Université Paris VI / Université Paris XI Institut National Agronomique Paris-Grignon Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier

Diplôme d'Etudes Approfondies de Phytopathologie

1996 - 1997

APPROCHE HISTOPATHOLOGIQUE DE LA RESISTANCE DU RIZ (*Oryza sativa*) AU VIRUS DE LA PANACHURE JAUNE (RYMV).

Jean-Michel LETT

Stage effectué de mars à septembre 1997, sous la direction de :
Denis FARGETTE
Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (CIRAD/ORSTOM),
BP 5035 34032 Montpellier.
Michel NICOLE
Laboratoire de Pathologie Végétale Tropicale (ORSTOM),
BP 5045 34032 Montpellier.



Cote: A * 14 938 Ex: 1

Université Paris VI / Université Paris XI Institut National Agronomique Paris-Grignon Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Montpellier

Diplôme d'Etudes Approfondies de Phytopathologie

1996 - 1997

APPROCHE HISTOPATHOLOGIQUE DE LA RESISTANCE DU RIZ (*Oryza sativa*) AU VIRUS DE LA PANACHURE JAUNE (RYMV).

Jean-Michel LETT

Stage effectué de mars à septembre 1997, sous la direction de :
Denis FARGETTE
Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes (CIRAD/ORSTOM),
BP 5035 34032 Montpellier.
Michel NICOLE
Laboratoire de Pathologie Végétale Tropicale (ORSTOM),
BP 5045 34032 Montpellier.

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier le Laboratoire de Phytopathologie des Régions Chaudes / ORSTOM et la formation doctorale Biologie, Diversité et Adaptations des Plantes Cultivées, qui m'ont permis de réaliser ce travail de recherche et je leur suis reconnaissant de m'avoir donné cette chance.

Je remercie très sincèrement Agnès PINEL qui m'a guidé et épaulé tout au long de ce travail, ainsi que toutes les personnes du LPRC : Jamel, Serge, Nathalie, Dominique, Daniel, Mustapha et Fabienne, pour leur précieuse aide technique, leur bonne humeur et leur amitié qu'ils ont offert sans compter.

Je remercie également Frédérique LOPEZ qui a réalisé avec beaucoup de mérite, toute la partie microtomie de ce travail.

J'adresse mes vifs remerciements à Denis FARGETTE et à Michel NICOLE, mes maîtres de stage et interlocuteurs privilégiés. Ils m'ont tous deux fait confiance et m'ont laissé une grande part d'initiative personnelle et d'autonomie tout au long de cette étude.

Enfin, je remercie chaleureusement mes parents et Séverine pour leur soutien. Je leur suis extrêmement redevable de leur compréhension pour toutes les contraintes liées à mes études. Ma dernière pensée va à un vieux compagnon de route qui malheureusement n'est plus.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. Présentation de la maladie	
2. La biologie du virus	
3. La diversité du RYMV	2
4. La résistance du riz au RYMV	
5. La résistance des plantes aux virus	3
5.1. La résistance à la multiplication	
5.2. La résistance à la migration	4
6. Contexte et objectifs de notre étude	5
MATERIELS ET METHODES	6
1. Matériel biologique	
2. Immunodétection des protéines virales par la technique de l'immuno-empreinte	
2.1. Empreinte de la feuille entière sur membrane de nitrocellulose	7
2.2. Détection par immunomarquage enzymatique	
3. Evaluation de la concentration virale par un test ELISA "double-sandwich" direct	
4. Préparation du matériel biologique pour l'observation en microscopie	8
RESULTATS	10
1. Etude de la distribution spatio-temporelle du RYMV par immuno-empreinte et par test ELISA	
1 1 Similarité de distribution	
1.2. Relation entre la charge virale détectée par IE et les symptômes	
1.3. Comparaison des étages foliaires entre les variétés IR64 et A zucena	11
1.4 Cinétiques virales et courbe étalon	12
2 Distribution spatio-temporelle du RYMV en fonction de la date d'inoculation	14
par test ELISA	13
3. Distribution à l'échelle tissulaire du RYMV par immunofluorescence (IF)	15
4. Distribution à l'échelle cellulaire du RYMV par microscopie électronique	14
DISCUSSION	16
PERSPECTIVES	19

Approche histopathologique de la résistance du riz (*Oryza sativa*) au virus de la panachure jaune (RYMV).

L'identification de marqueurs moléculaires de résistance du riz au RYMV, pour la sélection assistée par marqueur, est en cours de réalisation. A titre complémentaire, nous avons entrepris d'analyser l'expression biologique et cytologique de cette résistance et d'en comprendre les mécanismes.

La démarche repose sur la comparaison d'une variété sensible IR64 avec une variété partiellement résistante Azucena, à trois échelles : la plante entière par immuno-empreinte et test ELISA, tissulaire par immunomarquage de type fluorescence et cellulaire par microscopie électronique conventionnelle.

Cette étude a permis de mettre en évidence deux composantes impliquées dans la résistance du riz au virus. La première, liée à la morphogenèse foliaire, se traduit par un décalage entre le taux de croissance de la plante et le mouvement du virus à longue distance, se manifestant par des étages foliaires indemnes de virus, pour les deux variétés étudiées. La seconde, spécifique de la résistance intrinsèque liée à l'interaction plante-virus, entraîne un décalage dans le temps de l'accumulation de la charge virale et la présence d'une importante charge virale dans le méstome exclusivement pour la variété IR64, dont l'acteur principal pourrait être la restriction du mouvement de cellule à cellule par les plasmodesmes.

Mots clés : RYMV, Oryza sativa, panachure jaune du riz, résistance, immunoempreinte, immunomarquage.

Histopathological approach of rice (*Oryza sativa*) resistance to the yellow mottle virus (RYMV).

Identification of resistance molecular markers in rice to RYMV, for selection attend by markers is currently in progress. Correlatively, we have undertaken to analyze the biological and cytological expression of resistance in order to better understand the underlying mechanisms of rice defense. In this respect, comparison between a susceptible variety IR64 and a resistant one Azucena was performed at three different levels : the whole plant by immunoprinting and ELISA test, the tissue level by fluorescent immunolabelling and the cellular level by conventional electron microscopy. This study suggested the involvement of two components in rice resistance to the virus. The first depend on leaf morphogenesis that induced a delay in the virus long distance movement in both cultivars; it resulted in the occurrence of leaf vegetative steps apparently devoid of virus infection. The second component seemed to be specific to resistance expression. It caused a delay in the mestome of the virus in the resistant variety and a high concentration of virus particles in the mestome of the susceptible variety only. This may be explained by a restriction in the cell to cell movement through plasmodesmata.

Key words: RYMV, Oryza sativa, rice yellow mottle, resistance, immunoprinting, immunolabelling.



- Figure 1 : Organisation génomique de l'ARNm de 4450 nucléotides du RYMV. Les cadres ouverts de lecture ou ORF sont représentés par les boites.
 - ORF1: Protéine de 17,8 kDa qui est suspectée intervenir dans le mouvement du virus.
 - ORF2: Polyprotéine de 110 kDa qui donne après clivage une protéine Vpg, une protéine à sérine, une hélicase et une ARN polymérase ARN dépendante.
 - ORF3 : Protéine de 13,7 kDa dont la fonction est inconnue.
 - ORF4 : Protéine de capside de 26 kDa.

INTRODUCTION

1. Présentation de la maladie

La panachure jaune du riz est une maladie virale endémique en Afrique dont l'agent pathogène est le rice yellow mottle virus (RYMV). Décrite pour la première fois au Kenya (Bakker, 1974), elle s'est étendue à l'ensemble du continent africain et à Madagascar lors de l'intensification de la riziculture (Coulibaly *et al.*, 1994). En effet, le changement du système de culture avec l'introduction de nouvelles variétés performantes mais sensibles provenant d'Asie (*Oryza sativa*) et les nouvelles techniques culturales (irrigation, accroissement des surfaces, monoculture, augmentation de la densité des semis et du nombre de cycles de culture) font des plaines humides d'Afrique un écosystème favorable au développement de nombreuses maladies, dont la panachure jaune du riz a bénéficié.

La maladie se manifeste par un changement général de la couleur des feuilles qui présentent des panachures chlorotiques vert clairs lorsqu'elles sont jeunes, et jaunes lorsqu'elles sont plus âgées. Lors d'une attaque précoce, on observe un rabougrissement de la plante pouvant parfois provoquer sa mort. La rizière atteinte par la maladie présente une coloration générale jaune-orangée (Fauquet et Thouvenel, 1987). Les dégâts sont souvent considérables et la baisse de rendement peut atteindre 90 à 100% sur des variétés sensibles (Fomba, 1988). Actuellement, le RYMV et la pyriculariose sont considérés en Afrique comme les principaux problèmes phytosanitaires du riz.

2. La biologie du virus

Les caractéristiques structurales et les propriétés biochimiques du RYMV ont permis de classer ce virus dans le groupe des sobémovirus dont le type est le southern bean mosaic virus (SBMV). C'est un virus icosaédrique, à ARN monocaténaire de polarité positive et lié à une protéine Vpg en position 5' (Hull, 1989). La séquence nucléotidique d'un isolat de Côte d'Ivoire a été obtenue et caractérisée (Ngon A Yassi *et al.*, 1994). L'ARN non polyadénylé est composé de 4450 nucléotides. Il est organisé en quatre cadres ouverts de lecture (ORF) (Figure 1). L'ORF4 code pour la protéine de capside (PC) de 26 kDa. Par homologie de séquence avec le SBMV, la polyprotéine de 110 kDa (ORF2) donnerait après clivage, une protéine Vpg, une protéase à sérine, une hélicase et une ARN polymérase ARN dépendante. La fonction des protéines de 17,8 kDa (ORF1) et 13,7 kDa (ORF3) n'est pas encore attribuée. Un clone d'ADNc infectieux du RYMV a été obtenu et placé en aval du promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7 (Brugidou *et al.*, 1995). Il a été montré, à l'aide de mutations introduites au sein de l'ORF4, que la protéine de capside interviendrait dans le processus d'infection en permettant au virus de se déplacer dans la plante.

