

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
SOMMAIRE	5
INTRODUCTION GENERALE	17
I) Présentation du pathosystème	18
<u>1) Le riz : plante de grande culture et plante modèle</u>	18
a) présentation botanique du riz	18
b) importance économique du riz	23
c) Le riz en tant que plante modèle	24
<u>2) <i>Magnaporthe grisea</i>, agent causal de la pyriculariose du riz</u>	30
a) Symptomatologie et importance de la maladie	30
b) Morphologie, taxonomie	32
c) Cycle de multiplication et épidémiologie de <i>Magnaporthe grisea</i>	33
d) Méthodes de lutte	35
e) Un agent pathogène fongique modèle	43
II) Interaction gène de résistance - gène d'avirulence	44
<u>1) La théorie gène – pour – gène et la réaction hypersensible</u>	44
a) Les gènes « majeurs » de résistance	44
b) La théorie gène – pour – gène	45
c) La réaction hypersensible	46
<u>2) Les gènes de résistance : structures et organisation génomique</u>	47
a) Structures moléculaires des gènes de résistance	48
b) Organisation des gènes de résistance dans le génome	52
<u>3) Les interactions plantes – bactéries phytopathogènes :</u>	
<u>un modèle permettant de proposer des théories</u>	
<u>moléculaires de l'interaction gène – pour – gène</u>	54

Sommaire

a) Quel rôle pour les facteurs d'avirulence bactériens ?	54
b) Une première théorie moléculaire de l'interaction gène – pour – gène	55
c) L'hypothèse du protecteur (« Guard hypothesis »)	56
d) Conclusion : le modèle initial est remis en cause	60
<u>4) Les interaction plantes – champignon : un domaine encore peu défriché au niveau moléculaire.</u>	61
a) L'interaction <i>Cladosporium fulvum</i> – <i>Lycopersicon esculentum</i>	62
b) L'interaction <i>Oryza sativa</i> – <i>Magnaporthe grisea</i>	67
III) Objectifs de cette thèse	68
<u>1) Le gène d'avirulence ACE1</u>	69
a) Structure du gène	69
b) Diversité et rôle de ACE1 dans le pouvoir pathogène	70
<u>2) Pourquoi étudier Pi33 ?</u>	70
a) Etude de l'interaction	70
b) Un gène de résistance intéressant pour le sélectionneur	71
<u>3) Objectifs et stratégie employée</u>	72
a) Clonage d'un gène de résistance	72
b) Caractérisation de Pi33 comme nouveau gène de résistance	74
MATERIELS ET METHODES	75
I) Matériels	75
<u>1) Matériel fongique</u>	75
<u>2) Matériel végétal</u>	75
a) Variétés de riz	75
b) Lignées IR64 × Azucena	75
c) Lignées JX17 × ZYQ8	87
<u>3) Banques génomiques</u>	87
a) Banque de clones YAC de la variété Nipponbare du riz	87
b) Banques BAC	87
c) Contigs de la banque Nipponbare (OSJNBa)	87
II) Caractérisation et cartographie génétique de Pi-33	89

<u>1) Détermination de la présence de <i>Pi33</i> dans les lignées de riz étudiées</u>	89
a) Culture du riz	89
b) Préparation de l'inoculum	89
c) Inoculation, lecture des symptômes	89
<u>2) Recherche et cartographie de marqueurs proches de <i>Pi33</i></u>	91
a) synthèse de marqueurs RFLP à partir de séquences connues	91
b) Synthèse de sondes d'extrémités de YAC	92
c) Réalisation de membranes RFLP, marquage des sondes et hybridation	93
d) Marqueurs microsatellites	94
e) Sélection de marqueurs AFLP par Bulk Segregant Analysis	94
III) Cartographie physique et analyse de séquences	95
<u>1) Hybridation sur membranes BAC</u>	95
a) Confection des membranes	95
b) Conditions d'hybridation	96
<u>2) Synthèse de sondes à partir de clones BAC</u>	96
a) Reverse Southern	96
b) Utilisation de BAC entiers	96
c) Synthèse de sondes d'extrémité de BAC	97
<u>3) Marche <i>in silico</i></u>	98
<u>4) Recherche de RGA</u>	98
<u>5) Analyse de séquences</u>	98
a) Comparaison de séquences, recherches des séquences répétées	99
b) Détection et analyse des séquences exprimées	99
IV) Transformation du riz par bombardement	100
<u>1) De la graine au cal transformé</u>	100
a) Induction de la callogenèse	100
b) Transformation	101
c) Culture sur un milieu de sélection	102
<u>2) Du cal à la plante</u>	103
a) Prérégénération, régénération	103
b) Culture des plantes en milieu artificiel	103
c) Culture en Jiffy® et conditions d'inoculation	103

CARACTERISATION ET CARTOGRAPHIE FINE	
D'UN NOUVEAU GENE DE RESISTANCE : <i>Pi33</i>	105
I) Caractérisation d'un nouveau gène de résistance, <i>Pi33</i>	105
1) <u>Recherche et cartographie de la résistance correspondant à <i>ACE1</i></u>	105
2) <u>Distinction entre <i>Pi33</i> et les autres gènes de résistance</u>	107
a) Utilisation des lignées isogéniques et des cultivars différentiels	107
b) Tests d'allélisme	109
3) <u>Caractère dominant de <i>Pi33</i></u>	111
a) plantes F ₁	111
b) plantes F ₂	113
II) Densification de la carte IR64 × Azucena dans la zone de <i>Pi33</i>	114
1) <u>Cartographie fine de <i>Pi33</i></u>	114
a) Observations sur les 105 premières lignées	114
b) Recherche des recombinants dans la région de <i>Pi33</i>	115
c) Cartographie fine de <i>Pi33</i>	117
2) <u>Recherche de marqueurs liés à <i>Pi33</i></u>	117
a) Cartographie des marqueurs microsatellites	117
b) marqueurs RFLP	119
c) Sélection de marqueurs AFLP par Bulk Segregant Analysis	121
d) Marqueurs YAC end	121
e) Conclusion	121
III) Discussion	123
1) <u>Identification de <i>Pi33</i>, un nouveau gène de résistance du riz</u>	123
a) Différentes méthodes d'identification de nouveaux gènes de résistance.	123
b) Limites	124
c) Utilisation de couples de lignées isogéniques	125
3) <u>Hypothèses sur l'origine de <i>Pi1</i></u>	125
2) <u>Cartographie fine de <i>Pi33</i></u>	127
a) Intérêt de cloner <i>Pi33</i>	127
b) Nécessité d'une cartographie fine, comparaison avec d'autres études	127
c) Autres utilités de la cartographie fine	128

CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DE <i>PI33</i> , TEST DE COMPLEMENTATION, ET ETUDE DE LA SEQUENCE AU NIVEAU DE CE GENE	129
I) Cartographie physique de <i>Pi33</i> chez IR64 et Azucena	129
<u>1) Cartographie physique des marqueurs de la zone de <i>Pi33</i></u>	130
a) Marqueurs RFLP	131
b) Marqueurs d'extrémité de YAC	135
<u>2) Marche chromosomique dans Nipponbare</u>	135
a) De G1010 vers R1813	140
b) De R1813 vers Y2643L : Echec de diverses tentatives	143
c) De Y2643L vers R1813 : Utilisation de la PCR walking	145
d) Validation de la marche chromosomique par cartographie génétique	147
e) Conclusion	147
<u>3) Cartographie physique de <i>Pi33</i> dans la banque IR64 (OSIIBb)</u>	148
a) Cartographie dans la banque <i>IR64</i> (OSIIBb) de sondes déjà cartographiées dans la banque Nipponbare (OSJNBa)	148
b) Confirmation de la carte physique du locus de <i>Pi33</i> chez IR64	141
c) Confirmation de la cartographie physique par cartographie génétique	154
<u>4) Recherche d'homologues à des gènes de résistance (RGA)</u>	154
II) Test de complémentation	155
<u>1) Efficacité de la transformation</u>	157
<u>2) Tests de résistance</u>	157
III) Etude de la séquence du locus de <i>Pi33</i>	160
<u>1) Structure de la séquence de Nipponbare</u>	161
a) Séquences répétées	161
b) Gènes	163
<u>2) Les contigs de séquence <i>indica</i></u>	167
a) Présentation de cette séquence, utilité de son étude	167
b) Alignement des séquences <i>indica</i> et <i>japonica</i>	167
c) Etude de certains contigs <i>indica</i>	169
IV) Discussion	172

<u>1) Marche chromosomique</u>	174
<u>2) Cartographie physique comparée</u>	175
<u>3) Tentative d'affinement de la cartographie physique (test de complémentation)</u>	177
<u>4) <i>Pi33</i> est-il un gène centromérique ?</u>	178
<u>5) Etude des gènes prédits dans la séquence Nipponbare</u>	179
<u>6) Perspectives</u>	184
DIVERSITE AU NIVEAU DU LOCUS DE <i>PI33</i> ,	
ORIGINE DE CE GENE PARMIS LES PARENTS D'IR64	185
I) Résultats	186
<u>1) Recherche du gène de résistance <i>Pi33</i> dans la généalogie d'IR64</u>	191
a) Géniteurs « primaires »	191
b) Utilisation des autres membres de la généalogie de IR64	195
c) Conclusion	199
<u>2) Analyse de la diversité dans la zone de <i>Pi33</i> :</u>	
<u>Etude moléculaire des parents de IR64 et d'autres variétés</u>	199
a) Diversité des marqueurs SSR	201
b) Marqueurs RFLP	201
c) Structure de la diversité génétique du locus de <i>Pi33</i>	205
d) Présence de <i>Pi33</i> et diversité des marqueurs	205
II) Discussion	208
<u>1) Intérêt de cette étude dans le cadre d'une</u>	
<u>stratégie de sélection assistée par marqueurs</u>	208
<u>2) Diversité autour de <i>Pi33</i></u>	209
a) Plusieurs gènes ?	209
b) Une origine ancienne ?	210
<u>3) Perspectives</u>	211
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	213
I) Cartographie génétique et diversité	213
II) Cartographie physique et clonage	215

BIBLIOGRAPHIE	218
ANNEXES	263
Annexe 1 : Culture du riz en serre, préparation de l'inoculum, inoculation	265
a) Culture du riz en serre	265
b) Préparation de l'inoculum	265
c) Inoculation, lecture des symptômes	265
Annexe 2 : Milieux de culture pour les micro-organismes, antibiotiques	267
a) Milieu LB	267
b) Milieu 2YT	267
c) Milieu YPD	267
d) Milieu " Farine de riz "	267
Annexe 3 : Protocoles d'extraction d'ADN	268
a) ADN plasmidique : miniprep lyse alcaline	268
b) ADN BAC : protocoles d'extraction	269
c) Maxiprep d'ADN génomique bactérien (D'après Gabriel et De Feyter, 1992)	270
d) Extraction d'ADN végétal (Hoisington, 1992)	271
e) Extraction de l'ADN génomique de levure	272
f) Extraction grossière d'ADN à partir d'un morceau de gel d'agarose	273
Annexe 4 : amplification PCR de séquences connues	275
a) Mélange PCR	275
b) ADN	275
c) Cycle	276
d) Oligonucléotides utilisés	276
Annexe 5 : Ligation, transformation par choc thermique	279
a) Ligation	279
b) Transformation	279
Annexe 6 : Séquences des marqueurs G1010, R1813, C483, S10038C, Os.r6	280
a) Sonde G1010	280

Sommaire

b) Sonde R1813	281
c) Sonde S10038C	282
d) Sonde Os-r6.3	284
e) Sonde C483	285
Annexe 7 : PCR Walking	287
a) Principe	287
b) Préparation de l'adaptateur	287
c) Digestion - Ligation	288
d) Première PCR	288
e) Seconde PCR	289
f) Observation des amplifications, synthèse des sondes	290
Annexe 8 : Digestion de l'ADN, transfert sur membrane	291
a) Digestion	291
b) Précipitation	291
c) Electrophorèse, transfert	292
Annexe 9 : Marquage radioactif d'une sonde ADN	293
a) ADN obtenu par PCR préparative ou par PCR walking	293
b) ADN provenant d'une extraction grossière depuis un gel d'agarose	293
c) ADN provenant directement d'un clone BAC	293
d) ADN génomique de riz	293
Annexe 10 : Hybridation et deshybridation des membranes	295
a) Membranes RFLP	295
b) Membranes Haute Densité (HD) BAC	296
Annexe 11 : AFLP	297
a) Digestion	298
b) Ligation des adaptateurs	298
c) Préamplification	298
d) Marquage de l'amorce	299
e) Amplification AFLP	299
f) Pré-dépôt, migration, révélation	300
Annexe 12 : Confection de membranes BAC à haute densité	301

Sommaire

a) Repiquage de la banque	301
b) Repiquage des clones sur la membrane	301
c) Dénaturation	301
Annexe 13 : Milieux d'induction, de transformation et de culture des cals et plantules de riz	302
a) Solutions mères	302
b) Confection des milieux	303
Annexe 14 : Protocoles liés à la transgénèse	306
a) Désinfection des grains	306
b) Sélection des cals secondaires pour la transformation	306
c) Préparation des cals pour la transformation	306
d) Préparation du matériel pour la transformation	307
e) Réalisation du bombardement	308
Annexe 15 : Publication sous presse dans TAG	310
Annexe 16 : Alignement des séquences <i>indica</i>	329
Annexe 17 : Alignement de la séquence RGA trouvée dans le clone OJ1006_H01 avec <i>I2</i> de la tomate, d'autres séquences RGA, le contig 5542 de la séquence shotgun <i>indica</i>	337
Résumé en français, Titre en anglais, Résumé en anglais, mots-clefs	342

FIGURES

Note : Le nom de certaines figures et de certains tableaux a été raccourci dans le sommaire.

Figure A1a : Aires de répartition de <i>O. glaberrima</i> et des six espèces de riz sauvages du complexe <i>sativa</i>	20
Figure A1b : Aires de domestication supposées de <i>O. sativa</i>	20
Figure A2 : Evolution de la production, du rendement et de la surface plantée en riz	25
Figure A3 : Partage du séquençage du génome du riz au sein du consortium IRGSP	28
Figure A4 : Symptômes de la pyriculariose	31
Figure A5 : Cycle d'infection foliaire de <i>Magnaporthe grisea</i>	34
Figure A6 : Carte génétique des gènes de résistance à la pyriculariose	42
Figure A7 : Théorie classique de la résistance, théorie du protecteur	57
Figure A8 : Stratégie de clonage positionnel mise en place au cours de cette thèse	73
Figure B1 : Généalogie de IR64	79 et 188
Figure B2 : Généalogies de Bala et ZYQ8	83
Figure B3 : Généalogies des variétés différentielles japonaises	84
Figure B4 : Généalogies des autres variétés	85
Figure B5 : Echelle de lecture des symptômes de la pyriculariose	90
Figure C1 : Cartographie composite des gènes <i>Pi11</i> , <i>Pi29(t)</i> , <i>Pi33</i>	108
Figure C2 : Extrait de la carte microsatellite du chromosome 8	116
Figure C3 : Extrait de la carte RFLP du chromosome 8	116
Figure C4 : Extrait de la carte physique YAC établie par le RGP	116
Figure C5 : Cartographie fine de <i>Pi33</i>	120
Figure C6 : Synthèse des sondes d'extrémité de YAC	122
Figure D1 : Carte physique détaillée de la zone Y2643R – G1010	fournie séparément

Sommaire

Figure D2 : Carte physique simplifiée de la zone entourant <i>Pi33</i> dans Nipponbare	138
Figure D3 : Cartes physiques de <i>Pi33</i> dans IR64 et Nipponbare	142
Figure D4 : Reverse southern sur les clones 29M11, 22F06, 32F17	146
Figure D5 : Carte physique de <i>Pi33</i> dans la banque OSIBb (IR64)	150
Figure D6 : Gènes prédits et séquences répétées entre 56M07r et 57H10r	162
Figure D7 : Alignement des séquences <i>indica</i> sur la séquence de Nipponbare du RGP	168
Figure D8 : Deux contigs de la séquence <i>indica</i> en partie homologues à la séquence du locus de <i>Pi33</i> : Homologie avec les séquences <i>japonica</i> disponibles, gènes prédits.	170
Figure D9 : Cartographie physique de <i>Pi33</i> : Comparaison des distances physiques chez IR64 et Nipponbare	176
Figure D10 : Recherche de RGA dans la zone entourant le locus de <i>Pi33</i>	180
Figure D11 : Rôle de l'adénosylhomocystéine hydrolase dans le transfert du groupe méthyle	182
Figure E1 : Les types de parents de IR64	187
Figure E2 : Présence de <i>Pi33</i> dans la généalogie d'IR64	190
Figure E3 : Symptômes observés après inoculation de TYC et <i>O. nivara</i>	192
Figure E4 : Polymorphisme des marqueurs RFLP et SSR	200
Figure E5 : Diversité moléculaire au niveau de la zone de <i>Pi33</i>	204

TABLEAUX

Tableau A1 : Classification des espèces du genre <i>Oryza</i>	19
Tableau A2 : Longueur comparée de quelques génomes de plantes	25
Tableau A3 : Les gènes majeurs de résistance à la pyriculariose : localisation sur les chromosomes du riz	39
Tableau A4 : La relation gène – pour – gène	45
Tableau A5 : Principaux gènes de résistance clonés et caractérisés à ce jour	49
Tableau A6 : Gènes d'avirulence fongiques clonés et caractérisés à ce jour	63

Sommaire

Tableau B1 : Lignées parentes de IR64	77
Tableau B2 : Autres lignées utilisées	81
Tableau B3 : Banques BAC du riz utilisées	88
Tableau C1 : Présence du gène <i>R</i> correspondant à <i>ACE1</i> dans différents cultivars	104
Tableau C2 : Présence du gène <i>R</i> correspondant à <i>ACE1</i> dans différentes lignées isogéniques et différents cultivars différentiels	106
Tableau C3 : Test de résistance de plantes F2 IR64 × Azucena	112
Tableau C4 : Les différents marqueurs disponibles dans la région de <i>Pi33</i>	118
Tableau C5 : Cartographie fine de gènes de résistance du riz à la pyriculariose	128
Tableau D1 : Différentes sondes d'extrémité de clones Nipponbare	136
Tableau D2 : Différentes sondes d'extrémité de BAC OSIIBb (IR64)	152
Tableau D3 : Efficacité des transformations	156
Tableau D4 : Etude de la résistance des lignées transformées	158
Tableau D5 : Gènes prédits par RiceHMM, homologues et domaines structuraux	164
Tableau D6 : Gènes prédits par RiceHMM sur les contigs <i>indica</i> partiellement homologues à la séquence <i>japonica</i>	171
Tableau D7 : Cartographie physique de différents gènes de résistance du riz	173
Tableau D8 : Rapport distance génétique / distance physique au niveau de <i>Pi33</i>	178
Tableau E1 : Présence ou absence de <i>Pi33</i> chez certains parents de IR64	194
Tableau E2 : Diversité moléculaire au niveau de la zone de <i>Pi33</i>	198
Tableau E3 : Fonds génétiques de <i>Pi33</i>	202
Tableau E4 : Fréquence des différents allèles	206

INTRODUCTION GENERALE

L'étude des interactions entre les plantes et les agents pathogènes qui vivent à leurs dépens a mis en évidence tout un ensemble de stratégies défensives développées par les organismes végétaux au cours de leur évolution. L'une d'elles, nommée paradoxalement la réaction hypersensible (HR) est caractérisée par la mort rapide et programmée d'un petit nombre de cellules végétales au niveau du point d'inoculation, à un épaissement de leurs parois, et à la production de composés toxiques. Cette mort aboutit au blocage du développement de l'agent pathogène. En conséquence, et malgré son nom, cette réaction aboutit à une résistance totale de la plante.

Cette résistance est dite totale, car elle ne provoque l'apparition d'aucun symptôme de la maladie. Elle est souvent spécifique, car un individu donné résistera à certaines souches de l'agent pathogène (elles sont dites avirulentes), et non à d'autres (qui sont dites virulentes). Parallèlement, une souche donnée d'un agent pathogène pourra être virulente pour une plante de l'espèce considérée (on parle d'interaction compatible), et avirulente pour une autre (interaction incompatible).

Les travaux de Flor (1956) sur la génétique formelle de l'interaction lin – rouille du lin, suivi par de nombreux travaux sur plus de 40 interactions plantes – pathogènes (Notteghem, communication personnelle), ont abouti à la théorie gène – pour – gène qui rend compte de ce type d'interaction*. Selon cette théorie, chaque plante comporte dans son génome un ensemble de gènes nommés « gènes de résistance » qui correspondent chacun à un des gènes dits « gènes d'avirulence » de l'agent pathogène. Lorsqu'une souche pathogène comportant un gène d'avirulence donné tente d'attaquer une plante portant le gène de résistance correspondant, on observe généralement une réaction hypersensible. Dans tous les autres cas, l'agent pathogène se développe, et l'on observe les symptômes de la maladie.

L'objectif principal de cette thèse est le clonage et l'étude d'un gène de résistance du riz (*Oryza sativa* L.) à son principal agent pathogène fongique, *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr, l'agent causal de la pyriculariose. Dans un premier temps, une présentation des deux partenaires de cette interaction sera faite. Ensuite, nous nous intéresserons aux travaux déjà

* La théorie gène – pour – gène est décrite plus en détail § II.1.b. du présent chapitre, p. 45.

réalisés chez différentes espèces qui ont permis d'étudier les bases moléculaires de la théorie gène – pour – gène. Enfin, les objectifs et la stratégie des travaux réalisés au cours de la thèse seront précisés.

I) Présentation du pathosystème

1) Le riz : plante de grande culture et plante modèle

a) **présentation botanique du riz**

Le genre Oryza

Le genre botanique *Oryza* regroupe des riz sauvages et les riz cultivés. Ce sont des monocotylédones de la famille des Poacées, ordre des Cypéales, classe des Liliopsidés (Conquist, 1988).

Le genre *Oryza* comprend 24 espèces dont deux seulement sont cultivées. Suite à différentes études, tant morphologiques que moléculaires, ces différentes espèces ont été réparties en complexes selon différentes modalités. Ge *et al.* (2001) proposent, sur des bases moléculaires, une division en quatre complexes (*sativa*, *officinalis*, *ridleyi* et *meyeriana*), qui se rapproche de la division en sections et en séries proposée par le Genetic Resources Center* (Centre des Ressources Génétiques, GRC) sur des bases morphologiques (tableau A1). Le complexe *sativa* de Ge *et al.* comprend les deux espèces de riz cultivés, *Oryza sativa* L. et *Oryza glaberrima* Steud, ainsi que les six espèces sauvages qui leur sont apparentées : *O. barthii* A. Chev., *O. glumaepatula* Steud, *O. longistaminata* A. Chev. et Roehr., *O. meridionalis* Ng., *O. nivara* Sharma et Shastry, et *O. rufipogon* Griff. Toutes les espèces de ce groupe sont diploïdes, de génome AA, avec $2n = 24$. Les espèces cultivées sont annuelles avec une autogamie prépondérante. Les espèces sauvages sont pérennes ou annuelles, allogames ou autogames (Arraudeau, 1998).

Les riz sauvages du complexe *Sativa* se répartissent dans toute la zone intertropicale à l'exception des îles du Pacifique (figure A1a). Aux Amériques, *O. glumaepatula* a une aire de

* Site internet du GRC : <http://www.irri.org/GRC/GRC/home/home.htm>. En ce qui concerne la taxonomie du riz : <http://www.irri.org/GRC/Taxonomy/Taxonomy.htm>

GRC (2001)		Ge et al. (2001)
Sect. Padia	Ser. Meyerianae	Complexe <i>O. meyeriana</i>
	Ser. Ridleyanae	Complexe <i>O. ridleyi</i>
	Ser. Schlechterianae	<i>O. schlechteri</i> (isolée)
Sect. Brachianta	Ser. Brachiantae	<i>O. brachianta</i> (isolée)
Sect. Oryza	Ser. Latifoliae	Complexe <i>O. officinalis</i>
	Ser. Australienses	Complexe <i>O. sativa</i>
	Ser. Sativae	

Tableau A1: Classification des espèces du genre *Oryza*

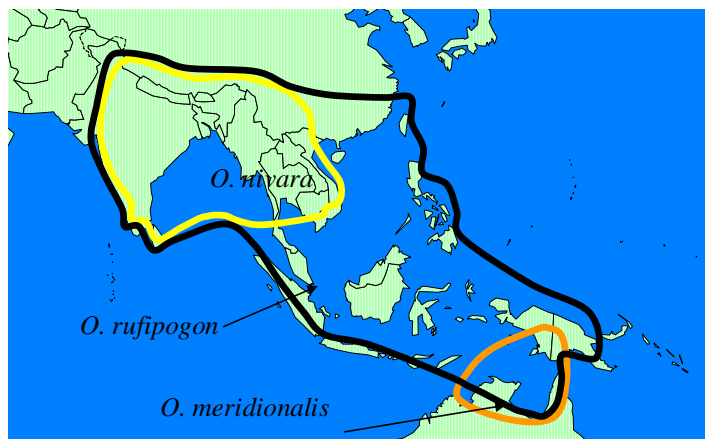


Figure A1a : Aires de répartition de *O. glaberrima* et des six espèces de riz sauvages du complexe *sativa*
D'après Vaughan, 1989

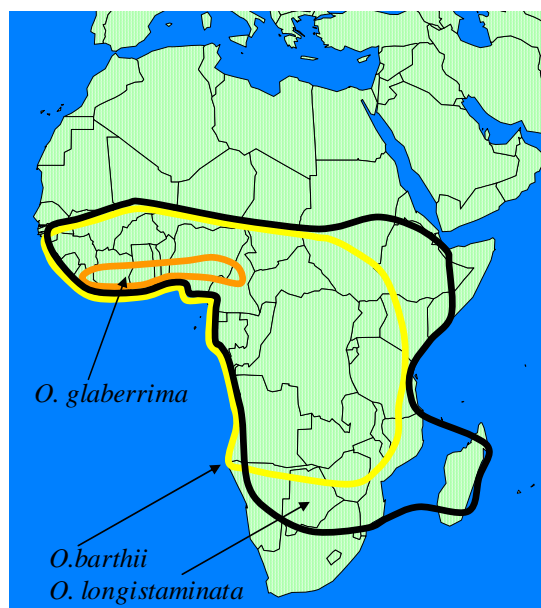
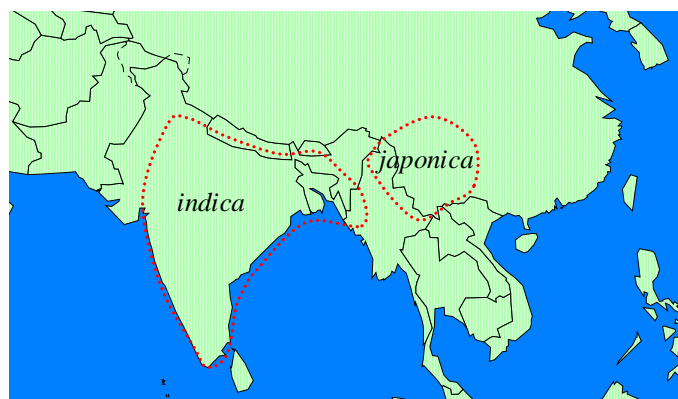


Figure A1b : Aires de domestication supposées de *O. sativa* d'après Second, 1982

Second (1982) fait l'hypothèse que la domestication des deux sous espèces *indica* et *japonica* du riz s'est faite dans deux zones différentes, présentées ici. D'autres auteurs, dont Oka (1974) considèrent que la domestication du riz (*indica* comme *japonica*) s'est réalisée dans une seule zone, qui correspond à la zone notée *japonica* sur cette carte



répartition s'étendant des bassins de l'Amazone et de l'Orénoque jusqu'au sud du Mexique et aux Antilles. En Afrique équatoriale, on trouve *O. barthii* et *O. longistaminata* qui est aussi présent à Madagascar. En Asie, dans un triangle dont la base court de la frontière indo-pakistanaise à Taiwan et dont la pointe se trouve dans le nord de l'Australie, on trouve *O. rufipogon*. A l'intérieur de cette zone, on trouve deux autres espèces, *O. nivara** dans le Deccan, les contreforts himalayens et la péninsule indochinoise, et *O. meridionalis* au nord de l'Australie et au sud de l'île de Nouvelle Guinée (figure A1a).

Les riz cultivés : diversité

Le caractère morphologique essentiel permettant de différencier les deux espèces cultivées du riz est la longueur de la ligule toujours plus courte et tronquée chez *O. glaberrima* (7 mm au maximum contre 8 à 45 mm pour *O. sativa*) (Arrauveau, 1998).

Oryza glaberrima, originaire d'Afrique, est uniquement cultivée dans la zone subsaharienne (figure A1a). Les surfaces cultivées sont en constante régression du fait de ses faibles qualités agronomiques (sensibilité à la photopériode, à la verse, égrenage spontané et faible productivité) et de l'introduction de l'espèce asiatique dans la région. Des études enzymatiques ont montré que cette espèce présente une moindre diversité génétique avec moins de polymorphisme que chez *Oryza sativa*.

Oryza sativa est l'espèce la plus cultivée dans le monde. Elle présente une très grande diversité de formes avec plus de 100 000 cultivars répertoriés dans la collection mondiale dont 65 000 sont gérés par le Genetic Resources Center (GRC**) au sein de l'International Rice Research Institute (IRRI) aux Philippines. La structuration de cette diversité intra-spécifique est très forte et très particulière. Sa compréhension a permis de grands progrès dans la définition des stratégies raisonnées d'amélioration génétique du riz.

L'espèce a tout d'abord été subdivisée en deux sous espèces, *indica* et *japonica*, sur la base d'observations phénotypiques, sérologiques et de barrières reproductives (Kato *et al.*, 1928). La variété type du groupe *indica* se caractérise par un fort tallage, des feuilles étroites et des grains longs et minces. Le groupe *japonica* possède trois types morphologiques. Le type tempéré, *japonica* au sens strict, possède un tallage moyen, des feuilles fines, des grains

* Il semblerait selon certaines études récentes que *O. nivara* ne corresponde pas à une espèce, mais à une sous population annuelle de *O. rufipogon* (Ghesquière, communication personnelle). Cependant, nous avons choisi ici de la présenter comme une espèce, étant donné qu'elle est considérée comme telle dans les travaux les plus récemment publiés (Ge *et al.*, 2001).

** <http://www.rgc.irri.org>

arrondis et courts. Le type tropical, appelé parfois *javanica*, se distingue par un tallage réduit, des feuilles larges et des grains longs et larges. Le troisième type est intermédiaire entre les deux précédents (Jacquot & Clement, 1995).

Les études isoenzymatiques menées sur un large échantillon de la collection mondiale ont permis de mieux cerner cette diversité. Six groupes isoenzymatiques ont été identifiés et définis en fonction de leur distance génétique (Glaszmann, 1987). L'utilisation des marqueurs moléculaires du type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont abouti à confirmer la classification obtenue grâce aux marqueurs isozymes (Arraudeau, 1998).

Parmi ces six groupes, ceux regroupant le plus grand nombre de variétés correspondent aux deux sous-espèces déjà définies : *japonica* (groupe VI) et *indica* (groupe I). Les groupes III et IV, originaires du Bangladesh, correspondent à des riz supportant de longues et profondes submersions et capables de les compenser par une croissance importante (jusqu'à 6m). Le groupe V, présent dans une bande allant de l'Iran à la Birmanie, correspond à des riz de haute qualité, parmi lesquels le Basmati des contreforts himalayens ou les riz Sadri d'Iran. Les riz du groupe II coexistent avec les riz *indica* en Inde, au Pakistan, au Népal et au Bangladesh. Au Bangladesh et dans les régions environnantes de l'Inde, le groupe II s'identifie clairement avec l'écotype « Aus ». Ce sont des riz de cycle court, pouvant être cultivés dans des conditions hydriques très variables (Glaszmann, 1987).

La structuration de la diversité du riz en deux grands pôles (groupe VI – *japonica* et groupe I – *indica*) a amené Second (1982) à faire l'hypothèse que la domestication du riz s'est faite séparément dans deux régions différentes de part et d'autre de l'Himalaya à partir de deux populations différentes de *O. rufipogon* (figure A1b). Selon d'autres auteurs, dont Oka (1974), la domestication du riz s'est faite dans une seule zone. La structuration de la population actuelle proviendrait de variations locales des conditions de culture, en particulier liées à l'altitude. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que des grains de riz trouvés lors de fouilles archéologiques présentent des morphologies intermédiaires entre *indica* et *japonica* et présentent aussi des caractéristiques de riz sauvages (Zhang & Yuan, 1998 in Liu, 2000*). Cependant, l'étude comparée de génomes *indica* et *japonica* semble indiquer que la séparation entre les deux groupes date d'avant le processus de domestication (Panaud, 2002, *communication personnelle*), ce qui semble renforcer l'hypothèse d'une double domestication avancée par Second (1982).

b) importance économique du riz

La culture du riz

Le riz, au même titre que le blé, est une culture ancienne. Les premières traces de sa culture remontent à 5000 ans avant notre ère (Hingham, 1989). Il constitue l'aliment de base des habitants d'un grand nombre de pays en voie de développement, et la moitié de la population mondiale en consomme régulièrement.

Les cultures de riz couvrent environ 150 millions d'hectares, soit plus du dixième de l'ensemble des surfaces cultivées. L'essentiel des surfaces (132 sur 150 millions d'hectares) se situe dans les zones humides tropicales et subtropicales soumises au régime de la mousson. Près de 90 % de ces surfaces se trouvent localisées en Asie alors que les 10 % restant se répartissent sur tous les autres continents.

Le riz, cultivé entre 40° de latitude sud et 53° de latitude nord, se développe dans un très large éventail de milieux en terme de topographie, type de sol, régime hydrique et facteurs climatiques. Le riz est aussi cultivé sous toutes les altitudes, de 0 à 1800 mètres à Madagascar ou 2400 au Népal ou sur les hauts plateaux andins (M. Valès, communication personnelle).

Les conditions d'environnement dans lesquelles le riz est cultivé sont généralement classées en fonction du régime hydrique. Lorsqu'il y a submersion, la riziculture est dite irriguée s'il y a contrôle de l'eau et inondée dans le cas contraire. Lorsqu'il n'y a pas submersion pendant la culture, la riziculture peut être strictement pluviale ou pluviale sur nappe (Arraudeau, 1998 ; Chaïr, 1995).

Production dans le monde

Les rendements en riz paddy* varient selon les conditions de culture de 1 à 10 t.ha⁻¹ en culture avec submersion et de 1 à 5 t.ha⁻¹ en riziculture pluviale. Par comparaison, l'espèce africaine, *Oryza glaberrima*, ne produit qu'exceptionnellement plus de 3 t.ha⁻¹.

En 2001, la production mondiale de riz paddy a atteint 593 Mt, pour une surface cultivée de 151 millions d'hectares, ce qui représente une baisse de 2,5 % par rapport à la production de 2000. De façon plus générale, elle se caractérise par une irrégularité due aux aléas climatiques associés au fait que près de la moitié des surfaces cultivées le sont sans

* [Agricultural archeology] 2000 1, 122-128 [en chinois] Traduction par Li Bin : <http://www.carleton.ca/~bgordon/rice/papers/liuzy20.htm>

* Les rendements du riz sont généralement donnés en poids de grain paddy (grain non décortiqué, avec leurs glumes et leurs glumelles). Un kilo de riz paddy donne environ 650 grammes de riz blanchi (grains entiers et brisures).



maîtrise de l'eau (figure A2). Malgré cette irrégularité, un certain nombre de projections relatives à la production ont pu être établies. Les superficies cultivées au niveau mondial devraient progresser lentement au rythme de 0,12 % par an, soit la moitié seulement de la croissance annuelle intervenue au cours des vingt dernières années (figure A2). Le taux de croissance du rendement moyen prévu d'ici 2004 est comparable à celui enregistré au cours des six dernières années, qui était de 1,16 %. Cependant, cette projection est bien inférieure au taux de 2,04 % enregistré au cours des vingt dernières années. La lutte contre les maladies du riz, en particulier par l'utilisation de résistances variétales, semble être l'une des solutions à apporter face à cette stagnation des rendements.

c) Le riz en tant que plante modèle

Le riz est actuellement la plante modèle des monocotylédones. En effet, le riz est à la fois une plante à petit génome, ce qui a facilité son séquençage complet, une plante diploïde et autogame, ce qui simplifie son étude génétique, une plante relativement facile à transformer génétiquement, et une plante de grande culture, ce qui permet d'espérer des applications directes des découvertes réalisées sur cette plante.

Les génomes végétaux sont de taille très variable. Chez les plantes à fleurs, les longueurs des génomes varient d'un facteur 1 à 2300 (tableau A2). Une première estimation de la taille du génome du riz a été réalisée par Arumuganathan & Earle (1991), et a donné une taille de 430 Mpb pour le génome nucléaire haploïde. Les mesures réalisées au cours des récents travaux de séquençage ont donné des résultats similaires : 460 Mbp pour la variété *indica* 93-11 (Yu *et al.*, 2002), et 420 Mpb pour la variété *japonica* Nipponbare (Goff *et al.*, 2002). Cette taille est environ 4 fois plus importante que celle du génome de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (125 Mb), mais bien plus faible que celles des autres monocotylédones de grande culture (tableau A2).

