *indica/japonica* differentiation.

**ETUDE DES BASES GENETIQUES DE LA RESISTANCE PARTIELLE
DU RIZ AU VIRUS DE LA PANACHURE JAUNE (RYMV) :
Cartographie Moléculaire et Relation avec la Diversité Génétique**

Résumé

La résistance partielle du riz (*Oryza sativa* L.) au virus de la panachure jaune (RYMV) a été étudiée à partir d'une collection de 130 variétés représentatives de la diversité morphologique et génétique chez *O. sativa*. Les symptômes et l'estimation du contenu en virus par test ELISA indiquent une meilleure résistance des variétés *japonica* que des variétés *indica* et, au sein des variétés *japonica*, une meilleure résistance des variétés pluviales que des variétés tempérées.

Le contenu en virus, les symptômes et l'impact du RYMV, au champ, sur des caractères morphologiques ont été étudiés dans des populations de lignées haploïdes doublées, issues de croisements *indica* x *japonica* pluvial (IR64/Azucena et IRAT177/Apura). Nos résultats soulignent le caractère polygénique de la résistance partielle au RYMV et montrent une relation entre la résistance et la morphologie. Des corrélations phénotypiques ont été détectées entre le niveau de résistance et le tallage, et en moindre mesure la hauteur. Des QTL de résistance ont été cartographiés par marquage moléculaire (RFLP) sur huit régions du génome dont certaines sont également impliquées dans la morphologie. En particulier, le gène de semi-nanisme *sd-1* est localisé dans une région fortement impliquée dans la résistance. Sur le chromosome 12, un QTL de résistance a été détecté dans les deux populations et semble indépendant de la morphologie. Dans la population IR64/Azucena, ce QTL est impliqué dans des interactions avec d'autres régions du génome, notamment une région du chromosome 7. L'introgession du QTL du chromosome 12 dans la variété IR64 est en cours afin de valider son effet dans un fond génétique *indica*. Par ailleurs, la diversité génétique de la collection de variétés a été étudiée à l'aide de marqueurs RFLP cartographiés au niveau de ce QTL : dans cette région, le polymorphisme est étroitement lié à la fois à la résistance au RYMV et à la différenciation *indica/japonica*.

Biologie

Spécialité : Biologie, Diversité et Adaptation des Plantes Cultivées, option : Phytopathologie

Mots clés : *Oryza sativa*, RYMV, résistance partielle, cartographie génétique, Quantitative Trait Locus, diversité génétique, épistasie.

Unité Génétique, Laboratoire GeneTrop, ORSTOM, BP5045, 34032 Montpellier cedex