Les riz sauvages africains O. longistaminata et O. barthii sont des hôtes naturels du virus et les diverses espèces de graminées constituent des réservoirs permanents. Le RYMV est un virus très stable et sa multiplication est très rapide. En conditions naturelles, le RYMV est transmis par des coléoptères de la famille des Chrysomelidae, principalement Sessilia pusilla et Chaetocnema pulla (Bakker, 1974). Expérimentalement, l'hypothèse d'une transmission par le sol (Raymundo et al., 1976; J. Maran, communication personnelle) et d'une transmission par contact entre les plantes

(Fauquet *et al.*, 1995) ont été émises. Au laboratoire, l'inoculation mécanique est aisée, ce qui facilite considérablement la transmission, la multiplication et l'étude du virus.

3. La diversité du RYMV

Une étude de diversité des caractéristiques biologiques, sérologiques et moléculaires, d'un corpus d'isolats de RYMV d'origines géographiques différentes et de plantes hôtes variées, est en cours. Une meilleure connaissance de la diversité du virus permettra de perfectionner les outils de diagnostic, de tester les tolérances des variétés et d'adapter les méthodes de lutte. Des différences d'agressivité entre les isolats ont été mises en évidence (Lecomte, 1993). L'agressivité est définie comme la propriété intrinsèque des entités virales à se multiplier et à induire des symptômes sur des plantes hôtes. C'est un caractère s'exprimant de manière quantitative (Fraser, 1986). Un isolat provenant du Burkina Faso a montré les symptômes les plus sévères et a atteint les concentrations en virus les plus élevées sur plante sensible.

A partir d'anticorps polyclonaux, une grande variabilité sérologique a été mise en évidence et a permis d'identifier des sérogroupes. Une caractérisation plus précise avec des anticorps monoclonaux a révélé l'existence de cinq sérogroupes aux distributions géographiques distinctes (N'Guessan *et al.*, 1997). Enfin, une caractérisation moléculaire par RT-PCR et séquençage du gène de la protéine de capside a mis en évidence une divergence nucléotidique pouvant atteindre 10% entre les isolats, avec des zones fortement conservées et des zones variables (Sadiky, 1995).

4. La résistance du riz au RYMV

La résistance est un phénomène inhibant totalement ou partiellement une ou plusieurs étapes du cycle viral dans une plante appartenant à une espèce hôte ou non-hôte. La résistance sera qualifiée respectivement de totale ou de partielle. Une plante sera dite sensible, lorsque le virus est capable d'infecter, de se multiplier et de migrer au sein de la plante (Legnani, 1995).

Actuellement, la lutte contre la panachure jaune du riz repose essentiellement sur l'exploitation des résistances variétales naturelles. Des programmes de criblage de nouvelles résistances naturelles et de sélection sont actuellement en cours à l'IITA (International Institute for Tropical Agriculture) et à l'ADRAO (Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest), basés sur l'observation des symptômes. L'utilisation d'espèces sauvages de riz et de riz cultivés africains (*O. glaberrima*) peut également être envisagée car elles représentent des réserves potentielles particulièrement importantes de gènes de résistance (Bonman *et al.*, 1992). Un programme basé sur la résistance dérivée de l'agent pathogène a été initié depuis quelques années par l'ILTAB (International Laboratory for Tropical Agricultural Biotechnology) dont l'objectif est l'obtention de plantes transgéniques résistantes au RYMV. Des clones infectieux du virus ont été synthétisés et placés en aval du promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7 (Brugidou *et al.*, 1995).

Les principales variétés de riz cultivées appartiennent à l'espèce O. sativa. L'utilisation des marqueurs isoenzymatiques et RFLP a permis de mettre en évidence, au sein de cette espèce, deux principaux groupes génétiques, analogues à des sous-espèces : le groupe *indica* et le groupe

japonica (Glazmann, 1987). Les riz de type *indica* (culture inondée ou irriguée) sont sensibles au RYMV, tandis que les variétés de type *japonica* (culture pluviale) sont le plus souvent résistantes.

5. La résistance des plantes aux virus

Globalement, un virus doit infecter, se multiplier et migrer dans une plante pour établir une interaction compatible. La résistance peut résulter de l'altération d'une ou de plusieurs de ces phases de l'écologie du virus dans la plante. Pour les phytovirus en général, les premières étapes du processus infectieux sont peu connues. Aucun récepteur cellulaire n'a encore été mis en évidence. L'introduction du virus dans la cellule végétale se ferait passivement, *via* les blessures (Legnani, 1995). Suite à l'introduction dans la cellule, le virus est décapsidé. La protéine virale Vpg, liée à l'extrémité 5' de l'ARNm viral du RYMV, protégerait ce dernier de dégradations par des exonucléases végétales dans les premières étapes de l'infection (Shababuddin *et al.*, 1988).

5.1. La résistance à la multiplication virale

Lors de la multiplication virale, trois phases sont indispensables : la traduction de l'ARN parental, sa transcription en ARN complémentaire, puis la réplication à partir du brin complémentaire. L'ARNm de polarité positive du RYMV joue le rôle de messager, permettant la production de protéines virales nécessaires au cycle viral. Il a également une fonction de matrice, pour la transcription des brins d'ARN à polarité négative complémentaires qui permettront la réplication. Toute inhibition totale ou partielle de l'une des trois phases principales du processus de multiplication entraînera un degré de résistance. Ainsi, la résistance "extrême" est définie comme une restriction de la multiplication virale s'exprimant chez les plantes entières et dans les cellules isolées de ces plantes, suite à l'inoculation par les virions ou leurs ARN. Alors qu'une résistance dite "facultative" s'exprime au niveau de la plante entière, mais pas au niveau des cellules isolées (Atabekov et Dorokhov, 1984). Cependant, la résistance générale des plantes aux virus ne semble pas être liée à une inhibition de la réplication puisque les virus apparaissent comme étant capable de se répliquer dans les cellules issues de plantes non-hôtes. Mais, elle serait plutôt liée au mouvement au sens large et à sa capacité à atteindre le phloème (Gilbertson et Lucas, 1996).

5.2. La résistance à la migration

Afin de produire une infection systémique, le virus doit pouvoir migrer dans la plante. Cette migration s'effectue principalement selon deux modes : dans un premier temps, un mouvement de cellule à cellule ou à courte distance (mouvement lent) et en deuxième temps un mouvement à longue distance, par le système vasculaire, qui comparativement au précédent est un mouvement rapide (Nono-Womdim, 1993).

Le transport du virus peut être subdivisé en quatre phases (Atabekov et Taliansky, 1990) :

- 1. Migration à courte distance des cellules infectées aux cellules adjacentes dans l'épiderme ou le parenchyme foliaire,
- 2. Transfert du génome viral du parenchyme infecté vers les tissus conducteurs, correspondant à une étape de transition entre le mouvement du virus à courte distance et le mouvement à longue distance,
- 3. Migration du virus à longue distance à travers le phloème et/ou le xylème,

4. Passage des tubes criblés et/ou des faisceaux xylèmiens aux tissus parenchymateux, mouvement inverse de la phase 2.

Les plasmodesmes qui sont des ponts cytoplasmiques entre les cellules adjacentes représentent la voie de transport du matériel viral de cellule à cellule (Lucas and Gilbertson, 1994). La plupart des virus agissent sur les plasmodesmes de manière à provoquer l'ouverture des voies de migration par l'intermédiaire de protéines de mouvement ou en induisant la formation de structures tubulaires (Kasteel *et al.*, 1996). L'infection virale étant dépendante de la plante hôte, Carrington *et al.* (1996) suggèrent que des facteurs spécifiques de l'hôte jouent un rôle clef dans le mouvement, en plus des facteurs de mouvement codés par le virus. Pour certains virus comme le TEV (Tobacco Etch Potyvirus; Dolja *et al.*, 1994, 1995), la protéine de capside semble également impliquée dans le mouvement de cellule à cellule.

La présence du RYMV sous la forme de virions matures icosaédriques dans les plasmodesmes et dans les parois de certaines cellules de riz a été mise en évidence (Brugidou, non publié). La protéine (P1) traduite à partir de l'ORF1 ne serait pas nécessaire à la réplication virale, mais semble indispensable à l'infection systémique. Il est vraisemblable qu'elle soit impliquée dans le mouvement du virus au sens large (mouvement de cellule à cellule et / ou de longue distance) (C. Bonneau, communication personnelle).

La restriction du mouvement de cellule à cellule résulterait d'une inhibition, de la synthèse et / ou de l'action de la protéine de mouvement (Mansky and Hill, 1993).

La grande majorité des phytovirus de monocotylédones migre par le phloème. Le mouvement à longue distance nécessite que le virus soit capable d'entrer et de sortir de la gaine périvasculaire, des cellules compagnes et de la sève élaborée. Ainsi, il a été montré que les plasmodesmes (type I) reliant les cellules du mésophylle et de l'épiderme sont différents à la fois du point de vue de leur morphologie et de leur limite d'exclusion, des plasmodesmes (type II) qui connectent les tissus vasculaires (Leisner *et al.*, 1993). Les données actuelles suggèrent que le mouvement à longue distance implique des fonctions virales et des facteurs de l'hôte, distinctes de celles impliquées dans le mouvement à travers les cellules de l'épiderme et du mésophylle (Carrington *et al.*, 1996). Peu de virus susceptibles de migrer à longue distance par le xylème ont été décrits. Les virus

Peu de virus susceptibles de migrer à longue distance par le xylème ont été décrits. Les virus transmis par coléoptères, comprenant les sobemovirus et les comovirus, seraient transportés à la fois par les vaisseaux du xylème et les tubes criblés du phloème (Hull, 1989; Nono-Womdim, 1993). La capacité du blueberry shoestring sobemovirus (BBSV) à migrer simultanément par le phloème et le xylème a été mise en évidence par une étude sérologique et cytologique (Urban *et al.*, 1989). Les mécanismes, qui permettent à ces virus de passer du xylème aux cellules voisines capables d'assurer leur multiplication, ne sont pas connus.