La cartographie génétique du riz

L'un des premiers outils d'étude du génome a été la cartographie génétique. Historiquement, ce sont des marqueurs morphologiques qui furent d'abord cartographiés. Cependant, c'est l'utilisation de marqueurs moléculaires, nombreux et faciles à générer, qui a permis un grand développement de cette discipline. L'utilisation d'un grand nombre de marqueurs permet en particulier de réaliser une carte « saturée », où chaque marqueur possède des voisins très proches, et où le nombre de groupes de liaison correspond au nombre de

**Figure A2 : Evolution du rendement,
de la production, et de la surface plantée en riz depuis 1960**

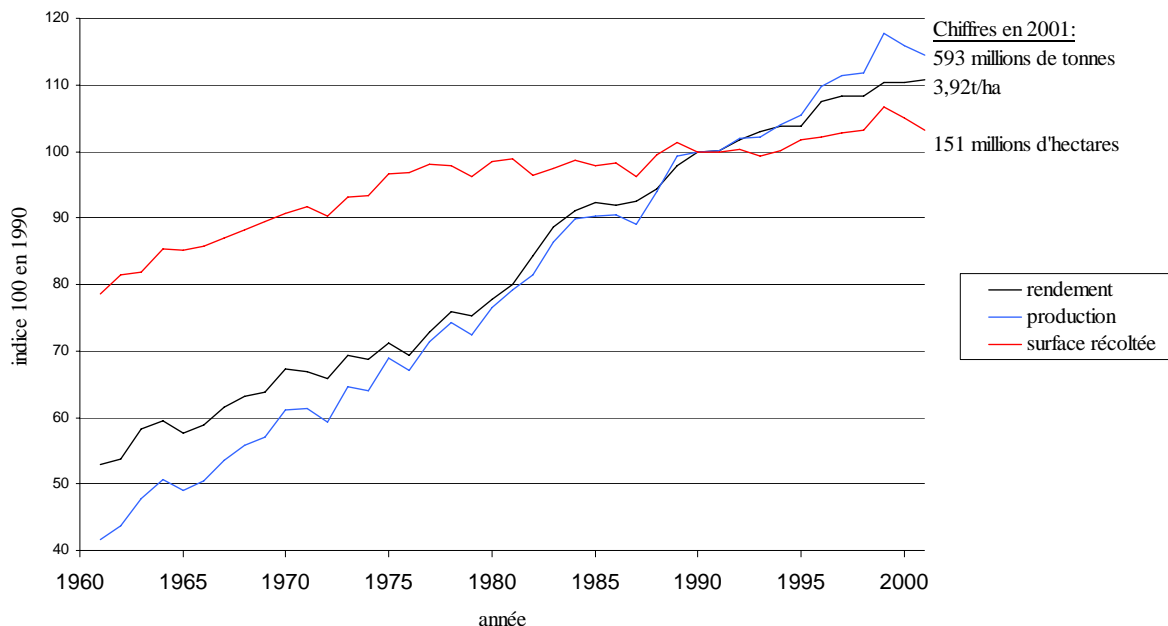


Tableau A2 : Longueur comparée de quelques génomes de plantes avec celui du riz

espèce	pléidie	longueur du génome (Mbp)	comparaison avec le génome du riz ⁽¹⁾	référence
<i>Cardamine amara</i>	2	54	0,12	Benett & Smith, 1991
<i>Arabidopsis thaliana</i>	2	125	0,29	The Arabidopsis Genome Initiative, 2000
<i>Oryza sativa</i>	2	430	1	Arumuganathan & Earle, 1991
<i>Sorghum bicolor</i>	2	735	1,7	Benett & Smith, 1991
<i>Lycopersicon esculentum</i>	2	1005	2,3	Benett & Smith, 1976
<i>Zea mays</i>	2 (4)	2671	6,2	Benett & Smith, 1991
<i>Saccharum officinarum</i>	~10	3969	9,2	Benett & Smith, 1976
<i>Hordeum vulgare</i>	2	5439	13	Benett & Smith, 1976
<i>Secale cereale</i>	2	8110	18	Benett & Smith, 1976
<i>Triticum aestivum</i>	6	16969	39	Benett & Smith, 1976
<i>Fritillaria assyriaca</i>	4	125000	290	Benett & Smith, 1976

(1) rapport taille du génome considéré / taille du génome nucléaire du riz

chromosomes déjà connus. L'élaboration de telles cartes a été une grande avancée dans la connaissance des génomes, mais ces cartes présentent des limites liées à leur nature statistique, et au fait qu'une carte donnée est inféodée à une descendance particulière : des marqueurs ne peuvent être ajoutés à cette carte qu'en utilisant l'ensemble des descendants du croisement qui a permis de la réaliser.

Depuis la publication de la première carte génétique du riz (McCouch *et al.* 1988), le nombre de marqueurs disponibles se multiplia et de nouvelles populations fixées utilisables pour la cartographie apparurent, telles que des lignées haploïdes doublées (par exemple Tanksley *et al.*, 1991 ; Zhu *et al.*, 1993) ou autofécondées (par exemple Wang *et al.*, 1994). Au sein de cet ensemble, nous pouvons distinguer deux cartes, qui ont joué un rôle de référence :

La carte du croisement IR64 × Azucena réalisée en utilisant des marqueurs microsatellites (Wu & Tanksley, 1993, Panaud *et al.*, 1996, Chen *et al.*, 1997, Temnykh *et al.*, 2000). Cette carte a été réalisée en utilisant 4 groupes de descendants provenant de croisements différents entre IR64 et Azucena (Temnykh *et al.*, 2000 ; Cho *et al.*, 2000), et sa version la plus récente comprend 600 marqueurs. L'un des principaux avantages de cette carte est que les marqueurs qui la constituent (microsatellites) peuvent facilement être utilisés dans d'autres croisements.

La carte réalisée au RGP, sur une population de 186 individus F₂ issus d'un croisement Nipponbare × Kassalath (Harushima *et al.*, 1998), est très dense. En effet, elle regroupe 3267 marqueurs, principalement de type RFLP, ce qui permet de saturer le génome du riz. Les sondes utilisées proviennent de fragments aléatoires du génome du riz, mais aussi d'ADNc de cals et de racines de riz. Certaines de ces sondes proviennent d'autres céréales et permettent d'étudier la synténie entre leurs génomes et celui du riz.

Cartographie physique du riz

La cartographie physique d'un génome consiste à déterminer entre les marqueurs non plus une distance théorique basée sur des taux de recombinaison (cartographie génétique), mais la distance réelle, en paires de bases, qui les sépare sur le chromosome. Cette cartographie s'appuie sur la création de banques de clones comportant des grands fragments du génome considéré.

Ces banques sont ensuite criblées à l'aide des sondes créées au cours de l'étape de cartographie génétique. Il est ainsi possible de savoir, pour chaque sonde, quels clones de la banque correspondent à cette zone du génome. Inversement, des marqueurs de type PCR RFLP peuvent être réalisés à partir des séquences d'extrémité de BAC et cartographiés génétiquement.

Une autre manière, complémentaire, de réaliser une carte physique est de comparer les profils de restriction des clones de la banque génomique. Si deux profils sont ressemblants, les clones auxquels ils appartiennent se recouvrent probablement sur une même zone. Ainsi, il est possible de produire de proche en proche des « contigs », ensemble de clones se recouvrant les uns les autres*.

La carte physique la plus complète du riz a été réalisée par Chen *et al.* (2002) en utilisant deux banques BAC de la variété Nipponbare élaborées par cette équipe à l'université de Clemson et totalisant 74000 clones. Des contigs ont été réalisés, et les banques ont été criblées à l'aide des sondes de la carte génétique du riz réalisée au Rice Genome Project (Projet Génome du Riz, RGP). Ce criblage a permis de relier certains contigs entre eux, pour arriver à une carte recouvrant 91,6 % du génome.

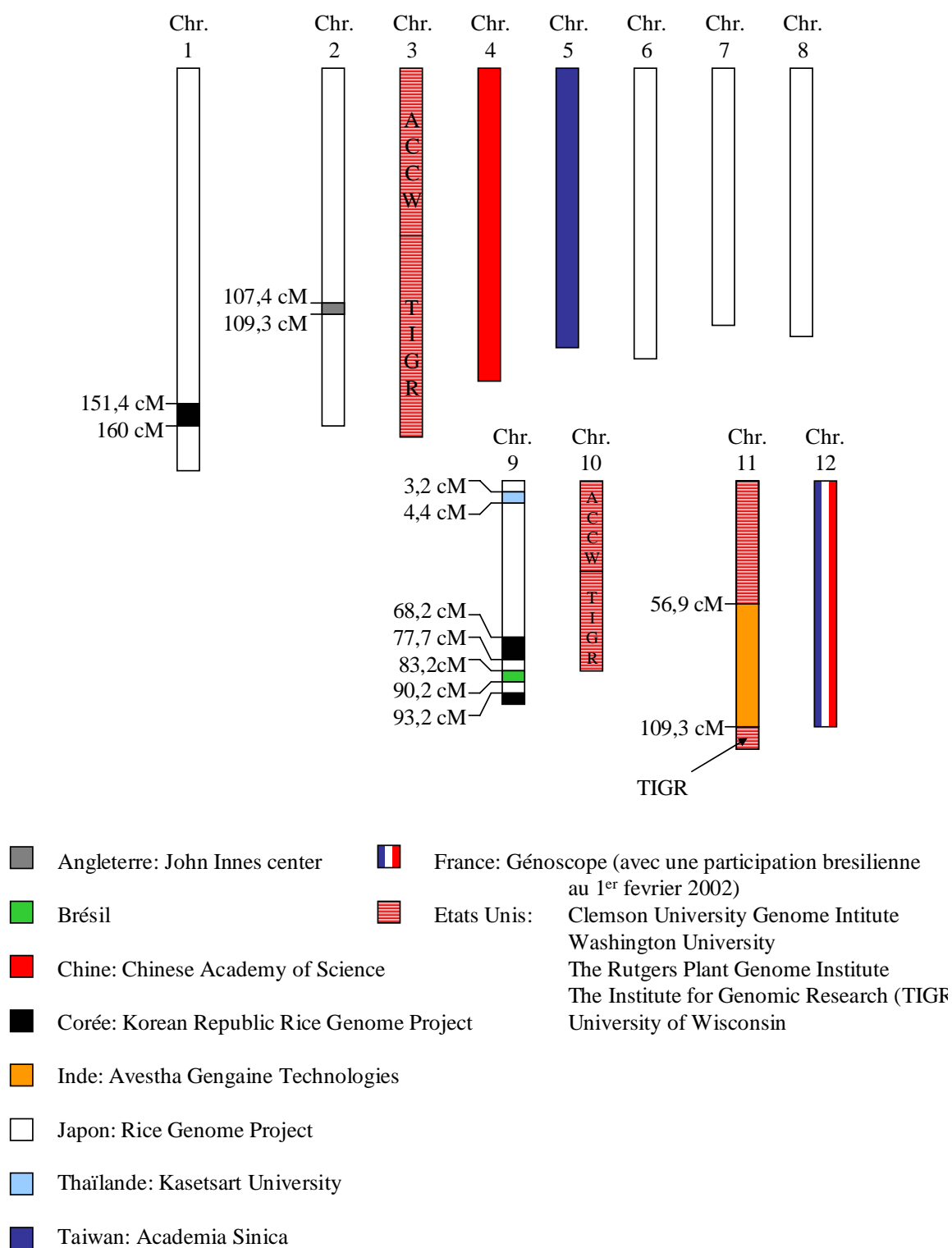
Séquençage du riz : plusieurs projets s'affrontent et se complètent

Plusieurs projets de séquençage du riz ont été mis en place. Au cours de ces projets, deux méthodes de séquençage ont été utilisées :

- (i) La méthode « BAC par BAC » qui consiste, en utilisant les données de cartographie physique, à séquencer, l'un après l'autre, différents clones BAC du riz. Le séquençage de ces BACs commence par une étape de shotgun, où des portions aléatoires des BACs sont séquencées, puis ces séquences sont alignées en contigs*. Ces contigs sont ensuite reliés entre eux par des séquençages spécifiques des zones manquantes. Une telle méthode est longue et lourde, mais elle mène à une séquence continue et de très haute qualité.
- (ii) La méthode du shotgun intégral, ou « whole shotgun » qui consiste à réaliser un très grand nombre de séquençages de portions aléatoires du génome, puis à assembler ces séquences à l'aide d'outils informatiques puissants. Cette méthode n'aboutit généralement pas, pour de relativement grands génomes comme celui du riz, à de

* Le terme de contig recouvre un même type de travail sur des données différentes. Il y a d'une part des contigs de clones, réalisés par analyse des profils de restriction, et qui servent à réaliser des cartes physiques, et d'autre part des contigs de séquences, qui permettent de relier de proche en proche les séquences obtenues par shotgun.

Figure A3 : Partage du séquençage du génome du riz au sein du consortium IRGSP



grands fragments de séquence continus. En effet, il est quasiment impossible de relier les séquences entre elles dans les zones répétées longues telles que les transposons. Le résultat d'un tel travail est un large ensemble de séquences d'une longueur allant de quelques centaines de pb à quelques dizaines de kpb.

Il y a deux projets publics de séquençage du riz. L'un, The International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) est un consortium d'organismes publics travaillant sur le séquençage du génome de la variété de riz *japonica* Nipponbare. L'ADN source utilisé pour l'ensemble des banques BAC et PAC* utilisées au cours de ce séquençage provient de semences issues d'une seule plante. Chaque membre du consortium a été chargé du séquençage d'une portion du génome du riz, selon les modalités indiquées en figure A3. Au fur et à mesure de l'avancement des travaux de ce consortium, les séquences sont publiées dans les bases de données DDBJ/EMBL/GenBank**.

Le second projet public a été le séquençage en shotgun intégral de la variété de riz *indica* 93-11. Ce projet a été financé par l'Académie Chinoise des Sciences à Pékin. Il a été initié en avril 2000, et a donné lieu à deux communications : un article dans la revue Chinese Science Bulletin (Yu *et al.*, 2001), puis un autre dans la revue Science (Yu *et al.*, 2002). Les portions de séquence obtenues sont accessibles dans la base de données du NCBI***.

Au cours de l'avancement de ces projets publics, la première annonce de séquençage du riz a été réalisée par la société Monsanto au printemps 2001 par voie de presse. Au cours du temps, il est apparu que, plus que d'une séquence génomique à proprement parler, il s'agissait d'un brouillon de séquence obtenu par « whole shotgun ». Suite à des accords, ce brouillon a été mis à la disposition du consortium international pour accélérer son travail de séquençage. En effet, Monsanto avait, comme le consortium international, choisi la variété Nipponbare pour ses travaux de séquençage.

Enfin, la société Syngenta, en collaboration avec la société Myriad Genetics a réalisé un travail de séquençage en « whole shotgun » de la variété Nipponbare (*japonica*) et a publié ses résultats dans le journal Science (Goff *et al.*, 2002), mais la séquence elle-même n'a jamais été accessible via les bases de données publiques.

* *P1 Artificial Chromosome. Insert de grande taille (comparable au BAC porté par un vecteur de type phage P1.*

** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

*** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/riceWGS.html>

ESTs et mutants d'insertion

En plus des projets liés à la génomique structurale du riz, des ESTs (Expressed Sequence Tag) ont été générés en grand nombre : 126 314 EST sont présents sur les bases de données publiques (NCBI^{*}). Ils permettent de savoir si un gène prédit à partir d'étude bio-informatique des séquences est réellement exprimé, et dans quelles conditions. Actuellement, un programme de séquençage de cDNA pleine longueur de riz est en cours au Rice Genome Project (RGP, Tsukuba, Japon), et il permettra d'avoir des séquences complètes exprimées.

Enfin, des collections de mutants d'insertion ont été réalisées, en utilisant différents éléments d'insertion (Greco *et al.*, 2001a et b, Hirochika, 2001, Izawa *et al.*, 1997, Jeon & An, 2001 ; Salaud *et al.*, 2002a). Ces mutants permettent d'étudier l'effet de l'inactivation d'un gène par l'insertion d'un fragment d'ADN. De plus, il est possible d'obtenir les séquences flanquantes de l'insertion, c'est à dire celle d'une partie du gène qu'il inactive. Ces mutants peuvent donc permettre de valider la fonction d'un gène préalablement identifié.

2) Magnaporthe grisea, agent causal de la pyriculariose du riz

a) Symptomatologie et importance de la maladie

Symptômes

M. grisea est capable d'attaquer tous les organes aériens de la plante. La forme la plus courante de la pyriculariose du riz (pyriculariose foliaire) commence par l'apparition sur les feuilles de taches blanchâtres (figure A4a). Ces lésions évoluent ensuite, pour prendre l'aspect de losanges dont le centre est grisâtre et les bords bruns (figure A4a). Dans le cas d'attaque sévères sur des individus très sensibles, cette bordure brune est moins importante, et les lésions peuvent fusionner et provoquer la mort de la feuille (figure A4a). L'agent pathogène peut parfois attaquer la gaine foliaire ce qui entraîne un brunissement de la jonction entre le limbe et la gaine (collar rot), puis la mort de la feuille. On observe généralement un pic de pyriculariose foliaire au moment du tallage suivi par son déclin (Bastiaans, 1991). La pyriculariose foliaire diminue la capacité photosynthétique des feuilles, ce qui a pour conséquences une baisse du tallage, de la hauteur des plantes, puis finalement du nombre de

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Figure A4 : Symptômes de la pyriculariose

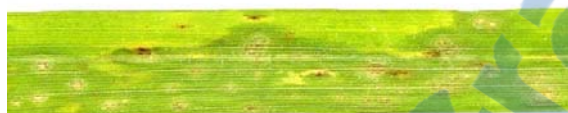
Figure A4a : Symptômes sur feuilles



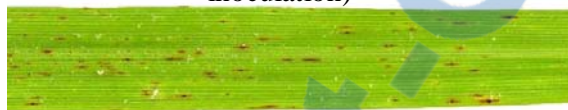
Symptômes précoces (3j après inoculation)



Symptômes typiques (8j après inoculation)



Symptômes sur plante très sensible (8j après inoculation)



Symptômes de type HR sur plante résistante (8j après inoculation)

Figure A4b : Symptômes sur panicules



Figure A4c : Forte attaque au champ



grains et de leur poids (Bastiaans, 1991, Goto, 1965, Prabhu & De Faria, 1982).

Les nœuds de la tige peuvent être attaqués par l'agent pathogène. L'infection du dernier nœud avant la panicule provoque la mort de cette dernière (pyriculariose paniculaire ou pyriculariose du cou, figure A4b). Cette forme de la maladie est la plus dommageable pour les cultures. On observe alors une panicule blanche, dont les grains sont vides. Une attaque plus tardive limite le remplissage des grains, ce qui a des conséquences sur le rendement, mais aussi sur la qualité de la récolte (Katsube & Koshimizu, 1970).

Enfin, *M. grisea* peut se développer sur les grains (pyriculariose des semences).

Importance économique

La pyriculariose du riz est présente dans toutes les zones où cette plante est cultivée (Ou, 1985). Cette maladie peut être particulièrement destructrice dans certaines conditions (figure A4c). En particulier, la culture en conditions tropicale, en situation pluviale mais aussi en situation irriguée avec de forts intrants azotés sont favorables à son développement (Teng *et al.*, 1991 ; Bastiaans, 1991). En revanche, les riz irrigués en conditions tempérées et les riz cultivés en altitude sont moins sujets à cette maladie.

Au niveau mondial, les pertes due à la pyriculariose du riz ont été chiffrées par Baker *et al.* (1997) à 157 millions de tonnes sur la période 1975-1990. En 1985, 12 % des surfaces de riz en Chine ont été atteintes par la pyriculariose foliaire, et 12 autres pour cent par la pyriculariose paniculaire (Shen & Lin, 1994). L'importance de cette maladie peut aussi être appréhendée en observant que, sur la période 1980 – 1990, entre 2 et 9 millions d'hectares ont été traités avec des fongicides en Chine (Shen & Lin, 1994).

Dans certains cas, la pyriculariose peut aboutir à une perte importante de production, à l'échelle de toute une région agricole. Un exemple référencé est celui de la région d'Uznuk en Turquie en 1995. Vingt pour cent de la récolte ont été perdus sur une surface de 25 000 hectares, certains agriculteurs n'ayant même pas pu récolter de grain (Talukder, 2002).

b) Morphologie, taxonomie

L'agent responsable de la pyriculariose est un champignon filamenteux Ascomycète appartenant au groupe des pyrénomycètes. C'est sous sa forme asexuée (*Pyricularia oryzae* Cavara) qu'il a été décrit pour la première fois en 1891.

Ce champignon présente sur milieu de culture un mycélium généralement gris, constitué de filaments cloisonnés dont les articles possèdent un seul noyau. Ce mycélium peut produire

des conidiophores portant des bouquets de conidies, les organes de multiplication asexuée du champignon. Ces conidies ovoïdes, de 25 à 30 µm de long, sont constituées de trois loges uninucléées, produites par des divisions mitotiques. Lorsque ces conidies sont libérées, elles peuvent se fixer sur des surfaces hydrophobes (dans la nature, des cuticules de feuilles) grâce à un mucilage glycoprotéique adhésif (Hamer *et al.*, 1988). En présence d'eau, les conidies germent à partir de la cellule basale ou apicale et développent un nouvel hyphes mycélien. Ce champignon différencie un organe de pénétration appelé appressorium qui est capable de transpercer, par simple pression mécanique, la cuticule de la feuille de riz ou des membranes artificielles (Howard & Ferrari, 1989 ; Bourret *et al.*, 1990).

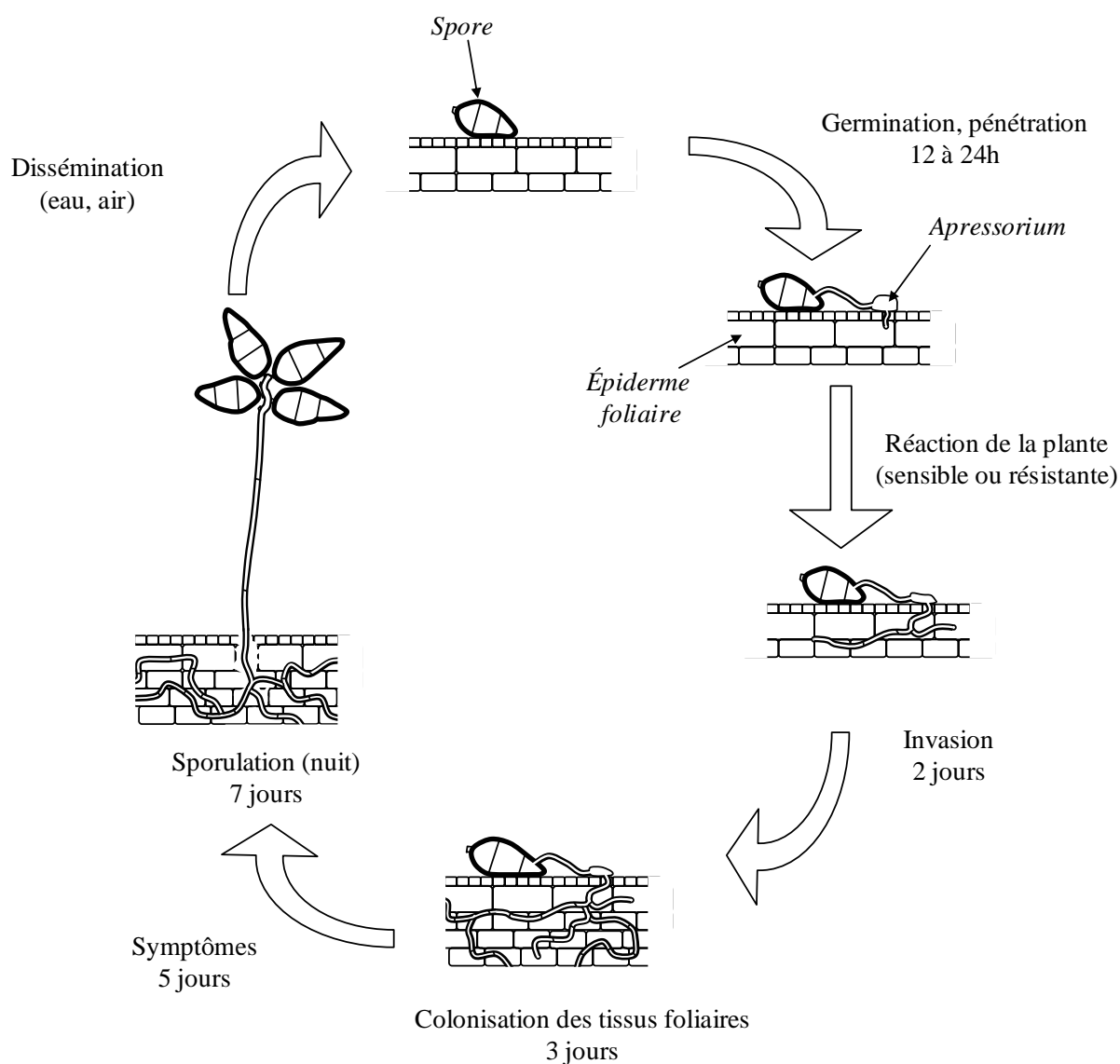
La forme sexuée (*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr) n'a jamais été observée dans la nature. Elle a été obtenue pour la première fois au laboratoire (Hebert, 1971) en croisant deux isolats de *Pyricularia grisea* pathogènes de *Digitaria sanguinalis*. Les périthèces sont caractéristiques de pyrénomycètes et contiennent de nombreux asques. Chaque asque contient huit ascospores, en forme de croissant, qui sont les produits de la méiose suivie d'une mitose. La méiose de *M. grisea* est semblable à celle des autres ascomycètes, et il est possible de dénombrer sept chromosomes (Skinner *et al.*, 1993).

Pyricularia grisea était considérée comme une espèce morphologiquement très proche de *Pyricularia oryzae*. *Pyricularia grisea* est pathogène sur un grand nombre de plantes monocotylédones. La proximité génétique, ainsi que la fertilité des croisements entre certaines souches fertiles de *Pyricularia grisea* et *Pyricularia oryzae* a montré que la séparation en deux espèces n'était pas justifiée. La tendance actuelle est à l'utilisation du nom de la forme sexuée *Magnaporthe grisea* pour désigner l'ensemble des souches précédemment nommées *Pyricularia grisea* et *Pyricularia oryzae*. *Magnaporthe grisea* est hétérothallique. Hebert (1971) et Ueyama & Tsuda (1975) ont démontré l'existence de deux signes de compatibilité sexuelle : Mat 1.1 et Mat 1.2.

c) Cycle de multiplication et épidémiologie de *Magnaporthe grisea*

L'origine de l'inoculum primaire est en général très mal connue. Il proviendrait de semences et de pailles infectées. Il provoque en début de culture des attaques localisées sur les jeunes plants. L'inoculum secondaire issu de ces premières infections est dispersé par le vent et la pluie, et initie des foyers secondaires (Kato, 1974 ; Suzuki, 1975). Ce type d'inoculum provoque des épidémies foliaires qui peuvent être relativement importantes. Au moment de la

Figure A5 : Cycle d'infection foliaire de *Magnaporthe grisea*
Ce cycle correspond à une infection foliaire d'une variété sensible à 26°C.
(D'après Ou, 1985 et Lebrun, 1991)



floraison, l'inoculum provenant des feuilles infectées attaque les tiges paniculaires, provoquant d'importantes pertes de récoltes.

La première étape d'une infection correspond à l'arrivée d'une spore sur une feuille et à son attachement à l'aide d'un mucilage adhésif (Hamer *et al.*, 1988). Après germination de la spore, formation de l'appressorium et pénétration d'un hyphes mycélien (*Réf. in Bourret et al.*, 1990 ; pour revue, Howard & Valent, 1996). Les hyphes infectieux sont inter et intracellulaires, et progressent dans le parenchyme foliaire (Ranomenjanahary, 1987 ; Heath *et al.*, 1990, *in* Lebrun, 1991). L'apparition des lésions correspond au moment où les hyphes ont envahi toutes les cellules de la zone infectée. Si les conditions hygrométriques sont favorables (HR > 90 %), ces lésions produisent des spores (figure A5). Le maximum de sporulation (2000 à 6000 spores par lésion et par jour) est atteint 7 à 10 jours après le début de l'infection (Kato, 1974), mais les lésions continuent de produire des spores pendant au moins 15 jours. Puis, les spores sont disséminées par la pluie et le vent, en majorité sur des distances de l'ordre de 3 mètres (Suzuki, 1975 ; Notteghem *et al.*, 1977 ; Ou, 1985). En conditions humides, la durée de vie des spores est courte (3 jours). Il faut donc qu'elles réinfectent le riz rapidement pour que l'épidémie progresse.

Un cycle infectieux foliaire peut être réalisé en moins de 7 jours dans les conditions les plus favorables. La rapidité de ce cycle compense la faible efficacité des spores à produire des lésions (selon Castano *et al* (1989), 1 % des spores inoculées provoque des lésions sur un cultivar sensible), ainsi que la quantité de spores relativement faible produite par lésion. Ainsi, le développement d'épidémies de pyriculariose provient surtout d'une multiplication de cycles infectieux rapides.

d) Méthodes de lutte

Les méthodes de lutte contre la pyriculariose sont très diversifiées, mais les contraintes liées au type de riziculture pratiquée excluent certaines de ces méthodes. Dans le cas de la pyriculariose, la lutte biologique reste limitée à un stade expérimental. En revanche, les luttes chimique, génétique, et par les pratiques culturales sont utilisées au champ.

La lutte chimique

La lutte chimique n'est pratiquée que dans les pays où le niveau technique et économique permet l'apport d'intrants. On la trouve là où le riz est cultivé sur de grandes parcelles (Amérique du nord et du sud, Notteghem, 1983) ou bien là où il présente une culture

à forte valeur ajoutée (Japon). De nombreuses familles de fongicides ont été utilisées (voir pour revue Ou, 1985) et de nombreuses matières actives sont encore commercialisées. Cependant, des souches résistantes sont apparues pour toutes les familles de fongicides utilisées. Parmi elles, les inhibiteurs de synthèse des mélanines (Tryciclazole, Pyroquilon), sont très efficaces, car ils rendent inopérants les appressoria, empêchant ainsi la pénétration du champignon (Bourret & Howard, 1990 ; Howard & Ferrarri, 1989 ; Woloshuk *et al.*, 1983). Récemment (Shigyo *et al.*, 2002), une souche mutante est apparue, qui résiste à une molécule de cette famille (le carpropamide). Cependant, une efficacité résiduelle a été observée, dont l'origine est inconnue. Des activateurs des défenses de la plante (Probenazole, BTH) sont également utilisés à grande échelle depuis 20 ans.

Les pratiques culturales

Les effets de diverses pratiques culturales sur la sensibilité du riz à la pyriculariose sont décrits dans la littérature. Cependant, les mécanismes qui induisent cette variation de la sensibilité demeurent très mal connus.

De nombreuses études ont montré que la sensibilité du riz à *M. grisea* augmente lors d'apports de fortes doses d'azote (Matsumaya, 1975 ; Matsumaya & Dimond, 1973 ; Mohanty & Gangopadhyay, 1982, *in* Tharreau, 1994) et de phosphore (Kozaka, 1965 ; Tokunaga *et al.*, 1965). L'influence du phosphore est particulièrement forte pour des doses d'azote élevées (Kozaka, 1965). L'apport de silice augmente la résistance à la pyriculariose (Seebold *et al.*, 2001). D'une manière générale, la sensibilité à la pyriculariose augmente lorsqu'il y a des déséquilibres entre les différents éléments minéraux du sol (Kokaza, 1965 ; Primavesi *et al.*, 1972). L'augmentation des quantités d'acides humiques dans le sol (Thangalevu & Ramabadrán, 1992 ; Tokunaga & Furuta, 1959), a également une action positive sur la résistance.

La sensibilité du riz à la pyriculariose augmente lorsque les plantes sont soumises à des déficits hydriques (Kahn & Libby, 1958). De ce fait, le contrôle de l'irrigation est un facteur déterminant dans la lutte contre la pyriculariose (réf. *in* Kosaka, 1965). Les cultivars adaptés aux conditions de culture irriguée sont de ce fait plus sensibles lorsqu'ils sont cultivés en conditions pluviales.

Il est possible de limiter l'influence de la pyriculariose en adaptant la date de semis en fonction des périodes défavorables au développement de la maladie. Ce choix visera à faire

coïncider les périodes de forte sensibilité du riz et les périodes les moins favorables à l'agent pathogène (Kahn & Libby, 1958 ; Kozaka, 1965).

Enfin, l'enfouissement ou la destruction des pailles peuvent se révéler important pour détruire l'inoculum primaire dans les zones où une conservation est possible dans les débris de récolte (Kozaka, 1965).

La lutte génétique : utilisation des gènes de résistance

Les premiers programmes d'amélioration de la résistance variétale furent initiés au Japon. Dès 1904, les sélectionneurs et phytopathologistes japonais ont utilisé des cultivars améliorés pour la résistance à *M. grisea* (Ezuka, 1979). La sélection a d'abord été basée sur le choix de lignées ayant un niveau de résistance modéré. Sans posséder une résistance totale, ces lignées réduisent les pertes. Cependant, avec l'augmentation de l'emploi de fertilisants azotés, ces résistances partielles ont été jugées insuffisantes. Les sélectionneurs se sont alors orientés vers l'obtention de cultivars pourvus d'une résistance totale. Pour ce faire, de nouveaux programmes de sélection furent mis en place, basés cette fois sur l'utilisation de gènes de résistance découverts dans des cultivars étrangers, et conférant une résistance totale vis-à-vis des isolats du Japon. Suite aux travaux fondateurs de Sasaki en 1922 et Nakatomi en 1926 (*in* Takahashi, 1965), et liés à cette nouvelle stratégie, de nombreux gènes de résistance du riz à la pyriculariose ont été recherchés dans différentes variétés, puis, plus tard, cartographiés (tableau A3).

Au début des années 60, Goto *et al.* (1961, 1964) et Yamazaki & Kiyosawa (1966) développèrent un ensemble de cultivars différentiels qui devint la base de l'étude des gènes de résistance au Japon. Ces travaux permirent de découvrir tout un ensemble de gènes de résistance dans les variétés japonaises : *Pi-a*, *Pi-i* et *Pi-k* (Kiyosawa, 1966). Par la suite, plusieurs allèles de *Pi-k* furent identifiés (*Pi-k*, *Pi-k^s*, *Pi-k^m*, *Pi-k^h* et *Pi-k^p*), et d'autres gènes furent découverts : *Pi-z*, *Pi-z^t*, *Pi-ta*, *Pi-ta²*, *Pi-b* et *Pi-t* (Kiyosawa, 1972 ; Shinoda *et al.*, 1971). A partir de ce travail, Kiyosawa développa un ensemble de cultivars différentiels, chacun ne portant qu'un ou deux gène(s) de résistance (Kiyosawa, 1984). Enfin, le gène *Pi-sh* fut découvert par Imbe & Matsumoto (1985).

Une série de travaux plus récents a été réalisée en utilisant des variétés *indica* (Bonman *et al.*, 1986 ; Mackill *et al.*, 1985 ; Yu *et al.*, 1987). Ces travaux commencèrent par l'introgression de gènes de résistance à partir de 4 variétés dans la variété CO39 dans le but de réaliser des lignées quasi-isogéniques (NILs) contenant chacune un seul gène de résistance.

Ils permirent d'isoler 5 gènes de résistance, *Pi-1*, *Pi-2* (renommé ensuite *Pi-z⁵*), *Pi-3*, *Pi-4^a* (qui se révéla être *Pi-ta*) et *Pi-4^b* (Yu *et al.*, 1991a ; Yu *et al.*, 1991b ; Mackill & Bonmann, 1992 ; Inukai *et al.*, 1994). Depuis, de nombreux autres gènes de résistance furent identifiés par différentes méthodes (tableau A3), et cartographiés génétiquement (figure A6).

L'utilisation de ces gènes de résistance pour lutter contre la pyriculariose est une idée séduisante : le caractère total de la résistance obtenue, la relative facilité avec laquelle ces facteurs monogéniques peuvent être insérés dans des variétés locales en font une solution de choix au problème posé par la pyriculariose. Cependant, l'émergence, en une à cinq années, de nouvelles races de *M. grisea* surmontant ces résistances (Kozaka, 1975 ; Toriyama, 1975 ; Kiyozawa, 1972), a toujours réduit ces efforts à néant. Ces faillites de résistance sont d'autant plus spectaculaires que les cultivars améliorés se révèlent beaucoup plus sensibles aux isolats virulents que les cultivars traditionnels. Ces nombreux échecs ont conduit les sélectionneurs et les phytopathologistes à élaborer des projets de sélection pour une résistance plus durable. Les stratégies proposées sont nombreuses : accumulation de gènes de résistance spécifiques, rotation des cultivars résistants, culture en mélange de variétés isogéniques ou de cultivars pourvus de différents gènes de résistance spécifique (pour revue, Mundt, 2002), utilisation de la résistance partielle. Le nombre d'exemples d'applications à grande échelle est réduit, mais l'on peut citer celui de l'expérimentation en grandeur nature de culture en mélange de deux variétés de riz dans la province du Yunnan, en Chine (Zhu *et al.*, 2000).

e) Un agent pathogène fongique modèle

Le riz étant à la fois une plante modèle et une plante de grande culture, et *Magnaporthe grisea* étant son principal agent pathogène fongique, cet organisme est devenu un modèle des champignons phytopathogènes (Valent *et al.*, 1990 ; Birren *et al.*, 2002). De plus, *M. grisea* se cultive facilement au laboratoire et peut être inoculé sur le riz en conditions contrôlées (annexe 1). Il a été possible de réaliser des croisements entre des souches de *M. grisea* pathogènes du riz (Kato & Yamaguchi, 1982 ; Leung *et al.*, 1988 ; Silué & Notteghem, 1991 ; Notteghem & Silué, 1992). Enfin, le génome de *M. grisea*, avec 40 Mpb (Skinner *et al.*, 1993), est relativement petit pour un génome eucaryote.