Brugidou (1995) a montré que la protéine de capside du RYMV était indispensable au mouvement à longue distance et interviendrait également dans le mouvement de cellule à cellule. Mais selon le pathosystème étudié, la translocation du virus à longue distance peut à la fois dépendre de la présence ou de l'absence de la protéine de capside. Ainsi, pour une grande majorité des phytovirus la conformation des virions sous la forme d'une nucléocapside est nécessaire à la migration à longue distance et ne l'est pas pour d'autres (Pooma *et al.*, 1996). Il n'existe pas une seule mais probablement plusieurs formes de migration à longue distance dans la plante.

6. Contexte et objectifs de notre étude

L'identification de marqueurs moléculaires de résistance du riz au RYMV est menée par l'ORSTOM. Ils seront utilisés dans un programme de sélection assistée par marqueurs (gain de temps et réduction des coûts). Leur stratégie d'étude repose sur l'identification de Quantitative Trait Loci (QTL) de résistance au sein de lignées Haploïdes Doublés (HD). Ces lignées sont issues d'un croisement entre un parent sensible IR64 du type *indica* et un parent partiellement résistant Azucena du type *japonica*. La charge virale de la plante entière après inoculation mécanique est le critère quantitatif de résistance retenu. La concentration virale a été estimée par une méthode immuno-enzymatique : le test ELISA. La distribution de la résistance parmi les lignées HD montre un profil bimodal suggérant qu'une résistance majeure opère dans la descendance. Un QTL majoritaire a été détecté sur le chromosome 12 et plusieurs autres QTL mineurs, qui seraient impliqués dans la résistance du riz au RYMV (Albar, 1994).

Afin de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la résistance du riz au RYMV, nous avons entrepris de compléter ces travaux par une étude à l'échelle cellulaire des parents à l'origine de ces lignées. L'objectif de cette étude est d'analyser l'expression biologique et cytologique de la résistance détectée et d'en comprendre les modalités.

La démarche de mon étude histo- et cytopathologique des mécanismes de la résistance du riz au RYMV repose sur un travail réalisé successivement à trois échelles, en comparant un parent sensible IR64 et un parent partiellement résistant Azucena, à l'origine des lignées HD. Au niveau de la plante entière par immuno-empreinte et par test ELISA, nous avons entrepris de visualiser la distribution spatio-temporelle du virus par étage foliaire. Cette première étape nous a permis de sélectionner les zones d'intérêts pour le travail au niveau tissulaire par immunofluorescence et au niveau ultrastructural par microscopie électronique.



Figure 2 : Symptômes de la panachure jaune du riz à 17 jours après inoculation chez la variété sensible IR64 et chez la variété résistante Azucena, inoculées 15 jours après semis.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

La variété IR64 appartient à l'espèce O. sativa de type indica; riz irrigué utilisé fréquemment en Afrique, très productif mais très sensible au RYMV. La variété Azucena est un O. sativa de type japonica; riz pluvial, moins productif mais présentant une résistance partielle (Figure 2). En complément, nous avons également étudié la variété TOG5681 (O. glaberrima), qui est un riz cultivé africain, et la variété Giganté (O. sativa de type indica) caractérisées toutes les deux par une absence totale de symptômes de la panachure jaune du riz, à la fois en serre et au champ.

Le matériel viral utilisé pour notre étude est un isolat de RYMV provenant du Burkina Faso (BF1) et présentant une très forte agressivité. Ce choix nous permet de distinguer rapidement dans le temps la variété sensible de la variété partiellement résistante et d'exacerber les mécanismes de résistance mis en jeu. Pour conserver le virus, les feuilles virosées de jeunes plants de la variété IR64 âgés de 30 jours sont récoltées et congelées à -80°C, 15 jours après inoculation. Dans le cas d'une succession de semis inoculés par le virus, les inoculations sont réalisées directement à partir de matériel frais virosé.

Pour l'ensemble de notre étude, nous avons inoculé mécaniquement la troisième feuille déroulée (nomenclature Hoshikawa, 1993) (Figure 3) 15 jours après semis et réalisé nos tests sur les feuilles déroulées ultérieurement. L'inoculum est obtenu par broyage de 1g de feuille virosée dans 10ml de tampon (KH2PO4 à 0,1M et Na2HPO4 à 0,1M, ajusté au pH7,2). L'inoculation mécanique est réalisée en frottant la feuille avec un doigt ganté en présence de carborundum.

2. Immunodétection des protéines virales par la technique de l'immuno-empreinte

Nous avons adapté et optimisé la technique de Lin *et al.* (1990) encore appelée "direct tissue blotting" pour notre pathosystème, dans le but d'étudier la distribution spatiale et temporelle du virus entre les différents étages foliaires.

Le terme "feuille" et "limbe" seront utilisés indistinctement tout au long de ce rapport pour désigner le limbe, sachant que la feuille chez les graminées comprend en fait le limbe et la gaine foliaire.

L'adaptation de la technique d'immuno-empreinte (IE) à notre pathosystème, a nécessité (1) l'utilisation d'une phase de pré-traitement des feuilles, (2) la recherche des concentrations optimales en anticorps polyclonaux et en conjugués, ainsi que (3) la détermination de la pression adéquate à appliquer sur les tissus, pour obtenir les meilleures conditions de discrimination du signal entre les variétés sensible (IR64) et résistante (Azucena). Nous avons également vérifié la reproductibilité du test et la spécificité de l'anticorps polyclonal et du conjugué. L'optimisation du protocole a permis, dans ces conditions, de minimiser le "bruit de fond" réduit à l'état de traces rosacées parfois à peine visibles correspondant à un marquage aspécifique, et d'obtenir une réponse spécifique élevée correspondant à notre système immuno-enzymatique sous formes de taches distinctes violet-noires. L'interprétation des résultats en est rendue aisée.

Une certaine variation de plante à plante est apparue entre nos répétitions, ce qui nous a amené à analyser nos résultats sur des données moyennes. Les causes de cette variation seront discutées tout au long de mon analyse.



Figure 3 : Nomenclature des étages foliaires chez le riz. D'après l'original de Hoshikawa (1993).

2.1. Empreinte de la feuille entière sur la membrane de nitrocellulose

Après prélèvement de la feuille entière, la face inférieure est recouverte sur toute sa longueur d'un ruban adhésif préalablement ajusté à sa largeur, afin d'éviter que la feuille ne se recroqueville sur elle-même. La face supérieure de l'échantillon est ensuite placée en contact direct avec la membrane de nitrocellulose. La feuille et la membrane de nitrocellulose sont alors enveloppées d'un film de cellophane et placé à -70°C pendant 10 min. L'ensemble est ensuite compressé par l'intermédiaire d'une presse hydraulique ajustée à une force de 24 bars/cm² pendant 2 min à température ambiante. Après dissociation de la feuille de riz, la membrane de nitrocellulose est séchée pendant 15 min à +50°C. Cette étape permet de fixer l'antigène et de limiter sa diffusion pendant la phase de marquage.

2.2. Détection par immunomarquage enzymatique

La présence du virus est révélée par la détection de la protéine de capside, en utilisant un anticorps polyclonal anti-RYMV d'origine malgache.

Afin de réduire le bruit de fond, une étape de saturation des sites de fixation non-spécifiques est nécessaire en incubant la membrane pendant une nuit à +4°C ou 1 h à 37°C, dans du lait écrémé à 5% et du tampon phosphate salin plus tween (PBS-T) à 0,05%. La membrane est rincée rapidement avec du PBS-T avant d'être incubée pendant 2 h à température ambiante, sous agitation, dans une solution d'anticorps polyclonal à une concentration de 1 pour 500, dilué dans un tampon PBS-T à 0,05% et de l'héparine 5U/ml. Après trois lavages successifs de 3 min chacun avec du PBS-T, on réalise la réaction avec le conjugué (anticorps anti-lapin lié à la phosphatase alcaline à une concentration de 1 pour 4000) pendant 2 h, sous agitation, à température ambiante. Cette opération est suivie de trois lavages successifs avec du PBS-T et de deux lavages successifs avec du PBS, pendant 3 min chacun.

La révélation se concrétise par une incubation à l'obscurité, à température ambiante, sous agitation, avec le substrat Nitroblue Tetrazolium Chloride (NBT) (30 mg/ml) / Bromo-Chloro-Indolyl Phosphate (BCIP) (15 mg/ml). La réaction enzymatique est arrêtée par deux lavages dans de l'eau distillée. La coloration spécifique du système immunoenzymatique (phosphatase alcaline + BCIP/NBT) utilisé est violet-noire. La visualisation de la présence de l'antigène est réalisable par la seule observation à l'oeil nu (Figure 4).

3. Evaluation de la concentration virale par un test ELISA "double-sandwich" direct

Le test DAS-ELISA permet de quantifier la charge virale et d'apprécier la répartition spatiotemporelle par étage foliaire. Il est réalisé sur des plantes issues du même semis, aux mêmes dates post-inoculation et dans des conditions environnementales similaires aux plantes utilisées pour l'IE.

Le matériel végétal congelé à -80°C est broyé dans du tampon PBS-T (1g/10ml). Le broyat ainsi obtenu est centrifugé (5 min, 10000g) et le test DAS-ELISA est réalisé sur le surnageant dilué 100 fois. On dépose dans chaque puits de la plaque de microtitration, 100 µl d'anticorps polyclonaux anti-RYMV malgache, dilués 1000 fois dans du tampon de fixation. On incube pendant 2 h à 37°C





Figure 4 : Détection sur feuille entière de la protéine de capside du RYMV par la technique d'immunoempreinte sur membrane de nitrocellulose
A : feuille n°5 de la variété sensible IR64 à 21 jours après inoculation.
B: feuille n°5 de la variété partiellement résistante Azucena à la même date.
Coloration spécifique violet-noire du système immunoenzymatique : phosphatase alcaline + BCIP/NBT.
Observation au microscope optique x40.

dans un environnement humide. Les sites de fixation sont ensuite saturés pendant 1 h à 37°C avec 200 μ l de lait écrémé utilisé à 3% dans du PBS-T. Puis on dépose successivement 100 μ l par puits de broyat (phase de dépôt des antigènes) et d'anticorps polyclonal anti-RYMV malgache conjugué à la phosphatase alcaline (1/1000^{ème}). Chacune de ces étapes dure 2h à 37°C (ou une nuit à 4°C), suivie d'un rinçage rapide puis de 3 lavages de 3 min avec du PBS-T. Cent μ l de substrat (p-Nitro Phényl Phosphate (pNPP) dans du tampon diéthanolamine; 1mg/ml et pH9,8) sont déposés par puits. La plaque est incubée à l'obscurité et à température ambiante. La densité optique est mesurée à une longueur d'onde de 405 nm (lecteur de microplaque Dynatech MR 5000) à différents temps d'incubation.