Un travail de cartographie physique est en cours de réalisation au Fungal Genomics Laboratory (FGL, laboratoire de génomique fongique) à partir d'une banque BAC de *M. grisea* (souche pathogène du riz 70-15) d'une profondeur de 25 fois le génome. Ce travail,

Tableau A3 : Les gènes majeurs de résistance à la pyriculariose, localisation sur les chromosomes du riz

Adapté et révisé de Talukder, 2002

Gène de Résistance	Chromosome	Position	Références
<i>Pi-t</i>	1	vers G359, 0cM de R1613, 2cM de C470, vers A59	Kaji et al., 1997a, 1997b ; Kiyosawa, 1972.
<i>Pi-sh</i>	1	lié à <i>Pi-t</i>	Imbe & Matsumoto, 1985.
<i>Pi24</i> (t)	1	vers K5 et RG532	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>non nommé</i>	1	entre RM151 et RM259	Pan et al., sous presse
<i>Pi25</i> (t)	2	vers RG520	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi-b</i> (<i>Pi-s</i>)	2	0 cM de R1792, R2511 et R2821, encadré par C2782B et C379	Kiyosawa, 1972 ; cloné par Wang et al., 1999 : NBS-LRR.
<i>Pi14</i> (t)	2	34% de recombinaison avec amp1	Pan <i>et al.</i> , 1996b, Pan <i>et al.</i> , 1998a
<i>Pi16</i> (t)	2	38% de recombinaison avec amp1	Pan et al., 1999
<i>Pi-tq5</i>	2	entre RG520 et RG446b	Tabien <i>et al.</i> , 2000.
<i>Pi-?(t)</i>	4	vers UMC68b	<i>in</i> Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi-kur-1</i>	4	?	Goto, 1988.
<i>Pi-</i> (t)	4	vers CDO593X	Causse et al., 1994 ; Hsieh, 1976.
<i>pi21</i>	4	à 5 cM de G271 et 8,3 cM de G317	Fukuoka & Okono, 2001. Gène récessif
<i>Pi26</i> (t)	5	vers RG520	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi10</i> (t)	5	3,9 cM de RRH18 et 2,8 de RRF6, RG13	Causse et al., 1994 ; D37, 1996b ; Naqvi et al., 1995.
<i>Pi23</i> (t)	5	19,4 cM de RM164 et 23,9 cM de RM249	Ahn <i>et al.</i> , 1997.
<i>Pi-i</i>	6	29% de recombinaison avec <i>Pi-zt</i>	Shinoda et al., 1971 ; Kiyosawa, 1972 ; Ise, 1991 ; Pan et al., 1996a, Kinoshita & Kiyosawa, 1997.
<i>Pi-z</i> (<i>Pi-z</i> , <i>Pi-z</i> ¹), <i>Pi-z</i> ⁵ (<i>Pi-2</i> (t))	6	2,9 cM de XNpb294 et 8,8 cM de XNpb 233, 2,1 cM de RG64 et 7,2 cM de RZ612, 5 cM de RG456.	Causse et al., 1994 ; Fukushi et al., 1992 ; Goto et al., 1981 ; Hittalami et al., 1995 ; Inukai et al., 1994, 1996b ; Kiyosawa, 1972 ; Mackill & Bonmann, 1992 ; Mew et al., 1994 ; Shinode et al., 1971 ; Yu et al., 1991a.
<i>Pi3</i> (<i>Pi5</i>)	6	7% de recombinaisons avec <i>Pi-i</i>	Mackill & Bonman, 1992 ; Inukai et al., 1994, 1996a. Serait un NBS-LRR (Jeon et al., sous presse
<i>Pi8</i> (t)	6	38% de recombinaison avec Amp-3 et 27% de recombinaison avec gi-2	Pan <i>et al.</i> , 1996a.
<i>Pi9</i> (t)	6	Près de RRA-19	Brar & Kush, 1997 ; Causse et al., 1994.
<i>Pi13</i> (t)	6	29% de recombinaison avec Amp3	Pan et al., 1996b ; Pan et al., 1998a.
<i>Pi27</i> (t)	6	Vers Est-2	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi13</i>	6	Coségrège avec C58, R538 et R1960	Hayasaka <i>et al.</i> , 1995.

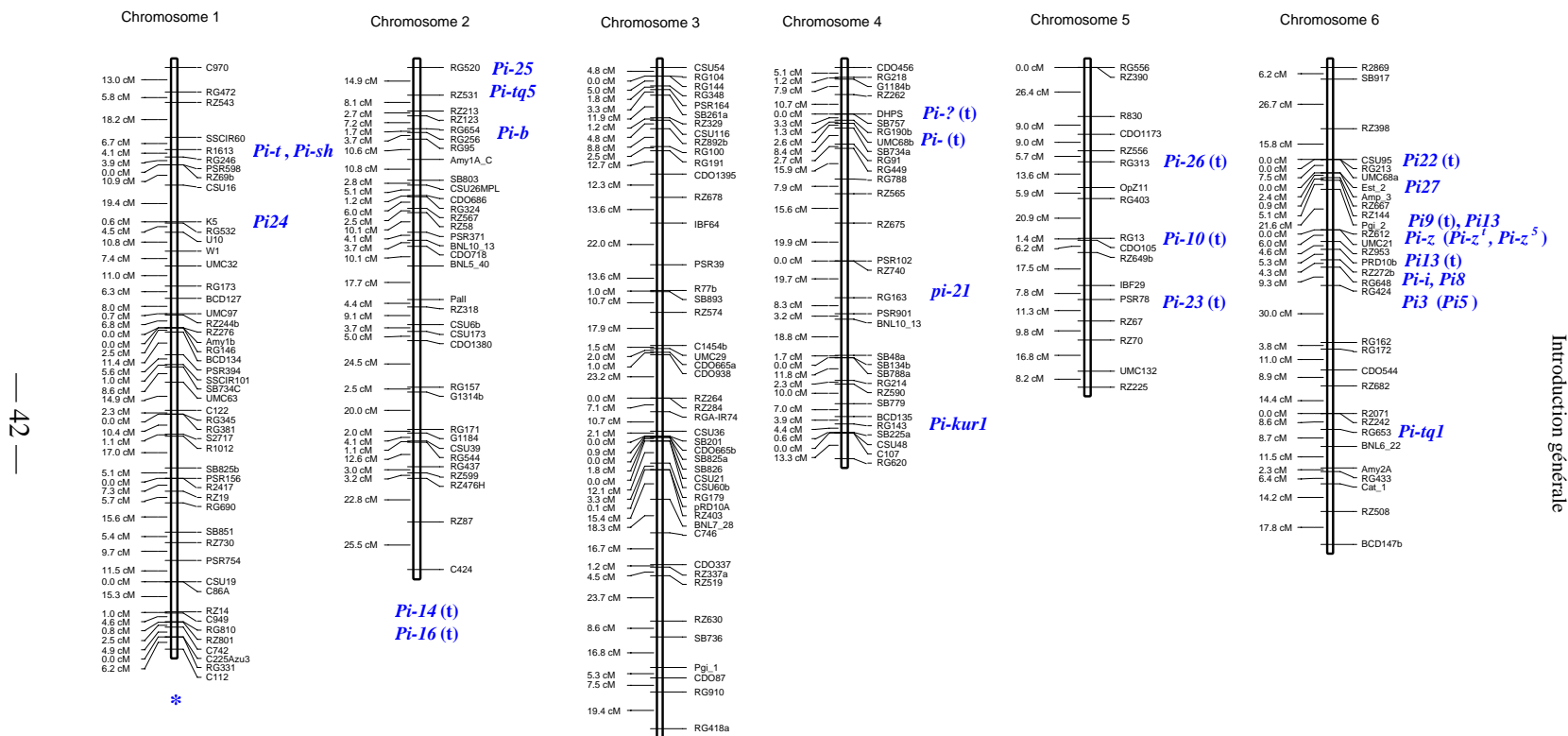
Tableau A3 (suite)

Gène de Résistance	Chromosome	Position	Références
<i>Pi22</i> (t)	6	Vers RG213	Ahn <i>et al.</i> , 1997.
<i>Pi-tq1</i>	6	entre C236 et RZ508	Tabien <i>et al.</i> , 2000.
<i>Pi17</i> (t)	7	lié à Est9	Pan <i>et al.</i> , 1996d.
<i>Pi29</i> (t)	8	vers RZ617	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi33</i>	8	non allélique de <i>Pi11</i> et <i>Pi29</i> (t). Entre R1813 et C483, à 0,4cM de 57H10r et 0,6 cM de i 06L16r	Résultats des travaux de cartographie réalisés au cours de cette thèse: Berruyer <i>et al.</i> , sous presse (annexe 15).
<i>Pi11</i> (t) (<i>Pi-zh</i>)	8	Près de RZ323 et RZ617, à 14cM de Bp127	Causse <i>et al.</i> , 1994 ; Zhu <i>et al.</i> , 1993.
<i>non nommé</i>	8	lié à RM 25	Sharma <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi-28</i>	8	13 cM de RM25	Pan <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi15</i>	9	lié à RM316 et G103. Encadré par BAPi15782 (à 0,39cM) et BAPi15844 (à 0,78 cM)	Pan <i>et al.</i> , 1996c, Pan <i>et al.</i> , 1998b.
<i>Pi28</i> (t)	10	vers RZ500	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi30</i> (t)	11	vers OpZ11-f	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi-a</i>	11		Shinoda <i>et al.</i> , 1971 ; Kiyosawa, 1972 ; Goto, 1981.
<i>Pi-f</i>	11	15% de recombinaison avec Pi-k	Yunoki <i>et al.</i> , 1970a ; Yunoki <i>et al.</i> , 1970b ; Shinoda <i>et al.</i> , 1971.
<i>Pi-is-1</i> (<i>Rb-4</i>)	11	23% de recombinaison avec le marqueur la	Goto, 1970.
<i>Pi-k</i> (<i>Pi-k^m</i> , <i>Pi-k^s</i> , <i>Pi-k^h</i> , <i>Pi-k^p</i>)	11	17,8 cM de G181, 1,6 cM de R1506, 2,4 cM de G181, 0,5 cM de R543, 1,6 cM de Y6854L, 1,5 cM de L190 et 4,3 cM de R1506	Goto <i>et al.</i> , 1981 ; Hayasaka <i>et al.</i> , 1996 ; Imbe <i>et al.</i> , 1997 ; Kaji & Ogawa, 1996a ; Kaji & Ogawa, 1996b ; Kiyosawa, 1972 ; Kiyosawa, 1978 ; Pan <i>et al.</i> , 1996a ; Shinoda <i>et al.</i> , 1971.
<i>Pi-kur-2</i>	11	14% de recombinaison avec le marqueur la	Goto, 1988.
<i>Pi-se-1</i> (<i>Rb-1</i>)	11	9,5% de recombinaison avec le marqueur la	Goto, 1970 ; Goto & Baluch, 1983 ; Goto & Baluch, 1984.
<i>Pi1</i>	11	4,7% de recombinaison avec Pi-k, 3,5 cM de Np181 et 7,9 cM de RZ536, près de RZ353X et RZ424, 14 cM de RZ536	Causse <i>et al.</i> , 1994 ; Inukai <i>et al.</i> , 1994 ; Inukai <i>et al.</i> , 1996a ; Inukai <i>et al.</i> , 1996b ; Mackill & Bonmann, 1992 ; Mew <i>et al.</i> , 1994 ; Yu <i>et al.</i> , 1996.
<i>Pi7</i> (t)	11	Près de CDO 365, encadré par RG103A et RG16	Causse <i>et al.</i> , 1994 ; Inukai <i>et al.</i> , 1996a ; Inukai <i>et al.</i> , 1996b ; Wang <i>et al.</i> , 1994.
<i>Pi18</i> (t)	11	5,4 cM de RZ536	Ahn <i>et al.</i> , 1996.
<i>Pi44</i> (t)	11	3,3 cM de AF348 et 11cM de AF349	Chen <i>et al.</i> , 1999.
<i>PBR</i>	11	10,8 cM de CDO226	Fujii <i>et al.</i> , 1995.
<i>Pbst</i>	11	13,8 cM de Stcvb-i, 9,4 cM de CDO226 et ST 723	Fujii <i>et al.</i> , 1997a ; Fujii <i>et al.</i> , 1997b ; Fujii <i>et al.</i> , 1998.
<i>Mpiz</i> (<i>Rb6</i>)	11	11% de recombinaison avec le marqueur la	Goto, 1976.
<i>Pi-lm2</i>	11	Vers RZ536	Tabien <i>et al.</i> , 2000.

Tableau A3 (suite et fin)

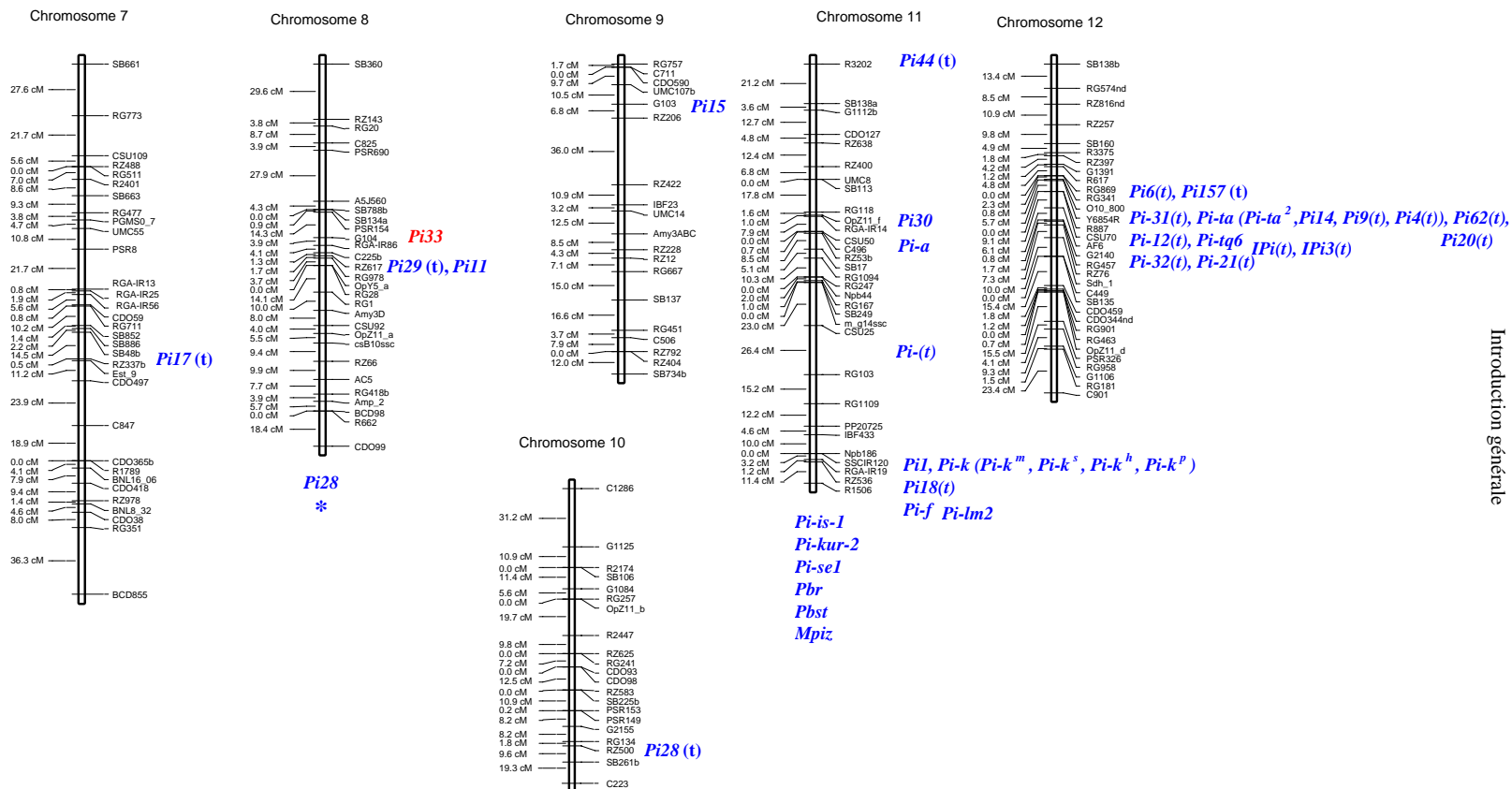
Gène de Résistance	Chromosome	Position	Références
<i>Pi-ta</i> (<i>Pi-ta</i> , <i>Pi-ta</i> ² , <i>Pi-4</i> (t), <i>Pi14</i> , <i>Pi19</i> (t))	12	11% de recombinaison avec spl-1. Coségrège avec Xnpb289, Xnpb319, Xnpb239, Xnpb196. 3,3cM de RZ397, 5,2 cM de RG241, 15,4cM de RG 869, 0,3cM de ta ² -1, 0,7cM de Xnpb088, 0,3cM de RUBss, 0,7cM de Xnpb316.	Causse et al., 1994 ; Inukai et al., 1993 ; Inukai et al., 1996b ; Ise, 1993 ; Kawasaki et al., 1996 ; Kiyosawa, 1972 ; Mackill & Bonmann, 1992 ; Mew et al., 1994 ; Nakamura et al., 1996 ; Nakamura et al., 1997 ; Rybka et al., 1994 ; Rybka et al., 1997 ; Shinoda et al., 1971 ; Yu et al., 1991a ; Yu et al., 1996. <i>Pi-ta</i> cloné par Bryan et al., 2000. Structure NBS-LRR. <i>Pi-ta2</i> en voie de clonage (Chuntai et al., sous presse)
<i>Pi31</i> (t)	12	Vers O10-800	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi6</i> (t)	12	Vers RG81	Causse et al., 1994 ; Mc Couch et al., 1994.
<i>Pi12</i> (t)	12	5,1 cM de RG869	Zheng <i>et al.</i> , 1996
<i>Pi20</i> (t)	12	1cM de Xnpb 88, 14 cM de Xnpb402	Imbe <i>et al.</i> , 1997
<i>Pi21</i> (t)	12	8,1 cM de RG241	Ahn <i>et al.</i> , 1997.
<i>Pi32</i> (t)	12	Vers AF6	Sallaud <i>et al.</i> , sous presse
<i>Pi62</i> (t)	12	Coségrège avec SP7C3 et SP8C6 entre RG9 et RZ816	Wu <i>et al.</i> , 1996
<i>Pi157</i> (t)	12	3 cM de RG341, 6,5cM de RG9	Naqvi & Chattoo, 1996b.
<i>IPi</i> (t)	12	Vers RZ670	Causse <i>et al.</i> , 1994.
<i>IPi3</i> (t)	12	Vers RZ670	Causse <i>et al.</i> , 1994.
<i>Pi-tq6</i>	12	Entre RG 869 et L102	Tabien <i>et al.</i> , 2000.

Figure A6: Carte génétique montrant la position des gènes de résistance à la pyriculariose



Lorsqu'il n'a pas été possible de placer un gène sur cette carte, son nom a été noté sous le chromosome où il se trouve. *indique un gène de résistance qui n'a pas encore été nommé. Le fond de carte provient de Sallaud *et al.* (sous presse).

Figure A6 (suite)



Introduction générale

financé par Novartis, est complété par le séquençage des extrémités des BAC de cette banque, et est disponible dans le site du FGL*. De plus, un premier travail de séquençage financé par la NSF (National Science Foundation) a déjà été réalisé avec des financements publics en collaboration par FGL, la North Carolina State University (NCSU, Université d'état de la Caroline du Nord) et le Whitehead Institute. Il s'agit d'un séquençage de type shotgun, avec une profondeur moyenne de sept fois le génome*.

Par ailleurs, de nombreux travaux de génomique fonctionnelle sont actuellement en cours. On peut citer le développement d'un grand nombre d'EST (12000), dont 2300 EST provenant du développement de l'agent pathogène dans la plante (Lee, 2002). Un grand nombre de collections de mutants d'insertion (avec des FST) sont également disponibles ou en cours d'obtention, qui permettront de réaliser des travaux de génomique inverse. On peut citer les 2000 mutants d'insertion GFP obtenus par Sun *et al.* (2002).

II) Interaction gène de résistance – gène d'avirulence

1) La théorie gène – pour – gène et la réaction hypersensible

a) Les gènes « majeurs » de résistance

En 1898, Farrer découvre qu'une résistance du blé à la rouille se transmet de génération en génération. Biffen (1905) montra ensuite que cette résistance suivait les lois mendéliennes à la façon d'un gène unique récessif. Dans de nombreux génotype végétaux, des résistances à des maladies dues à un ou quelques gènes, parfois récessifs, le plus souvent dominants, ont été trouvées. De telles résistances sont dites monogéniques (ou oligogéniques). Elles sont aussi dites « majeures », voire « totales », car dans certaines conditions elles aboutissent à l'absence totale de la maladie sur les plantes qui les portent. On observe alors soit une absence totale de symptôme, soit une petite tache brune au niveau du point d'inoculation, à partir de laquelle aucun développement ni aucune multiplication de l'agent pathogène n'est visible.

* <http://www.fungalgenomics.ncsu.edu>

* *Magnaporthe Sequencing Project*. Ralph Dean, Fungal Genomics Laboratory at North Carolina State University (<http://www.fungalgenomics.ncsu.edu>), and Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe/>)

Le plus souvent, les plantes portant un gène de résistance majeur à un organisme pathogène sont résistantes à certains génotypes de cet agent pathogène, tout en étant sensibles à d'autres. Pour cette raison, ces résistances sont aussi nommées « résistances spécifiques ». Dans de nombreux cas, l'expérience a montré qu'une simple mutation de l'agent pathogène peut aboutir à un nouveau génotype contre lequel la plante n'est plus résistante.

Van Der Plank (1968) a introduit le terme de « résistance verticale » pour les décrire, par opposition à « résistance horizontale » qui décrit des résistances partielles et non spécifiques que les plantes peuvent aussi manifester face aux organismes pathogènes.

b) La théorie gène – pour – gène

L'existence de résistances spécifiques et monogéniques a été décrite en 1942 par Flor, dans le cas de l'interaction entre le lin et le champignon *Melampsora lini*. De plus, à partir de l'étude génétique de ces résistances, il met au point la théorie dite gène – pour – gène (Flor, 1956), qui sera ensuite étendue à de nombreuses autres interactions plante – agent pathogène (Flor, 1971 ; Day, 1974 ; Thompson & Burdon, 1992 ; Keen, 1990 ; De witt, 1992) dont l'interaction riz – *Magnaporthe grisea* (Silué *et al.*, 1992a et b). Selon cette théorie, les résistances majeures sont dues à des gènes spécifiques, dits gènes de résistance (gènes *R*)

Tableau A4 : La relation gène – pour – gène

		Plante		
		<i>RR</i>	<i>Rs</i>	<i>ss</i>
Pathogène (diploïde)	<i>Avr-Avr</i>	-	-	+
	<i>Avr vir</i>	-	-	+
	<i>vir vir</i>	+	+	+
Pathogène (haploïde)	<i>Avr</i>	-	-	+
	<i>vir</i>	+	+	+

- : Interaction incompatible :

l'agent pathogène est bloqué dans les premiers stades de son développement

+ : Interaction compatible :

l'agent pathogène se développe et provoque les symptômes de la maladie

auxquels correspondent des gènes d'avirulence chez l'agent pathogène. Chaque gène de résistance a un ou plusieurs allèle(s) dominant(s) (*R*), qui induit la résistance, et un ou plusieurs allèle(s) récessif(s) (*s*). De même, Le gène d'avirulence a un allèle dominant (*Avr*) et un ou plusieurs allèles récessif(s) (*vir*). Lorsqu'un organisme pathogène *Avr* infecte une plante *R*, la réaction est dite incompatible, et l'organisme pathogène ne se développe pas. Dans tous les autres cas, il se développe, et les symptômes de la maladie sont observés (tableau A4). Par un abus de langage, les allèles de ces gènes provoquant la réaction incompatible sont souvent appelés « gène de résistance » et « gène d'avirulence ».

La plupart des pathosystèmes pour lesquels une relation gène – pour – gène a été démontrée correspondent à des plantes modèles ou cultivées. Il existe de nombreux cas où la théorie gène – pour – gène n'a pas été démontrée (en particulier dans les cas d'agents pathogènes fongiques asexués). L'utilisation de la théorie gène – pour – gène pour ces pathosystèmes est une extrapolation des résultats obtenus avec des organismes pathogènes sexués proches. Dans le cas de l'interaction riz – *Magnaporthe grisea*, la première preuve d'une interaction gène – pour – gène a été apportée par Silué *et al.* (1992a).

Il existe de nombreuses exceptions au modèle gène – pour – gène (Dioh, 1998). On observe parfois des gènes d'avirulence reconnus par deux gènes de résistance, ou bien des gènes de résistance reconnaissant deux gènes d'avirulence. Par ailleurs, bien que les études génétiques réalisées aient fréquemment montré le caractère dominant du gène de résistance, on observe parfois des gènes de résistance récessifs, en particulier dans des populations naturelles (Christ *et al.*, 1987, *in* Dioh, 1998). Cette observation a amené Barrett (1985) à faire l'hypothèse selon laquelle la présence prépondérante de gènes dominants parmi les gènes de résistance connus serait due à un biais, ces gènes dominants étant plus facilement repérés et utilisés pour la sélection de cultivars résistants. Cependant, étant donné que la très grande majorité des gènes de résistance caractérisés sont dominants, l'hypothèse la plus couramment admise reste celle selon laquelle la sensibilité correspondrait à une perte de la fonction codée par le gène de résistance, et serait donc récessive.

c) La réaction hypersensible

Dans la théorie gène – pour – gène, l'interaction entre une plante portant un gène de résistance et un agent pathogène portant le gène d'avirulence correspondant aboutit à une résistance totale de la plante. Des études récentes, réalisées sur des cultures de cellules

végétales, et utilisant des facteurs d'avirulence déjà connu, ont mis à jour un ensemble de réactions précoces assez semblables dans des pathosystèmes très différents, certains impliquant une résistance variétale, d'autres une résistance non – hôte. Ainsi, l'élicitation de cellules de persil par le peptide PEP-3 (un éliciteur non spécifique de *Phytophthora megasperma*), l'élicitation de cellules d'*A. thaliana* par une protéine dérivée d'une flagelline bactérienne, l'élicitation de cellules de tabac portant le gène de résistance *Cf-9* de la tomate par la protéine Avr9 ont révélé des processus similaires (Jabs *et al.*, 1997 ; Piedras *et al.*, 1998 ; Felix *et al.*, 1999), correspondant à ce que l'on appelle la réaction hypersensible.

Nous n'entrerons pas ici dans les détails de la description moléculaire de la réaction hypersensible (pour une revue, Hammond-Kosack & Jones, 1996). Cependant, parmi les événements précoces de cette réaction, un influx de calcium (pour revue, Grant & Mansfield, 1999), l'alcalinisation de l'espace intercellulaire, l'activation de protéine-kinases (pour revues, Martin, 1999 ; Grant & Mansfield, 1999), la production d'espèces actives de l'oxygène et d'oxyde nitrique (pour revue, Bolwell, 1999), et une reprogrammation transcriptionnelle (Dangl & Jones, 2001), peuvent être mises en évidence.

Plus tard (15 minutes après l'infection), l'oxyde nitrique, les kinases et les formes activées de l'oxygène concourent à l'activation d'une batterie de gènes nommés « gènes de défense » dans et autour de la cellule infectée. Les fonctions de ces gènes de défense sont multiples. On peut noter parmi elles, la production d'acide salicylique, d'éthylène, l'épaississement de la paroi cellulaire, la lignification, la production de divers composés antimicrobiens, et enfin, une mort cellulaire rapide, qui est la réaction hypersensible au sens strict (pour revue : Lam *et al.*, 2001).

2) Les gènes de résistance : structures et organisation génomique

a) Structures moléculaires des gènes de résistance

☼ *Les classes de gènes de résistance*

Les protéines codées par la majorité des gènes de résistance caractérisés à ce jour (tableau A5) possèdent des motifs que l'on trouve chez des protéines réceptrices et/ou transductrices de signal. La majorité de ces protéines de résistance contiennent des répétitions riches en leucines (Leucine Rich Repeats, LRRs) à leur extrémité C – terminale, et un site de

liaison à un nucléotide (Nucleotide Binding Site, NBS). Ces gènes sont nombreux dans les génomes végétaux. Le séquençage d'*Arabidopsis thaliana* a montré que les homologues à des gènes de résistance (au nombre de 150) représentent 0,6 % des gènes prédits (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). De plus, aucune autre fonction que la résistance n'a été associée à ces gènes chez les plantes (en dehors de la sensibilité au Fenthion due à *Prf* qui n'est pas une fonction biologique pour la plante).

Les gènes de résistance dont la structure est de type NBS-LRR peuvent se subdiviser en deux sous-classes en fonction d'autres domaines prédits par leurs séquences. Les protéines de la première sous-classe (1a dans le tableau A5) comprennent un domaine TIR à leur extrémité N – terminale. Le nom de ce domaine provient de son homologie avec les récepteurs *toll* de *Drosophila melanogaster* et *Interleukin-1* des mammifères. Les protéines NBS-LRR ne comprenant pas de domaine TIR (classe 1b) possèdent le plus souvent un domaine de dimérisation de type « coiled – coil » (CC) qui prend parfois l'aspect d'un « leucine zipper » (LZ). Une telle structure est fréquente chez les protéines de résistance des céréales. De façon générale, aucun gène de résistance, qu'il soit caractérisé ou putatif, ayant une structure de type TIR-NBS-LRR, n'a été décrit chez les monocotylédones (Meyers *et al.*, 1999 ; Pan *et al.*, 2000 ; Young, 2000, Yu *et al.*, 2002 ; Goff *et al.*, 2002).

Trois autres classes de gènes de résistance, bien moins importantes en nombre, peuvent être regroupées. Ces gènes codent pour des protéines comportant des LRR suivies d'un domaine transmembranaire (*Cf2*, *Cf4*, *Cf5*, *Cf9*), ou bien suivies d'un domaine transmembranaire puis d'une kinase (*Xa21*), ou bien codent uniquement pour une kinase (*Pto*, *PBS1*). Bien que les protéines *Cf* n'aient pas de domaines kinase, tandis que *Pto* et *PBS1* ne possèdent pas de domaine LRR, les réunir semble pertinent si l'on prend en compte le fait que la protéine NBS-LRR *Prf* est nécessaire à l'expression de la résistance due à la kinase *Pto*, tandis que la kinase *PBS1* est nécessaire à l'apparition de la résistance due à la protéine NBS-LRR *RPS5* (Salmeron *et al.*, 1996 ; Swiderski & Innes, 2001). Enfin, il est à noter que certains auteurs (comme Dangl & Jones, 2001) contestent le qualificatif de « gène de résistance » à *Pto* et *PBS1* (cf. *infra* § (ii) dans le § III.3.c. du présent chapitre, p. 59).

Enfin, 4 autres gènes de résistance dont les structures sont originales peuvent être cités : *HSl^{pro-1}* présente un domaine transmembranaire et un motif n'ayant qu'une légère homologie avec des LRR (Cai *et al.*, 1997) ; *Rpw8* ne présente pas d'homologie avec des gènes dont le rôle est connu (Xiao *et al.*, 2001) ; *Hml* présente la structure d'une enzyme de détoxification

Tableau A5: Les gènes de résistance clonés et caractérisés à ce jour. (Adapté et complété de Hulbert *et al.*, 2001)

Classe	Gène	Interaction (Hôte / pathogène)	Locus complexe (1)	Introgressé depuis une espèce sauvage	Références	Gène d'avirulence	Références
1a TIR-NBS-LRR	<i>L</i>	Lin / <i>Melampsora lini</i>	Non	Non	Lawrence <i>et al.</i> , 1995	126 Kda	Pfizner & Pfizner, 1992
	<i>M</i>	Lin / <i>Melampsora lini</i>	Oui	Non	Anderson <i>et al.</i> , 1997		
	<i>N</i>	Tabac / TMV	Oui	Oui	Whitman <i>et al.</i> , 1996		
	<i>P</i>	Lin / <i>Melampsora lini</i>	Oui	Non	Dodds <i>et al.</i> , 2000		
	<i>RPP1</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Peronospora</i>	Oui	-	Botella <i>et al.</i> , 1998		
	<i>RPP5</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Peronospora</i>	Oui	-	Parker <i>et al.</i> , 1997		
	<i>RPS4</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i>	Non	-	Gassman <i>et al.</i> , 1999		
1b NBS-LRR	<i>Bs2</i>	Piment / <i>Xanthomonas</i>	Oui	Oui	Tai <i>et al.</i> , 1999	<i>AvrBs2</i>	Swords <i>et al.</i> , 1996
	<i>Dm3</i>	laitue / <i>Bremia</i>	Oui	Non	Meyers <i>et al.</i> , 1998	Prot. Capside	Bandahmane <i>et al.</i> , 1995
	<i>Gpa2 / Rx1</i>	Pomme de terre / <i>Globodera</i>	Oui	Oui	Van der Vossen <i>et al.</i> , 2000		
		Pomme de terre / PVX (<i>Rx1</i>)			Bendahmane <i>et al.</i> , 1999		
	<i>I2</i>	Tomate / <i>Fusarium</i>	Oui	Oui	Ori <i>et al.</i> , 1997 ; Simons <i>et al.</i> , 1998		
	<i>Mi</i>	Tomate / <i>Meloidogyne</i> / <i>Macrosiphum</i>	Oui	Oui	Milligan <i>et al.</i> , 1998		
			Oui	Oui	Rossi <i>et al.</i> , 1998 ; Wang <i>et al.</i> , 1998		
	<i>Mla</i>	Orge / <i>Blumeria</i>	Oui	Non	Zhou <i>et al.</i> , 2000	<i>AvrPita</i>	Jia <i>et al.</i> , 2000 ; Orbach <i>et al.</i> , 2000
	<i>Pib</i>	Riz / <i>Magnaporthe</i>	Oui	Non	Wang <i>et al.</i> , 1999		
	<i>Pita</i>	Riz / <i>Magnaporthe</i>	Non	Non	Bryan <i>et al.</i> , 2000		
	<i>Pta^f(2)</i>	Tomate / <i>Pseudomonas</i>	Oui	Oui	Salmeron <i>et al.</i> , 1996	<i>Cf. Pto</i>	
	<i>Rp1</i>	Mais / <i>Puccinia</i>	Oui	Non	Collins <i>et al.</i> , 1998	<i>AvrRpm1</i> <i>AvrB</i>	Guttman & Greenberg, 2001 Staskawicz <i>et al.</i> , 1987
	<i>RPM1</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i>	Non	-	Grant <i>et al.</i> , 1998		
	<i>RPP8</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Peronospora</i>	Oui	-	Mc Dowell <i>et al.</i> , 1998	Capside TCV	Cooley <i>et al.</i> , 2000
	<i>HRT</i>	<i>Arabidopsis</i> / TCV	Oui	-	Cooley <i>et al.</i> , 2000		
	<i>RPP13</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Peronospora</i>	Non	-	Bittner-eddy <i>et al.</i> , 2000		
	<i>RPS2</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i>	Non	-	Allard, 1975 ; Bent <i>et al.</i> , 1994	<i>AvrRpt2</i>	Guttman & Greenberg, 2001
<i>RPS5</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i>	Non	-	Warren <i>et al.</i> , 1998	<i>AvrPphb</i>	Puri <i>et al.</i> , 1997	
<i>Rx2</i>	<i>Solanum tuberosum</i> / PVX	Oui	Oui	Bendahmane <i>et al.</i> , 1999			
<i>Sw-5</i>	Tomate / Topsovirus	Oui	Oui	Brommonshenkel <i>et al.</i> , 2000			
<i>Xa1</i>	Riz / <i>Xanthomonas</i>	Non	Non	Yoshimura <i>et al.</i> , 1998			

Tableau A5 (suite et fin)

Classe	Gène	Interaction (Hôte / pathogène)	Locus complexe (1)	Introgessé depuis une espèce sauvage	Références	Gène d'avirulence	Références
2 LRR-TM	<i>Cf-2</i>	Tomate / <i>Cladosporium fulvum</i>	Oui	Oui	Dixon <i>et al.</i> , 1996		
	<i>Cf-5</i>	Tomate / <i>Cladosporium fulvum</i>	Oui	Non	Dixon <i>et al.</i> , 1998		
	<i>Cf-4</i>	Tomate / <i>Cladosporium fulvum</i>	Oui	Oui	Thomas <i>et al.</i> , 1997	<i>Avr4</i>	Joosten <i>et al.</i> , 1994
	<i>Cf-9</i>	Tomate / <i>Cladosporium fulvum</i>	Oui	Oui	Jones <i>et al.</i> , 1994	<i>Avr9</i>	van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1992
	<i>9DC</i>	<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i> / <i>Cladosporium fulvum</i>	Oui	-	Van der Hoorn <i>et al.</i> , 2001	<i>Avr9</i>	van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1992
	<i>Hcr9.4E</i>	Tomate / <i>Cladosporium</i>	Oui	Oui	Takken <i>et al.</i> , 1999.		
3 Proteine kinase	<i>Pto</i>	Tomate / <i>Pseudomonas</i>	Oui	Oui	Martin <i>et al.</i> , 1993	<i>AvrPto</i>	Ronald <i>et al.</i> , 1992
	<i>Pbs1</i> ²	<i>Arabidopsis</i> / <i>Pseudomonas</i>	?	-	Swiderski & Innes, 2001	Cf. <i>RPP5</i>	
4: LRR-TM-Kinase	<i>Xa21</i>	Riz / <i>Xanthomonas</i>	Oui	Oui	Song <i>et al.</i> , 1995		
5: Unique ⁽³⁾	<i>HS1^{pro-1}</i>	Betterave / <i>Heterodera</i>	Non	Oui	Cai <i>et al.</i> , 1997		
6: Unique	<i>Rpw8</i>	<i>Arabidopsis</i> / <i>Erisyphe</i>	Oui	-	Xiao <i>et al.</i> , 2001		
7: Protéine Membranaire ⁽⁴⁾	<i>mlo</i>	Orge / <i>Blumeria graminis</i>	Non	Non	Buschges <i>et al.</i> , 1997		
8: Toxine réductase	<i>Hm1</i>	Maïs / <i>Blumeria</i>	Non	Non	Johal & Briggs, 1992.		

(1) Un locus complexe est un locus où l'on trouve plusieurs gènes homologues et physiquement très proches.

(2) *Prf* est requis pour le fonctionnement de la résistance spécifique due à *Pto*. De même, *Pbs1* est requis pour le fonctionnement de la résistance spécifique due à *RPP5*.

(3) La séquence protéique de *HS1^{pro-1}* a d'abord été considéré comme faisant partie de la famille NBS-LRR, mais elle ne présente que très peu d'homologie avec les autres NBS-LRR et le consensus LRR est très peu suivi.

(4) La protéine prédite est une protéine de 60 kDa ayant 6 domaines transmembranaires.

(Johal & Briggs, 1992.); et *mlo*, récessif, code pour une protéine transmembranaire (Buschges *et al.*, 1997).

☉ *Spécificité des gènes de résistance et domaine LRR*

Le domaine LRR que présente la grande majorité des protéines de résistance est généralement considéré comme le déterminant majeur de la spécificité des gènes *R* (Kobe & Diessenhofer, 1994 ; Kobe & Diessenhofer, 1995). En effet, un certain nombre de protéines possédant des LRR ont été décrites chez les mammifères et la drosophile, qui ont un rôle de reconnaissance des agents pathogènes et provoqueraient, dans certains cas, des mécanismes de mort cellulaire programmée. Dans ces protéines animales, il a été montré que c'est le domaine LRR qui interagit avec des protéines spécifiques de l'agent pathogène (Anderem & Ulevich, 2000 ; Medzhitov *et al.*, 2000, *in* Dangl & Jones, 2001). De plus, une très grande diversité est observée parmi les différents allèles des gènes de résistance connus. Au niveau du domaine LRR, cette diversité serait à l'origine de la diversité des spécificités des protéines de résistance. Une telle supposition est confortée par les études réalisées sur les différents allèles des gènes *L* et *P* du lin (Dodds *et al.*, 2000 ; Ellis *et al.*, 1999).

Cependant, il a été montré que d'autres domaines de protéines de résistance ont un rôle dans cette spécificité (Ellis *et al.*, 2000 ; Luck *et al.*, 2000), et que le domaine LRR peut parfois avoir un rôle dans la transduction du signal de résistance (Warren, 1998 ; Hwang *et al.*, 2000).

☉ *Où sont les protéines de résistance ?*

Il est possible de prédire la localisation de la protéine codée par un gène de résistance à partir de sa séquence. Parfois, ces localisations ont été confirmées par d'autres expérimentations telles que l'immunolocalisation. Ainsi, les protéines de type LRR-TM et LRR-TM-kinase sont transmembranaires et présentent leur domaine LRR dans le domaine extracellulaire (Piedras *et al.*, 2000).

A l'inverse, les protéines de type NBS-LRR sont probablement cytoplasmiques, bien qu'elles soient peut-être associées à des membranes (Boyes *et al.*, 1998). La majorité des gènes de résistance coderaient donc pour des récepteurs (LRR) et transducteurs (NBS) de signaux protéiques situés à l'intérieur de la cellule végétale et spécifiques des gènes d'avirulence correspondants. Ces gènes confèrent des résistances à un très large groupe d'organismes dont des nématodes, des insectes, des agents pathogènes bactériens et viraux, et des agents pathogènes filamenteux de trois taxa différents (dont un straménopile,

Peronospora parasitica) ayant des modes de parasitisme très diversifiés (biotrophes stricts comme *Puccinia* ou *Blumeria*, hémibiotrophes, tels *Magnaporthe grisea*, pathogènes vasculaires comme *Fusarium*). Ce type de protéine de résistance serait donc efficace vis-à-vis de la majorité des agresseurs de la plante.

Dans la majorité des cas, la protéine codée par le gène de résistance détecterait donc un signal situé à l'intérieur de la cellule végétale. Ce signal pourrait être :

(i) la protéine codée par le gène d'avirulence. On la retrouverait dans le cytoplasme végétal soit parce que l'agent pathogène se développe à l'intérieur de la cellule vivante (virus, champignons biotrophes), soit parce que ce dernier l'injecte dans la cellule végétale, comme le font les agents pathogènes bactériens à l'aide du système de sécrétion de type III (cf. *infra* § II.3.a. du présent chapitre, et Leach *et al.*, 2001).

(ii) une modification intracellulaire due à l'activité de la protéine d'avirulence.

b) Organisation des gènes de résistance dans le génome

☼ *Gènes isolés, gènes groupés*

Il existe différents types d'organisation des gènes de résistance dans le génome.

Le plus simple est celui de gènes isolés. Parfois, l'étude des allèles de ces gènes révèle une diversité de spécificités, différents allèles de ces gènes reconnaissant différents facteurs d'avirulence. C'est le cas pour le gène *L* du lin, ou le gène *RPP13* d'*Arabidopsis* (Bittner-Eddy *et al.*, 2000). Le plus souvent, l'étude de la diversité génétique de l'espèce au niveau d'un locus de résistance met en évidence un allèle codant pour la résistance étudiée, et d'autres allèles ne semblant pas conférer d'autres résistances. Cela peut être dû au fait que les facteurs d'avirulence activant ces autres allèles ne sont pas connus. L'étude moléculaire des différents allèles de ces gènes a révélé un taux de divergence élevé entre eux, indice d'un taux d'évolution rapide (Caicedo *et al.*, 1999 ; Stahl *et al.*, 1999).

Cependant, la plupart des gènes de résistance sont groupés (organisation en clusters). Dans les espèces ayant une forte densité en gènes (*O. sativa*, *A. thaliana*), ces gènes sont souvent physiquement proches les uns des autres. En revanche, dans les plantes à grand génome, ces clusters sont parfois étendus, et les gènes qui les composent distants les uns des autres de près de 100kpb (cas de *RPI* chez le maïs, Meyers *et al.*, 1998 ; ou de *DM3* chez la laitue, Sun *et al.*, 2000).

Certains de ces clusters comportent des gènes dont il est clair qu'ils ne proviennent pas de récents événements de duplication. L'exemple le plus marquant est celui du locus de *Pto* dans le génome de la tomate. Ce locus contient 5 ORFs (Open Reading Frames, cadres ouverts de lecture) codant pour des kinases, l'une d'entre elles étant *Pto*. Il contient aussi un gène codant pour une protéine de type NBS-LRR, *Prf* qui est indispensable à la reconnaissance d'Avrpto par *Pto*. Il serait intéressant de comprendre pourquoi *Prf* se trouve à l'intérieur du cluster de *Pto* dont les autres gènes codent pour une autre famille de protéines. Une explication serait que *Pto* et *Prf* aient pour lointain ancêtre un gène comportant à la fois une kinase et un domaine LRR, à l'instar de *Xa21* (Salmeron *et al.*, 1996).

Dans d'autres cas, la présence de séquences d'une même famille, mais très divergentes est observée dans les clusters de gènes de résistance. Ainsi, le locus *m1a* de l'orge comporte 3 familles différentes de gènes NBS-LRR codant pour des protéines ayant moins de 33 % d'homologie (Wei *et al.* 1999). Plusieurs gènes de chacune de ces familles sont entremêlés dans une zone de plus de 240 kpb. Dans le génome du riz, le cluster situé au locus de *Xa21* est constitué de 7 membres issus de phénomènes complexes de recombinaisons, d'insertions et délétions de transposons, de mutations (Song *et al.*, 1997). Un exemple plus simple est celui de *Rps4* chez *A. thaliana*, qui est adjacent à un autre gène NBS-LRR très peu homologue (Wei *et al.*, 1999). On trouve 25 couples de ce type dans le génome d'*A. thaliana* et de telles structures semblent aussi fréquentes dans le génome du riz. On retrouve aussi dans les bases de données de nombreuses séquences comprenant plus d'un gène NBS-LRR, avec des taux d'homologie des acides aminés pouvant descendre en dessous de 40 %. De tels couples sont probablement dus en majorité à d'anciens événement de duplications dus à des recombinaisons asymétriques.

Le séquençage du génome d'*A. thaliana* (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) a permis de comparer le nombre de loci de résistance simples, et le nombre de clusters. La majorité des loci sont simples, mais la majorité des gènes de résistance putatifs appartiennent à des loci complexes : 46 gènes *R* putatif de type NBS-LRR sont des singletons, 50 forment 25 paires, 21 forment 7 triplets, et 33 gènes se regroupent dans 5 clusters de 4, 5, 7, 8 et 9 membres (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

☉ Clusters de gènes et cartographie génétique

Des clusters de gènes de résistances peuvent aussi être observés à une plus large échelle, qui ont été nommés complexes de gènes *R* chez *A. thaliana*. Ce terme peut aussi être appliqué

à des ensembles de gènes de résistance qui ont été cartographiés dans des zones de un à 20 centiMorgans (Hulbert *et al.*, 1997 ; Pryor, 1987). De tels groupements ont aussi été observés lors de travaux de cartographie d'homologues de gènes de résistance (Botella *et al.*, 1997 ; Collins *et al.*, 1998 ; Kanazin *et al.*, 1996 ; Lagudah *et al.*, 1997 ; Leister *et al.*, 1996 ; Leister *et al.*, 1998 ; Shen *et al.*, 1998 ; Yu *et al.*, 1996). Cette organisation a aussi été observée lors du séquençage du génome d'*A. thaliana* (Young *et al.*, 2000).

Les raisons d'une telle organisation sont aujourd'hui largement inconnues. Elles pourraient être les mêmes que pour les clusters observés au niveau des loci de résistance (cf. § précédent), et liés à des événements rares de recombinaisons complexes. La trace d'un tel événement a été observée entre deux loci du chromosome 1 de la tomate séparés de plusieurs centiMorgans (Parniske *et al.*, 1999, et cf. § 4.a)

3) Les interactions plantes – bactéries phytopathogènes : un modèle permettant de proposer des théories moléculaires de l'interaction gène – pour – gène

La plupart des gènes d'avirulence bactériens clonés l'ont été par complémentation d'une souche virulente par une banque d'une souche avirulente. Depuis le clonage du gène d'avirulence *avrA* (Staskawicz *et al.*, 1984) à partir de la race 6 de *Pseudomonas syringae* pv. *glyciniae*, un grand nombre de gènes d'avirulence bactériens ont été isolés par cette méthode (Leach *et al.*, 1996 ; Gabriel, 1999). Par ailleurs, surtout chez *Arabidopsis*, mais aussi chez le riz et la tomate, un certain nombre des gènes de résistance correspondant aux gènes d'avirulence bactériens clonés ont été caractérisés. Ces travaux ont permis de mieux comprendre l'interaction entre les facteurs d'avirulence et de résistance.

a) Quel rôle pour les facteurs d'avirulence bactériens ?

En général, les analyses structurales des gènes bactériens d'avirulence n'ont pas apporté d'information sur leur fonction. Les conclusions générales des études réalisées sont que (i) l'analyse des séquences n'a pas montré de similarité entre les gènes d'avirulence bactériens et d'autres séquences, ni leur appartenance à une famille unique ; (ii) les gènes d'avirulence bactériens sont monocistroniques : ils ne possèdent qu'un seul cadre ouvert de lecture ; (iii) les séquences protéiques déduites des gènes d'avirulence bactériens ne possèdent pas de motifs reconnaissables.

☉ *Les facteurs avir bactériens et le système de sécrétion de type III*

Un trait commun entre ces gènes, bien qu'il souffre des exceptions, est que les produits de ceux-ci, qui sont de petites protéines, sont injectés dans la cellule végétale via les systèmes d'expression de type III (pour revue : Galan & Colmer, 1999). En particulier, beaucoup de gènes d'avirulence bactériens sont exprimés en même temps que les gènes du système d'expression de type III, nommés gènes *hrp*.

Les gènes *hrp* sont nécessaires à la pathogenicité des bactéries phytopathogènes, mais aussi à l'induction de la HR chez les plantes non-hôtes et hôtes résistantes (Van Gijsegem, 1997, *in* Grant & Mansfield, 1999). De plus, ils sont homologues à des gènes nécessaires à l'expression des facteurs de virulence chez des bactéries pathogènes des mammifères telles que *Yersinia* (Hueck, 1998, *in* Grant & Mansfield, 1999). L'expression des gènes *hrp* peut être induite sur milieu minimum dans des conditions de pH bas, mais elle atteint des niveaux bien plus élevés dans la plante. Dans le cas de *Ralstonia solanacearum*, plusieurs études montrent que c'est une interaction directe entre les cellules de la plante et l'agent pathogène qui aboutit à la surexpression des gènes *hrp* (Van Gijsegem, 1997 ; Marena *et al.*, 1998 ; Brito *et al.*, 1999, *in* Grant & Mansfield, 1999 ; Brito *et al.*, 2002).

Les protéines d'avirulence bactériennes seraient donc, dans le cas général, injectées dans le cytoplasme des cellules végétales via le système de sécrétion de type III. C'est à l'intérieur du cytoplasme que se trouvent la majorité des protéines de résistance. Ce serait donc en son sein que l'interaction directe ou indirecte, entre protéines de résistance et protéines d'avirulence aurait lieu.

b) Une première théorie moléculaire de l'interaction gène – pour – gène

Le tableau qui se dégage des études moléculaires des interactions plantes – bactéries est le suivant : l'interaction entre des gènes de résistance différents, bien que présentant des structures homologues, et des gènes d'avirulence très divers, aboutit à des réactions de défense qui ne sont pas propres à l'interaction, mais plutôt comparables entre elles. De plus, les structures observées chez les protéines de résistance semblent indiquer qu'elles jouent plus un rôle de capteur qu'un rôle de résistance à proprement parler. Ce constat a amené Staskawicz *et al.* (1995) à proposer un modèle moléculaire de la relation gène – pour – gène.

Dans ce modèle, que nous appellerons le modèle du récepteur (figure A7), les gènes de résistance coderaient pour des protéines jouant le rôle de récepteur et de transmetteur du

signal : en interagissant avec le produit des gènes d'avirulence, ces protéines émettraient un signal aboutissant à une réaction contrôlée par d'autres gènes, qui eux seraient conservés chez les plantes à fleurs.

L'un des sous-entendus de ce modèle est que les gènes d'avirulence codent pour des protéines effectrices du pouvoir pathogène*. Le premier cas où un tel rôle a été montré a été celui du gène *avrBs2* de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Kearney & Staskawicz, 1990). L'étude de souches de cet agent pathogène ayant un gène *avrBs2* inactivé a montré que ces souches ont un pouvoir pathogène et un taux de multiplication dans les tissus hôtes fortement réduits (Gassman *et al.*, 2000 ; Kearney & Staskawicz, 1990 ; Swords *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres gènes *Avr* de *Xanthomonas* (Kearney *et al.*, 2000 ; Bai *et al.*, 2000 ; Swarup *et al.*, 1991 ; Swarup *et al.*, 1992 ; Yang *et al.*, 1996). On a aussi pu mettre en évidence le rôle de gènes d'avirulence dans l'agressivité d'autres espèces bactériennes phytopathogènes telles que *Pseudomonas syringae* (Jackson *et al.*, 1999 ; Tsiamis *et al.*, 2000 ; Yucel *et al.*, 1994 ; Chang *et al.*, 2000 ; Shan *et al.*, 2000).

c) L'hypothèse du protecteur (« Guard hypothesis »)

☼ Présentation de la théorie

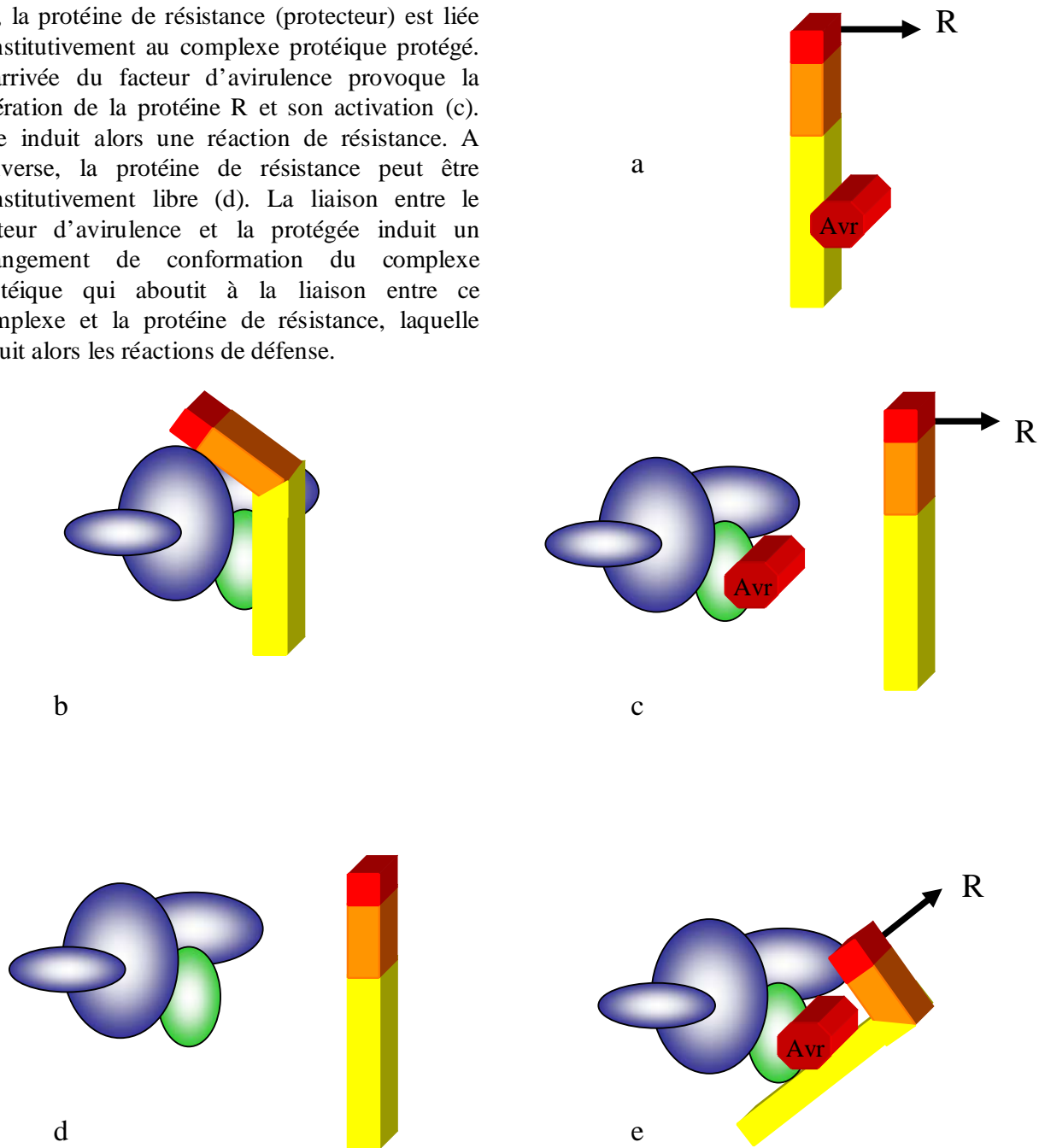
L'hypothèse du protecteur a été évoquée pour la première fois par Van der Biezen & Jones (1998) pour expliquer pourquoi la protéine kinase Pto a besoin de la présence de la protéine NBS-LRR Prf pour activer la réaction de défense en présence d'AvrPto. Selon ce modèle, Pto est une composante générale de la réaction de défense de l'hôte, peut être dans une voie de réponse à des éliciteurs non spécifiques des bactéries phytopathogènes. Le rôle d'AvrPto serait d'agir sur Pto pour supprimer cette voie de défense non spécifique. Prf serait alors une protéine NBS-LRR qui « protégerait » (« guard ») Pto, détecterait son blocage par AvrPto et activerait alors la réaction de défense. Une généralisation de ce modèle serait que les protéines *R* interagiraient physiquement avec les cibles des effecteurs de type III de l'agent pathogène. Ces cibles seraient des composants de la résistance, ou bien des protéines de la plante dont la fonction serait modifiée pour transférer des substances nutritives de la plante vers la bactérie. Quand un effecteur bactérien lié au système de sécrétion de type III pénètre

* Pour une revue plus détaillée sur ce sujet, voir Leach *et al.*, 2001.

Figure A7 : La théorie classique de la résistance (Staskawicz, 1995) et la théorie du protecteur (D'après Dangl, 2001)

Dans la première théorie moléculaire de la résistance (a), la protéine d'avirulence (rouge) se lie au domaine LRR de la protéine de résistance (jaune). Des domaines effecteurs de cette protéine, tels que le NBS, le domaine TIR ou CC activent alors les réactions de défense.

Dans la théorie du protecteur, la protéine d'avirulence (rouge) a pour cible une protéine dite « protégée » (verte) par la protéine de résistance, et intégrée dans un complexe protéique (bleu). Dans cette théorie, deux types de relations sont possibles. En (b), la protéine de résistance (protecteur) est liée constitutivement au complexe protéique protégé. L'arrivée du facteur d'avirulence provoque la libération de la protéine R et son activation (c). Elle induit alors une réaction de résistance. A l'inverse, la protéine de résistance peut être constitutivement libre (d). La liaison entre le facteur d'avirulence et la protégée induit un changement de conformation du complexe protéique qui aboutit à la liaison entre ce complexe et la protéine de résistance, laquelle induit alors les réactions de défense.



dans une cellule de l'hôte résistant, il interagirait avec sa cible, et le complexe résultant serait reconnu par la protéine de résistance. Celle-ci serait activée et provoquerait la réaction de défense (figure A7). En l'absence de la protéine de résistance, l'interaction entre la protéine cible et l'effecteur de type III ne serait pas détectée, et la maladie s'installerait.

Dans un premier scénario, la protéine *R* serait constitutivement liée à « sa protégée » (« guardée »), et s'en séparerait si un effecteur de type III s'y lie, ce qui l'activerait. Ce scénario est cohérent avec le fait que la surexpression de *Prf* conduit à une résistance constitutive. Ce scénario implique que la protéine NBS-LRR, ainsi que la voie de signalisation qui la suit, sont inhibées par la « protégée ». Dans un autre scénario, la protéine *R* est libre et l'action de l'effecteur de type III sur la protégée entraîne une modification de sa conformation aboutissant à une plus grande affinité du complexe effecteur – protégée pour la protéine *R*. La liaison de cette dernière avec le complexe activerait la réaction de défense. Ces deux scénarii sont cohérents avec le fait que l'interaction directe entre le facteur d'avirulence et la protéine *R* a rarement pu être mise en évidence.

☼ *Prédictions de cette théorie*

- (i) Les protéines *R* peuvent interagir constitutivement avec leur protégées. Ces dernières sont des cibles des effecteurs de l'agent pathogène indispensables pour que l'infection réussisse et/ou des protéines liées aux réactions de défense. Il n'y a pas de cas où ce type de relation protecteur – protégée – effecteur a été montré, mais certaines interactions semblent s'en rapprocher. Ainsi, Chen *et al.* (2000) ont montré que la protéine d'avirulence *avrRpt2* provoquait, chez les plantes sensibles, une augmentation de l'agressivité de l'agent pathogène, et que son action se situait à l'intérieur de la cellule végétale. Dans un autre exemple, celui de l'interaction entre le gène de résistance *HRT* et le gène d'avirulence correspondant, qui code pour la capsid du virus TCV, il a été montré par double hybride que cette protéine de capsid se lie avec la protéine NAC d'*A. thaliana*. Cette protéine est probablement un régulateur transcriptionnel. Des mutants de ce virus dont la capsid n'interagit plus avec NAC restent capables d'infecter la plante, mais ne provoquent plus de réaction de défense liée à *HRT*. Dans cette théorie, NAC serait la protégée, *HRT* le protecteur, et la protéine de capsid serait un effecteur agissant sur NAC afin de favoriser la multiplication du virus.

- (ii) Le complexe effecteur – protégée pourrait être observé à la fois chez les individus résistants et chez les sensibles. Chez les individus résistants, la protéine R serait liée à ce complexe. Cela laisse à penser qu'une mutation du gène de la protégée peut amener à une perte de la résistance. Un tel phénomène pourrait expliquer le phénotype du mutant *pbs1* (Warren *et al.*, 1999). En effet, cette mutation empêche l'expression de la résistance induite par l'interaction entre avrPphB (de *Pseudomonas syringae*) et RPS5 (d'*A. thaliana*). Récemment, le gène *PBS1* a été cloné, et caractérisé (Swiderski & Innes, 2001). Il s'agit d'une kinase. Swiderski & Innes (2001) considèrent qu'il s'agit d'un gène de résistance, à l'instar de *Pto*, *RPS5* jouant le rôle de *Prf*. Dans l'hypothèse du protecteur, *PBS1* est le protecteur à l'instar de *Prf*, et *PBS1* est la protégée à l'instar de *Pto*.
- (iii) Si un nombre limité de complexes protéiques de l'hôte sont des cibles pour les effecteurs de la bactérie pathogène, alors un complexe protéique donné peut être la cible pour plusieurs effecteurs bactériens. Cela suggère que plusieurs protéines R peuvent se lier à un même complexe protéique et en conséquence être indirectement liées entre elles. Cette notion peut éclairer les interférences fonctionnelles de deux protéines R structurellement proches (Ritter & Dangl, 1996 ; Reuber *et al.*, 1998), et aussi des résultats surprenants où une protéine d'avorulence bactérienne copécipite avec la protéine de résistance correspondant à un autre facteur d'avorulence (Leister & Katagiri, 2000).
- (iv) Un corollaire de cette prédiction est qu'à l'inverse un protecteur peut détecter l'attaque de sa protégée par différents effecteurs. Autrement dit, un gène de résistance peut détecter différents effecteurs ayant la même cible. Cette prédiction a pu être vérifiée pour au moins deux cas (Grant *et al.*, 1995 ; Rossi *et al.*, 1998) où il a été montré qu'une seule protéine de résistance reconnaissait aux moins deux effecteurs différents. Il est également possible que l'évolution des gènes de résistance ne soit pas aussi rapide que dit précédemment, au moins dans certain cas. En effet, un gardien pouvant détecter l'attaque d'un complexe protéique qui est une cible de nombreux agents pathogènes est une protéine de résistance efficace dont le gène a toutes les chances d'être conservé longtemps. Or le décryptage du génome d'*A. thaliana* révèle qu'un nombre non négligeable de gènes de résistance (une quarantaine) sont présents sur des loci simples. Ils seraient donc peu sujets à des réorganisations rapides, peut-être parce qu'il s'agit de

gènes efficaces sur un grand nombre d'agents pathogènes, et donc conservés depuis longtemps dans l'espèce.

d) Conclusion : le modèle initial est remis en cause

Le modèle du récepteur (Staskawicz *et al.*, 1995 ; cf. *supra* § II.3.b du présent chapitre, p. 55), où la protéine d'avirulence, facteur de pathogénie, est reconnue par une protéine de résistance, ce qui aboutit à la HR via une voie métabolique unique ne rend pas compte d'un certain nombre d'observations issues des nombreux travaux de biologie moléculaire sur l'interaction gène – pour – gène. En particulier, elle ne permet pas d'expliquer pourquoi il est bien souvent impossible de montrer une interaction physique entre la protéine d'avirulence et celle de résistance, pourquoi d'autres gènes sont nécessaires à l'expression de la résistance spécifique (*Pto* et *Prf*, *PBS1* et *RPS5*), et pourquoi la majorité des facteurs d'avirulence étudiés n'ont aucun rôle dans la pathogénicité.

Un nouveau modèle de la résistance spécifique est en train d'émerger progressivement. Dans ce modèle d'interaction plante – bactérie, les gènes liés à l'avirulence se trouvent dans des « îlots de pathogénie », petites portions du génome souvent portées par des plasmides, qui codent à la fois pour le système de sécrétion de type III et pour les facteurs que ce système injecte dans la cellule végétale. Ces îlots peuvent être transmis entièrement ou partiellement par transfert horizontal entre les pathovars voire entre les espèces de bactéries phytopathogènes. Ils contiennent donc un ensemble de gènes de différentes origines, et ayant évolué au cours du temps en fonctions d'hôtes différents de celui actuellement attaqué par l'agent pathogène considéré. Si certains de ces effecteurs sont indispensables à l'efficacité de l'infection, d'autres ne jouent qu'un rôle quantitatif, et d'autres enfin n'ont pas d'avantages sélectifs. Ces effecteurs agissent sur des cibles protéiques dans la cellule végétale. A l'origine, leur action bloque les phénomènes de résistance ou modifie le métabolisme cellulaire à l'avantage de la bactérie. Parfois, la cible protéique de ces effecteurs n'existe pas chez l'espèce hôte, ou est différente, et l'effecteur est inefficace. La présence de tels effecteurs inefficaces a été proposée par Gabriel (1999). Selon cet auteur, ce serait même la majorité des gènes d'avirulence qui seraient des gènes gratuits (c'est à dire sans avantage sélectif).

Du côté de la plante, un certain nombre de protéines de type NBS-LRR ou — tout au moins — possédant des LRR sont capables de détecter des modifications de conformation des protéines cibles dues à l'action des effecteurs. Les gènes codant pour ces protéines évoluent

de façon rapide, en réponse à une rapide évolution des effecteurs auxquels sont confrontés les populations végétales à cause des transferts horizontaux. Si l'action d'un des effecteurs de la bactérie est détectée par l'hôte, alors on observe une réaction hypersensible. Si les effecteurs agissent d'une manière qui n'est pas détectée par la plante, alors la maladie se développe.

La différence entre une résistance spécifique et une résistance non-hôte n'est pas une différence de nature : elle est due au fait que les effecteurs d'une bactérie pathogène d'un autre hôte n'ont pas été sélectionnés en fonction des « protecteurs » de l'espèce considérée (Gabriel, 1999). Beaucoup d'entre eux seront donc repérés par la plante non-hôte. Dans le cas de la résistance spécifique, une telle sélection s'est opérée. Cependant, suite aux variations au sein de la population végétale, de nouveaux « protecteurs » peuvent apparaître et détecter un nouvel effecteur. De même, suite aux transferts horizontaux, une bactérie peut acquérir de nouveaux effecteurs qui, eux, sont détectés par son hôte, ou par une sous-population de son espèce hôte. Ces effecteurs indésirables peuvent se maintenir dans la population de l'agent pathogène tant qu'une partie des individus de l'espèce hôte ne possède pas les « protecteurs » correspondant, et si eux-mêmes ou des gènes proches physiquement procurent un avantage sélectif, lié à l'agressivité ou non. Une telle proposition est appuyée par de récents travaux montrant que certains phénomènes de résistance non-hôte s'expliquent par la présence de gènes semblables aux gènes de résistance spécifiques (Dangl *et al.*, 1992 ; Fillingham *et al.*, 1992 ; Innes *et al.*, 1993 ; Keen *et al.*, 1991 ; Swarup *et al.*, 1992 ; Whalen *et al.*, 1991 ; Wood *et al.*, 1994).

4) Les interaction plantes – champignon : un domaine encore peu défriché au niveau moléculaire

Dans le cas des champignons phytopathogènes, les couples gène *R* / gène *avr* clonés sont rares. En effet, l'isolement des gènes d'avirulence se fait le plus souvent par clonage positionnel ou génétique inverse, méthodes plus difficiles à mettre en oeuvre que celles utilisées pour l'isolement de gènes d'avirulence bactériens. De plus, le clonage positionnel implique une cartographie génétique, ce qui nécessite d'une part la possibilité de disposer d'ADN génomique du parasite et d'autre part la possibilité de réaliser des croisements entre des isolats différents pour leur avirulence. Or, de nombreux agents pathogènes biotrophes ne peuvent être cultivés sur milieu artificiel et, pour de nombreux champignons phytopathogènes, aucune reproduction sexuée n'a été observée ni induite jusqu'à ce jour.

En revanche un certain nombre de gènes de résistance ont été caractérisés (tableau A5). Parmi eux, on trouve beaucoup de gènes « classiques » de type NBS-LRR, mais aussi un certain nombre de gènes différents, uniques dans leur classe. En particulier, les gènes *Cf* de la tomate qui ont été clonés sont les seuls gènes de résistance connus à ce jour à posséder une structure de type LRR-TM*.

On trouve dans la littérature une douzaine de gènes d'avirulence fongiques qui ont été clonés et caractérisés. Cependant, pour la moitié d'entre eux, la séquence du gène de résistance correspondant n'est pas encore caractérisée (tableau A6). De façon générale, ces gènes codent pour des petits peptides (20 à 200 acides aminés, soit 2 à 20 kDa environ), et pour beaucoup d'entre eux, ces peptides sont probablement sécrétés par l'agent pathogène.

a) L'interaction *Cladosporium fulvum* – *Lycopersicon esculentum*

L'interaction *Cladosporium fulvum* – *Lycopersicon esculentum* est actuellement l'interaction plante – champignon pour laquelle le plus de recherches furent réalisées en ce qui concerne l'interaction entre les facteurs de résistance et les facteurs de virulence. Pour ces raisons, cette interaction est considérée comme un modèle. Ce modèle n'est cependant pas forcément généralisable, les gènes de résistance *Cf* étant les seuls gènes de cette classe à avoir été caractérisés.

☼ Caractérisation des gènes d'avirulence et de résistance

Les gènes de résistance *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9*, ont été clonés et caractérisés. (*Cf-2* Dixon *et al.*, 1996 ; *Cf-4* Thomas *et al.*, 1997 ; *Cf-5* Dixon *et al.*, 1998 et *Cf-9* Jones *et al.*, 1994). Les gènes d'avirulence correspondants ont été clonés à l'exception d'*Avr5* (*Avr2* Luderer *et al.*, 2002 ; *Avr4* Joosten *et al.*, 1994 et *Avr9* van den Ackerveken *et al.*, 1992).

Cf-4 et *Cf-9* sont localisés dans le même locus du chromosome 1 de la tomate. Il s'agit d'un locus complexe nommé « Milky way » où se trouve un cluster de gènes et pseudogènes homologues à *Cf-9* et *Cf-4*. De tels homologues se trouvent aussi dans d'autres loci du bras court du chromosome 1 nommés « Northern light » et « Southern cross ». Le gène de résistance *Cf-9* pourrait provenir d'un événement de recombinaison entre le gène *9DC* situé au même locus, ayant la même spécificité pour *Avr9* et caractérisé dans *Lycopersicon pimpinellifolium* (van Der Hoorn *et al.* 2001a) et un autre membre de cette famille n'ayant pas cette spécificité. Enfin, au cours de la caractérisation de *Cf-4*, un des homologues de ce gène présent sur le locus, et nommé *Hcr9-4E* (Homologue *Cladosporium* Resistance) a révélé une

* gènes codant pour des protéines comportant un domaine de répétitions riches en leucine (LRR), ainsi qu'un domaine transmembranaire (TM).

Tableau A6: Gènes d'avirulence clonés et caractérisés à ce jour chez les pathogènes filamenteux

Adapté et complété de Leach *et al.*, 2001

Gène d'avirulence	Pathogène / hôte	Taille	Protéine extra-cellulaire	Informations structurales	Gène de résistance correspondant	Référence
<i>Avr2</i>	<i>Cladosporium</i> / tomate	78 aa.	?	Pas d'homologie connue	<i>Cf-2</i> LRR-TM	Luderer <i>et al.</i> , 2002
<i>Avr4</i>	<i>Cladosporium</i> / tomate	105 aa.	<i>oui</i>	Riche en cystéine. Présente une structure de type cystein knot.	<i>Cf-4</i> LRR-TM	Joosten <i>et al.</i> , 1994 ; Takken <i>et al.</i> , 2000
<i>Avr9</i>	<i>Cladosporium</i> / tomate	28 aa.	<i>oui</i>	Riche en cystéine. Présente une structure de type cystein knot.	<i>Cf-9</i> LRR-TM	Kooman gersmann <i>et al.</i> , 1997 ; Kooman gersmann <i>et al.</i> , 1998 ; Perez-garcia <i>et al.</i> , 2001 ; Van Kan <i>et al.</i> , 1991 ; Vervoort <i>et al.</i> , 1997.
<i>Ecp2</i>	<i>Cladosporium</i> / tomate	165 aa.	<i>oui</i>	Joue une role dans la virulence. Pas d'homologie connue	<i>CF-ECP2</i>	Haansra <i>et al.</i> , 1999 ; van den Ackerveken <i>et al.</i> , 1993
<i>AvrPita</i>	<i>Magnaporthe grisea</i> / riz	223 aa.	<i>peptide signal</i>	Metalloprotéase à hème de zinc.	<i>Pita</i> NBS-LRR	Jia <i>et al.</i> , 2000 ; Orbach <i>et al.</i> , 2000
<i>Ace-1 (Avr-IRAT-7)</i>	<i>Magnaporthe grisea</i> / riz	4035 aa.	<i>non</i>	Polykétide synthase - Non ribosomal Peptide Synthase.	Pi33, sujet de cette thèse	Böhnert <i>et al.</i> , 2000
<i>Avr-Co39</i>	<i>Magnaporthe grisea</i> / riz	89 aa.	<i>peptide signal</i>	protéine élicitrice	<i>Pi-avrCo39</i>	Lebrun, <i>com. pers.</i>
<i>PWL1</i>	<i>Magnaporthe grisea</i> / <i>Eragrostis curvula</i>	147 aa.	?	Famille de gènes, peptides riches en glycine.	?	Kang <i>et al.</i> , 1995
<i>PWL2</i>	<i>Magnaporthe grisea</i> / <i>Eragrostis curvula</i>	145 aa.	?		?	Sweigard <i>et al.</i> , 1995
<i>NIP (AvrRs1)</i>	<i>Rynchosporium secalis</i> / seigle	60 aa.	<i>oui</i>	peptide riche en cystéine, toxine	<i>Rrs1</i>	Knogge <i>et al.</i> , 1994 ; Rohe <i>et al.</i> , 1995.
<i>Inf1</i>	<i>Phytophthora infestans</i> / tabac	118 aa.	<i>oui</i>	Infestine	?	Kamoun <i>et al.</i> , 1997 ; Kamoun <i>et al.</i> , 1998.
<i>ParA1</i>	<i>Phytophthora parasitica</i> / tabac	98 aa.	<i>oui</i>	Parasiticine	?	Kamoun <i>et al.</i> , 1993.

spécificité pour un facteur d'avirulence non encore caractérisé.

Cf-2 et *Cf-5* sont eux aussi présents dans un même locus complexe situé sur le chromosome 6. Ce locus comprend de deux à quatre copies homologues. On retrouve dans le génome de la plante à partir de laquelle le gène *Cf-2* a été cloné la trace d'une recombinaison très récente. En effet, le gène *Cf-2* est présent sous la forme de deux copies fonctionnelles, conférant chacune la résistance spécifique, et ne différant que par 3 acides aminés.

Cf-2, *Cf-4*, *Cf-5*, *Cf-9*, *9DC* et *Hcr9-4E* présentent des homologies de séquence. Pour tous ces gènes, la séquence d'acides aminés déduite permet de supposer que la protéine de résistance présente une structure de type LRR-TM. Dans ce type de structure, il est prédit que le domaine LRR est extracellulaire, ce qui a été confirmé par immunolocalisation pour *Cf-9* (Piedras *et al.*, 2000). Une telle structure est assez originale pour des gènes de résistance. En effet, des gènes de résistance de cette famille n'ont été actuellement caractérisés dans aucune autre interaction plante – agent pathogène. En conséquence, les conclusions de l'étude de cette interaction, qui est actuellement la plus poussée en ce qui concerne les organismes pathogènes fongiques, risquent de ne pas pouvoir être totalement généralisées aux autres interactions plante - champignon filamenteux où la majorité des gènes de résistance caractérisés à ce jour ont une structure de type NBS-LRR ou TIR-NBS-LRR.