4. Préparation du matériel biologique pour l'observation en microscopie

Des fragments rectangulaires et transversaux de feuille (2 x 5 mm) ont été prélevés sur les différents étages foliaires au cours des travaux réalisés en immuno-empreinte et en test ELISA. Ces prélèvements ont été réalisés 8, 11, 14 et 17 jours après inoculation (JAI). Les échantillons ont subi une étape de fixation des tissus par un traitement de 3 h, sous agitation, dans une solution de glutaraldéhyde à 1% et de paraformaldéhyde à 4%, dilués dans un tampon cacodylate 0,1 M pH7,2, suivie de 3 lavages de 20 min dans le même tampon. La déshydratation progressive est réalisée par des bains successifs de 1 h dans de l'éthanol à 10% et 30% sous agitation, 50% sans agitation, 70% pendant une nuit à 4°C, 80% et 90% pendant 20 min. L'imprégnation est accomplie par 2 bains successifs de 3 h dans un mélange de London resin (LR) White/Ethanol 90% (1/2; v/v) et de LR White/Ethanol 90% (2/1; v/v), puis d'un premier bain de LR White pur d'1 h suivi d'un second de 12 h à 4°C. L'étape de polymérisation de la résine LR White pure contenant l'échantillon est réalisée par une incubation de 24 h à 58°C dans une capsule en gélatine. Les coupes semi-fines et ultra-fines ont été obtenues avec un ultra-microtome Reichert Ultracut E.

Pour l'observation en microscopie photonique à fluorescence, les coupes semi-fines $(0.5-1 \, \mu m)$ sont collées sur des lames en verre, recouvertes de Biobond (BIOCELL). Nous avons récupéré trois coupes par échantillon, pour un total de 126 échantillons étudiés. La première est colorée pendant 2 min au bleu de toluidine à 1gr/100ml de tampon sodium tétraborate (10H2O) à 1%, pH9,4. Les deux autres coupes subissent l'immunomarquage. La phase de saturation des sites aspécifiques est réalisée par un premier dépôt de 8 µl de PBS-T à 0,05% et de Bovine Serum Albumin (BSA) à 3% pendant 15 min à 20°C. On dépose ensuite 8 µl d'anticorps polyclonal de chèvre dilué au 1/20^{ème} dans la solution de saturation précédente, pendant 15 min à 20°C. Ces deux premières étapes sont suivies par un rinçage à l'eau distillée et un séchage. Dans un deuxième temps, on incube les coupes avec 8 µl d'anticorps polyclonal anti-RYMV malgache (anticorps primaire de lapin) dilué au 1/40^{ème} dans le tampon de saturation pendant 1 h à 37°C. Après lavages, elles subissent un dernier traitement de 8 µl d'anticorps polyclonal anti-lapin marqué à la fluorescéine (anticorps secondaire de chèvre), dilué au 1/20ème dans le tampon de saturation. Ces deux dernières étapes sont successivement concrétisées par un rinçage au PBS-T et deux rinçages à l'eau distillée, chacun de 5 minutes et suivi d'un séchage. Les observations ont été réalisées avec un microscope photonique à fluorescence Diaplan (Leitz), équipé d'un filtre bleu (excitation : 450-490 nm; barrière : 520 nm).

Pour l'observation en microscopie électronique et pour une bonne conservation des structures cellulaires, les échantillons ont subi une double fixation : une première fixation de 2 h au glutaraldéhyde à 2% dans un tampon cacodylate 0,01M pH 7,2, suivie de 3 lavages de 20 min dans le même tampon; puis 1 h dans le second fixateur, O_SO4 à 1% dans l'eau. Après 3 lavages de 20 min dans l'eau, une déshydratation progressive est réalisée avec des incubations d'1 h, dans un gradient d'éthanol 10, 30, 50, 70, 80, 90 et 100%. Suivent des incubations d'1 h à température ambiante successivement dans l'oxyde de propylène et le mélange résine épon 812-oxyde de propylène dans les rapports 1/2, puis 2/1 et l'épon pur. Après 1 nuit d'imprégnation à 4°C dans l'épon pur, la polymérisation des échantillons s'effectue 24 h à 57°C.

Les coupes ultra-fines (70-90 nm) de tissus sont déposées sur des grilles en nickel de 200 mesh recouvertes d'un film de collodion à 2%. Elles sont colorées pendant 15 min à l'acétate d'uranyle à 2%, puis pendant 2-3 min au citrate de plomb à 2%. Les observations sont réalisées au microscope électronique à transmission Jeol 100 CX II.

RESULTATS

1. Etude de la distribution spatio-temporelle du RYMV par immuno-empreinte et par test ELISA

L'IE et le test ELISA sont réalisés par étage foliaire 8, 11, 14, 17, 21 et 25 jours après inoculation (JAI), avec deux répétitions par étage et par date. L'IE permet de distinguer, par observation directe, la répartition du virus sur l'ensemble de la feuille. Le nombre de taches violet-noires et l'intensité de la coloration traduisent la répartition et la charge virale de manière semi-quantitative. En complément, la charge virale globale est quantifiée par étage foliaire, par l'intermédiaire d'un test ELISA utilisé en routine pour la détection du RYMV. Ce test présente une sensibilité plus grande, mais ne renseigne pas sur la localisation spatiale du virus sur la feuille (Figure 5 et 6). Le nombre de répétitions de notre dispositif expérimental ne permet pas de réaliser une comparaison statistique des résultats à une date donnée. A saturation du test ELISA dès 17 JAI pour la variété IR64 et 21 JAI pour la variété Azucena, l'IE permet seule de distinguer les charges virales entre les deux variétés pendant toute l'expérimentation (Figure 5 et 6).

En première analyse, la distribution du virus sur feuille entière révèle une grande similarité entre les variétés IR64 et Azucena, malgré une différence de morphologie et de croissance, de charge virale et d'expression des symptômes. Nous préciserons, étage foliaire par étage foliaire, la distribution du virus et la charge virale en combinant les résultats de l'IE et de l'ELISA, qui sont globalement complémentaires et concordants.

1.1. Similarité de distribution

L'IE révèle une répartition du RYMV sur l'ensemble de la feuille, aussi bien pour la variété sensible que pour la variété résistante, sous formes de taches alignées le long des nervures et en périphérie de la feuille (Figure 4). Cette observation indique qu'il n'y a pas de localisation préférentielle de la distribution du virus à une fraction de feuille, ni chez la variété sensible, ni chez la variété résistante. La distribution sous formes de taches et non pas sous forme d'un continuum, ne correspond pas à des zones circonscrites d'accumulation du virus, mais semble plutôt inhérente à la technique de l'IE, en regard des résultats en IF et des données de la littérature, qui montrent que le RYMV se multiplie abondamment dans le parenchyme vasculaire. Ainsi, sous l'effet de la pression, une fraction du liquide intracellulaire du parenchyme vasculaire et intravasculaire serait évacuée par les hydathodes vers l'extérieur de la feuille. Une autre fraction envahirait les méats qui relient les faisceaux vasculaires et les stomates, pour finalement s'évacuer par ces derniers.

L'IE permet d'apprécier distinctement la différence de charge virale entre la plante sensible et résistante, par la densité et l'intensité du marquage. Par contre, elle ne permet pas de conclure quant à la répartition tissulaire de la charge virale, qui est l'objet d'une étude plus fine des tissus par immunomarquage en microscopie à fluorescence.

1.2. Relation entre la charge virale détectée par IE et les symptômes

L'IE révèle la présence du virus chez la variété IR64, dès l'apparition des premiers symptômes de la maladie, sur la dernière feuille déroulée 14 JAI. En revanche, pour la variété Azucena, les premiers marquages positifs précèdent la manifestation des premiers symptômes 17 JAI.



Figure 5 : Représentation schématique de la distribution spatio-temporelle, par étages foliaires, de la protéine de capside du RYMV, révélée par immunoempreinte, chez la variété sensible IR64 et chez la variété partiellement résistante Azucena, 8 - 11 - 14 - 17 - 21 et 25 jours après inoculation (JAI). Feuille n°3 inoculée 15 jours après semis.



Figure 6 : Représentation schématique de la distribution spatio-temporelle, par étages foliaires, de la protéine de capside du RYMV, révélée par le test ELISA, chez la variété sensible IR64 et chez la variété partiellement résistante Azucena, 8 - 11 - 14 - 17 - 21 et 25 jours après inoculation (JAI). Feuille n°3 inoculée 15 jours après semis. La valeur entre parenthèses correspond à la DO mesurée.



Figure 7 : Comparaison de l'intensité de la détection de la protéine de capside du RYMV par immunoempreinte et du degré de gravité des symptômes 15 jours après inoculation de la feuille n°3, chez la variété sensible (symptômes A et immunoempreinte B) et chez la variété partiellement résistante Azucena (symptômes C et immunoempreinte D), pour la feuille n°3 inoculée. L'augmentation de la charge virale et de la gravité des symptômes est plus rapide chez la variété IR64 que chez la variété Azucena. Elle aboutit rapidement à la nécrose de les feuilles 5 et 6 de la variété IR64 dès le 25^{ème} JAI, alors que les symptômes chez la variété Azucena n'évoluent que lentement, sans aboutir à la dégénérescence des mêmes étages foliaires. Pour une charge virale équivalente en IE, les symptômes de la panachure sont plus intenses pour la variété IR64 que pour la variété Azucena (Figure 7).