Les gènes *Avr4* et *Avr9* codent pour de petits peptides riches en cystéine comportant une structure de type « cystine knot ». Ce type de structure a été trouvé dans des bloqueurs de protéases, de canaux ioniques, dans des facteurs de croissance (Vervoort *et al.*, 1997). Le site d'*Avr9* reconnu par *Cf9* correspond au site actif de ce type de peptide (Kooman-Gersman *et al.*, 1997). Le peptide *Avr9* est partiellement digéré par les protéases fongiques et végétales avant de déclencher la réaction de résistance (Van Den Ackerveken *et al.*, 1993). Le promoteur d'*Avr9* ressemble à celui de gènes fongiques liés à la réaction à la carence azotée. Une construction p*Avr9*-GUS s'exprime lors de stress azotés chez *A. nidulans* (Snoeijsers *et al.*, 1999). Le peptide *Avr2* ne possède aucune homologie avec d'autres protéines ni aucune structure connue.

☼ *ECP2* et *Cf-ECP2*

Bien que les études réalisées sur cette interaction soient bien moins importantes, la façon dont ces deux gènes ont été caractérisés est intéressante. En effet, *ECP2* est un gène qui a tout d'abord été caractérisé pour son rôle dans le pouvoir pathogène. Il code pour un petit

peptide sécrété dans l'espace intercellulaire au cours de l'infection (van den Ackerveken *et al.*, 1993). Du fait de son importance dans l'agressivité de *C. fulvum*, de son caractère extracellulaire, et comme ce gène est présent dans toutes les souches de *C. fulvum* pathogènes de la tomate (Laugée *et al.*, 1998), il a été décidé de rechercher une résistance contre ce peptide spécifique. Elle a été trouvée et cartographiée sous le nom de *Cf-ECP2* sur le chromosome 1 de la tomate entre les clusters d'homologues à *Cf-9* « Milky way » (qui porte *Cf-9*) et « Southern cross » définis par Parniske *et al.* (1999) (Haansra *et al.*, 1999). Par ailleurs, d'autres facteurs de virulence extracellulaires (ECP1, ECP3, ECP4, ECP5) ont provoqué l'apparition de HR chez des tomates cultivées et des accessions de l'espèce proche *Lycopersicon pimpinellifolium* (Laugée *et al.*, 2000). Dans le cas de ECP3 et ECP5, il a été montré que cette résistance est due à un gène unique dominant.

☼ Interactions entre les protéines codées par ces gènes

Il a été montré assez tôt, que l'interaction des protéines Avr9 et Cf-9 aboutit à la mort des cellules végétales (Hammond-Kosak *et al.*, 1994), et que cette réponse peut être reproduite chez d'autres solanacées (Hammond-Kosak *et al.*, 1998 ; Rivas *et al.*, 2002), et même chez le colza (Henin *et al.*, 2001). Chez la tomate, la mort cellulaire due à l'interaction Cf-9 – Avr9 est contrôlée au cours du développement. En effet, l'expression conjointe de ces deux protéines dans des lignées transformées n'induit pas la mort dans les cals, ni dans les jeunes plants (Honné *et al.*, 1998). L'étude de l'interaction *Cf4 / Avr4* a donné des résultats similaires, bien qu'elle semble aboutir plus rapidement à la HR (Thomas *et al.*, 2000). En particulier, il a été montré que l'interaction *Avr4 / Cf-4* induit une réaction HR dans la laitue (Van der Hoorn, 2000).

Dans le cas de Cf-4 et Cf-9, le domaine LRR semble avoir un rôle fondamental dans la spécificité de la réaction hypersensible, mais il a été montré que seules des parties de ce domaine sont réellement indispensables (Van der Hoorn *et al.*, 2001 ; Wulff *et al.*, 2001).

La chaîne de réaction due à l'activation de Cf-9 par Avr9 passerait par l'activation de canaux ioniques à potassium (Blatt *et al.*, 1999), de kinases membranaires Ca^{2+} dépendantes (Romeis *et al.*, 2000) indispensables au bon fonctionnement de la HR (Romeis *et al.*, 2001), et de MAP kinases impliquées dans les réactions aux blessures et à l'acide salicylique (Romeis *et al.*, 1999). Cependant, que ce soit pour *Cf-2* ou *Cf-9*, l'acide salicylique ne semble pas indispensable à l'expression de la résistance (Brading *et al.*, 2000).

☉ *Et les nouvelles théories ?*

Jusqu'ici, les interactions entre les facteurs d'avirulence de *C. fulvum* et les protéines de résistance de la tomate semblent concorder avec le modèle général de Stakawicz *et al.* (1995). L'interaction spécifique entre des facteurs d'avirulence et des facteurs de résistance possédant des LRR aboutit à une réaction de défense qui est commune et générale puisqu'elle intègre des facteurs de réaction à des stress physiques et qu'il est possible de l'induire dans des familles végétales différentes. De plus, l'un des facteurs d'avirulence étudiés ici (ECP2) est un facteur d'agressivité.

Cependant, les autres facteurs d'avirulence étudiés ne semblent pas jouer un grand rôle dans la pathogénie : il existe des formes mutantes spontanées (mutation ponctuelle pour *Avr4*, Joosten *et al.*, 1994, ou même forme tronquée pour *Avr2*, suite à l'insertion d'un rétrotransposon, Luderer *et al.*, 2002) de ces facteurs. Il est aussi possible de créer au laboratoire des souches où ces facteurs sont mutés. Si parfois une perte de l'avirulence est observée, on ne constate jamais la perte de l'agressivité même lorsque c'est au niveau du site actif que l'on opère ces mutations (Kooman-Gersman *et al.*, 1997). Cet ensemble de données milite en faveur de la théorie du gène d'avirulence gratuit (Gabriel, 1999).

Enfin, les derniers résultats concernant l'interaction entre *Avr9* et *Cf-9* semblent donner à *Cf-9* plus le rôle du « protecteur » proposé par Dangl & Jones (2001) que celui du « récepteur » proposé par Staskawicz *et al.* (1995) (figure A7). En effet, malgré différentes expérimentations, il a été impossible de montrer que *Avr9* et *Cf-9* interagissaient de façon physique (Luderer *et al.*, 2001). En revanche, Kooman-Guersmann *et al.* (1998) montrent que *Avr9* se fixe sur une protéine membranaire, qui ne serait pas *Cf-9*. De plus, Rivas *et al.* (2002) ont montré que la protéine *Cf-9* est une composante d'un complexe protéique d'environ 420 kDa qui se trouve au niveau de la membrane plasmique. Des résultats similaires ont été obtenus en ce qui concerne *Cf-4*. Ce complexe comporterait des composantes extracellulaires et au moins une protéine glycosylée. Aucune modification de la taille de ce complexe n'a été observée lors de l'élicitation par *Avr9*. Cela serait dû au fait que l'activation de ce complexe se ferait par un changement de conformation, des liaisons transitoires ou une liaison avec une (ou des) protéine(s) de petite taille(s).

b) L'interaction *Oryza sativa* / *Magnaporthe grisea*

☼ *Le couple Pi-ta / Avr-pita*

L'autre cas de couple *R/avr* fongique où les deux gènes ont été clonés est celui de l'interaction entre le gène de résistance du riz *Pi-ta*, et le gène d'avirulence *Avr-pita* porté par *Magnaporthe grisea*. *Pi-ta* a été cloné par l'équipe de B. Valent (Bryan *et al.* 2000). Des plants de riz d'une variété sensible ont été transformés avec *Pi-ta* et ont montré une résistance à *avr-Pita*. La séquence d'acides aminés déduite indique que *Pi-ta* code pour une protéine de type NBS-LRR. Le locus de *Pi-ta* n'est pas, à l'inverse de *Cf4/9* et de nombreux loci de résistance, un locus complexe. L'analyse d'allèles sensibles de *Pi-ta* a montré qu'une seule substitution différencie ces allèles de l'allèle résistant.

Le gène d'avirulence correspondant à *Pi-ta* (*Avr-pita*) a été cloné au sein de la même équipe (Orbach *et al.*, 2000). Ce gène code pour une protéine ayant une structure de métalloprotéase neutre à hème de zinc, et possédant un signal de sécrétion à son extrémité N-terminale.

L'interaction entre *Pi-ta* et *Avr-pita* semble plus correspondre au modèle de Staskawicz (1995) qu'à celui du protecteur. En effet, des expérimentations menées par Jia *et al.* (2000) suggèrent que l'interaction entre les protéines *Pi-ta* et *Avr-pita* se fait de façon directe dans le cytoplasme des cellules de riz. En ce qui concerne l'importance d'*Avr-pita* dans la pathogénie, les résultats obtenus jusqu'à présent sont peu clairs. En effet, il est relativement facile d'obtenir au laboratoire des mutants spontanés d'*Avr-pita*, la majorité de ces mutants portent des délétions, et semblent aussi agressifs que les isolats sauvages porteurs du gène d'avirulence. Par contre, les allèles *avr-pita* des souches virulentes trouvées dans la nature ne diffèrent de l'allèle avirulent que par quelques mutations ponctuelles. La conservation de la structure d'*Avr-pita* dans la nature peut indiquer que les souches où *Avr-pita* reste fonctionnel tout en n'étant plus reconnu par la plante sont favorisées. De plus, *Avr-pita* n'est exprimé que pendant l'infection, principalement pendant la phase de colonisation, ce qui indique que ce gène pourrait avoir un rôle dans le pouvoir pathogène.

☼ *Le point sur le clonage des autres gènes de résistance du riz*

En dehors de *Pi-ta*, un autre gène de résistance du riz à *M. grisea* a été cloné. Il s'agit de *Pi-b*, codant pour une protéine de type NBS-LRR (Wang *et al.*, 1999). Ce gène se trouve dans une région hypervariable du génome. L'allèle résistant porte, en plus de *Pi-b*, une séquence

homologue nommée *Pib'*. L'étude d'un allèle sensible montre un seul homologue à *Pib*, non codant, nommé *Pib''*.

Actuellement, différentes équipes sont en voie de cloner d'autres gènes de résistance à la pyriculariose. Giufu *et al.* (2002) ont obtenu une cartographie physique des deux gènes fortement liés *Pi9(t)* et *Pi2(t)*, ainsi que la séquence de la région. Sur 100 kpb environ, 6 séquences NBS-LRR ont été trouvées. La zone où se trouve le gène de résistance *Pi-CO39* a été séquencée chez la variété CO39 (résistante) et comparée avec la séquence obtenue dans le cadre du séquençage de la variété Nipponbare (Leong *et al.*, 2002). Là encore, les loci révèlent une organisation complexe de répétitions en tandems de séquences NBS-LRR. Quatre de ces gènes ont été trouvés chez CO39 et 16 chez Nipponbare. Enfin, le gène *Pi3* (= *Pi5*) a été cartographié physiquement à l'aide d'une banque TAC* de la lignée portant ce gène. Le séquençage des TAC de la zone a révélé trois séquences de type NBS-LRR (Jeon *et al.*, 2002).

Les gènes de résistance du riz à la pyriculariose seraient donc principalement des gènes de type NBS-LRR, contrairement aux gènes de résistance de la tomate à *C. fulvum*. Cela pourrait être mis en corrélation avec le fait que *C. fulvum* a un développement intercellulaire, tandis que celui de *M. grisea*, à la fois inter et intracellulaire, commence par la pénétration, à travers la cuticule, à l'intérieur d'une cellule. Les facteurs d'avirulence de *C. fulvum* resteraient à l'extérieur des cellules, agiraient sur les membranes et seraient détectés à ce niveau. Ceux de *M. grisea* seraient détectés dans la première cellule attaquée par l'organisme pathogène par des protéines de résistance cytoplasmiques.

L'étude d'une séquence « whole shotgun » du riz montre que les gènes de résistance y sont plus nombreux que chez *A. thaliana*. On trouve environ 600 séquences de type NBS-LRR, et 450 séquences de type LRR-TM. Une moitié de ces séquences comporte aussi un domaine kinase (comme *Xa21*), et l'autre non (comme les gènes *CfX*) (Goff *et al.*, 2002).

III) Objectifs de cette thèse

Bien que de nombreux travaux de clonages de gènes de résistance du riz à la pyriculariose soient en cours, le nombre de gènes actuellement clonés est faible, alors que le riz et l'agent de la pyriculariose, *M. grisea* sont des organismes modèles, et que le séquençage

* TAC : Transferable Artificial Chromosome. Vecteur portant un large insert (> 80 kpb) pouvant être directement utilisé pour la transformation végétale par *A. tumefaciens*.

de leurs deux génomes est en cours. Ce paradoxe peut s'expliquer par le fait qu'un tel séquençage ne se fait de façon exhaustive que pour un nombre limité de génomes, alors que les gènes d'avirulence et de résistance proviennent de l'ensemble de la diversité génétique des espèces considérées.

L'objet d'étude de cette thèse est un gène de résistance du riz, *Pi-33*, qui correspond au gène d'avirulence *ACE1* (anciennement *AvrIrat 7*, Böhnert *et al.*, 2000).

1) Le gène d'avirulence *ACE1*

a) Structure du gène

La grande majorité des gènes d'avirulence fongiques clonés à ce jour codent pour des petits peptides qui seraient excrétés puis seraient reconnus par la protéine codée par le gène de résistance correspondant (tableau A6). L'une des exceptions à ce modèle est le gène d'avirulence *ACE1*, cloné par H. Böhnert (2000) au sein de l'équipe de M. H. Lebrun. Ce gène code pour une très grosse protéine (4035 a.a.) qui présente des structures typiques d'un domaine polykétide synthétase (PKS) et d'un domaine peptide synthétase non ribosomal (nonribosomal peptide synthase, NRPS). La séquence de *ACE1* est proche de celle du gène *LNKS* d'*Aspergillus terreus* impliquée dans la synthèse de la lovastatine bien que seul *ACE1* possède un domaine NRPS. Bien que certaines d'entre elles aient un rôle dans la pathogénie (pour revue, Yoder *et al.*, 1998), aucune des polykétides synthétases fongiques étudiées à ce jour ne semble être sécrétée. Par ailleurs, aucune signature de sécrétion dans le gène *ACE1* n'a été trouvée et des expériences de fusion avec un rapporteur GFP ont montré que la protéine *ACE1* se trouve dans le cytoplasme des appressoria et des hyphes infectieux primaires (Böhnert, 2001). L'hypothèse actuellement avancée est que l'enzyme codée par *ACE1* catalyserait la synthèse d'un petit métabolite secondaire qui serait excrété, puis reconnu par une protéine de résistance du riz. De plus, des expériences de mutation dirigée sur les sites enzymatiques de *ACE1* ont montré que l'activité enzymatique de *ACE1* est nécessaire à l'avirulence (Böhnert *et al.*, 2002). Cette situation rappelle celle d'un gène d'avirulence bactérien, *AvrD* dont le produit provoque la synthèse de syringolides induisant la HR chez les lignées de soja portant le gène de résistance *Rpg4* (Keen *et al.*, 1990 ; Smith *et al.*, 1993 ; Yucel *et al.*, 1994).

b) Diversité et rôle de *ACE1* dans le pouvoir pathogène

L'importance de *ACE1* dans la pathogénie n'a pas encore été clairement identifiée. Cette protéine est synthétisée uniquement dans le cytoplasme des appressoria avant la pénétration. Le maximum d'expression du gène *ACE1* se situe 24h après inoculation, et semble lié à la capacité de l'appressorium à développer une forte pression et à pénétrer dans la plante (Fudal *et al.*, 2002). Cependant, la délétion de *ACE1*, n'a pas mis en évidence de perte d'agressivité mesurable (Tharreau, com. pers.).

Dans la nature, tous les isolats avirulents possèdent le même allèle de *ACE1* (nommé *Guy-ACE1*). Des isolats virulents ont été découverts en Colombie, au Brésil, en Inde, en Chine, au Cameroun et aux Philippines. La plupart de ces isolats virulents appartiennent à un même groupe d'isolats proches génétiquement provenant probablement d'un évènement unique situé en Asie. Ils se sont ensuite répandus dans les autres zones de culture du riz. Ces isolats possèdent une diploïdisation partielle au niveau de *ACE1*. Ils possèdent un allèle de *ACE-1* proche de l'allèle avirulent (*Guy-ACE1*) et un autre allèle (*CM28-ACE1*), qui diverge de *Guy-ACE1* de 12 % au niveau nucléotidique. Ce taux de divergence est très supérieur à celui noté chez les allèles des autres gènes de *M. grisea* (<1 %). Certains isolats virulents de cette même classe dérivent des premiers par une nouvelle haploïdisation et ne possèdent que l'allèle *CM28-ACE1* (Böhnert *et al.*, 2002).

2) Pourquoi étudier *Pi-33* ?

a) Etude de l'interaction

Actuellement, peu de couples gène d'avirulence fongique / gène de résistance sont caractérisés. De plus, la majorité de ces couples provient de l'interaction *Cladosporium fulvum* / *Lycopersicon esculentum*. En dehors de ce modèle, un seul couple gène de résistance / gène d'avirulence fongique a été entièrement caractérisé (*Pi-ta* / *Avrpita*). Le gène *ACE1* ayant été cloné, le clonage de *Pi33* devient plus intéressant que celui d'un autre gène de résistance, car cela aboutirait à la connaissance d'un second couple gène d'avirulence fongique / gène de résistance chez les monocotylédones. De plus, le gène d'avirulence *ACE1* ne présente pas les caractéristiques d'un gène d'avirulence fongique classique. En particulier, la protéine *ACE1* n'est pas sécrétée par *M. grisea*. Elle n'est donc pas susceptible d'être

reconnue directement par une protéine NBS-LRR cytoplasmique. Il se pourrait donc que *Pi33* ait des caractéristiques originales pour un gène de résistance.

☉ Récepteur ou protecteur ?

Actuellement, deux hypothèses ont été formulées concernant le fonctionnement des protéines de résistance. Dans la première hypothèse, celle du récepteur formulée par Staskawicz *et al.* (1995), l'interaction entre la protéine de résistance et le facteur d'avirulence induit la HR. Dans celle du protecteur (Dangl & Jones, 2001), la protéine de résistance réagit à un changement de conformation d'une autre protéine de la plante dû à l'action du facteur d'avirulence.

Si *Pi33* code pour une protéine ayant un domaine LRR, typique des interactions protéine – protéine, alors il est possible de supposer qu'elle interagisse avec une autre protéine, affectée par la petite molécule synthétisée par *ACE1* (hypothèse du protecteur). En revanche, si *Pi33* code pour une protéine non-LRR, il se peut que cette protéine détecte directement la présence de ce composé (hypothèse du récepteur).

☉ Structure d'un locus de résistance

Actuellement, une grande quantité de séquences est disponible chez le riz. L'étude de la séquence au niveau du locus de *Pi33* permettra de connaître, dans le cas précis de ce gène, la structure du génome au niveau d'un gène de résistance du riz.

b) Un gène de résistance intéressant pour le sélectionneur

La cartographie du gène de résistance *Pi33* permettra de réaliser une sonde ou d'identifier des marqueurs proches à l'aide desquels il pourra être introgressé dans de nouvelles variétés par Sélection Assistée par Marqueurs (SAM). En effet, ce gène confère un large spectre de résistance aux souches de *M. grisea*. La combinaison avec les autres gènes de résistance spécifiques *Pi1* et *Pi2* semble exclure toutes les souches testées à ce jour. Cette combinaison pourrait permettre d'obtenir une résistance durable du riz à la pyriculariose.

3) Objectifs et stratégie employée

a) **Clonage d'un gène de résistance (Figure A8)**

☼ *Cartographie fine*

La stratégie mise en place a d'abord été de caractériser et de cartographier finement le gène de résistance *Pi33*. Pour cela nous avons utilisé les couples de souches isogéniques réalisés au cours des travaux de clonage de *ACE1*. En effet, des souches virulentes avaient été transformées avec *ACE1* afin de prouver qu'il conférait l'avirulence. L'utilisation de ces souches transformées en parallèle avec leurs parentes sauvages permet une caractérisation de la présence du gène de résistance correspondant à *ACE1*. Les plantes sensibles à la souche sauvage et résistantes à la souche transformée portent *Pi33*, le gène correspondant à *ACE-1*. Ensuite, nous avons utilisé une importante population de lignées HD IR64 × Azucena afin de cartographier finement *Pi33*.

☼ *Cartographie physique*

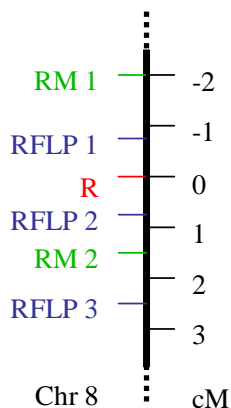
Après la cartographie fine, nous avons réalisé une cartographie physique du locus de *Pi-33*. Pour cela, nous avons utilisé la banque de la variété de riz Nipponbare, à partir de laquelle une carte physique du génome du riz a été réalisée par Chen *et al.* (2002). L'utilisation de cette banque partiellement ordonnée en contigs permet une cartographie physique plus rapide. Cependant, la variété Nipponbare ne contient pas l'allèle résistant de *Pi33*. Cette cartographie physique dans Nipponbare a donc servi ensuite de point de départ pour une cartographie physique dans IR64, qui possède le gène de résistance *Pi-33*, mais pour laquelle les contigs ne sont pas disponibles.

☼ *Validation par un test de complémentation, étude de séquences*

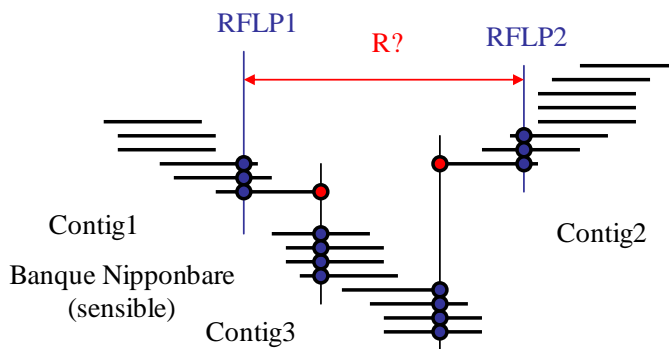
La cartographie physique de *Pi33* dans la banque de IR64 a permis de sélectionner un certain nombre de clones BAC susceptibles de porter ce gène de résistance. Afin de vérifier la présence de *Pi33* dans l'un au moins de ces clones BAC, nous avons décidé de transformer du riz de la variété Kassalath, ne portant pas *Pi33*, avec ces clones BAC. L'acquisition de la résistance vis-à-vis de souches de l'agent pathogène portant *ACE1* serait alors la signature de la présence du gène.

Figure A8 : La stratégie de clonage positionnel mise en place au cours de cette thèse

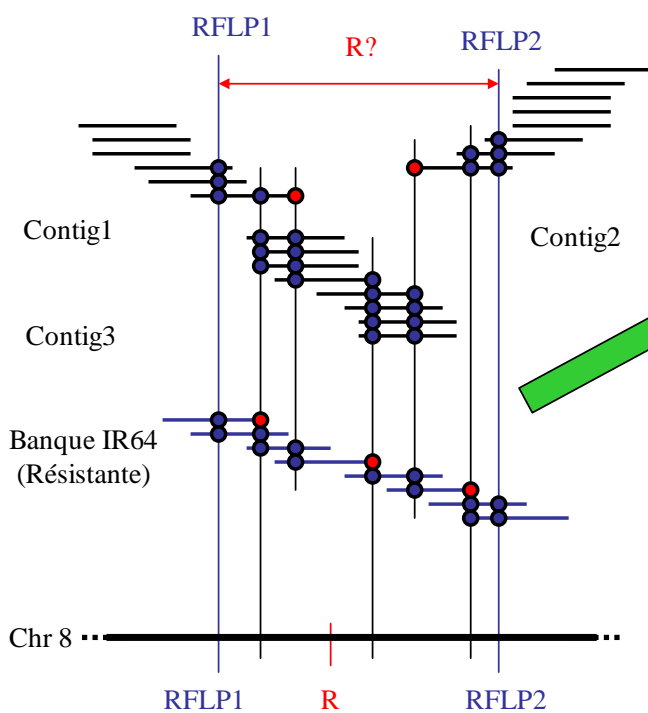
1) Cartographie : positionnement de marqueurs proches



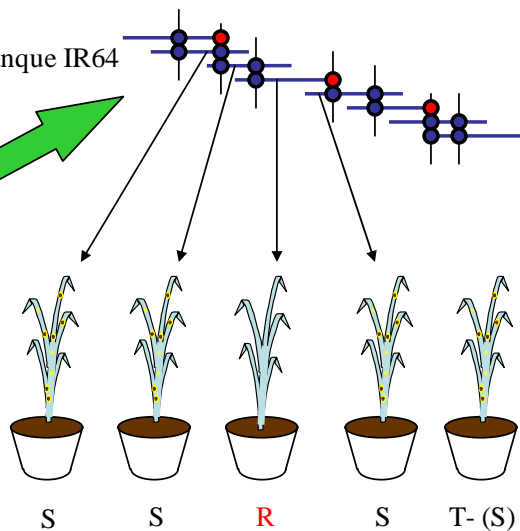
2) Hybridation sur banque BAC, marche chromosomique:



3) changement de banque, cartographie des nouvelles sondes



4) validation de la cartographie physique par un test de complémentation



Parallèlement, l'avancement des travaux de séquençage nous a permis, au moins pour la variété Nipponbare, d'étudier la séquence de la zone où se trouve *Pi33* afin d'y rechercher des séquences analogues à des gènes de résistance.

b) Caractérisation de *Pi33* comme nouveau gène de résistance.

Nous nous sommes proposés, en plus de sa cartographie et de son clonage, de caractériser plus précisément le gène de résistance *Pi33*. En particulier, nous avons étudié son caractère dominant ou récessif en utilisant des lignées F_1 et F_2 du croisement IR64 \times Azucena. De plus, nous nous sommes intéressés à l'origine de ce gène, et à sa répartition parmi les différentes variétés de riz. Pour cela, nous avons recherché ce gène et étudié le polymorphisme génétique au niveau de son locus chez les variétés parentes de IR64, ainsi que dans un ensemble de variétés et de lignées, dont des lignées différentielles possédant différents gènes de résistance connus.

*

*

*

MATERIELS ET METHODES

I) Matériels

1) Matériel fongique

La caractérisation et la cartographie du gène *Pi33* reposent sur l'utilisation de couples de souches isogéniques. Dans ces couples, une des souches est virulente et ne contient pas l'allèle avirulent du gène *ACE-1*. L'autre est issue de la complémentation de la première par le cosmide D31C12, contenant le gène *ACE-1* (Böhnert *et al.*, 2001). En conséquence, cette souche est avirulente sur les variétés contenant *Pi33*, et ces deux souches sont considérées comme isogéniques au gène d'avirulence près. En effet, Böhnert *et al.* (2001) ont montré que *ACE1* est suffisant pour compléter les souches virulentes de *M. grisea*.

Quatre souches virulentes ont été ainsi complémentées par l'équipe de M-H Lebrun : la souche CM28 originaire du Cameroun, les souches PH14 et PH19 originaires des Philippines, et la souche 2/0/3, issue d'un croisement réalisé au laboratoire. Les souches transformées correspondantes, CM28-D31C12, PH14-D31C12, PH19-D31C12, et 2/0/3-D31C12 sont avirulentes sur les variétés de riz contenant *Pi33*.

2) Matériel végétal

a) Variétés de riz

Le terme « variété traditionnelle » est appliqué aux variétés de riz dont la généalogie n'est pas connue.

Parents des croisements utilisés dans cette étude

- IR64 est une variété améliorée de riz *indica* demi-nain obtenue à l'IRRI. La généalogie de cette variété est montrée figure B1.
- Azucena est une variété *japonica* tropicale traditionnelle utilisée en culture pluviale aux Philippines. Sa généalogie n'est pas connue.

- Bala est une variété de type Aus de l'est de l'Inde (Price & Tomos, 1997). Bala est issue du croisement entre une variété locale Aus (N22) et Taichung Native 1 (Chaudary & Rao, 1982). Sa généalogie est indiquée figure B2.
- ZYQ8 (Zhai Ye Qing 8) est une variété chinoise de type *indica* qui porte le gène de résistance *Pi-11(t)* (Zhu *et al.*, 1993). Sa généalogie est indiquée figure B2.
- JX17 (Hing Xi 17) est une variété *Japonica* originaire de Chine qui a été utilisée en croisement avec ZYQ8 pour cartographier *Pi-11(t)* (Zhu *et al.*, 1993).

Les Parents de IR64

Il a été possible d'obtenir la généalogie de la variété IR64 sur la base de données IRIS*. A partir de cette généalogie, un ensemble de lignées et de variétés parentes de IR64 ont pu être obtenues. Elles sont détaillées dans le tableau B1.

Autres variétés

Un certain nombre d'autres variétés et lignées du riz ont été utilisées au cours de cette étude. Le tableau B2 et les figures B3 et B4 présentent un certain nombre de données sur ces variétés. Parmi elles, on trouve un ensemble de variétés différentielles japonaises basé sur celui établi par Kiyosawa (1984) (figure B3), ainsi qu'un ensemble de lignées différentielles obtenues à l'IRRI par Mackill & Bonman (1992)**. On trouve aussi la variété Nipponbare, qui est utilisée comme modèle génétique, en particulier pour le séquençage du riz.

b) Lignées IR64 × Azucena

Cent cinq des lignées haploïdes doublées (HD) issues d'une F₁ IR64 × Azucena réalisées à l'IRRI (Guiderdoni *et al.*, 1992) furent utilisées dans cette étude. IR64 porte l'allèle résistant du gène *Pi33*, Azucena l'allèle sensible. Le gène *Pi33* a donc pu être cartographié sur ces lignées (Tharreau *et al.*, 2000 (sous le nom de *Pi-Irat7-1*)). De plus, 500 lignées HD et 284 lignées *single seed descent* (SSD) IR64 × Azucena ont été produites dans le cadre du projet EGRAM***. Ces lignées ont été caractérisées pour différents marqueurs

* International Rice information system : <http://www.iris.irri.org/>

** Ces lignées furent obtenues en introgressant par backcross (BC₆F₃) des résistances provenant de 4 variétés : LAC23, Tetep, Pai-Kan-Tao et 5173 dans une variété sensible : CO39 (Mackill & Bonman, 1992).

*** European comparative GRAMineae Mapping programme.

Tableau B1: Lignées parentes de IR64

Variété / lignée	Origine des semences ⁽¹⁾	N° IRGC ⁽²⁾	Notes ⁽³⁾
Benong	IRRI	13530	Isolée en Indonésie
Bluebonnet	IRRI	6310	USA, 1944
BPI76	IRRI	39	Lignée IRRI, 1968
BPI121-407	IRRI	1576	Lignée IRRI, 1972
Century patna 231	IRRI	6227	USA, 1954
Chow-Sung	IRRI	2171	Corée
Cina	IRRI	17435	Isolée en Indonésie
CO18	IRRI	6331	Inde
CPSLO17	IRRI	76301	1966, IRRI
Dee Geo Woo Gen	IRRI	123	Variant demi-nain, Taiwan (< 1949)
Fortuna	IRRI	6308	Isolée d'une variété traditionnelle (Pa Chiam) Taiwan, 1905
Gam-Pai-15	IRRI	831	Thaïlande
Geb 24	IRRI	5909	Variant naturel issu de Kichilli samba en Inde.
IR8	IRRI / CIRAD	66395	Lignée IRRI. En 1966, distribué comme cultivar
IR22	IRRI	11356	Lignée IRRI
IR24	IRRI / CIRAD	19907	Lignée IRRI. En 1971, distribué comme cultivar en Asie et en Afrique.
IR64	IRRI	66970	Lignée IRRI, 1985. Distribué à partir de 1986 dans différents pays d'Asie et d'Afrique.
IR95-23-1-1-3*	IRRI	10943	Lignée IRRI
IR262-43-8-11	IRRI	10947	En 1971, distribuée comme cultivar au Sri Lanka.
IR579-48-1-2 (Nilo 11)	IRRI	11371	En 1971, distribuée comme cultivar au Salvador.
IR773 A 1-36-2-1	IRRI	11374	Lignée IRRI, 1969
IR747B2-6-3-3-1	IRRI	32922	Lignée IRRI
IR1006-28-6-1-1*	IRRI	16319	Lignée IRRI
IR1416-131-5	IRRI	32607	En 1971, distribuée comme cultivar au Liberia sous le nom "Suakoko 12".
IR1614-138-1-3*	IRRI	32629	Lignée IRRI
IR1614-389-1-1*	IRRI	32630	Lignée IRRI
IR1704-32-3*	IRRI	32640	Lignée IRRI
IR1704-13-3-3-2*	IRRI	32641	Lignée IRRI
IR1721-11-6-8-3-2*	IRRI	32643	Lignée IRRI
IR1721-11-13-25-2-3*	IRRI	32644	Lignée IRRI
IR1737-19-7-8-3*	IRRI	32645	Lignée IRRI
IR1833-369-1-4*	IRRI	32662	Lignée IRRI

Tableau B1 (suite)

Variété / lignée	Origine des semences ⁽¹⁾	N° IRGC ⁽²⁾	Notes ⁽³⁾
IR5657-33-2	IRRI	77992	Lignée IRRI
Kichilli Samba	IRRI	49796	Isolée en Inde
Latisail	IRRI	4803	Isolée en Inde (Ouest bengale)
Mudgo	IRRI	6663	Isolée en Inde (région de Goa) (<1962)
NMS4	IRRI	172	Isolée en taïlande de Nahng Mon 1950
<i>O. nivara</i>	IRRI	101508	Isolée en Inde
Peta	IRRI	35	Isolée en indonésie en 1949
Rexoro	IRRI	143	Isolée en 1928 de Marong Paroc, Philippines, 1911.
Seraup Besar 15	IRRI	14468	Isolée en Malaisie
Sigadis	IRRI	611	Isolée en Indonésie, 1955
SLO17	IRRI	637	Isolée en Inde
Tadukan	IRRI	9804	Isolée aux Philippines
Taichung Native 1	IRRI / CIRAD	105	Taiwan, 1961
Tetep	IRRI	32576	Isolée au Viet-Nam, 1962
Texas Patna	IRRI	144	USA, 1942
TKM 6	IRRI	237	Inde, 1961
Tsai Yuan Chung	IRRI	126	Taiwan (<1949)

(1) IRRI : semences obtenues auprès du Genetic Resources Center (GRC) à l'IRRI. Il est possible d'obtenir des semences à l'adresse <http://www.irri.org/GRC/requests/requests.html>. CIRAD : semences multipliées au CIRAD avant le début de ces travaux.

(2) IRGC : International Rice Genetic Center.

(3) L'année indiquée est soit la plus ancienne année où cette variété est mentionnée dans la base de l'IRIS, soit l'année où cette lignée est utilisée dans un croisement. Dans ce dernier cas, elle est indiquée entre parenthèse, précédée du signe <. IR64 est issu d'une lignée issue d'un croisement ayant eu lieu en 1974 et de l'un des parents de cette lignée. Toutes les lignées et variétés de ce tableau ont donc été obtenues ou isolées avant 1974.