1.3. Comparaison des étages foliaires entre IR64 et Azucena (Figures 5 et 6)

La feuille n°2 ne révèle jamais la présence du virus et devient rapidement sénescente, aussi bien chez les plantes virosées que saines. Elle semble donc échapper au processus de migration systémique du virus à partir du point d'inoculation.

L'étage foliaire n°3 présente un intérêt particulier. La feuille n°3 est la seule où l'infection virale est la résultante d'une inoculation par voie mécanique, alors que pour les étages foliaires supérieurs, la présence du virus résulte de sa migration dans la plante. Ainsi, les différences de distribution et de charge virale seront analysées à la fois entre l'étage foliaire n°3 d'IR64 et d'Azucena et également avec les autres étages foliaires.

L'IE révèle une différence de la charge virale entre les variétés IR64 et Azucena dès 8 JAI. Celle-ci ne peut être attribuée à un dépôt différentiel de particules virales à la surface de la feuille, les feuilles inoculées étant rincées cinq minutes après inoculation par de l'eau distillée. Elle met également en évidence l'augmentation dans le temps de la charge virale à la fois pour le parent sensible et le parent résistant.

L'absence de virus chez la variété Azucena en test ELISA 14 JAI, malgré sa présence 11 JAI, reflète vraisemblablement la variabilité de la croissance des plantes, apparente aussi au sein des répétitions.

La feuille n°4 semble, dans la limite du seuil de sensibilité du test ELISA, être entièrement épargnée par le virus chez la variété IR64 et partiellement chez la variété Azucena. L'absence de symptômes chez la variété IR64, est associée à une absence de taches violet-noires en IE et à une DO inférieure au "bruit de fond" en test ELISA. En revanche, la variété Azucena renferme une faible charge virale uniquement détectée sur le 1^{er} tiers de la base de la feuille par IE. Cette charge virale n'évolue pas par la suite. Paradoxalement, c'est l'étage foliaire n°4 de la plante sensible qui est épargné par l'infection virale et celui de la plante résistante qui présente une faible charge virale. La croissance de la variété IR64 est avancée d'une feuille par rapport à celle de la variété Azucena. Pour prendre en compte cette différence de phyllochronie, nous comparons les étages foliaires n°4 des deux variétés à deux stades de croissance différents et a priori également distincts au moment de l'inoculation. La feuille n°4 de la variété Azucena et la feuille n°5 de la variété IR64 déroulées à la même période entre 8 et 11 JAI, permettent de comparer deux feuilles qui sont au même stade de développement lors de l'IE et du test ELISA, ainsi qu'a posteriori au moment de l'inoculation. L'IE et le test ELISA montrent un décalage de 3 jours dans la détection du virus dans la feuille. La faible charge virale d'Azucena à 17 JAI n'augmente pas dans le temps et reste circonscrite à la base de la feuille. Celle de la variété IR64 évolue pour devenir très forte et atteindre l'ensemble de la surface foliaire (Figure 5).



Figure 8 : Courbe étalon réalisée par test ELISA en utilisant un anticorps polyclonal anti-RYMV, à partir de matériel très virosé pour la variété sensible IR64 et pour la variété partiellement résistante Azucena, ainsi que de virus purifié (6,8µg/µl).



Figure 9 : Cinétiques virales obtenues par un test ELISA, en utilisant un anticorps polyclonal anti-RYMV, de l'étage foliaire n°3 inoculée 15 jours après semis (A) et de l'étage foliaire n°5 (C), chez la variété sensible IR64 et chez la variété partiellement résistante Azucena. La feuille n°5 est déroulée à partir de 8 jours après inoculation (JAI) chez la variété IR64 et 17 JAI chez la variété Azucena. L'ajustement linéaire de la phase exponentielle des cinétiques virales des deux cultivars est réalisée pour les étages foliaires 3 (B) et 5 (D).

La feuille n°5 de la variété IR64 suffisamment déroulée pour faire un test ELISA, dévoile la présence du virus dès le 8^{ème} JAI. La contradiction entre un marquage très fort à 14 JAI sur les deux premiers tiers de la feuille et un marquage faible à 17 JAI sur le premier tiers de la feuille en IE pour la variété IR64, reflète probablement la variabilité inter-plante. Les immuno-empreintes réalisées à 17, 21 et 25 JAI, traduisent un comportement similaire du RYMV à la fois chez les deux variétés, avec un marquage de plus en plus intense qui s'étend progressivement à toute la surface foliaire.

L'étage foliaire n°6 de la variété IR64 présente dès son déroulement à 17 JAI un marquage fort sur l'ensemble de la feuille en IE et une DO forte en ELISA, qui évolue dès le 21^{ème} JAI vers un marquage très fort et aboutit à une nécrose du limbe. La feuille n°6 de la variété Azucena suffisamment développée 25 JAI pour réaliser un test ELISA, mais pas d'IE qui nécessite l'utilisation d'une feuille entièrement déroulée, présente également une forte charge virale. Ainsi, les étages foliaires n°6 des deux cultivars, contiennent toutes deux, dès leur apparition, une très forte charge virale et présentent des symptômes très graves de la maladie.

Les feuilles n°6 de la variété IR64 et n°5 de la variété Azucena se déroulent à la même période, entre 14 JAI et 17 JAI. Le virus est présent de manière homogène sur l'ensemble des deux feuilles, dès leur apparition, néanmoins en concentration plus élevée pour la plante sensible.

1.4. Cinétiques virales et courbe étalon

La réalisation d'une courbe "étalon" à partir de matériel très virosé de la variété IR64 (feuille n°6, 25 JAI) et de la variété Azucena (feuille n°5, 25 JAI), ainsi que de virus purifié (6,8mg/ml), permet de déterminer le seuil de détection du test ELISA (0,5ng/ml) pour lequel la DO est supérieure à deux fois le bruit de fond et le seuil de saturation du test ELISA (0,5mg/ml) pour lequel la DO n'augmente plus avec la concentration virale. La figure 8 montre que les trois courbes suivent les mêmes tendances avec cependant un décalage entre elles en fonction de la dilution, lié à la différence de concentration virale initiale. La similarité des pentes et l'allure des trois courbes reflètent l'absence d'effet inhibiteur de l'un ou l'autre extrait de plante et facilite ainsi, la comparaison entre les différentes cinétiques (Figure 8).

La comparaison de la tendance générale des cinétiques virales obtenues à partir des données ELISA de la feuille n°3 de la variété IR64 et de la variété Azucena, nous montre un décalage d'une dizaine de jours (Δt) entre les deux courbes et une dilution de la charge virale estimée à 4 fois par l'intermédiaire de la courbe étalon, une similarité d'évolution et une tendance équivalente à décrire une sigmoïde (Figure 9A). La même similitude est observée dans les cinétiques virales de la feuille n°5 des deux cultivars, avec cependant un décalage (Δt) dans le temps plus faible (4 à 5 jours) et une dilution de la charge virale plus faible (1,8 fois) entre la variété sensible et la variété résistante (Figure 9C).

Les données ELISA correspondant aux cinétiques virales par étages foliaires chez les deux variétés IR64 et Azucena ne permettent pas de réaliser un ajustement logistique avec des coefficients de détermination significatifs, à cause d'un nombre de données et de répétitions insuffisants. Malgré cet handicap et la faible puissance statistique, nous avons réalisé un ajustement linéaire de la phase exponentielle des cinétiques virales des variétés IR64 et Azucena correspondant à l'étage foliaire n°3 inoculée, en excluant la phase stationnaire (5 à 14 JAI) de la variété Azucena. Les deux pentes



Figure 10 : Représentation schématique de la distribution spatio-temporelle de la protéine de capside du RYMV, révélée par le test ELISA, par étages foliaires, chez la variété sensible IR64 et chez la variété partiellement résistante Azucena, en fonction de trois dates d'inoculation de la feuille n°3 : 15 - 20 - 25 jours après semis (JAS). Le test ELISA est réalisé à 15 - 20 ou 30 jours après inoculation et la valeur entre parenthèses correspond à la DO mesurée.

des droites (0,099 pour la variété IR64 et 0,11 pour la variété Azucena), qui reflètent le taux de multiplication du virus, se révèlent relativement équivalentes (Figure 9B). La réalisation d'un ajustement linéaire similaire pour l'étage foliaire n°5 de la variété IR64 et de la variété Azucena a également permis d'obtenir deux droites dont les pentes sont proches (0,086 pour la variété IR64 et 0,088 pour la variété Azucena) (Figure 9D).

2. Distribution spatio-temporelle du RYMV en fonction de la date d'inoculation par test ELISA

A l'image des expérimentations précédentes, la distribution du virus semble intimement liée au stade de développement des feuilles. Afin de vérifier l'importance de la date d'inoculation et du stade de développement des étages foliaires supérieurs à la feuille n°3 inoculée, sur la distribution du virus, trois inoculations à des dates différentes, 15, 20 et 25 jours après semis (JAS) ont été faites. Un test ELISA a été réalisé sur des plants issus d'un même semis et dans les mêmes conditions expérimentales.

Les observations montrent que plus la date d'inoculation est tardive, plus le nombre de feuilles qui semblent "échapper" au virus augmente à la fois pour la variété IR64 et pour la variété Azucena. Selon l'âge auquel l'inoculation a été réalisée sur la feuille n°3, on observe un écart de une (+15 JAS), de zéro (+20 JAS) ou de deux (+25 JAS) feuilles entre les deux variétés, qui sont épargnées par la migration systémique du RYMV, dans la limite de sensibilité du test ELISA (Figure 10).

Ainsi à 15 JAS, la DO mesurée confirme que la feuille n°4 de la variété IR64 ne contient apparemment pas de virus; mais montre que celle de la variété Azucena révèle une forte charge virale similaire à celle des étages foliaires supérieurs (Figure 10). Les plants issus du semis de la variété Azucena ont présenté une croissance très lente en début de période végétative, avant et après l'inoculation, ce qui pourrait expliquer la charge plus faible obtenue lors de l'observation en IE (Figure 5 et 6).

A 20 JAS, le test ELISA réalisé à 15 JAI sur tous les étages foliaires de rang supérieur à la feuille inoculée des deux cultivars révèle une absence de virus. Par contre, à 20 JAI les feuilles n°4 et n°5 de la variété IR64 et de la variété Azucena sont apparemment indemnes de virus comparé aux étages foliaires supérieurs présentant une forte charge virale (Figure 10).

A 25 JAS, la DO correspondant à la feuille n°6 de la variété Azucena révèle la présence de particules virales, alors que celle des feuilles de la plante sensible n'est pas significative. Le virus n'a pas été détecté dans les feuilles 4, 5 et 6, 30 JAI pour les deux cultivars, et dans la feuille n°7 de la variété IR64 (Figure 10). Paradoxalement, c'est le cultivar résistant qui révèle en premier le déplacement du virus par migration systémique vers les étages foliaires supérieurs.

3. Distribution à l'échelle tissulaire du RYMV par immunofluorescence (IF)

L'étude de la distribution du virus par étages foliaires, a permis de sélectionner la période après inoculation la plus propice à la mise en évidence des fondements de la résistance de la variété Azucena.

Tableau 1 :	Distribution à l'échelle tissulaire du RYMV détecté par immunomarquage de type fluorescence de la protéine de capside. Les
	observations sont réalisées sur des échantillons prélevés 8 - 11 - 14 et 17 jours après inoculation (JAI) sur des plantes inoculées
	15 jours après semis.

	IR64	8	JAI	11 JAI			14 JAI			17 JAI		
	Etage foliaire	n°4	n°5	n°4	n°5	n°6	n°4	n°5	n°6	n°4	n°5	n°6
1	Epiderme Supérieur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Mésophylle	-	-	-	+	+	-	-	-	I	. .	-
3	Sclérenchyme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Gaine Vasculaire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Méstome	-	-	-	-	÷	-			-	++	
6	Vaisseaux du xylème	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-
7	Parenchyme xylèmien	I	-	-	÷	i.	-			-	++	
8	Tubes Criblés	-	-	-	-	-		-	+/-	-	+/-	+/-
9	Parenchyme Phloèmien	-	-	-	÷	++	-	++		-		
10	Epiderme inférieur		-	-	-	-	-	-	-	-	-	_
-	pas ou peu de fluorescence	+/-	+/- fluorescence épisodique				fluorescence moyenne			forte fluorescence		
	AZUCENA	IAL 8		11 JAI		14 JAI			17 JAI			
	Etage foliaire	n°4	n°5	n°4	n°5	n°6	n°4	n°5	n°6	n°4	n°5	n°6
1	Epiderme Supérieur	-	-	-	-		-	-		-	-	-
2	Mésophylle	-	-	-	÷		-	-		I	-	-
3	Sclérenchyme	-	-	-	-		-	-		-	-	-
4	Gaine Vasculaire	-	-	-	-		-	-		-	-	-
5	Méstome	-	-	-	-		-	-		-	-	-

4	Game vasculaire									_
5	Méstome	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Vaisseaux du xylème	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Parenchyme xylèmien	-	-	-		-		-	÷	+
8	Tubes Criblés	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
9	Parenchyme Phloèmien	-	-	-		-		-	l 🕂	÷
10	Epiderme inférieur	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nous avons ainsi prélevé trois échantillons par feuille, correspondant aux trois fragments représentant l'ensemble de la longueur de la feuille étudiée en IE, par étage foliaire et pour quatre dates de prélèvement 8, 11, 14 et 17 JAI, à la fois pour la plante inoculée et le témoin sain, et ceci chez la variété IR64 et chez la variété Azucena.

L'optimisation de la technique de marquage de type IF a nécessité l'utilisation des anticorps primaire et secondaire en concentrations optimales pour limiter le "bruit de fond" et percevoir la fluorescence spécifique vert-pâle de la fluorescéine. Le bruit de fond est lié à la fois au marquage aspécifique de l'anticorps primaire sur les chloroplastes, et également à la fluorescence naturelle de coloration jaune des chloroplastes et de coloration brun-orange des parois primaires.

L'analyse finale de l'IF est effectuée sur les données moyennes et par défaut, des trois fragments correspondant à un étage foliaire. Le critère d'évaluation "-" correspondant à une absence ou une faible fluorescence ne désigne pas un déficit en protéines de capside dans les tissus mais une charge virale trop faible pour être différenciée du bruit de fond (Tableau 1).

L'examen microscopique des coupes immunotraitées révèle que la distribution du virus dans les tissus est relativement similaire chez les variétés IR64 et Azucena. Ainsi, la feuille n°4 semble être épargnée par le virus chez les deux variétés. Le virus est détecté à la même période (11 JAI) et dans les mêmes types de tissus : le mésophylle, les parenchymes xylèmien et phloèmien, pour la feuille n°5 (Tableau 1). Par contre, l'étage foliaire n°6, déroulé uniquement pour la variété IR64 à 11 JAI, présente une fluorescence (a) plus forte que la feuille n°5 de la même plante, dans les parenchymes xylèmien et phloèmien, (b) identique pour le mésophylle et (c) exclusive pour le méstome (Tableau 1 et Figure 11). Ainsi, on observe entre deux feuilles virosées successives, où la présence du virus est liée à la migration systémique, une différence de l'intensité de la fluorescence pour un même type de tissu et une répartition tissulaire différente. Cette constatation renforce l'hypothèse déjà émise, suite aux expériences précédentes réalisées en IE, de l'importance du stade de développement d'une feuille au moment de l'inoculation, dans l'évolution et dans la répartition de la charge virale par étage foliaire dans le temps.

La présence d'une charge virale suffisante dans le mésophylle pour être différenciée du bruit de fond ne semble pas être une tendance générale mais plutôt l'expression de la variabilité entre les plantes (Tableau 1).

Les parenchymes xylèmien et phloèmien sont les tissus qui présentent une fluorescence homogène pour les deux cultivars. Cette observation, renforcée par la présence épisodique du virus dans les vaisseaux du xylème et dans les tubes criblés, suggère que le RYMV est capable de migrer sur une longue distance par le xylème et le phloème (Tableau 1).

L'intensité de la fluorescence observée sur les coupes de la variété Azucena reste constante pour les étages foliaires n°5 et n°6, alors qu'elle augmente pour les parenchymes xylèmien et phloèmien de la feuille n°5 et le méstome de la feuille n°6 de la variété IR64. Cependant, la capacité de différenciation des charges virales, traduite par une intensité de fluorescence différente, semble être plus faible que celle mise en évidence par l'IE et le test ELISA.

4. Distribution à l'échelle cellulaire du RYMV par microscopie électronique

L'observation en microscopie électronique conventionnelle de coupes ultrafines a été effectuée sur des échantillons de la feuille n°6 de la variété sensible IR64, 21 jours après inoculation et présentant de graves symptômes de la maladie. Le parenchyme vasculaire, xylèmien et phloèmien,



Figure 11

Microscopie photonique à fluorescence; simple fixation aldéhyde; immunolocalisation de la protéine de caspide du RYMV dans la feuille n°5 de riz 14 jours après inoculation. (anticorps primaire dilué 1/40; anticorps secondaire conjuguée à la fluoresceine). Une réponse séropositive se traduit par une fluorescence verdâtre. Pour la signification des chiffres se référer au Tableau 1.

A et B. Variété résistante Azucena; fluorescence moyenne visible dans le parenchyme xylèmien (7) et dans le parenchyme phloèmien (9), de la feuille infectée. Absence de fluorescence dans la feuille saine (B) (échelle = 4μ M).

C et D. Variété sensible IR 64; dans les feuilles infectées (C), une forte fluorescence verdâtre est visible dans les cellules du méstome (5) et les parenchymes phloèmien (9) et xylèmien périvasculaire (7). Une telle fluorescence est absente des feuilles saines (D) (échelle = 4μ M).

contient une importante charge virale qui occupe tout le cytoplasme de la cellule. L'absence d'organites constitutifs visibles et la rétractation de la membrane plasmique de la paroi cellulaire, reflètent une intense désorganisation cellulaire (Figure 12 A et B), comparé aux tissus sains (Figure 13 A et B)

Le temps imparti n'a pas permis d'aller plus en avant dans cette étude ultrastructurale des mécanismes de la résistance partielle de la variété Azucena.



Figure 12

Microscopie électronique à transmission; double fixation aldéhyde-osmium; contraste acétate d'uranyle et citrate de plomb. Feuille n°6 de la variété sensible IR 64 virosée présentant de graves symptômes de la panachure jaune du riz; 21 jours après inoculation.

A. Cellule du parenchyme phloèmien dont le cytoplasme renferme une concentration importante de virus. Aucun organites constitutifs n'est visible. Le plasmalemme n'adhère plus à la paroi (flèches) (échelle = 0.4μ m).

B. Cellule parenchymateuse chargée en virus et associée à un vaisseau du xylème. Remarquez la présence de vésicules paramurales (flèche) résultant probablement d'une altération de la membrane plasmique (p : ponctuation; s : paroi secondaire) (échelle = 0,20µm).

Figure 13

Microscopie électronique à transmission; double fixation aldéhyde-osmium; contraste acétate d'uranyle et citrate de plomb. Variété sensible IR 64 saine.

A. Détail d'une cellule du mésophylle montrant la bonne préservation des structures cellulaires (ch : chloroplaste; mi : mitochondrie; p : paroi cellulaire) (échelle = $1 \mu m$).

B. Parenchyme phloèmien (mi : mitochondrie; p : paroi cellulaire; pl : plasmodesmmes) (échelle = $1 \mu m$).



DISCUSSION

L'objectif de cette étude étaient d'identifier des facteurs responsables de la résistance partielle du riz au RYMV, présente chez la variété Azucena.

L'analyse de la plante entière montre que certains étages foliaires matures de rang supérieur à la feuille inoculée échappent à la migration systémique du virus, à la fois chez la variété sensible IR64 et chez la variété résistante Azucena, selon le stade de développement de la plante auquel est réalisée l'inoculation. Ce comportement appelé "résistance développementale" par Leisner *et al.* (1993), intervenant sur le mouvement à longue distance du virus au cours de l'infection systémique, existe chez les deux cultivars, mais ne semble pas intervenir dans la résistance vraie qui distingue les deux variétés.