* indique une lignée issue d'un parent de IR64 par autofécondation

Figure B1 : Généalogie d'IR64 et de ses parents

Figure B1a: généalogie d'IR64

			cf. fig. B1b	IR8	IR1103-15-							
			?	Show Sung	8-4-2-2-3							
			cf. fig. B1b	IR8								
		?	<i>Fortuna**</i>	<i>BPI76</i>	IR1163-124-1-3		IR1870					
?			<i>Seraup Besar 15</i>	<i>IR1006</i>								
			cf. fig. B1b	IR8								
			cf. fig. B1b	IR8	IR22							
			?	<i>Tadukan</i>			IR1614					
			cf. fig. B1b	IR8	IR1402							
			?	<i>Mudgo</i>								
				*	<i>IR773A-1-36-2-1</i>							
				*	<i>IR773A-1-36-2-1</i>							
			*	<i>IR773A-1-36-2-1</i>								
cf. fig. B1b	cf. fig. B1b	IR8	<i>IR773A-1-36-2-1</i>	IR773A-1-36-2-1/O nivara	IR1915-B		IR1916					
?	<i>CP SLO 17</i>	IR238-28-3	?	<i>O. nivara</i> (ID3907)								
?	<i>NMS 4***</i>	2										
			?									
				?	<i>Fortuna**</i>		<i>BPI-121-407</i>					
				?	<i>Seraup Besar 15</i>							
			cf. fig. B1b	<i>Peta</i>	IR400-28-45		IR1416-131-5					
cf. fig. B1b				<i>Peta</i>			IR1833					
*				<i>IR95</i>								
				?	<i>Tetep</i>							
			cf. fig. B1b	IR8	IR22							
			?	<i>Tadukan</i>								
			cf. fig. B1b	<i>Peta</i>								
	cf. fig. B1b	<i>Peta</i>			IR262-43-8-11		IR833-6-2-1-1					
cf. fig. B1b	<i>Taichung Native 1</i>	IR86			IR95							
cf. fig. B1b												
				?	<i>Gam-Pai-15</i>							
			cf. fig. B1b	IR8	<i>IR579-48-1-2</i>							
			?	<i>Tadukan</i>								
				<i>CO18</i>	TKM 6		IR1561-149-1					
			?	<i>GEB24*</i>								
?				<i>CO18</i>	IR747-B2-6-3							
?				<i>GEB24*</i>								
	cf. fig. B1b	<i>Taichung Native 1</i>		IR746-A								
							IR2040					
			cf. fig. B1b	IR24								
			cf. fig. B1b	IR24								
cf. fig. B1b	<i>IR24</i>				IR1721		IR1737					
	<i>O. nivara</i> (IRGC 101508)	IR1641		<i>IR1704</i>								
?												
						*						
							IR2061-465-1-4					

* isolée de Kichili Samba. ** isolée de Pa-Chiam. ***Isolée de Nanhng-Mon

Figure B1b: généalogie de IR8, Sigadis, CPSLO 17, IR24, Peta et Taichung Native 1

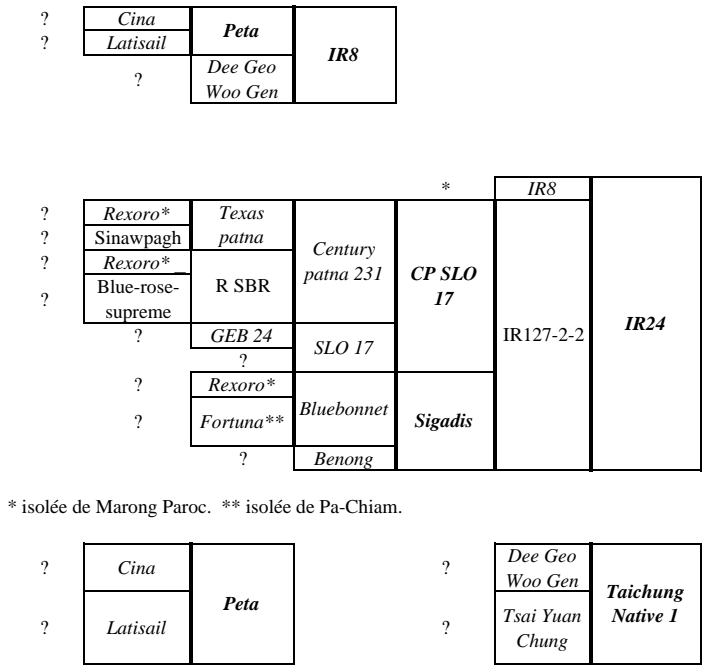


Figure B1c: légende des généalogies

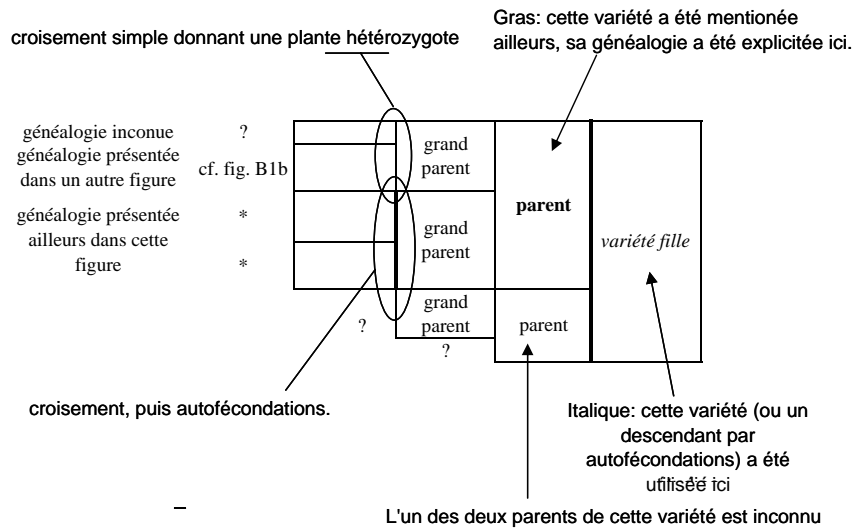


Tableau B2: Les autres lignées utilisées

Variété / lignée	Origine des semences ⁽¹⁾	N° IRGC ⁽²⁾	Notes ⁽³⁾
Variétés différentielles japonaises (Kiyosawa 1984)			
Fukunishiki	CIRAD	40257	Obtenu au Japon en 1969
K1	CIRAD	40254	Obtenu en Inde en 1969
K59	CIRAD	40261	Obtenu en Inde en 1969
K60	CIRAD	36112	Obtenu en Inde (<1976)
Kanto51	CIRAD		Obtenu au Japon en 1955
Norin 22	CIRAD	10905	Obtenu au Japon
Pi-n°4	CIRAD		Obtenu au Japon en 1961
Reiho	CIRAD	40025	Obtenu au Japon en 1975
Shin 2	CIRAD	7661	Obtenu au Japon (<1978)
St1	CIRAD	30329	Obtenu au Japon
Toride 1	CIRAD	40260	Obtenu au Japon en 1969
Tsuyuake	CIRAD	40262	Obtenu au Japon
Zenith	CIRAD	10655	Obtenu au Japon
Lignées différentielles obtenues à l'IRRI ⁽⁴⁾ (Mackill & Bonman, 1992)			
C101LAC	CIRAD		Parent donneur : LAC23, Parent récurrent : CO39
C104LAC	CIRAD		Parent donneur : LAC23, Parent récurrent : CO39
C103TTP	CIRAD		Parent donneur : Tetep, Parent récurrent : CO39
C101A51	CIRAD		Parent donneur : 5173, Parent récurrent : CO39
C102A51	CIRAD		Parent donneur : 5173, Parent récurrent : CO39
C105TTP-4 (L-23)	CIRAD		Parent donneur : Tetep, Parent récurrent : CO39
C101PKT	CIRAD		Parent donneur : Pai-Kan-Tao, Parent récurrent : CO39
C101TTP-3	CIRAD		Parent donneur : Tetep, Parent récurrent : CO39
C105TTP-1	CIRAD		Parent donneur : Tetep, Parent récurrent : CO39
C105TTP-2 (L-9)	CIRAD		Parent donneur : Tetep, Parent récurrent : CO39
C104PKT	CIRAD		Parent donneur : Pai-Kan-Tao, Parent récurrent : CO39
C105TTP-2 (L23)	CIRAD		Parent donneur : Tetep, Parent récurrent : CO39
Autres variétés			
Azucena	IRRI / CIRAD	328	Isolée à Palawan (Philippines)
Bala	IRRI / CIRAD	12884	Obtenu en Inde en 1972.
BW100	CIRAD	50657	
C4-63	IRRI	11352	Obtenu à l'IRRI en 1960
Carreon	CIRAD	5993	Isolée aux Philippines
CI 5173	IRRI	3971	

Tableau B2 (suite)

Variété / lignée	Origine des semences ⁽¹⁾	N° IRGC ⁽²⁾	Notes ⁽³⁾
CO39	CIRAD	51231	Obtenu en Inde (<1987)
DJ8-341	CIRAD		Variété distribuée en Côte d'Ivoire
IR1529	CIRAD		Obtenu à l'IRRI
IR36	CIRAD	39292	Obtenu à l'IRRI. Distribuée en Chine (1976)
IR5	CIRAD	10321	Obtenu en 1976 à l'IRRI
IR64	IRRI / CIRAD	66970	Obtenu en 1985 à l'IRRI.
IR72	CIRAD	76330	Obtenu à l'IRRI en 1981.
Irat13	CIRAD	28508	
Irat7	CIRAD		
JX17	Zhu		Isolée en Chine
Kassalath	CIRAD		
Lac23	CIRAD	14957	Isolée au Liberia (1972)
Maratelli	CIRAD	3091	Isolée en Chine, distribuée en Italie (<1947)
Moroberekan	CIRAD	12048	
Nipponbare	CIRAD		Obtenu au Japon (1988?)
Pai-Kan-Tao	IRRI	32570	Isolée à Taiwan en 1962.
Sinampaga	IRRI	3966	Isolée en 1916 de sinawpagh (Bulakan, Phillipines)
ZYQ8	Zhu		Obtenu en Chine (Guandong Acad. Agric. And Sci.) en 1972. Porte le gène de résistance <i>Pi11</i> (t)

(1) IRRI : semences obtenues auprès du Genetic Resources Center (GRC) à l'IRRI. Il est possible d'obtenir des semences à l'adresse <http://www.irri.org/GRC/requests/requests.html>. CIRAD : semences multipliées au CIRAD avant le début de ces travaux. Zhu : Semences obtenues auprès du Pr Liwang Zhu.

(2) IRGC : International Rice Genetic Center.

(3) L'année indiquée est: soit la plus ancienne année où cette variété est mentionnée dans la base de l'IRIS, soit l'année où cette lignée est utilisée dans un croisement. Dans ce dernier cas, elle est indiquée entre parenthèse, précédée du signe <.

(4) Ces lignées furent obtenues selon un plan de sélection de type BC_6F_3

Figure B2 : Généalogies de Bala et ZYQ8

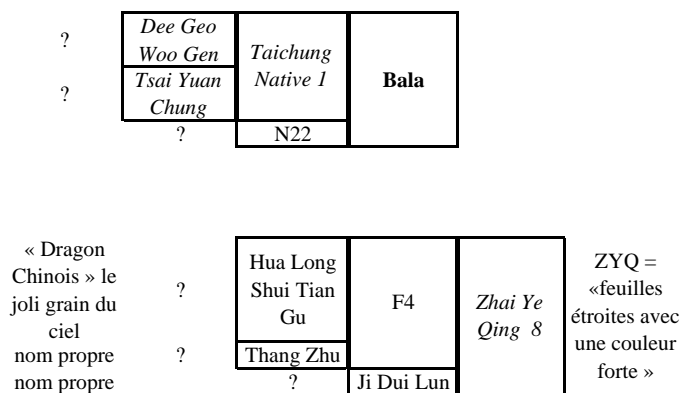


Figure B3 : Généalogies des variétés différentielles japonaises

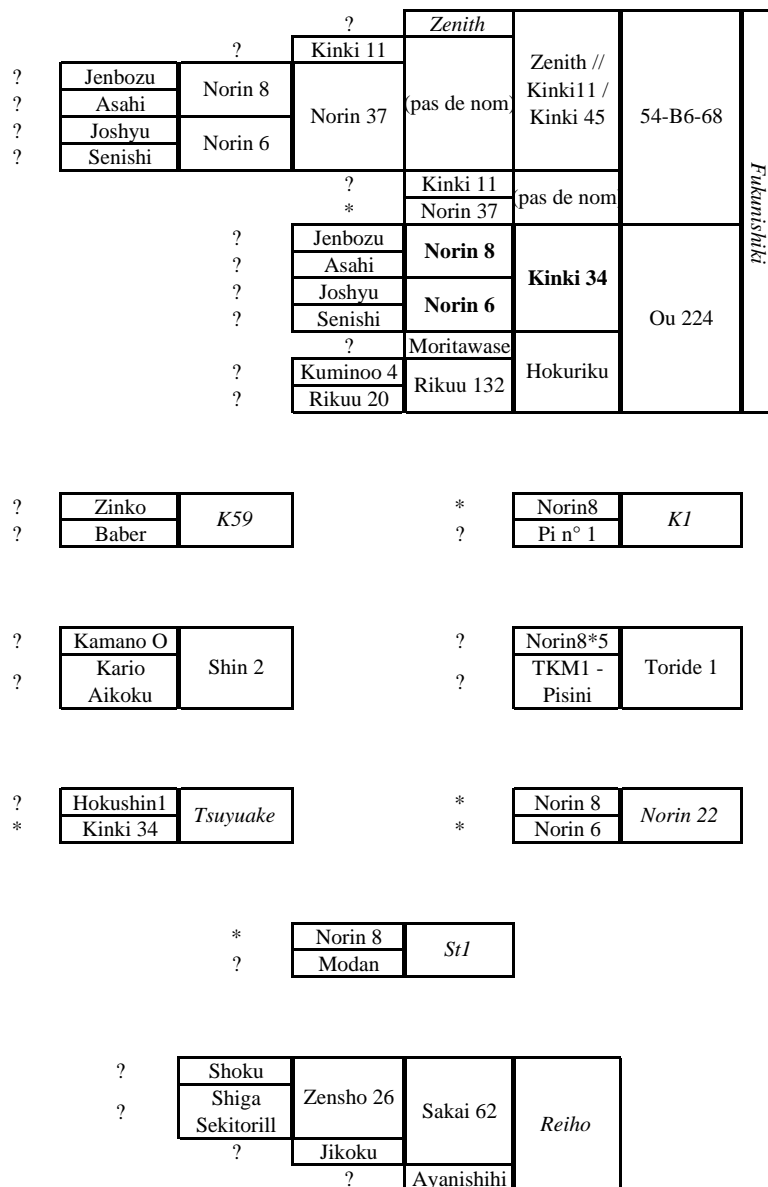
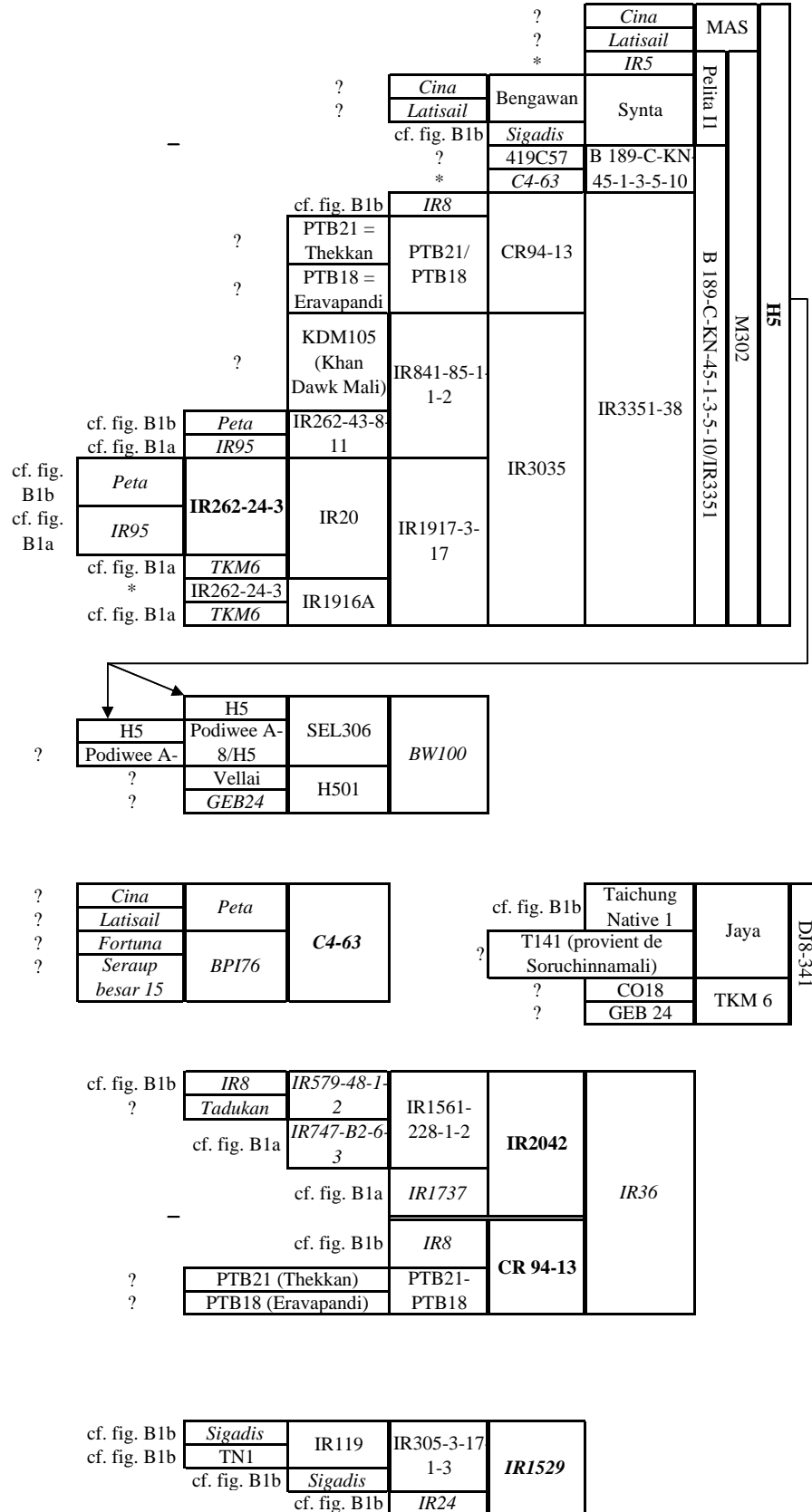


Figure B4 : Généalogies des autres variétés



microsatellites, dont deux, RM44 et RM72, encadrent *Pi33*. Sur ces 784 lignées, 767 ont été caractérisées pour RM44 et RM72. Sept de ces lignées présentent un allèle non parental pour l'un au moins de ces marqueurs. Sept cent soixante lignées sont donc utilisables dans cette étude. Soixante-dix-huit de ces lignées sont recombinantes entre RM44 et RM72, soit une distance de 10,3 cM. Des graines ont pu être obtenues pour 69 de ces lignées.

c) Lignées JX17 × ZYQ8

Le gène de résistance *Pi11(t)* a été cartographié par Zhu *et al.* (1993) sur un croisement JX17 × ZYQ8. Afin de réaliser un test d'allélisme, 52 lignées HD qui furent utilisées pour cartographier *Pi11(t)* ont été obtenues dans le cadre de notre collaboration avec l'Institut de Génétique de l'Académie des Sciences de Chine à Pékin., auprès du Pr. Zhu Lihuang.

3) Banques génomiques

a) Banque de clones YAC de la variété Nipponbare du riz

Une Banque YAC (Yeast Artificial Chromosome) du riz a été créée au RGP (Saji *et al.*, 2001). Une carte physique du riz a été réalisée à partir de cette banque en utilisant 1439 marqueurs de la carte à haute densité Nipponbare × Kassalath (Kurata *et al.*, 1994 ; Harushima *et al.*, 1998 ; RGP, 2000). Elle couvre 63% du génome.

b) Banques BAC

Différentes banques BAC du riz sont disponibles (tableau B3). La banque de la variété Nipponbare présente l'avantage d'être ordonnée en contigs, ce qui permet une marche plus rapide. Cependant, cette variété ne possède pas l'allèle résistant de *Pi33*. En revanche, si la variété IR64 possède cet allèle, la banque génomique de cette variété (OSIIBb, tableau B3) n'est pas ordonnée.

c) Contigs de la banque Nipponbare (OSJNBa)

Il est possible d'ordonner une banque BAC par étude des profils de restriction des clones qui la composent. Pour chacun des clones, ce profil est comparé avec ceux de tous les autres clones de la banque. Lorsque les profils de restriction de deux clones sont très proches, on peut supposer que ces deux clones proviennent de la même région du génome, où ils ont un fort taux de recouvrement. Il est ainsi possible de relier, de proche en proche, un nombre

de plus en plus grand de clones qui forment ce que l'on appelle un contig : une construction virtuelle où chaque clone est positionné par rapport aux autres, et qui représente une région du génome plus grande que celle recouverte par un seul clone. Le risque d'erreur que l'on prend en faisant une telle construction peut être modulé par la mesure d'un score de ressemblance entre profils de restriction. Plus on accepte une ressemblance faible, plus ce risque est grand. Plus il est fort, moins on pourra relier de clones, et moins les contigs seront étendus.

De tels contigs ont été réalisés à l'université de Clemson à partir des clones des banques OSJNBa et OSJNBb. Ces contigs sont disponibles sur Internet^{*}, et il est possible de connaître, à partir des clones BAC s'hybridant avec une sonde donnée, dans quel contig ils se trouvent. Cela permet de réaliser une marche chromosomique non de BAC en BAC, mais de contig en contig.

Les travaux d'hybridation qui ont été réalisés depuis sur ces banques par de nombreuses équipes de par le monde ont permis de réaliser de nouveaux contigs, plus longs, mais aussi de les placer sur les chromosomes du riz. Ces nouveaux contigs sont disponibles depuis le mois d'octobre 2001 et sont régulièrement mis à jour^{**} (Chen *et al.*, 2002). Ils sont numérotés indépendamment des contigs précédemment publiés. En s'inspirant des programmes permettant de les visualiser, ces nouveaux contigs seront nommés « contigs FPC », les anciens « contigs PDF ». Dans le texte et les figures, un numéro de contig donné sans plus de précision est un numéro de contig PDF.

* *CUGI contig viewer* : http://www.genome.clemson.edu/tools/contig_viewer/index.html

** *CUGI Rice FPC Map* (Dernière version : octobre 2002) : <http://www.genome.arizona.edu/fpc/rice/>

Tableau B3 : Banques BAC du riz disponibles au laboratoire

Banque	Variété	Nombre de clones	Longueur moyenne des clones (kpb)	Taux de couverture du génome	Disponible	Membranes disponibles (nombre)	Ordonnée en contigs
OSJNBa	Nipponbare	36000	120	11 ×	O	O (14)	O
OSJNBb	Nipponbare	45000	135	15 ×	N ⁽¹⁾	O (2)	O
OSIIBb	IR64	18000	100	4,5 ×	N ⁽¹⁾	O (10)	N
AZU	Azucena	36000	110	10 ×	O	O (5)	N

(1) Il est possible de se procurer des clones de cette banque auprès de l'université de Clemson.

II) Caractérisation et cartographie génétique de *Pi33*

1) Détermination de la présence de *Pi33* dans les lignées de riz étudiées

a) Culture du riz

Les lignées de riz sont cultivées dans un mélange de terreau Neuhaus N°9 ($\frac{7}{8}$) et de pouzzolane ($\frac{1}{8}$). Les semis sont réalisés dans des terrines de semis de $30 \times 50 \times 7$ cm à raison de 16 lots de grains et de 15 grains par lot. L'arrosage se fait par aspersion. La fertilisation se fait à l'aide d'une solution nutritive dont la composition est indiquée en annexe 1. Certains individus ont ensuite été repiqués individuellement dans des pots de 15 cm de diamètre pour multiplication.

b) Préparation de l'inoculum

Les souches de *M. grisea* sont cultivées 10 jours sur milieu farine de riz, (annexe 2) à 28°C, avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12h/12h. Afin de limiter l'évaporation, les boîtes sont scellées avec du ruban adhésif (Tesa[®] 5280).

Les spores sont prélevées en versant sur la boîte 5 ml d'eau stérile, puis en prélevant la suspension ainsi obtenue. Cette suspension est calibrée par comptage sur cellule de Malassez.

c) Inoculation, lecture des symptômes

Les plantes sont inoculées 20 à 30 jours après semis (stade 3-4 feuilles) par injection dans la gaine, à l'aide d'une seringue, d'une suspension étalonnée à 25 000 spores/ml, ou par pulvérisation d'une suspension à 50 000 spores/ml dans une solution à 1% de gélatine.

La lecture des symptômes se fait sept à dix jours après l'inoculation. Des notes sont attribuées aux symptômes à l'aide d'une échelle dérivée de celle de Notteghem (1981, *in* Tharreau, 1994)

- 1 Pas de symptôme.
- 2 Lésions nécrotiques de diamètre inférieur à 2 millimètres.
- 3 Lésions à centre clair limitées par une bordure nécrotique
- 4 Lésions à centre grisâtre plus ou moins limitées
- 5 Lésions à centre gris et forme losangique typique
- 6 Zones décolorées coalescentes non limitées par une bordure nécrotique

Les plantes présentant des symptômes de type 1 et 2 sont considérées comme résistantes. Les plantes présentant des symptômes de type 5 et 6 sont considérées comme sensibles. Suivant les variétés et les répétitions, les plantes présentant des symptômes intermédiaires (3 et 4) ont pu être considérées comme sensibles ou résistantes.

Afin de rechercher le gène *Pi33*, chaque lignée de riz est inoculée avec au moins un couple de souche (cf. *supra* § I.1. du présent chapitre, p. 75). Lorsque cette lignée est sensible à la souche virulente et résistante à la souche isogénique transformée, on considère qu'elle



Figure B5 : Échelle de lecture des symptômes de la pyriculariose

1 2 3 4 5 6

Les symptômes 1 et 2 sont typiques des interactions incompatibles,
les symptômes 5 et 6 sont typiques des interactions compatibles.
Les symptômes 3 et 4 correspondent à des résistances modérées.

possède le gène de résistance *Pi33*. Afin de s'assurer de la validité des résultats, chaque expérimentation est répétée au moins deux fois dans le temps, et dans certains cas plusieurs couples de souches isogéniques furent utilisés.

2) Recherche et cartographie de marqueurs proches de *Pi33*

Différentes méthodes ont été utilisées pour densifier la carte génétique dans la région de *Pi33*. D'une part, des marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorphisme de longueur des fragments de restriction) et SSR (Small Sequence Repeats, microsatellites) présents dans la zone de *Pi33* dans d'autres cartes ont été cartographiés dans le croisement IR64 × Azucena. D'autre part, de nouveaux marqueurs ont été cartographiés : à partir des clones YAC de la banque du RGP, des marqueurs d'extrémités de YAC ont été générés, et des marqueurs AFLP ont été sélectionnés par une méthode de Bulk Segregant Analysis.

a) synthèse de marqueurs RFLP à partir de séquences connues

A partir de la séquence des sondes utilisées pour révéler des marqueurs RFLP dans la carte Nipponbare × Kassalath du Rice Genome Project (RGP) (Kurata *et al.*, 1994 ; Harushima *et al.*, 1998 ; RGP, 2000)(figure C3), des oligonucléotides ont été définis. A l'aide de ces amorces, des inserts correspondant aux marqueurs RFLP G1010, R1813, Os-r6.3, T19, S1633B et S10038C ont été obtenus par amplification PCR (Protocoles en annexe 4) à partir d'ADN génomique de riz des variétés Nipponbare, Azucena et IR64 (extraits selon les protocoles de l'annexe 3). Les amorces PCR ont été définies à l'aide du programme Do Primer (Interactiva) (<http://doprimer.interactiva.de/>). Les marqueurs RFLP C483, E4472S, C0392S, C1251S ont été obtenus en définissant les oligonucléotides avec le programme Vector NTI 6.0.

Des ligations entre pGEM[®]-T easy (Promega) et les inserts PCR ont été réalisées. Les plasmides obtenus ont servi à transformer des cellules compétentes de la souche DH5α de *E. coli* par choc thermique (protocole en annexe 5). Ils ont été séquencés par la société GenomExpress, et leurs séquences comparées entre les trois variétés étudiées, et avec les séquences publiées correspondantes (annexe 6).

Les plasmides recombinants purifiés selon le protocole de l'annexe 3 ont été utilisés pour synthétiser les sondes RFLP par PCR préparative (annexe 4) et marquage radioactif (annexe 7).

b) Synthèse de sondes d'extrémités de YACs

Deux clones YAC de la banque du RGP (Saji *et al.*, 2001) ont été utilisés au cours de cette étude : le clone Y2643, dont l'insert mesure 820 kpb et contient le marqueur RFLP C483, et le clone Y3140, dont l'insert mesure 340 kpb et contient le marqueur RFLP R1813. (figure C4). Ces deux clones YAC ont été cultivés sur milieu YPD (annexe 2). Le protocole d'extraction de l'ADN génomique des souches YAC est basé sur une lyse alcaline, précédée d'une dégradation de la paroi des cellules par de la zymolyase, et suivie d'extractions des impuretés au PCIA et au CIAA. Il est inspiré de celui de Umehara *et al.* (1996) et précisé en annexe 3.

☼ *Utilisation de la PCR walking*

Le protocole de synthèse des sondes est présenté en annexe 7. Il s'agit d'un protocole de type PCR walking, qui permet d'amplifier spécifiquement un segment d'ADN dont la séquence est inconnue, à l'exception de l'une de ses bordures. Ce protocole est adapté de celui mis au point par E. Bourgeois pour l'identification de rétrotransposons *Tos*. Il s'inspire des travaux de Devic *et al.* (1997) et Balzergue *et al.* (2001).

Ce protocole se déroule en trois phases :

— Une double réaction de digestion – ligation, au cours de laquelle l'ADN du YAC est digéré par une enzyme de restriction générant des fragments à bouts francs. Simultanément, les extrémités franches sont liguées à un adaptateur tel que le site de restriction disparaisse après la ligation.

— Une première réaction de PCR est réalisée en utilisant une amorce spécifique des télomères du YAC (YR1 ou YL1 selon l'extrémité que l'on cherche à amplifier) et une amorce spécifique de l'adaptateur : MA1. L'adaptateur est conçu de telle manière que les fragments d'ADN encadrés par deux adaptateurs ne sont pas amplifiables. L'amplification est donc sélective des extrémités de YAC.

— Une deuxième PCR est réalisée, en utilisant comme matrice ADN une dilution au cinquantième de la première PCR, et des oligonucléotides situés à l'intérieur du fragment

généralisé lors de la première PCR, MA2 du côté de l'adaptateur, YL2 ou YR2 du côté des télomères du YAC.

Par ailleurs, ces deux PCR se font selon un cycle « Touch Down », où les premiers cycles se font à une température d'appariement élevée, favorisant la spécificité de l'amplification, puis les cycles suivants à une température plus basse, favorisant un bon rendement de la réaction pour ces fragments spécifiques devenus majoritaires.

Etant donné que la longueur des fragments de restriction extrêmes des YACs n'est pas connue, sept enzymes de restriction différentes produisant des bouts francs sont utilisées, afin d'augmenter la probabilité de générer un fragment assez court pour une amplification efficace lors des deux PCR successives.

A l'issue de la seconde PCR, 10 $\mu\ell$ de chaque amplifiat sont déposés sur gel d'agarose (1,5%) puis séparés par électrophorèse. Cette analyse permet de sélectionner la ou les enzymes de restriction conduisant à l'amplification correcte d'un insert unique.

Les sondes d'extrémités de YAC ainsi obtenues peuvent être utilisées pour la cartographie génétique de marqueurs RFLP et pour la cartographie physique.

c) Réalisation de membranes RFLP, marquage des sondes et hybridation

Afin de cartographier les marqueurs RFLP, des membranes Southern ont été réalisées selon le protocole de l'annexe 8.

Ces membranes sont de trois types :

- (i) Des membranes « de tri », contenant de l'ADN des variétés IR64 et Azucena digéré par 11 enzymes différentes.
- (ii) Des membranes « population », contenant de l'ADN de lignées IR64 \times Azucena recombinantes entre RM44 et RM72 digéré par une enzyme donnée. Etant donné la grande quantité d'ADN nécessaire pour la réalisation de telles membranes, la disponibilité des semences de ces lignées, et les temps de culture, seules 52 lignées recombinantes ont pu être étudiées.
- (iii) Des membranes « diversité », contenant de l'ADN de différentes variétés de riz, dont des parents de la variété IR64, digéré par une enzyme donnée.

Les conditions de préhybridation, d'hybridation, d'exposition et de deshybridation des membranes sont précisées en annexes 9 et 10.

d) Marqueurs microsatellites

Les marqueurs microsatellites (SSR) utilisés ici proviennent de la carte microsatellite du riz élaborée à l'université de Cornell, et dont un extrait est visible en figure C2. Les marqueurs RM310, RM330B (Wu & Tanksley, 1993), RM72 (Temnykh *et al.*, 2000) RM44 (Chen *et al.*, 1997), RM557, RM483, RM404 (Temnykh *et al.*, 2001) ont été sélectionnés en fonction de leur position potentiellement proche de *Pi33*.

Les amorces de ces marqueurs ont été utilisées pour réaliser des amplifications par PCR selon les protocoles de l'annexe 4. Les amplifiats obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 4% puis coloration au bromure d'éthidium. L'utilisation de tels gels donne le plus souvent une résolution du polymorphisme de longueur suffisante (jusqu'à 6 paires de bases de différence).

e) Sélection de marqueurs AFLP par bulk segregant analysis

Les AFLP ont été réalisées avec le kit AFLP™ Analysis System II, AFLP Small Genome Primer Kit (CAT. NOS. 10717-015, 10719-011, LIFE TECHNOLOGIES™). Le protocole utilisé, conseillé par le fabricant, est indiqué en annexe 12.

Quatre mélanges d'ADN ont été réalisés à partir des 105 lignées IR64 × Azucena.

— Deux mélanges dits « recombinés » : le premier est composé d'ADN d'individus résistants (6 individus), le second est composé d'ADN d'individus sensibles (5 individus). Les individus de ces mélanges sont ceux ayant les recombinaisons les plus proches de *Pi33*. Toutes ces recombinaisons sont comprises entre les marqueurs RGC825 et A5J560 qui encadrent *Pi33* dans un espace de 44 cM.

— Deux mélanges dits « non recombinés » : le premier est composé d'ADN d'individus résistants (6 individus), le second est composé d'ADN d'individus sensibles (6 individus). Ces individus ont été choisis pour présenter le plus de polymorphisme possible en dehors de la zone de *Pi33*. Ils ne présentent pas de recombinaisons entre RGC 825 et A5J 560.

Pour chaque couple d'amorces, une première réaction a été réalisée avec les parents et les 4 mélanges. Pour ceux où un polymorphisme entre les mélanges a été observé, une seconde réaction a été réalisée avec des lignées recombinées pour cartographier précisément les marqueurs ainsi sélectionnés.

III) Cartographie physique et analyse de séquences

1) Hybridation sur membranes BAC

a) **Confection des membranes**

L'annexe 12 donne le détail de ce protocole.

Les banques BAC présentes au laboratoire sont conditionnées sous la forme de plaques standard à 384 puits (marque Genomix). Chaque puits contient un clone de la banque, conservé dans du milieu 2YT chloramphénicol additionné de 5% de glycérol. Ces plaques peuvent être conservées un an à -80°C.

Chaque membrane de Nylon (Hybond N⁺, Amersham) est placée dans une boîte de Pétri de dimensions 22,2 × 22,2 cm contenant du milieu LB chloramphénicol solide. A l'aide du robot Flexis[®] (Genomic solutions), 18 432 clones (48 plaques de 384 puits) de la banque considérée sont repiqués sur la membrane.

Chaque boîte ainsiensemencée est placée 15h environ à 28°C, afin d'obtenir une croissance suffisante, mais non excessive, évitant ainsi le mélange entre les colonies.

⊙ *Dénaturation*

Quatre feuilles de papier pour chromatographie (Wattman[®]) sont imbibées à l'aide de quatre solutions différentes :

Solution 1 : NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M.

Solution 2 : NaCl 1,5 M, TrisHCl 0,5 M pH 7, EDTA 1 mM.

Solution 3 : NaOH 0,4 M

Solution 4 : SSC 2× (composition en annexe 10)

Afin de détruire les bactéries et de provoquer des liaisons entre leur ADN et la membrane, les membranes sont placées successivement sur chaque feuille Wattman (qui constitue un bain) pendant 7 minutes.

Les membranes sont ensuite séchées à l'air libre. Elles sont prêtes à être utilisées en hybridation.

b) Conditions d'hybridation

Les conditions de préhybridation, d'hybridation et de rinçage des membranes à haute densité, qui sont précisées en annexe 10, sont différentes de celles des membranes RFLP car la présence d'un bruit de fond facilitant la lecture est recherchée.

La deshybridation (annexe 10) se fait de façon plus douce que pour les membranes RFLP car les quantités d'ADN lié sont plus faibles.

2) Synthèse de sondes à partir de clones BAC

a) Reverse Southern

Cette technique vise à sélectionner, dans l'ADN d'un clone BAC, des portions non répétées. Pour cela, 1,1 µg d'ADN du BAC considéré, extrait selon le protocole de l'annexe 3 a été digéré par les enzymes EcoR I et HinD III, séparément, et conjointement. A partir de 100 ng de chaque digestion, une membrane a été réalisée selon le protocole de l'annexe 8. Cette membrane a ensuite été hybridée en utilisant, en guise de sonde, de l'ADN génomique de riz (protocoles en annexes 9 et 10). L'autoradiographie montre les bandes avec une intensité qui est fonction de leur longueur, et aussi du nombre de répétitions présentes dans le génome des séquences qu'elles contiennent. Les bandes fortes correspondent à de l'ADN répété. L'ADN non répété correspond à des zones où l'autoradiographie est peu impressionnée, voire pas du tout.

Parallèlement, le reste du produit de digestion (1 µg) est séparé par électrophorèse dans les mêmes conditions que l'ADN destiné au transfert, et est analysé par coloration au BET et photographie. L'intensité des bandes ne dépend que de leur longueur.

Une bande visible par coloration du gel et non sur l'autoradiographie correspond probablement à une zone du BAC dont la séquence est unique ou faiblement répétée dans le génome du riz. Cette bande est excisée, puis l'ADN qu'elle contient est extrait selon le protocole présenté en annexe 3, marqué selon le protocole de l'annexe 9, et utilisé comme sonde.

b) Utilisation de BACs entiers

De l'ADN de BAC a été utilisé directement comme sonde. Cet ADN est contaminé par de l'ADN bactérien. De plus, il contient le vecteur PBeloBAC 11. Il subit donc une contre

hybridation avec de l'ADN total de *E. coli* transformée avec le vecteur pBeloBAC 11, afin d'améliorer la spécificité de ce type de sonde. Les conditions de synthèse de sondes de BAC entiers sont précisées en annexe 9.

c) Synthèse de sondes d'extrémité de BAC

☉ *Sélection des extrémités de BACs d'intérêt*

La première étape est de sélectionner des extrémités de BAC non répétées, afin que les sondes obtenues donnent en hybridation des résultats exploitables. Chaque séquence d'extrémité de BAC d'intérêt est donc comparée aux séquences disponibles sur trois bases de données au moyen du programme BLAST : celle des séquences publiées du NCBI (base nr, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), celle des séquences répétées du riz du TIGR (<http://www.tigr.org/>), celle des séquences extrêmes de BACs des banques OSJNBa et OSJNBb de Clemson (http://www.genome.clemson.edu/projects/rice/rice_bac_end/). Les séquences ne présentant aucune homologie sur ces trois banques sont considérées comme non répétées et traitées comme telles. Celles présentant de fortes homologies avec d'autres séquences extrêmes de BACs du même contig sont aussi considérées comme non répétées.

Les sondes d'extrémités de BAC ont ensuite été synthétisées par PCR, en définissant des oligonucléotides à partir des séquences de ces extrémités. A partir de ces séquences, des amorces PCR ont été définies à l'aide du programme Vector NTI, et ont servi à les amplifier, à partir de l'ADN des BACs considérés, purifié suivant le protocole de l'annexe 3. Une PCR préparative a été réalisée, une partie servant à fabriquer la sonde, l'autre étant liguée à pGEM[®]-t (Promega), clonée dans *E. coli* DH5- α , puis envoyée à la société GenomExpress pour séquençage.

Les sondes ainsi obtenues sont hybridées d'une part sur des membranes de la banque BAC OSJNBa de Clemson, d'autre part sur des membranes Southern, afin de caractériser, puis de cartographier les RFLPs obtenues.

☉ *Synthèse des sondes par walking PCR*

La méthode utilisée ici, très semblable à celle utilisée pour les sondes d'extrémités de YACs, est présentée en annexe 7. Elle diffère seulement par la plus faible quantité d'ADN matrice utilisée, et par les oligonucléotides employés. Enfin, les sondes d'extrémité des BAC

de la banque d'IR64 ont été clonées dans le vecteur pGEM[®]-T selon les protocoles de l'annexe 5, puis séquencées par l'entreprise GenomExpress.

3) Marche *in silico*

☼ *Recherche d'identités de séquences d'extrémités de BAC*

Lorsque des séquences d'extrémités de BAC sont identiques, et qu'elles ne sont pas répétées dans le génome, on peut supposer qu'elles proviennent de la même région du génome. Une telle identité peut permettre :

- de relier deux contigs
- d'orienter un clone BAC dans un contig (quelle extrémité de ce BAC est tournée vers l'intérieur du contig, quelle autre vers l'extérieur)
- de préciser la position d'une sonde dans un contig.