La migration à longue distance d'un virus par le phloème est un transport passif associé au flux de photoassimilats, qui migre des feuilles productrices (sources) vers les feuilles majoritairement utilisatrices (puits), c'est à dire des vieilles feuilles vers les jeunes feuilles (Leisner *et al.*, 1992). Or, au cours de son développement, la feuille passe d'un stade juvénile où elle a besoin d'énergie pour sa croissance à un stade adulte où sa production est supérieure à ses besoins. Par conséquent, les feuilles accessibles à la migration systémique du virus par le phloème changent au cours du développement de la plante (Leisner *et al.*, 1993). Leur nombre est progressivement réduit sachant que le nombre de feuilles déroulées chez le riz avant floraison est fixé (S. Jaffuel, communication personnelle). Ce comportement va résulter d'une compétition entre le mouvement de migration du virus à longue distance et le taux de croissance de la plante infectée (Leisner *et al.*, 1993). Selon cette hypothèse, les facteurs génétiques ou environnementaux qui influencent le processus de développement de la plante, auront une implication dans la distribution virale et dans la sévérité des symptômes à l'échelle de la plante entière.

Cependant, cette hypothèse ne tient pas compte de la possible transmission du virus par le xylème, qui accompagnerait le mouvement de l'eau et des sels minéraux, circulation qui se produit tout le long de la vie de la feuille. Des travaux récents ont en effet mis en évidence microscopiquement la présence du virus dans tous les types cellulaires du xylème, incluant les vaisseaux (Opalka et Brugidou, non publié). Mais, le ou les mécanismes permettant au virus de passer des vaisseaux aux cellules parenchymateuses capables d'assurer leur multiplication, et le chemin inverse, n'est pas encore élucidé. Une étude morphologique du riz et des relations entre les faisceaux vasculaires apparaît donc nécessaire pour approfondir le fondement de cette limitation de la diffusion du virus liée à l'ontogenèse de la plante.

L'analyse effectuée en IE, confortée par le test ELISA, montre que la résistance partielle d'Azucena ne se traduit pas par une inhibition totale de l'augmentation de la charge virale, tant au sein de la feuille n°3 inoculée mécaniquement, qu'au niveau des étages foliaires supérieurs où la présence du virus est liée à sa migration systémique. Le RYMV est détecté au même moment chez les deux cultivars, dans deux feuilles déroulées à la même période mais d'étages foliaires différents, de rang supérieur à la feuille inoculée et ayant *a priori* subit le même historique de développement au cours de l'infection systémique virale. Au niveau tissulaire, l'IF a permis de détecter le virus à la même période (11 JAI), au sein d'une feuille de rang supérieur à la feuille inoculée (n°5) et dans les mêmes types de tissus à la fois chez la variété IR64 et chez la variété Azucena. Suite à une inoculation tardive (25 JAS), c'est le cultivar résistant qui manifeste le premier le déplacement systémique du virus. Par conséquent, il est probable que la limitation de la migration à longue distance du virus ne soit pas l'acteur principal de la résistance partielle portée par la variété Azucena.

La distribution homogène du virus sur l'ensemble de la surface foliaire, chez les deux cultivars, exclut le blocage total du mouvement de cellule à cellule du virus chez la variété résistante Azucena, du moins pendant les premières phases de l'infection. Cependant, l'importante charge virale détectée dans le méstome, exclusivement chez la variété sensible IR64, suggère qu'une restriction partielle du mouvement de cellule à cellule joue un rôle essentiel dans la résistance de la variété Azucena. Le méstome pourrait représenter une barrière cellulaire au déplacement du virus des cellules du parenchyme vasculaire, lieu d'une intense réplication virale, vers le limbe, et inversement. Chez la variété résistante Azucena, cette assise cellulaire pourrait contribuer (1) au ralentissement de l'invasion cellulaire, (2) à une diminution du nombre de cellules infectées et (3) à un décalage des cinétiques de charge virale par feuille entière entre les deux cultivars. C'est donc au niveau de la paroi et des plasmodesmes qu'il conviendrait de rechercher les causes d'une éventuelle restriction du mouvement de cellule à cellule. A ce titre, le rôle des plasmodesmes secondaires concerne à la fois les performances physiologiques de la feuille et le transport du virus de cellule à cellule (Lucas and Gilbertson, 1994). Les différences morphologiques entre la variété sensible IR64, de type *indica*, et la variété résistante Azucena, de type *japonica*, sont en effet considérables. Cette observation, ainsi que les données obtenues à partir des lignées HD (G. Pressoir, communication personnelle), argumentent l'hypothèse qu'une partie de la résistance de la variété Azucena pourrait résulter de facteurs constitutifs, liés à la morphologie du riz pluvial.

Les comparaisons foliaires et tissulaires traduisent toujours une charge virale plus élevée chez la variété sensible IR64. L'évolution générale des cinétiques virales et les pentes des courbes qui reflètent le taux de multiplication du virus sont cependant similaires pour les deux variétés, à la fois pour l'étage foliaire où la présence du virus est liée à l'inoculation mécanique et pour l'étage foliaire où le virus est présent grâce à la migration à longue distance. Bien que notre démarche ne nous permette pas de distinguer la restriction du mouvement de cellule à cellule et la limitation de la réplication cellulaire, nos résultats permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle un des moteurs de la résistance partielle de la variété Azucena semble être le mouvement de cellule à cellule à cellule.

Cette hypothèse est cohérente avec les résultats obtenus sur les cultures de protoplastes (C. Brugidou, communication personnelle). Les protoplastes issus des variétés TOG5681 et Giganté, qui montrent une très forte résistance au RYMV en serre et en plein champ, sont capables de répliquer le virus à un niveau tout à fait comparable à celui de la variété IR64. Le complément serait de réaliser cette expérimentation sur des protoplastes de la variété partiellement résistante Azucena, d'autant qu'une étude comparative des variétés IR64, Azucena, TOG5681 et Giganté, a révélé l'absence totale de symptômes et de charge virale détectable en ELISA chez les deux dernières, à la fois pour l'étage foliaire n°3 inoculé et les étages foliaires supérieurs (Collaboration avec M.N. Ndjiondjop Nzenkam, données non fournies).

Nos observations suggèrent fortement que le RYMV se réplique intensément dans le parenchyme vasculaire, à la fois dans les cellules compagnes et dans le parenchyme xylèmien, qui sont des tissus différenciés possédant une intense activité cellulaire. Or, l'obtention de protoplastes passe par une phase d'isolement de cellules de l'épiderme ou du mésophyle et la régénération de lignées cellulaires indifférenciées. De nombreuses études réalisées sur des protoplastes issus de plantes résistantes ou immunes ont montré des niveaux de réplication virale identiques ou supérieurs aux plantes sensibles, qui semblent être liés à leur état de cellule indifférenciée. Les facteurs



- Figure 14 : Ajustement théorique de la cinétique de la charge virale dans une feuille, par une équation logistique. La linéarisation de la phase exponentielle de la courbe (B) permet d'estimer le taux de multiplication du virus (C1 : mouvement de cellule à cellule et r1 : taux de réplication virale chez la variété sensible; C2 : mouvement de cellule à cellule à cellule et r2 : taux de réplication virale chez la variété partiellement résistante)
 - A Dans le premier cas, c'est l'inhibition du taux de réplication qui est le facteur principal de la résistance.
 - B Dans le deuxième cas, c'est la restriction du mouvement de cellule à cellule qui est le moteur de la résistance.

responsables de la résistance cellulaire, apparaissant actifs dans les cellules différenciées de feuille, ne le sont plus dans les protoplastes correspondant (Ponz and Bruening, 1986). Par conséquent, il parait délicat d'extrapoler le comportement de protoplastes à celui de la plante entière, en ce qui concerne l'étude de la résistance à un virus.

En outre, l'évolution générale de la charge virale dans une feuille semble décrire une sigmoïde, avec une phase de latence (phase A), plus importante pour la variété Azucena, une phase de croissance linéaire correspondant à la multiplication intense du virus (phase B) et un plateau (phase C) qui reflète la saturation des cellules en particules virales (Figure 9). Cette observation est en accord avec l'évolution de la charge virale sur plante entière (Albar, 1994). L'ajustement théorique de la cinétique virale par une équation logistique, nous permet de visualiser deux cas intéressants (Figure 14). Dans le premier cas, on suppose que le taux de réplication par étage foliaire chez la variété IR64 (r1) est différent et supérieur au taux de réplication chez la variété Azucena (r2), et que le mouvement de cellule à cellule chez la variété IR64 (c1) est équivalent à celui chez la variété Azucena (c₂). Dans le deuxième cas, on se place dans les conditions inverses. On suppose que le mouvement de cellule à cellule est différent $(c_1 \neq c_2)$ et que le taux de réplication est équivalent (r₁=r₂). Malgré les limites statistiques de notre ajustement linéaire, ce dernier argument indirect corrobore l'hypothèse selon laquelle l'acteur principal de la résistance partielle portée par la variété Azucena semble être la restriction du mouvement de cellule à cellule. Car, au niveau de la plante entière et par étage foliaire, on assiste effectivement à un décalage constant dans le temps (Δt) des deux cinétiques virales, qui ne semble pas être lié à un mécanisme induisant une diminution de la réplication virale au sein d'une cellule, mais plutôt au nombre de cellules du limbe infectées par le virus.

La comparaison de l'expression de la maladie et de la répartition du virus a montré que l'absence de symptômes chez la variété résistante Azucena n'est pas liée à un défaut de virus, mais à une inaptitude des feuilles infectées à produire des symptômes dont les mécanismes sous-jacents n'ont pas encore été décrits (Leisner *et al.*, 1993). En outre, plus les feuilles sont dans un état juvénile au moment de l'infection et plus elles présentent une charge virale et des symptômes importants au moment de leur maturation, chez les deux variétés IR64 et Azucena. L'expression différente des symptômes, à charge virale équivalente entre les deux cultivars, semble refléter une réaction cellulaire différente à la charge virale, n'aboutissant pas au même degré d'altération des chloroplastes.

La résistance partielle portée par la variété Azucena, *a priori* de nature polygénique, semblait impliquer plusieurs mécanismes (Albar, 1994). Cette étude a permis de mettre en évidence deux facteurs différents impliqués dans la résistance au RYMV :

- le premier est lié à la compétition entre le taux de croissance de la plante et le mouvement du virus à longue distance; il se manifeste par des étages foliaires apparemment indemnes de virus; il n'intervient pas dans la capacité de réplication du virus dans une feuille mature inoculée artificiellement,

- le deuxième, spécifique de la distinction entre la variété résistante Azucena et la variété sensible IR64 semble reposer principalement sur la restriction du mouvement de cellule à cellule; il entraîne un décalage dans le temps de l'accumulation virale et la présence d'une importante charge virale dans le méstome exclusivement chez la variété IR64.

PERSPECTIVES

L'approche sérologique par l'IE et le test ELISA, retenue pour étudier la distribution spatiotemporelle du RYMV, pour obtenir des indications semi-quantitatives sur la charge virale et la répartition tissulaire du virus par IF de manière descriptive, visualise uniquement la distribution de la protéine de capside et non celle du virus sensu stricto. Par conséquent, cette étude devrait être complétée par un travail supplémentaire sur la distribution spatio-temporelle de l'acide nucléique viral. Elle permettrait d'étudier (1) la forme, ARNm ou nucléocapside, sous laquelle le virus se déplace de cellule à cellule et (2) les sites de réplication potentiels, et de confirmer la distribution et la répartition du virus au sein de la plante. Bien que les techniques d'hybridation in situ fournissent des informations très précises, elles demeurent cependant destructives. L'utilisation d'un marqueur comme la green fluorescent protein (GFP) semble à cet égard mieux adaptée à notre problématique. Elle faciliterait l'étude de la distribution du virus dans le temps, au niveau de la plante entière, des tissus et de la cellule. Elle offre la possibilité de s'affranchir de la variabilité entre les plantes sachant que la technique n'est pas destructive sur plante entière. L'insertion du gène GFP directement dans le génome du virus donne accès à l'étude de l'infection virale par la traduction de l'ARNm viral en protéines. Elle permet ainsi d'analyser le mouvement de cellule à cellule en observant les plasmodesmes et en suivant les protéines virales susceptibles de jouer un rôle dans le mouvement (Oparka et al., 1997).

La présence d'une charge virale importante dans le méstome exclusivement chez la variété sensible IR64, ouvre la voie à une étude ultrastructurale de l'organisation de cette assise cellulaire en mettant l'accent sur les plasmodesmes secondaires. A cet égard, le rôle possible d'une protéine de mouvement, suspectée d'être codée par l'ORF1 du RYMV, serait d'agir sur la limite d'exclusion des plasmodesmes. Il serait par ailleurs judicieux d'y associer une analyse cytochimique de la paroi afin d'appréhender des différences dans leur composition chimique.

L'utilisation d'une variété sensible de type *indica*, qui se rapproche au mieux de la morphologie, de la croissance et de la phyllochronie de la variété Azucena, devrait permettre de s'affranchir des comportements de résistance liés au développement et à la morphologie de la plante pour cibler les mécanismes de résistance spécifiques au virus.

L'étude de ces mécanismes sur les lignées isogéniques obtenues à partir des HD issues du croisement entre la variété sensible IR64 et la variété résistante Azucena constitue la perspective à long terme de notre étude et devrait faciliter la compréhension des mécanismes intimes intervenant dans la résistance exprimée par la variété Azucena.

Références bibliographiques

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 de Phytopathologie*. 18p.

Atabekov J. G. and Dorokhov Y. L., 1984. Plant virus-specific transport function and resistance of plants to viruses. *Adv. Virus Res.*, 29, 313 - 364.

Atabekov J. G. and Taliansky M. E., 1990. Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv. Virus Res.*, 38, 201 - 248.

Bakker W., 1974. Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya. Ph.D. thesis. Agricultural University, Netherlands. *Agric. Res. Rep.* No. 829, 152p.

Bonman J. M., Khush G. S. and Nelson R. J., 1992. Breeding rice for resistance to pests. Annu. Rev. Phytopathol., 30, 507 - 528.

Brugidou C., Holt C., Ngon A Yassi M., Zhang S., Beachy R. and Fauquet C, 1995. Synthesis of an infectious full-lenght cDNA clone of rice yellow mottle virus and mutagenesis of the coat protein. *Virology*, 206, 108 - 115.

Carrington J. C., Kasschau K. D., Mahajan S. K. and Schaad M. C., 1996. Cell to cell and longdistance transport of viruses in plants. *The Plant Cell*, 8, 1665 - 1681.

Coulibaly Y. M., Bah S., Traore O. B. et Thiero S., 1994. La panachure jaune du riz ou Rice Yellow Mottle Virus : une nouvelle maladie du riz à l'office du Niger - Mali. *Office du Niger*, République du Mali, décembre 1994, 29p.

Dolja V. V., Haldeman R., Robertson N. L., Dougherty W. G. and Carrington J. C., 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.*, 13, 1482 - 1491.

Dolja V. V., Haldeman-Cahill R., Montgomery A. E., Vandenbosch A. K. and Carrington J. C., 1995. Capsid protein determinants involved in cell to cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology*, 206, 1007 - 1016.

Fauquet C. et Thouvenel J. C., 1987. Maladies virales des plantes en Côte d'Ivoire. ORSTOM ed., Paris, 243p.

Fauquet C., Brugidou C., Kouassi N., Bonneau C., Ngon A Yassi M., Opalka N., Yeager M. et Beachy R. N., 1995. Rice Yellow Mottle Virus : a threat to african farmers and a model for plants virologists. Premier symposium international sur la marbrure du riz (RYMV), 18 - 22 septembre 1995, Mbé/Bouaké, Côte d'Ivoire, 46p.

Fomba S. N., 1988. Screening for seedling resistance to rice yellow mottle virus in some rice cultivars in Sierra Leone. *Plant Disease*, 72, 641 - 642.

Fraser R.S., 1986. Genes for resistance to plant viruses. CRC Crit. Rev. Plant Sciences, 3 : 257 - 294.

Gilbertson R. L. and Lucas W. J., 1996. How do viruses traffic on the "vascular highway"? *Trends Plant Sci.*, vol.1, 8, 260 - 268.

Glazmann J. C., 1987. Isozyme and classification of asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.*, 74, 21 - 30.

Hoshikawa K. and Matsuo T., 1993. Science of the rice plant. Volume One : Morphology. Food and Agriculture Policy Research Center. Tokyo.

Hull R., 1989. The movement of viruses in plants. Annu. Rev. Phytopathol., 27, 213 - 240.

Kaasteel D. T. J., Perbal C. M., Boyer J. C., Wellink J., Goldbach R. W., Maule A. J. and van Lent J. W. M., 1996. The movement proteins of cowpea mosaic virus and cauliflower mosaic virus induce tubular structures in plant and insect cells. *J. Gen. Virol.*, 76, 2315 - 2321.

Lecomte N., 1993. Study of the pathogenecity of certain rice yellow mottle virus (RYMV) strains and the resistance of a number of rice cultivar (*Oryza sativa*) to RYMV. *Rapp. Multigr.* CIRAD/ORSTOM, 27p.

Legnani R., 1995. Analyse, comparaison et exploitation des résistances au virus Y de la pomme de terre (PVY) et au tobacco etch virus (TEV) chez la tomate. Thèse de docteur en sciences à l'Université de Montpellier II. 165p.

Leisner S. M., Turgeon R. and Howell S. H., 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.

Leisner S. M., Turgeon R. and Howell S. H., 1992. Long distance movement of cauliflower mosaic virus in infected turnip plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5, 41-47.

Lin N. S., Hsu Y. H. and Hsu H. T., 1990. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasmalike organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes. *Phytopathology*, 80, 824 - 828.

Lucas W. J. and Gilbertson R. L., 1994. Plasmodesmata in relation to viral mouvement within leaf tissues. Annu. Rev. Phytopathol., 32, 387 - 411.

Mansky L. M. and Hill J. H., 1993. Molecular basis for disease resistance in plants. Arch. Virol., 131, 1 - 16.

Ngon a Yassi M., Ritzenthaler C., Brugidou C., Fauquet C and Beachy R. N., 1994. Nuceotide sequence and genome characterization of rice yellow mottle virus RNA. J. Gen. Virol., 75, 249 - 257.

N'Guessan P., Pinel A., Caruana M.L., Frutos R., Sy A. and Fargette D., 1997. Evidence of serogroups of rice yellow mottle virus in Côte d'Ivoire. *Phytopathology*, soumis.

Nono-Womdim R., Gebre Selassie K. and Marchoux G., 1993. Migration des virus dans la plante. Revue bibliographique. Agronomie, 13, 785 - 813.

Oparka K.J., Roberts A.G., Santa Cruz S., Boevink P., Prior D.A.M. and Smallcombe A., 1997. Using GFP to study virus invasion and spread in plant tissues. *Nature*, 388, 401 - 402.

Ponz F. and G. Bruening, 1986. Mechanisms of resistance to plant viruses. Ann. Rev. Phytopathol., 4:355-381.

Pooma W., Gillette W. K., Jeffrey J. L. and Petty I. T. D., 1996. Host and viral factors determine the dispensability of coat protein bipartite geminivirus systemic movement. *Virology*, 218, 264 - 268.

Raymundo S. A., Buddenhagen I. W., Fomba S. N. and Akibobetts D. T., 1976. Recent advances in knowledge of rice viruses and resistance to beetle transmitted mottle of rice in west Africa. *Seminar Monrovia*, Liberia, 9p.

Sadiky R., 1995. Etude de la variabilité moléculaire du virus de la panachure jaune du riz (RYMV). Rapport de stage, 47p.

Shababuddin M., Shaws J. G. and Rhoads R. E., 1988. Mapping of the tobacco vein mottle virus Vpg cistron. *Virology*, 163, 635 - 637.

Urban L. A., Ramsdell D. C., Klomparens K. L., Lynch T. and Hancock J. F., 1989. Detection of blueberry shoestring virus in xylem and phloem tissues of highbush blueberry. *Phytopathology*, 79, 488 - 493.