☼ *Recherche d'homologies de profils de restriction*

La confection des contigs par l'université de Clemson s'est faite en utilisant un score d'homologie très élevé, afin de minimiser le risque d'erreur. La recherche des clones BACs dont le profil de digestion présente un score d'homologie élevé avec celui du BAC situé à l'extrémité d'un contig, mais plus faible que celui retenu par le CUGI permet de réaliser une marche chromosomique *in silico*, qui sera ensuite validée par des hybridations. Les profils de restriction des BACs des banques Nipponbare OSJNBa et OSJNBb étaient disponibles auprès de l'université de Clemson et ont permis un tel travail.

4) Recherche de RGA

Une recherche de RGA (Resistance Gene Analogs, Analogues de gène de résistance) a été réalisée au cours de ces travaux par PCR en utilisant des amorces dégénérées (annexe 4). Ces amorces sont spécifiques des domaines conservés des domaines NBS et *Pto*-like kinase. Etant donné le caractère dégénéré de ces amorces, des PCR de type touchdown furent mises en place en s'inspirant des cycles utilisés pour la walking PCR.

5) Analyse de séquences

Au cours des travaux, des projets de séquençage du génome du riz ont abouti à la mise à disposition, sur Internet, de grands fragments de séquence. Les zones d'intérêt ont été analysées en utilisant la méthodologie suivante :

a) **Comparaison de séquences, recherches des séquences répétées**

La comparaison des séquences entre elles, ou avec des bases de données furent réalisées principalement en utilisant le programme BLAST (Basic Local Alignment Tool, Altschul *et al.*, 1990), sous ses différentes formes [principalement BLASTn (comparaison de séquences nucléotidiques) et BLASTx (comparaison de séquences protéiques)]. Ces comparaisons de séquences furent réalisées sur le serveur du NCBI* en utilisant les bases de données suivantes : nr (nucléotide ou peptide)**, les contigs obtenus lors du séquençage du riz *indica* par Yu *et al.* (2002)***. Parfois, et en particulier pour des comparaisons de séquences nucléotidiques de grande taille, le programme Megablast (Zhang *et al.*, 2000) a été utilisé.

On peut diviser les séquences répétées en deux grandes catégories : les séquences répétées de petite taille sont détectées à l'aide du programme RepeatMasker* (Smit & Green, *non publié*). On trouve ainsi principalement des microsatellites et des séquences de faible complexité (riches en un seul ou deux nucléotides).

Les séquences des zones répétées de plus de 1 kpb [(principalement des transposons, des rétrotransposons, ou bien des zones constituées de nombreuses séquences répétées plus courtes telles que les MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements, Eléments transposables miniatures constitués de répétitions inversées) ou les LTR (Long Transposable repeats, séquences répétées longues qui bordent les éléments transposables)] ont été comparées à l'aide du programme BLAST à la base de données des séquences répétées du riz du TIGR**.

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

** Une explication sur le contenu de ces bases de données est disponible à l'adresse suivante :

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgitelp.html#nucleotide_databases

*** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/Genomes/riceWGS.html>

* <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>

** <http://tigrblast.tigr.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1>

b) Détection et analyse des séquences exprimées

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthode analytique infaillible permettant de détecter, dans une séquence eucaryote, les gènes exprimés. En ce qui concerne le riz, la détection de ces gènes est rendue encore plus ardue par le fait que leur pourcentage en GC est variable (Yu *et al.*, 2002). Au cours des analyses de séquences du riz réalisées lors de cette thèse, le programme RiceHMM^{***} a été utilisé pour rechercher les séquences exprimées. Ce programme de prédiction présente l'avantage d'avoir été mis au point à partir d'EST (c'est à dire de séquences dont on sait qu'elles s'expriment) du riz.

Cependant, ce programme n'est pas parfait, et des alignements entre des EST du riz et des zones qui n'ont pas été prédites par ce programme sont souvent observés. A l'inverse, certains gènes putatifs désignés par RiceHMM ne présentent aucune homologie avec des EST de riz. En conséquence, la détermination de gènes putatifs s'est faite en utilisant aussi d'autres programmes, dont Autopredgenset, faisant partie du système mis en place par le RGP pour annoter la séquence du riz et nommé RiceGAAS^{*}.

Enfin, les séquences protéiques prédites furent analysées dans le cadre de RiceGAAS à l'aide des programmes suivants :

- (i) SOSui permet de connaître le caractère soluble ou membranaire de la protéine prédite
- (ii) PSORT détermine le compartiment cellulaire dans lequel cette protéine se trouverait.
- (iii) HMMER (Krogh *et al.*, 1994) permet de comparer la séquence de la protéine prédite avec deux bases de données de structures protéiques : Pfam et PROSITE^{**}.

IV) Transformation du riz par bombardement

Afin de valider la cartographie physique de *Pi33* dans la variété IR64, il a été décidé de transformer une variété *indica* sensible avec les BACs d'IR64 de la zone. Cette transformation a été réalisée par bombardement de cals à l'aide d'un canon à particules. Cette méthode présente l'avantage de permettre la transformation du riz directement par de l'ADN extrait de clones BAC de *E. coli*.

^{***} <http://rgp.dna.affrc.go.jp/RiceHMM/index.html>

^{*} RiceGAAS : <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>. Une explication du fonctionnement de ce système d'analyse du génome du riz est donnée dans le site suivant : http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/RiceGAAS_system.html.

^{**} Pfam : <http://pfam.wustl.edu/>, PROSITE : <http://www.expasy.org/prosite/>.

1) De la graine au cal transformé

a) Induction de la callogenèse

Les grains sont désinfectés selon le protocole de l'annexe 12, puis placés sur du milieu d'induction NB (annexe 13). Les boîtes sont laissées entrouvertes sous le flux laminaire afin d'éliminer l'excès d'humidité, puis placées à l'obscurité à une température de 28°C.

Au bout de 20 jours, le scutellum de l'embryon du grain forme un cal compact de 0,5 à 1 cm de diamètre (cal primaire). A la périphérie de ce cal primaire, de petites unités de quelques mm de diamètre (cals secondaires) se forment. Ces cals secondaires sont transférés sur une nouvelle boîte de milieu NB. Le cal primaire, qui n'est pas transféré, peut donner de nouveaux cals secondaires après quelques jours.

Les cals secondaires sont cultivés 14 jours à 28°C dans l'obscurité. A l'issue de ce temps d'incubation, les cals ont proliféré et ont donné trois types de formation :

- (i) Des cals de forme complexe et de taille supérieure à 2mm qui sont éliminés.
- (ii) Des unités sphériques présentant une surface rugueuse et de taille comprise entre 0,8 et 2 mm qui seront utilisées pour le bombardement.
- (iii) Des unités d'une taille inférieure à 0,8 mm qui peuvent être transférées sur du milieu frais NB. Après 14 jours d'incubation, ces unités proliféreront en donnant à nouveau les 3 types de cals décrits ici.

b) Transformation

☼ *ADN utilisé*

L'objectif de cette expérimentation est de valider la carte physique du gène *Pi33* par un test de complémentation. La transformation d'une variété sensible par un BAC contenant le gène doit mener à la régénération de plantes résistantes et à l'identification de ce clone BAC.

Les plantes sont cotransformées, c'est à dire transformées avec un mélange constitué d'un vecteur de sélection (le plasmide pILTAB227 qui confère la résistance à l'hygromycine) et du vecteur d'intérêt (le clone BAC). De plus, deux transformations ont été réalisées : l'une avec le plasmide pGFP contenant le gène de la *green fluorescent protein* précédé d'un promoteur induisant une expression constitutive, l'autre avec le vecteur pBeloBAC11 ne contenant pas d'insert.

Enfin, une lignée non transformée a été créée, en réalisant toutes les étapes de culture *in vitro* et de régénération en utilisant des milieux ne contenant pas d'hygromycine.

☼ *Préparation des cals*

Soixante à cent cals secondaires sont sélectionnés pour le bombardement (annexe 12). Ils sont placés sur du milieu NBO (annexe 11), qui présente une plus forte pression osmotique que le milieu NB.

☼ *Préparation et enrobage des micro-particules*

Pour chaque tir, 3 mg d'un mélange 50/50 de particules d'or de 1,0 μm et 1,6 μm est stérilisé selon le protocole de l'annexe 12, puis resuspendu dans 50 μl d'eau bidistillée stérile. 5 μg d'ADN sont ajoutés au mélange, ainsi que de la spermidine pour une concentration finale de 0,02 M. Enfin, l'ajout progressif de NaCl provoque la précipitation de l'ADN sur les microparticules.

☼ *Bombardement*

Les conditions du bombardement réalisés ici sont :

- (i) Vide poussé à 0,1 bar.
- (ii) Disque de rupture de 75 bar. psi.
- (iii) Cible positionnée à 6cm de la grille d'arrêt.
- (iv) Deux tirs par boîte d'explants en opérant une rotation de 180° de la boîte entre deux tirs.

Les détails du protocole de transformation sont indiqués en annexe 14.

Après action du canon, les cals sont laissés sur milieu NBO pendant 16 à 20h à 28°C et à l'obscurité.

c) Culture sur un milieu de sélection

Les cals sont transférés sur du milieu NBH40 (annexe 13) qui contient 40 mg/l d'hygromycine.

Au bout de 14 jours de culture à l'obscurité à 28°C, certains cals développent des globules beiges et translucides à leur surface. Ces globules sont dispersés à l'aide d'une pince autour du cal. Les cultures sont remises 12 jours à 28°C à l'obscurité, puis à nouveau observées. Certains globules translucides n'évoluent pas et sont considérés comme non transgéniques. D'autres globules se développent en cals résistants de taille supérieure, blanc-beige, et d'aspect rugueux. Cette évolution se fait de façon asynchrone. En conséquence, après un premier prélèvement des cals résistants, les cultures sont à nouveau placées à 28°C dans l'obscurité. De nouveaux cals résistants se développent et sont à leur tour prélevés après 6 jours puis 13 jours de culture.

2) Du cal à la plante

a) Prérégénération, régénération

Les cals résistants sélectionnés lors de l'étape précédente sont repiqués sur le milieu de prérégénération PRH50 (annexe 13) à raison de 10 à 20 par boîte (100 mm × 20 mm). Les cals issus d'un même nodule de départ sont considérés comme clonaux et repiqués conjointement. Après 10 jours, les cals qui ont augmenté de taille et qui sont compacts et blancs sont repiqués sur le milieu de régénération RN (annexe 13) à raison de 5 à 6 par boîte pendant 15 jours. Ils sont maintenus à l'obscurité à 28°C durant 24 h avant d'être transférés à la lumière. L'éclairement dure 12 h avec une intensité de $40 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ à 28°C.

b) Culture des plantes en milieu artificiel

Après 15 jours à la lumière, certains cals ont verdi et ont développé des tiges et des racines. Ces jeunes plantules de 1 à 5 cm sont transférées dans des tubes contenant du milieu MS (annexe 13) et placées dans les mêmes conditions de culture pendant 15 à 20 jours. Une fois que ces plantules ont formé un important réseau racinaire et que les feuilles atteignent le haut du tube, elles sont repiquées en Jiffy® (mottes de tourbe). Pour cela les racines et les feuilles sont rabattues.

c) Culture en Jiffy® et conditions d'inoculation

Les jeunes plantes sont alors placées en chambre de culture pendant 4 à 6 semaines. Les conditions dans la chambre sont : température 26°C, hygrométrie 90%, lumière $120 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, 12h par jour. Deux fois par semaine, les mottes de tourbe sont humectées avec une solution nutritive (composition en annexe 1).

Deux semaines après la mise en jiffy®, les plantes sont inoculées par pulvérisation (annexe 2, et *supra*, § II.1.c. du présent chapitre, p. 89) avec une suspension de spores de la souche PH14-D31C12. Cette souche possède le gène d'avirulence *ACE1* et est virulente sur la variété Kassalath. Parfois, les plantes sont inoculées une seconde fois 15 jours après la première inoculation afin de vérifier la validité des lectures.

Après inoculation et lecture des symptômes, les plantes sont repiquées en pots de 1 litre dans un mélange de terreau Neuhaus N°9 et d'engrais retard. Elles ont ainsi été conduites jusqu'à la récolte de graines.

Tableau C1 : Présence ou absence du gène de résistance correspondant à *ACE1* dans différents cultivars

Lignées et cultivars de riz		Sous espèce	Gènes R connus	Réaction à ⁽¹⁾							Résistance spécifique à <i>ACE-1</i>
				Guy 11	PH14	PH14-D31C12	PH19	PH19-D31C12	2/0/3	2/0/3-D31C12	
Parents des croisements utilisés dans cette étude	IR64	<i>indica</i>	<i>Pi25</i> à <i>Pi32</i>	R	S	R	S	R	R	R	O
	Azucena	<i>japonica</i>		S	S	S	S	S	S	S	N
	Bala	<i>indica</i>		R	S	R	-	-	S	R	O
	ZYQ8	<i>indica</i>	<i>Pi11</i>	-	S	R	S	R	R	R	O
	JX17	<i>japonica</i>		-	R	R	R	R	S	S	N
Nipponbare ⁽²⁾		<i>japonica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
Kassalath ⁽²⁾		<i>indica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
Maratelli ⁽³⁾		<i>japonica</i>		S	S	S	S	S	S	S	N
Irat7 ⁽⁴⁾		<i>indica</i>		R	-	-	R	R	S	R	O
DJ8-341 ⁽⁴⁾		<i>indica</i>		R	-	-	R	R	S	R	O
BW100				R	-	-	R	R	S	R	O
Carreon		<i>indica</i>		R	-	-	R	R	S	R	O
CO39		<i>indica</i>		S	-	-	S	S	S	S	N
DGWG		<i>indica</i>		-	S	S	-	-	S	S	N
IR1529		<i>indica</i>		R	S	R	S	R	S	R	O
IR36		<i>indica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
IR5		<i>indica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
IR72		<i>indica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
IR8		<i>indica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
IRAT13		<i>japonica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
LAC23		<i>japonica</i>		S	-	-	-	-	-	-	N
Moroberekan		<i>japonica</i>		S	-	-	-	-	S	S	N
Tetep		<i>indica</i>		S	-	-	-	-	-	-	N
TN1		<i>indica</i>		R	S	R	-	-	S	R	O
TYC		<i>indica</i>		-	S	R	-	-	S	R	O

(1) Les variétés ayant un score de 1 ou 2 sont considérées comme résistantes (R), celles ayant un score de 5 ou 6 comme sensibles (S) (cf. chapitre « Matériels et méthodes », § II.1.c., p. 90).

(2) Parents des lignées utilisées par Kurata *et al.* (1994)

(3) Témoin sensible.

(4) Cultivars résistants utilisés par Böhnert *et al.* (2000) et Dioh *et al.* (2001) pour cartographier *ACE1*.

CARACTERISATION ET CARTOGRAPHIE FINE D'UN NOUVEAU GENE DE RESISTANCE : *Pi33*

Note :

Le paragraphe I.1. est un résumé d'expérimentations réalisées avant le début de cette thèse. Le reste de ce chapitre correspond à des travaux réalisés au cours de celle-ci. Les résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication sous presse dans la revue Theoretical and Applied Genetics, « Characterization and fine mapping of Pi33, a new rice resistance gene », présentée en annexe 15.

I) Caractérisation d'un nouveau gène de résistance, *Pi33*

1) Recherche et cartographie de la résistance correspondant à *ACE1*

La souche Guy11 de *M. grisea* est avirulente sur la variété Irat7. Cette avirulence a une origine monogénique comme l'ont montré des croisements entre Guy11 et la souche 2/0/3, qui est virulente sur le variété IRAT7 (Silué *et al.*, 1992). Ce gène d'avirulence a été cloné et nommé *ACE1*. Il code pour une grosse protéine (4035 a.a.) ayant des motifs enzymatiques de type PKS-NRPS (cf. chapitre « Introduction générale » § III.1.a. p. 69).

Dans un premier temps, la résistance à *ACE1* a été recherchée dans différentes variétés (tableau C1). Pour cela, ces variétés ont été inoculées avec Guy11 et l'un au moins des trois couples de souches PH14 \ PH14-D31C12, PH19 \ PH19-D31C12, 2/0/3 \ 2/0/3-D31C12 (cf. chapitre « Matériel et méthodes » § I. 1. p. 75). Les variétés sensibles à Guy11, PH14-D31C12, PH19-D31C12 ou 2/0/3-D31C12 ne portent pas de résistance à *ACE1*. Celles qui sont sensibles à l'une des souches virulentes et résistantes à la souche transformée correspondante portent cette résistance. Les variétés BW100, DJ8-341, Carreon, IR1529, Irat7, Taichung Native 1 (TN1), Tsai Yuan Chung (TYC) et Zhai Ye Qing 8 (ZYQ8) possèdent le gène de résistance correspondant à *ACE1* (tableau C1). Les variétés IR64 (*indica*) et Bala (*indica* « Aus ») possèdent aussi ce gène de résistance. La variété Azucena (*Japonica*) ne le possède pas. En conséquence, il est possible de cartographier le gène correspondant à *ACE1* en utilisant les lignées IR64 × Azucena et Azucena × Bala.

Tableau C2 : Présence ou absence du gène de résistance correspondant à *ACE1* dans différentes lignées isogéniques et cultivars différentiels

Lignées et cultivars de riz	Sous espèce	Gènes R connus	Réaction à ⁽¹⁾					Résistance spécifique à <i>ACE-1</i>	
			Guy 11	PH19	PH19-D31C12	2/0/3	2/0/3-D31C12		
Lignées isogéniques obtenues à partir de CO39 (Mackill & Bonman 1992).	C101LAC	<i>indica</i>	<i>Pi1</i>	R	S	R	S	R	O
	C104LAC	<i>indica</i>	<i>Pi1</i>	S	S	S	S	S	N
	C103TTP	<i>indica</i>	<i>Pi1</i>	S	S	S	S	S	N
	C101A51	<i>indica</i>	<i>Pi2</i>	S	-	-	S	S	N
	C102A51	<i>indica</i>	<i>Pi2</i>	S	-	-	S	S	N
	C105TTP-4 (L-23)	<i>indica</i>	<i>Pita</i>	S	-	-	S	S	N
	C101PKT	<i>indica</i>	<i>Pita</i>	S	-	-	S	S	N
	C101TTP-3	<i>indica</i>	<i>Pita</i>	S	-	-	S	S	N
	C105TTP-1	<i>indica</i>	<i>Pita</i>	S	-	-	S	S	N
	C105TTP-2 (L-9)	<i>indica</i>	<i>Pita</i>	S	-	-	S	S	N
	C104PKT	<i>indica</i>	<i>Pi3</i>	S	-	-	S	S	N
	C105TTP-2 (L23)	<i>indica</i>	<i>Pita</i>	S	-	-	S	S	N
Cultivars différentiels japonais (Kiyosawa, 1984)	Fukunishiki	<i>japonica</i>	<i>Pi-z Pi-sh</i>	S	-	-	S	S	N
	K1	<i>japonica</i>	<i>Pi-ta</i>	R	-	-	R	R	?
	K59	<i>japonica</i>	<i>Pi-t</i>	S	-	-	S	S	N
	K60	<i>japonica</i>	<i>Pi-k^p</i>	S	-	-	S	S	N
	Kanto51	<i>japonica</i>	<i>Pi-k</i>	S	-	-	S	S	N
	Pi-n°4	<i>japonica</i>	<i>Pi-ta²</i>	S	-	-	S	S	N
	Shin 2	<i>japonica</i>	<i>Pi-k^s Pi-sh</i>	S	-	-	S	S	N
	Toride 1	<i>japonica</i>	<i>Pi-z^t</i>	S	-	-	S	S	N
	Tsuyuake	<i>japonica</i>	<i>Pi-k^m</i>	S	-	-	S	S	N
	Zenith	<i>japonica</i>	<i>Pi-z Pi-a</i>	S	-	-	S	S	N
(Kiyosawa et al., 1986)	Norin 22	<i>japonica</i>	<i>Pi-sh</i>	S	-	-	S	S	N
	Reiho	<i>japonica</i>	<i>Pi-ta Pi-ta²</i>	S	-	-	S	S	N
(Ezuka, 1979)	St1	<i>japonica</i>	<i>Pi-f</i>	S	-	-	S	S	N

(1) Les variétés ayant un score entre 1 et 2 sont considérées comme résistantes (R), celles ayant un score entre 5 et 6 comme sensibles (S). Suivant les variétés et les répétitions, les plantes présentant des symptômes intermédiaires (3 et 4) ont pu être considérées comme sensibles ou résistantes (cf. chapitre « Matériels et méthodes » § I.1.c., p. 90)

Les deux souches du couple PH14 ont été inoculées sur les descendants des croisements IR64 × Azucena (105 lignées haploïdes doublés, HD) et Azucena × Bala (100 lignées obtenues par Single Seed Descent, SSD en F_6)^{*} déjà utilisés pour la construction de cartes génétiques du riz. Le caractère monogénique de la résistance correspondant à *ACE1* a ainsi été confirmé (Tharreau *et al.*, 2000). Dans les deux croisements, ce gène a été placé à proximité du marqueur G1010 sur le bras court du chromosome 8. Dans cette région du génome du riz, on trouve deux gènes de résistance à la pyriculariose : *Pi29(t)* et *Pi11*.

2) Distinction entre *Pi33* et les autres gènes de résistance

a) Utilisation des cultivars différentiels et des lignées isogéniques

☉ *Cultivars différentiels japonica*

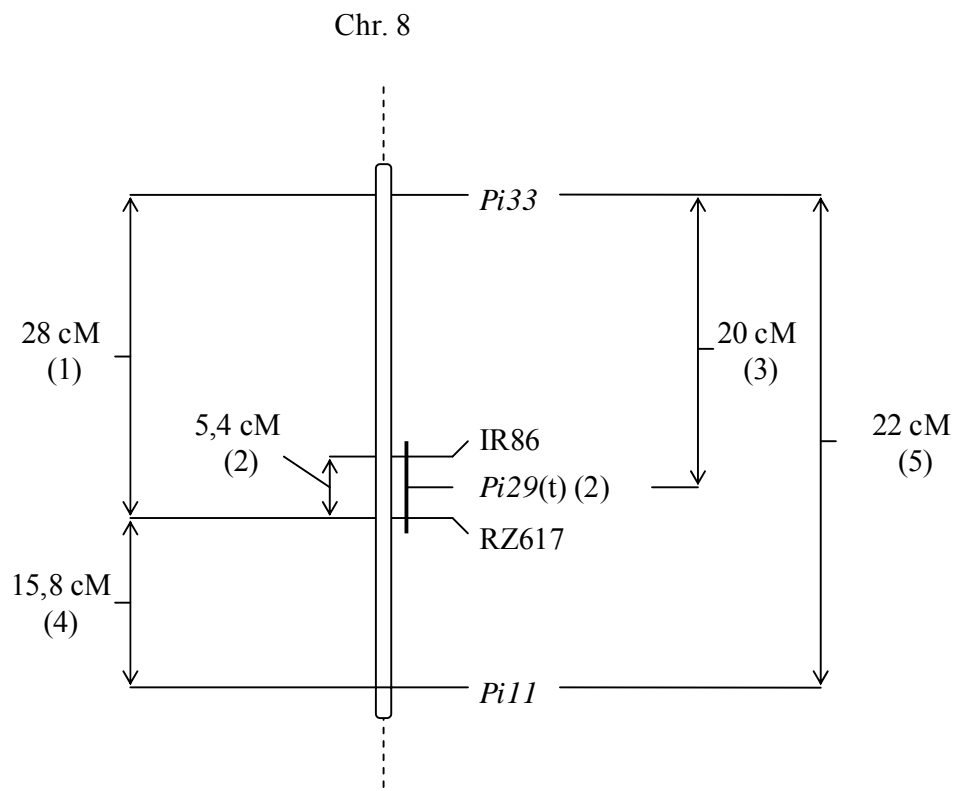
Pour déterminer si la résistance correspondant à *ACE1* était due ou non à un gène connu, les cultivars différentiels établis par Kiyosawa (Kiyosawa, 1984 ; Kiyosawa *et al.*, 1986 ; Ezuka, 1979) ont été inoculés avec le couple de souches 2/0/3 \ 2/0/3-D31C12. Toutes ces variétés, à l'exception de K1, montrèrent une sensibilité aux deux souches (tableau C2). En conséquence, la résistance à *ACE-1* ne correspond pas aux gènes présents dans ces cultivars, à savoir : *Pi-a*, *Pi-f*, *Pi-k*, *Pi-k^m*, *Pi-k^p*, *Pi-k^s*, *Pi-s^h*, *Pi-t*, *Pi-ta²*, *Pi-z* et *Pi-z^t*. Bien que la sensibilité de K1, portant *Pita*, à *ACE1* n'ait pas été établie, *Pita* n'est pas le gène correspondant à *ACE1*, car la variété Reiho, qui porte *Pita*, s'est révélé sensible à 2/0/3 et 2/0/3-D31C12.

☉ *Lignées isogéniques indica*

La résistance à *ACE1* étant absente du cultivar CO39, nous avons testé les lignées isogéniques qui ont été dérivées de ce cultivar par Mackill & Bonman (1992) et qui contiennent différents gènes de résistance connus (*Pi1*, *Pi2*, *Pi3*, *Pi-ta*). Toutes ces lignées quasi-isogéniques sont sensibles aux souches contenant *ACE1*, à l'exception de C101LAC, qui possède le gène de résistance *Pi1* (tableau C2). Cette lignée est sensible à 2/0/3 et PH19, et résistante à 2/0/3-D31C12 et PH19-D31C12. Elle porte donc la résistance correspondant à *ACE1*, et on pourrait en conclure que cette résistance est codée par *Pi1*. Cependant, deux

^{*} Dans la suite du texte, des lignées obtenues par haplodiploïdisation (HD) ou Single Seed Descent (SSD) à partir d'un croisement entre les variété *A* et *B* seront nommées « lignée HD *A* × *B* » ou « lignée SSD *A* × *B* ». Il sera aussi fait référence à des « plantes F_1 *A* × *B* » ou « F_2 *A* × *B* »

Figure C1 : Cartographie composite des gènes *Pi-11(t)*, *Pi-29(t)*, *Pi33*



Légende:

Lignées IR64 × Azucena:

- (1) : Tharreau *et al.*, 2000
- (2) : Sallaud *et al.*, sous presse.
- (3) : Présente étude

lignées ZYQ8 × JX-17:

- (4) : Zhu *et al.*, 1993
- (5) : Présente étude.

éléments nous font rejeter cette hypothèse:

- (i) *Pi1* n'est pas sur le chromosome 8, mais sur le chromosome 11.
- (ii) La lignée C104LAC, qui porte aussi *Pi1*, est sensible à 2/0/3-D31C12. Elle ne porte donc pas la résistance correspondant à *ACE1*.

De plus, les deux parents de C101LAC, CO39 et LAC23 sont sensibles. Il semble peu probable que la conformité des semences de C101LAC utilisées soit à mettre en cause car elles proviennent directement de l'IRRI, où C101LAC a été créée.

Ces trois points nous semblent donc plutôt indiquer soit (i) que le lot de semences de LAC23 utilisé dans cette expérimentation est différent de celui utilisé par Mackill & Bonman (1992) pour créer C101LAC, soit (ii) que au cours de l'élaboration de cette lignée, le gène *R* correspondant à *ACE1* a été apporté par allopollinisation. Quoi qu'il en soit, C101LAC possède deux gènes de résistance : le gène de résistance correspondant à *ACE1* et *Pi1*.

b) Tests d'allélisme

Les gènes de résistance *Pi11* et *Pi29(t)* ayant été cartographiés sur le bras court du chromosome 8, nous nous sommes proposé de vérifier si le gène *R* correspondant à *ACE1* était allélique de l'un d'eux. Le gène *Pi11*, porté par ZYQ8, a été caractérisé dans le croisement JX17 × ZYQ8. Il a été cartographié à proximité du marqueur RZ617. Le gène *Pi29(t)* est porté par IR64 et a été cartographié lui aussi dans la région de RZ617. De plus, ces deux gènes de résistance sont portés par des variétés (IR64 et ZYQ8 respectivement), qui portent elles-mêmes la résistance à *ACE1*. Afin de savoir si la résistance à *ACE1* correspondait ou non à *Pi11* ou *Pi29(t)*, nous avons donc dû réaliser des tests d'allélisme.

☉ *Pi11*

Le gène *Pi11* (=Pi-zh) a été caractérisé dans le croisement ZYQ8 × JX17 (Zhu *et al.*, 1993). Le parent ZYQ8 (Zhai Ye Qing 8) possède ce gène qui lui confère une résistance à la souche Zhong 10-8-14, le parent JX17 (Hing Xi 17) ne le possède pas. Cinquante deux des lignées HD qui ont été utilisées pour cartographier *Pi11* ont été obtenues dans le cadre de collaborations avec l'Institut de Génétique de l'Académie des Sciences de Chine à Pékin, auprès du Pr. Zhu Lihuang.

ZYQ8 possédant à la fois *Pi11* et le gène de résistance correspondant à *ACE1*, si l'un au moins des descendants ne comporte qu'un seul de ces gènes de résistance, c'est qu'ils sont

situés à des loci différents dans le chromosome 8. En revanche, si aucun des descendants ne présente un tel phénotype, on peut affirmer que ces deux gènes sont génétiquement proches, voire alléliques.

Le parent JX17 résiste à la fois à la souche PH14-D31C12 et à la souche PH14. Il possède donc au moins un autre gène de résistance correspondant à un gène d'avirulence de PH14. En conséquence, on doit s'attendre à ce que la moitié des individus de la descendance résistent à la fois à PH14-D31C12 et à PH14. Sur les 52 lignées HD testées, 23 (44%) sont résistantes à ces deux souches. La variété JX17 posséderait donc effectivement un gène de résistance spécifique inconnu. Sur les 29 lignées sensibles à PH14, on constate que 13 lignées sont résistantes et 16 sensibles à PH14-D31C12. Ces résultats confirment le caractère monogénique de la résistance associée au gène d'avirulence *ACE1*.

Parmi 23 des lignées sensibles à PH14, pour lesquelles les résultats obtenus au cours de ces deux tests de résistance sont sûrs, 5 lignées recombinantes furent observées : deux d'entre elles sont sensibles à PH14-31C12 et résistantes à Zhong 10-8-14, les trois autres sont sensibles à Zhong 10-8-14 et sensibles à PH14-31C12. **Le gène de résistance correspondant au gène d'avirulence *ACE1* n'est donc pas *Pi11*.**

☼ *Pi29(t)*

Sallaud *et al.* (sous presse) trouvent un autre gène de résistance dans la région de *Pi11*, le gène *Pi29(t)*. Ce gène a été cartographié en utilisant 104 des 105 lignées HD IR64 × Azucena disponibles au début de nos travaux. Sur ces lignées, la résistance à *ACE1* a aussi été cartographiée (Tharreau *et al.*, 2000).

La cartographie du gène *Pi29(t)* s'est faite en utilisant une seule souche de *M. grisea* (CL6), originaire de Colombie. Cette souche est avirulente sur la variété IR64 et virulente sur la variété Azucena. Les études réalisées par Sallaud *et al.* (sous presse) ont montré que cette souche permet d'identifier deux loci impliqués dans la résistance, l'un correspondant à *Pi29(t)*, l'autre à *Pi24(t)*, qui se trouve sur le chromosome 1. En conséquence, lorsqu'une lignée IR64 × Azucena résiste à CL6, il se peut qu'elle possède *Pi24(t)*, *Pi29(t)* ou les deux.

En conséquence, seules les 20 lignées sensibles à CL6 ont été prises en compte : elles ne contiennent pas le gène de résistance *Pi29(t)*. Au cours de l'étude de Tharreau *et al.* (2000), la résistance à *ACE1* a été recherchée chez ces 20 lignées à l'aide des souches PH14 (virulente) et PH14-D31C12 (avirulente). Parmi ces 20 lignées, 4 sont résistantes vis-à-vis du gène

d'avirulence *ACE1* porté par PH14-31C12. Leur existence prouve que ***Pi29(t)* et le gène de résistance correspondant à *ACE1* sont différents, puisqu'il existe des plantes possédant l'un et non l'autre.**

☼ *Conclusion*

La résistance spécifique aux souches de *M. grisea* portant *ACE1* est codée par un gène unique porté par le chromosome 8, comme nous l'avons vu précédemment. Ici, nous avons montré que ce gène est différent des gènes de résistance précédemment décrits dans cette zone. Il se cartographie à une distance de *Pi11* que l'on peut évaluer à 22 ± 4 cM, et à une distance de *Pi29(t)* de 20 ± 4 cM. Cette dernière est cohérente avec la distance calculée entre le gène de résistance correspondant à *ACE1* et RZ617, un marqueur proche de *Pi29(t)* (28 cM). Nous proposons de nommer *Pi33* le gène de résistance correspondant à *ACE1*, conformément aux conventions en vigueur (Kinoshita, 1998). Les positions relatives de *Pi11*, *Pi29(t)*, et *Pi33* sont montrées dans la figure C1.

3) Caractère dominant de *Pi33*

a) **Plantes F_1**

Généralement, la résistance spécifique est un caractère de type monogénique dominant. Cependant, en ce qui concerne *Pi33*, des tests réalisés précédemment sur des individus F_2 avaient donné des résultats contradictoires : selon la variété parentale porteuse du gène de résistance, celui-ci paraissait dominant (chez Carreon) ou récessif (chez DJ8-341). Dans d'autres cas, on observait une répartition de type 1:1 dans la descendance F_2 (chez Irat7) (Tharreau, 1994).

Afin de lever le doute concernant le caractère dominant ou récessif de *Pi33* des tests de résistance ont été réalisés par injection sur des individus F_1 issus du croisement IR64 (E) \times Azucena (F). Etant donné le faible nombre de semences disponibles, les essais ont été menés en une seule fois, et uniquement en inoculant les plantes avec la souche PH14-D31C12, avirulente vis-à-vis de *Pi33*. Les variétés témoins ont été les parents : IR64 (résistante) et Azucena (sensible), ainsi qu'une autre variété sensible : Maratelli.

Au cours de cette expérimentation, toutes les plantes de la variété Azucena ont montré clairement un phénotype sensible. Les plantes de la variété IR64 n'ont pas montré une résistance forte et homogène : certains individus ont présenté une réaction compatible. Cependant, l'aspect général des plants IR64 comparé à celui des plants Azucena montrait une

Tableau C3 : test de résistance de plantes F₂ IR64 x Azucena vis-à-vis de PH14-D31C12.

		Nombre de plantes			Proportion de plantes	
		Sensibles	Résistantes	Total	Sensibles	Résistantes
IR64		0	39	39	0,0 %	100,0 %
Azucena		26	2	28	93,0 %	7,0 %
F ₂ IR64 x Azucena	observées	45	162	207	21,7 %	78,3 %
	"corrigées"	49	158	207	23,4 %	76,6 %
Valeurs théoriques pour	<i>Pi-33</i> dominant	52	155	207	25%	75%
	<i>Pi-33</i> récessif	155	52	207	75%	25%

		valeur chi2	probabilité associée ⁽¹⁾	hypothèse
Hypothèse " <i>Pi-33</i> dominant"	ségrégation "observée"	1,17	0,28	acceptée
	ségrégation "corrigée"	0,28	0,57	acceptée
Hypothèse " <i>Pi-33</i> récessif"	ségrégation "observée"	313	4 x 10 ⁻⁷⁰	refusée
	ségrégation "corrigée"	294	7 x 10 ⁻⁶⁶	refusée

(1) Probabilité de se tromper en refusant l'hypothèse

différence nette, entre une très forte sensibilité (Azucena) et une résistance faible et hétérogène (IR64, pour laquelle certains individus étaient sensibles, d'autres étaient résistants, d'autres enfin présentaient des symptômes intermédiaires). On peut l'interpréter comme une résistance forte ne s'exprimant qu'imparfaitement du fait des conditions de l'inoculation (injection).

Les plantes F_1 ne présentèrent pas une résistance forte, elles non plus, mais leur interaction avec la souche PH14-D31C12 aboutit à des symptômes bien plus proches de ceux d'IR64 que de ceux d'Azucena.

Etant donné le caractère ambigu des résultats obtenus, il a été décidé de faire une notation plante à plante des symptômes sur les 16 plantes F_1 inoculées, sur 10 des plantes IR64 inoculées, et sur 10 des plantes Azucena. Ces notations se font sur une échelle allant de 1 (Résistant) à 6 (Sensible) et inspirée de Notteghem (1981, *in* Tharreau, 1994) (annexe 2). En faisant la moyenne des évaluations, on obtient :

IR64	$3,4 \pm 0,9$
Azucena	$5,9 \pm 0,2$
F_1	$4,3 \pm 0,7$

Un test d'égalité des espérances a montré, pour un seuil de 5%, que la différence entre les moyennes de IR64 et des F_1 n'était pas significative, mais que les différences entre F_1 et Azucena, et entre IR64 et Azucena l'étaient. Il indiquerait donc que les F_1 se comportent comme IR64 (résistance s'exprimant partiellement suite aux conditions d'inoculation dans cette expérimentation), et différemment d'Azucena (forte sensibilité)

En conclusion, bien que les résultats de cette expérimentation militent en faveur du caractère dominant de *Pi33*, l'absence de résistance totale chez IR64 et chez les F_1 ne permet pas de conclure avec certitude.

b) Plantes F_2

En conséquence, il a été décidé de multiplier ces plantes F_1 afin d'obtenir des plantes F_2 IR64 \times Azucena. Deux cent sept plantes F_2 ont été inoculées par pulvérisation avec la souche PH14-D31C12. Parallèlement, des plantes IR64 et Azucena ont été inoculées avec la même souche en guise de témoin. Toutes les plantes IR64 ont montré une résistance, tandis que 93% des plantes Azucena ont montré des symptômes sensibles (tableau C3). L'absence de

symptômes sensibles chez 7 % des plantes Azucena pourrait s'expliquer par un phénomène d'esquive, lié par exemple à la position de la feuille au moment de l'inoculation.

En ce qui concerne les plantes F_2 , 21,7 % des plantes ont montré des symptômes de sensibilité (tableau C3). Pour prendre en compte le fait que, chez le témoin sensible, une partie des plantes ne montrent pas de symptômes, on peut corriger ce pourcentage en utilisant la formule suivante : $F_2^{S_{réel}} = F_2^{S_{vu}} \times \left(1 + \frac{Az^R}{Az^S}\right)$ où $F_2^{S_{réel}}$ est le nombre de plantes F_2 n'ayant pas la résistance correspondant à *ACE1*, $F_2^{S_{vu}}$ est le nombre de plantes F_2 manifestant une sensibilité, et où $\frac{Az^R}{Az^S}$ est le rapport entre le nombre de plantes Azucena « résistantes » et le nombre de plantes Azucena sensibles. On obtient alors un pourcentage « corrigé » de 23,4% de plantes sensibles.

Que ce soit en données brutes ou en données corrigées, le test du χ^2 a montré que l'hypothèse selon laquelle *Pi33* est récessif ne peut être conservée, et que celle selon laquelle il est dominant ne peut être rejetée (tableau C3). **En conclusion, à l'instar de nombreux autres gènes de résistance, *Pi33* est dominant.**

II) Densification de la carte IR64 × Azucena dans la zone de *Pi33*

1) Cartographie fine de *Pi33*

a) Observations sur les 105 premières lignées

Pi33 a été cartographié dans un espace de 6,7 cM entre les marqueurs G1010 et G104 sur les 105 lignées HD IR64 × Azucena disponibles au début des travaux. Une position similaire de ce gène a été trouvée dans le croisement Azucena × Bala. Cependant, à cette position, il existe un nombre relativement important (12) de lignées ayant un phénotype sensible, et dont les marqueurs proches de la position supposé de *Pi33* proviennent du parent résistant IR64 (ces lignées seront nommées « sensibles dans un contexte génétique résistant »). Ce résultat peut s'expliquer par plusieurs hypothèses :

- (i) Le phénotype observé correspond au génotype. Il y aurait un grand nombre de doubles recombinants, sur une distance considérée jusqu'à présent comme faible (6,7 cM). Cette hypothèse n'explique pas pourquoi tous ces « doubles recombinants » sont sensibles.

- (ii) Suite à des recombinaisons asymétriques, le gène *Pi33* serait délété chez certaines des lignées étudiées. Il faut cependant noter (i) qu'en dehors de ce phénotype sensible aucune trace de délétion n'a été observée, (ii) que, pour 8 de ces lignées, on ne constate aucune recombinaison sur le reste du chromosome 8 et (iii) que, pour les 4 autres lignées, les recombinaisons observées n'intéressent pas la zone de *Pi33*.
- (iii) Le gène de résistance *Pi33* peut, selon le contexte génétique, voir son expression inhibée. Dans un premier temps, on peut supposer que cette répression est le fait d'un gène unique, qui proviendrait du parent Azucena, serait absent des lignées résistantes, et présent dans les lignées sensibles dans un contexte résistant. Cette hypothèse d'un gène unique se heurte au fait que la ségrégation entre les 42 lignées résistantes et les 12 lignées sensibles en contexte résistant n'est pas de type 1:1. De plus, la cartographie d'un tel gène hypothétique s'est révélée non concluante.

En conclusion, l'hypothèse la moins improbable semble donc être l'existence d'un facteur multigénique tendant à inhiber l'expression phénotypique de *Pi33*.

b) Recherche des recombinants dans la région de *Pi33*

Dans le but de réaliser une cartographie physique, il est nécessaire d'affiner la cartographie génétique de *Pi33*. Cela implique d'une part de placer un plus grand nombre de marqueurs dans la région de ce gène, et d'autre part d'augmenter la précision de la cartographie de *Pi33* et des marqueurs qui l'entourent. Dans ce cadre, de nouvelles lignées IR64 × Azucena constituent un outil précieux.

Le gène *Pi33* a déjà été cartographié sur 105 lignées IR64 × Azucena (Tharreau *et al.*, 2000 (sous le nom de *Pi-Irat7-1*)). Cinq cent nouvelles lignées Haploïdes Doubles (HD) et 284 lignées « Single Seed Descent » (SSD) IR64 × Azucena ont été produites dans le cadre du projet EGRAM. Ces lignées ont été caractérisées pour différents marqueurs microsatellites, dont deux, RM44 et RM72, encadrent *Pi33*. Sur un total de 889* lignées, 858 furent caractérisées pour les deux marqueurs microsatellites. Sept de ces lignées présentent un allèle non parental pour l'un au moins de ces marqueurs. Huit cent cinquante et une lignées sont donc utilisables dans cette étude. Quarante vingt dix de ces lignées sont recombinantes entre RM44 et RM72, soit une distance de 10,6 cM. Pour 73 de ces lignées, des graines ont pu être obtenues, ce sont donc ces dernières qui ont été utilisées ultérieurement.

* 105 lignées HD + 500 autres HD (EGRAM) + 284 lignées SSD

Figure C2 : Extrait de la carte microsatellite du chromosome 8 établie à l'Université de Cornell sur le croisement IR64 x Azucena (Wu, Tanksley, 1997; Chen *et al.*, 1997; Temnykh *et al.*, 2000; Temnykh *et al.*, 2001)

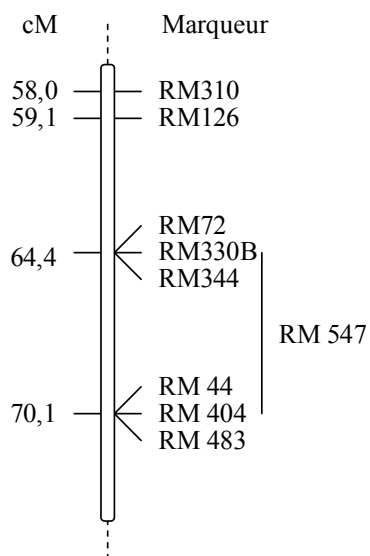


Figure C3 : Extrait de la carte RFLP du chromosome 8 établie par le RGP sur le croisement Nipponbare x Kassalath (RGP, 2000)

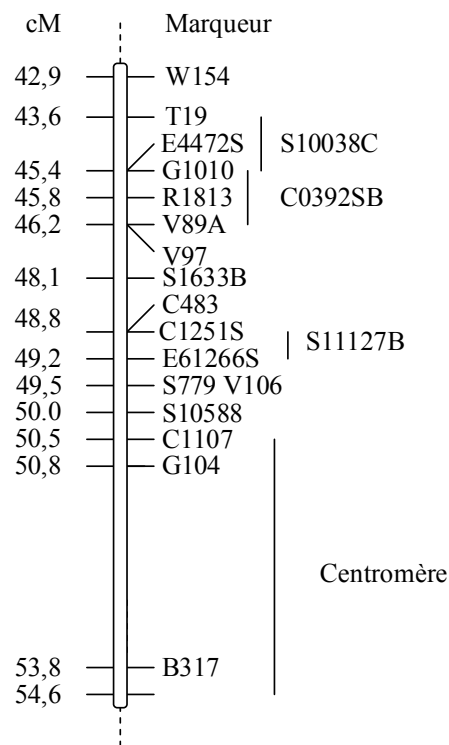
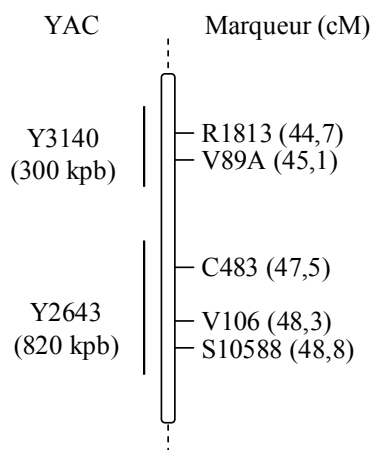


Figure C4 : Extrait de la carte physique YAC établie par le RGP sur le croisement Nipponbare x Kassalath (Umehara *et al.*, 1995)



c) Cartographie fine de *Pi33*

Cinquante sept des lignées recombinantes ont été inoculées avec les souches PH14 et PH14-D31C12. Les lignées présentant une sensibilité à PH14 (virulente) et une résistance à PH14-D31C12 (avirulente) sont considérées comme possédant *Pi33*, celles sensibles à PH14-D31C12 comme ne le possédant pas. Afin de s'assurer des résultats, plusieurs répétitions de ces expérimentations ont été réalisées. Selon la lignée considérée, le nombre de répétition varie de 2 à 6. Ces inoculations ont permis une précision de la cartographie de *Pi33* de l'ordre de 0,2 cM. **Ce gène se situe à 0,7 cM du marqueur RM72 et 9,9 cM de RM44.**

2) Recherche de marqueurs liés à *Pi33*

Sur la carte précédemment établie à l'aide des lignées HD IR64 × Azucena, le gène *Pi33* est situé dans une zone de 6,7 cM entre les marqueurs G1010 et G104. *Pi33* serait à une distance de 1 à 2 cM de G1010. Actuellement, différentes cartes génétiques du riz sont disponibles. L'utilisation des marqueurs qui, dans ces cartes, se trouvent entre G104 et G1010 a eu pour but de resserrer l'espace entre *Pi33* et ses marqueurs les plus proches.

Dans la carte du RGP, réalisée à partir d'une population de 186 individus F₂ Nipponbare × Kassarath, G1010 et G104 sont séparés par 5,4 cM ce qui est cohérent avec nos données. Entre ces deux marqueurs, on trouve 14 autres marqueurs RFLP sur cette carte, comme le montre la figure C3. Treize des seize marqueurs RFLP ont été séquencés au RGP et leurs séquences sont disponibles sur les banques de données publiques (NCBI). Les séquences des marqueurs V106, V89A et V97 ne sont pas disponibles. Les vecteurs plasmidiques originaux de ces marqueurs n'ont pas pu être obtenus.

Dans la carte microsatellite élaborée à Cornell, on trouve aussi neuf marqueurs microsatellites dans cette zone du chromosome 8 (figure C2).

Par ailleurs, un analogue de gène de résistance, nommé Os-r6.3 a été cartographié à proximité de *Pi33* (Leister *et al.*, 1998). La séquence de ce marqueur est disponible dans les banques de données.

a) Cartographie des marqueurs microsatellites

Un polymorphisme de longueur a été observé sur gel d'agarose entre les parents IR64 et Azucena pour sept des neuf marqueurs microsatellites (tableau C4). L'analyse de la descendance par PCR a permis de placer ces marqueurs par rapport à *Pi33*. Il est à noter que

Tableau C4 : Les différents marqueurs disponibles dans la région de *Pi33*

Type de marqueur	Marqueur	Séquence disponible	Synthèse des amorces	Cloné ⁽¹⁾	Séquence ⁽¹⁾	Polymorphisme ⁽²⁾	Cartographie génétique ⁽³⁾
RFLP	T19	O	O	O	N	O	N
	E4472S	O	O	N	N	NT	N
	S10038C	O	O	O	O	O	O
	C0392SB	O	O	N	N	NT	N
	G1010	O	O	O	O	O	O
	R1813	O	O	O	O	O	O
	V89A	N	N	N	N	NT	N
	V97	N	N	N	N	NT	N
	S1633B	O	O	O	N	O	O
	C483	O	O	N	O	O	O
	C1251S	O	O	N	N	NT	N
	S1127B	O	O	N	N	NT	N
	Os-r6.3	O	O	O	N	N	N
SSR	RM310	O	O	N	N	O	O
	RM126	O	O	N	N	N	N
	RM72	O	O	N	N	O	O
	RM330B	O	O	N	N	O	O
	RM344	O	O	N	N	N	N
	RM547	O	O	N	N	O	O
	RM44	O	O	N	N	O	O
	RM404	O	O	N	N	O	O
	RM483	O	O	N	N	O	O

(1) Au cours de ces travaux, pour vérification

(2) Entre les variétés IR64 et Azucena. O : Oui, N : Non, NT : Non Testé

(3) En utilisant les lignées recombinantes du croisement IR64 x Azucena

RM72 et RM44, qui encadrent *Pi33*, ont permis de sélectionner, parmi les 760 lignées actuellement disponibles, les 73 qui sont recombinantes dans la région de ce gène.

b) marqueurs RFLP

☼ *Synthèse des marqueurs*

Les inserts de G1010, R1813, S10038C, Os-r6.3, C483 et S1633 ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique des variétés IR64, Azucena et Nipponbare. Ils ont ensuite été clonés, puis séquencés (détails dans le tableau C4). L'alignement de ces séquences (annexe 10) montre dans tous les cas une forte homologie entre les trois variétés. Dans le cas de R1813, le séquençage a montré que deux séquences différentes avaient été amplifiées et clonées pour chaque variété. L'une présente une forte homologie avec la séquence de R1813, l'autre ne présente aucune homologie et correspond probablement à une amplification non spécifique (résultat non montré).

☼ *Cartographie*

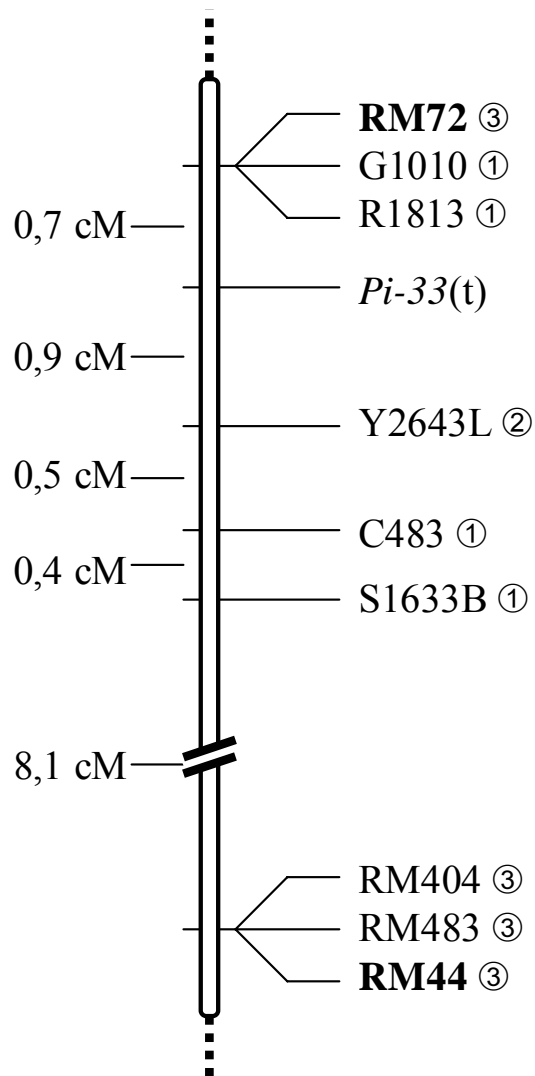
Les sondes S10038C, G1010, et Os-r6.3 ont été hybridées sur des membranes Southern des 105 premières lignées HD IR64 × Azucena dans le but de les localiser sur la carte.

L'insert Os-r6.3 était monomorphe chez les parents, et n'a donc pas pu être cartographié. La sonde S10038C a été cartographiée sur le chromosome 7, et non sur le chromosome 8 dans lequel elle est placée sur la carte du RGP.

La sonde G1010 a été précédemment cartographiée sur cette population mais, une nouvelle hybridation a été réalisée afin de vérifier sa position. Si les résultats observés sont cohérents avec ceux obtenus précédemment pour 103 des 105 lignées, on obtient un résultat différent pour les lignées recombinantes 47 et 253, ce qui déplacerait la position de ce marqueur de 2 cM par rapport à sa position initiale.

Les marqueurs R1813, S1633B et C483 ont été cartographiés sur les 57 lignées recombinantes entre RM44 et RM72 pour lesquelles la présence de *Pi33* a été testée. La sonde R1813 se trouve à 0,7 cM en amont de *Pi33*, tandis que la sonde C483 se trouve à 1,4 cM en aval de ce gène. Contrairement aux données du RGP indiquant que S1633B se trouve en amont de C483, nous l'avons cartographié en aval de ce dernier (figure C5). En ce qui concerne les sondes R1813 et G1010, les résultats obtenus suggèrent que ces sondes sont confondues avec RM72.

Figure C5 : Cartographie fine de *Pi33*



Légende:

- ① : Marqueur RFLP du RGP
- ② : Marqueur YAC END
- ③ : Marqueur microsatellite

c) Sélection de marqueurs AFLP par Bulk Segregant Analysis (BSA)

Ce travail a été réalisé par Sylvain Gaillard, dans le cadre de son stage de maîtrise.

Une stratégie de Bulk segregant analysis a été mise en place pour rechercher des marqueurs AFLP liés à *Pi33*. Au cours de cette expérimentation, il n'a pas été possible de trouver des marqueurs présentant un net polymorphisme entre les mélanges « sensibles » et les mélanges « résistants ». En revanche, dans 8 cas, il a été trouvé des marqueurs ne présentant qu'une très faible amplification pour l'une des deux classes de mélange. Ces marqueurs ont été cartographiés en utilisant 31 des lignées recombinantes. Les résultats obtenus ne permettent pas une cartographie sûre de ces marqueurs mais permettent néanmoins de conclure qu'aucun d'entre eux ne se trouve entre RM72 et C483.

d) Marqueurs YAC ends

Sur la carte physique YAC du riz élaborée au RGP (Saji *et al.*, 2001), deux clones YAC encadrent la zone d'intérêt (figure C4). Le clone Y3140 contient R1813, tandis que le clone Y2643 contient C483, V106 et S10588. Ces deux clones ont été utilisés comme matrice ADN pour des PCR walking (cf. chapitre « Matériels et méthodes », § II.2.b, p. 92, ainsi que l'annexe 7). Ainsi que le montre la figure C6, il existe, pour chaque extrémité de YAC, au moins une enzyme permettant la synthèse d'une sonde de bonne qualité. Quatre sondes d'extrémité de YAC ont été purifiées par PCR préparative : Y2643L (DraI), Y2643R (PvuII), Y3140L (StuI) et Y3140R (PvuII).

Les marqueurs Y3140R et Y3140L n'ont pas été cartographiés car ils présentent des profils de restriction complexes lors de l'hybridation avec l'ADN génomique d'IR64 et d'Azucena. Y2643R ne présente pas de polymorphisme de restriction avec les enzymes utilisées.

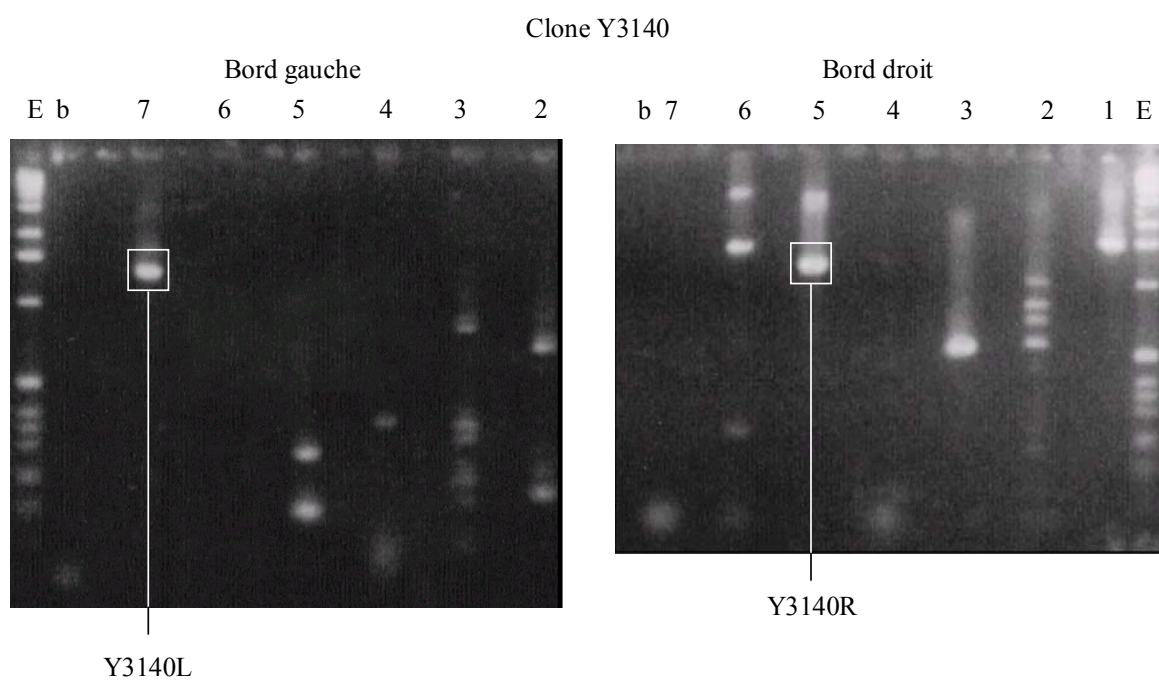
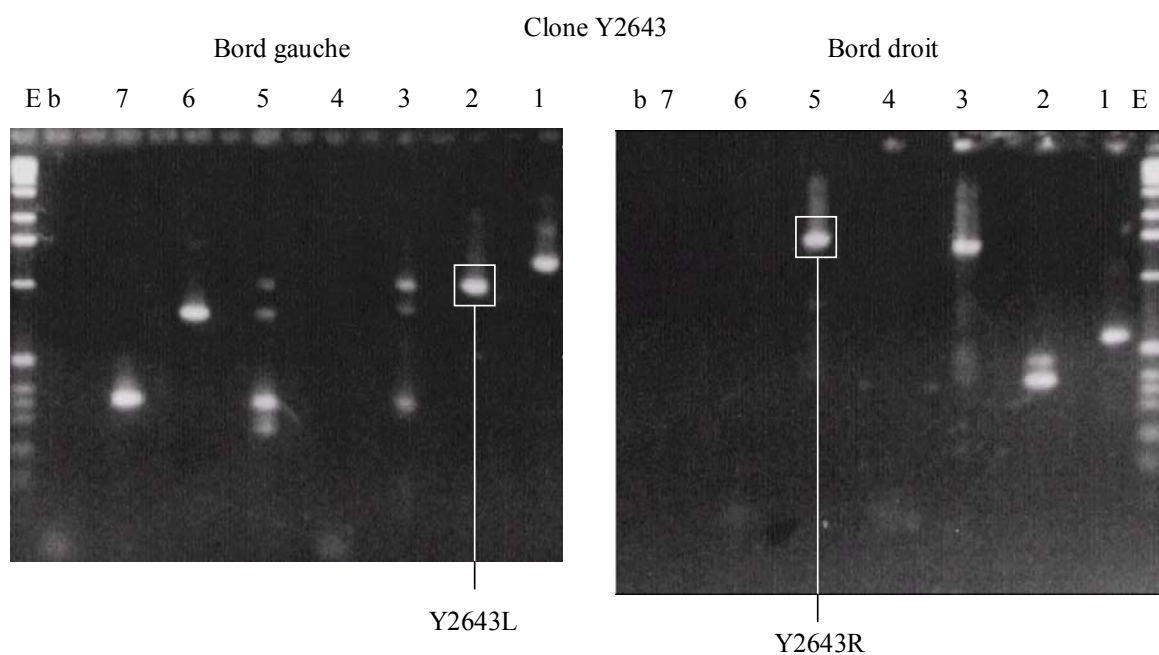
Le marqueur Y2643L présente un polymorphisme exploitable. Il a été cartographié sur les 57 nouvelles lignées recombinantes à 0,9 cM de *Pi33*.

e) Conclusion

Lorsque ce travail de cartographie fine a été initié, le gène *Pi33* se trouvait dans une zone de 6,7 cM définie à partir d'une descendance de 105 individus. **La zone séparant les marqueurs les plus proches de ce gène a été réduite à 1,6 cM (figure C5), grâce à l'adjonction des nouveaux marqueurs et l'utilisation d'une population de 784 descendants. Cet espace est comparable à celui obtenu par d'autres équipes au cours**

Figure C6 : Synthèse des sondes d'extrémité de YAC

Gels de vérification de la seconde PCR (cf. « Matériels et méthodes », § II.2.b, p. 92 et annexe 7).
ADN matrice : digestion-ligation à partir de 150 pg d'ADN génomique de levure



1 : Ecl 136 II
4 : Hpa I
7 : StuI

Légende:
2 : Dra I
5 : Pvu II
b : blanc

3 : EcoR V
6 : ScaI
E : Echelle

d'autres travaux de clonage de gènes de résistance à la pyriculariose (tableau C5). Il est suffisamment étroit pour entamer un travail de cartographie physique.

III) Discussion

1) Identification de *Pi33*, un nouveau gène de résistance du riz correspondant à *ACE1*

Démontrer qu'un gène de résistance à la pyriculariose est un gène encore non décrit est complexe car (i) les isolats de *M. grisea* utilisés comportent souvent plusieurs gènes d'avirulence inconnus et (ii) les différents cultivars de riz comportent généralement plusieurs gènes de résistance épistatiques. Le phénotype « résistant » peut être dû à n'importe lequel des gènes de résistance qui ségrègent parmi les descendants d'un croisement. Il est donc bien plus difficile de prouver la présence d'un gène de résistance que son absence.

a) Différentes méthodes d'identification de nouveaux gènes de résistance

Historiquement, la caractérisation de gènes de résistance à la pyriculariose s'est faite d'abord en étudiant les spectres de résistance vis-à-vis de différents isolats des variétés résistantes. En particulier, l'étude de variétés japonaises obtenues par l'introgression de résistances issues de variétés chinoises a permis la caractérisation d'un premier ensemble de gènes de résistance (Kiyosawa, 1966 ; Kiyosawa, 1972 ; Shinoda *et al.*, 1971). On peut aussi citer les travaux de Mackill & Bonman (1992) qui introgressèrent des gènes de résistance des variétés Tetep, LAC23, Pai Kan Tao et 5173 dans la variété sensible CO39 et étudièrent les spectres de résistance des lignées isogéniques obtenues. Ce type de méthode a aussi été utilisé pour étudier d'autres pathosystèmes, tels que l'interaction *Lycopersicon esculentum* – *Cladosporium fulvum*. Dans ce dernier cas, c'est à partir d'espèces sauvages proches que les gènes de résistance *Cf* furent introgressés dans des variétés améliorées à partir des années 1930 (Steven & Rick, 1988).

De nombreuses autres méthodes ont aussi été utilisées pour découvrir des gènes de résistance. On peut citer parmi elles la recherche, parmi des mutants d'une lignée résistante, d'individus sensibles spécifiquement à une souche de l'agent pathogène, qui a permis de mettre en évidence le gène de résistance RPS2 (Kunket *et al.*, 1993), ou encore la recherche,

dans une collection de lignées de tomates sauvages, d'individus manifestant une réaction hypersensible lors de la mise en contact avec un facteur d'agressivité, qui a permis de découvrir le gène de résistance *Cf-ECP2* chez la tomate (Laugée *et al.*, 1998).

La cartographie de ces gènes de résistance s'est faite le plus souvent en inoculant la descendance d'un croisement entre une variété résistante et une variété sensible à l'aide d'une souche avirulente. Cette méthode a été aussi utilisée pour détecter de nouveaux gènes de résistance. C'est de cette manière que des gènes de résistance à la pyriculariose tels que *Pi11* (Zhu *et al.*, 1993) ou *Pi-CO39(t)* (Chauhan *et al.*, 2002) ont été identifiés.

Récemment, neuf gènes de résistance du riz à la pyriculariose ont été trouvés de cette manière dans un seul croisement en utilisant 6 souches de *M. grisea* (Sallaud *et al.*, sous presse). Au delà des gènes mis en évidence, c'est le nombre de gènes de résistance à la pyriculariose du riz qui restent encore à découvrir que cette étude nous révèle. La mise en évidence de quatre gènes de résistance là où aucun autre gène n'avait été cartographié, dans un croisement déjà bien connu, laisse entrevoir la très grande quantité de gènes de résistance inconnus présents dans les nombreuses variétés de riz cultivées dans le monde.

b) Limites

De telles méthodes présentent souvent l'inconvénient de ne pas permettre de distinguer deux gènes de résistance se trouvant sur des loci proches (ou inversement, de se rendre compte qu'ils ne forment qu'un). Les gènes de résistance provenant de variétés différentes sont cartographiés dans des croisements différents en utilisant des souches différentes. Le génotype des souches n'étant généralement pas connu, il est impossible de tester l'identité de deux gènes de résistance identifiés dans des croisements différents avec des souches différentes. Ainsi, *Pi3* et *Pi5* ont été considérés comme différents, jusqu'à ce que Jeon *et al.* (2002) montrent qu'ils ne forment qu'un seul et même gène. Il en est de même pour *Pi4* et *Pi-ta* (Inukai *et al.*, 1994). On peut encore citer *Pi1* et *Pi-k^m* qui sont probablement alléliques (Tharreau, communication personnelle).

Aucun test d'allélisme n'a été réalisé entre *Pi11* et *Pi29(t)*. Ces deux gènes se trouvent dans le voisinage du même marqueur du chromosome 8, mais ils ont été détectés dans des croisements différents à l'aide de souches différentes. On ne peut donc exclure qu'ils ne forment qu'un. De façon plus générale, si 61 gènes de résistances à la pyriculariose sont considérés comme caractérisés (tableau A3, p. 38), combien d'entre eux sont-ils en réalité

alléliques ? Parmi eux en est-t-il qui portent plusieurs noms ? Et, inversement, les 5 allèles de *Pi-k*, les 2 allèles de *Pi-ta* et de *Pi-z* sont-ils tous des allèles ? Il est souvent assez difficile de le savoir.

c) Utilisation de couples de souches quasi isogéniques

Au cours de cette étude, nous avons identifié un nouveau* gène de résistance du riz, *Pi33*, que nous avons cartographié sur le bras court du chromosome 8. Cette identification a été permise par l'utilisation de couples de souches isogéniques du champignon pathogène *M. grisea* (produites par l'équipe de Marc-Henri Lebrun) qui ne diffèrent que par la présence ou l'absence de l'allèle avirulent du gène *ACE1*. Lorsqu'une lignée de riz est à la fois sensible à une souche virulente et résistante à la souche isogénique avirulente correspondante, alors il est possible d'affirmer que cette variété possède *Pi33*. Ces couples de souches isogéniques sont très utiles pour identifier le gène de résistance correspondant à *ACE1* et suivre sa ségrégation dans n'importe quel croisement. L'utilisation de couples de souches isogéniques est une première dans l'isolement de gènes de résistances à des agents pathogènes fongiques.

A l'aide de cet outil, nous avons réalisé un ensemble d'expérimentations permettant de distinguer *Pi33* d'autres gènes de résistances connus : (i) nous avons recherché *Pi33* parmi diverses variétés résistantes, (ii) nous l'avons placé de façon précise sur le chromosome 8 de la carte du génome du riz et (iii) nous l'avons distingué par des tests d'allélisme des autres gènes de résistance à la pyriculariose déjà placés sur ce chromosome. Ces expériences montrèrent que *Pi33* est différent de tous les autres gènes de résistance à la pyriculariose connus. Une telle méthode permet donc une identification sûre des gènes de résistance étudiés, et inversement elle évite de créer des doublons en donnant un nouveau nom à un gène de résistance déjà caractérisé dans d'autres cultivars.

2) Hypothèses sur l'origine de *Pi33*

Pi33 a été détecté dans plusieurs variétés demi-naines de riz *indica* dont Bala, Carreon, IR1529, IR64, Irat7, BW100, DJ8-341, Taichung Native 1 (TN1), et Zhai Ye Qing (ZYQ8). Deux hypothèses peuvent être faites concernant l'origine de cette répartition : (i) *Pi33* provient d'un parent commun à ces variétés ou (ii) *Pi33* est présent dans différentes variétés

* Par nouveau, nous entendons nouvellement découvert, et non nouvellement apparu.

traditionnelles et a été sélectionné plusieurs fois indépendamment à partir de ces sources diverses.

Dans la première hypothèse, le parent commun à la plus grande partie de ces variétés (Bala, BW100, DJ8-341, IR64, IR1529 et Irat7) est Taichung Native 1 (TN1) (figures B1, B2, et B3 et la base de données IRIS^{*}). Cette variété possède *Pi33* et provient du croisement Deo-Geo-Woo-Gen (DGWG) × Tsai-Yuan-Chung (TYC). DGWG est un mutant spontané qui a été très utilisé pour l'introgession du gène de semi-nanisme dans les variétés *indica* de la révolution verte (Monna, 2002). Cette variété s'est révélée sensible aux souches transformées avec *ACE1* et ne semble donc pas posséder *Pi33*. En revanche, TYC s'est révélée résistante à 2/0/3-D31C12 tout en étant sensible à 2/0/3. Comme TN1 a été une source secondaire du gène de semi-nanisme dans beaucoup de croisements, ce serait cette variété qui aurait transmis *Pi33* à de nombreuses variétés demi-naines du riz.

Dans la seconde hypothèse, *Pi33* a été introgressé dans des variétés *indica* demi-naines à partir de différentes origines. Une telle hypothèse pourrait être confortée par le fait qu'une variété *indica* traditionnelle comme Carreon contient elle aussi *Pi33*. Par ailleurs, une variété améliorée ne comportant pas TN1 dans sa généalogie (ZYQ8) s'est elle aussi révélée résistante.

Quelle que soit l'hypothèse concernant l'origine de *Pi33*, ce gène a été sélectionné plusieurs fois dans différents croisements. Par exemple, il a été sélectionné dans le croisement DGWG × Tsai Yuan Chung qui a abouti à la variété TN1, à Taiwan ; il a aussi été sélectionné dans le croisement TN1 × Ebandioulaye qui a abouti à la variété Irat7, en Afrique de l'Ouest ; et enfin il a aussi été sélectionné dans les nombreux croisements qui ont mené à IR64, aux Philippines. Ces événements indépendants de sélection involontaire^{**} dans plusieurs programmes d'amélioration végétale mis en place dans trois zones géographiques différentes ne peuvent pas s'expliquer par la sélection pour le semi nanisme qui est induit par un gène récessif du chromosome 1 (*sd1*) Ils pourraient refléter le large spectre de résistance de *Pi33* vis-à-vis des souches de *M. grisea*. Une telle hypothèse est appuyée par des travaux réalisés parallèlement à cette thèse qui ont montré que les souches virulentes appartiennent à un groupe génétique particulier et seraient issues d'un petit nombre de mutation (Isabelle Fudal, communication personnelle).

^{*} International Rice information system : <http://www.iris.irri.org/>

^{**} Par involontaire, nous entendons qu'au moment où ces croisements étaient réalisés, *Pi33* n'était pas connu. Nous n'entendons bien sûr pas qu'une sélection massale ou autre pour la résistance à *M. grisea* n'ait pas été réalisée.

Afin d'étudier plus en détail ces hypothèses, le gène de résistance *Pi33* a été recherché dans un nombre plus important de lignées du riz dont des lignées parentes de IR64. Parallèlement, des travaux de biologie moléculaire ont été réalisés pour étudier la diversité génétique de ces lignées au niveau du locus de *Pi33*. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre « Diversité au niveau du locus de *Pi33* », p. 185.

3) Cartographie fine de *Pi33*

a) Intérêt de cloner *Pi33*

Bien que la pyriculariose du riz constitue un modèle de l'interaction plante – agent pathogène, les mécanismes moléculaires de l'interaction entre les gènes de résistances et les gènes d'avirulence sont peu connus. Sur les 64 gènes de résistance déjà recensés, il existe un seul exemple de couple gène d'avirulence – gène de résistance où les deux partenaires ont été clonés et où leur interaction a été étudiée, c'est celui de l'interaction *Pi-ta* (Bryan *et al.*, 2000) – *AvrPita* (Jia *et al.*, 2000). Dans un autre cas (*Pib*, Wang *et al.*, 1999), seul le gène de résistance l'a été. Enfin, trois autres gènes de résistance sont en cours de clonage (en plus de *Pi33*). Pour l'un d'entre eux (*Pi-CO39*), le gène d'avirulence correspondant a été cloné (*AVR1-CO39*, Farman & Leong, 1998 ; Farman *et al.*, 2002).

La caractérisation de gènes de résistance et des facteurs d'avirulence correspondants, qui est importante pour comprendre comment les plantes résistent à leurs agents pathogènes, ne fait donc que commencer chez le riz. Dans le cas de *Pi33*, cet intérêt est renforcé par le fait que *ACE1* n'est pas un gène d'avirulence classique. Tant que le génome du riz n'est pas totalement séquencé, le clonage positionnel est requis pour isoler de nouveaux gènes de résistance. De plus, même après le séquençage de la variété Nipponbare du riz qui est en cours, le clonage positionnel restera indispensable pour caractériser des gènes de résistance portés par d'autres variétés.

b) Nécessité d'une cartographie fine, comparaison avec d'autres études

Comme le riz a un génome plus grand que celui d'*A. thaliana*, la cartographie physique requiert au préalable une cartographie génétique fine. Dans le cas de *Pi33*, le fait que ce gène soit proche du centromère du chromosome 8 risque d'induire une augmentation du rapport distance physique / distance génétique (comme cela est généralement supposé, et a été montré par Chen *et al.*, 2002 pour les chromosomes 1, 4 et 10 du riz), ce qui renforce la nécessité et l'utilité d'une cartographie fine.

Le clonage positionnel est une méthode qui a déjà été utilisée pour cloner un certain nombre de gènes de résistance du riz. En ce qui concerne la cartographie fine, le tableau C5 montre les travaux déjà réalisés chez le riz. A l'exception du cas de *Pi2(t) – Pi9(t)*, qui a été cartographié avec une grande précision en utilisant un très grand nombre de marqueurs et de lignées recombinantes, les travaux réalisés ont abouti à des cartes dont la précision est du même ordre de grandeur que celle réalisée ici (tableau C5). Cette cartographie fine a permis de réaliser la cartographie physique présentée dans le chapitre suivant.

c) Autres utilités de la cartographie fine

Si la cartographie fine est une étape indispensable du clonage positionnel de *Pi33*, elle peut aussi être utile pour d'autres applications, car elle apporte des marqueurs proches de ce gène. Au niveau fondamental, les marqueurs proches sont susceptibles de présenter un fort déséquilibre de liaison avec *Pi33*. Ils peuvent donc être utilisés pour étudier le polymorphisme du locus de *Pi33* chez des variétés résistantes ou sensibles. D'un point de vue plus appliqué, les marqueurs proches de *Pi33* pourraient être un outil dans le cadre d'une sélection assistée par marqueurs de ce gène. Une telle démarche peut se faire dans le cadre de la mise en place d'une résistance durable. En effet, l'allèle avirulent d'*ACE1* est porté par la très grande majorité des souches de *M. grisea*. Les souches virulentes semblent toutes avirulentes vis-à-vis des gènes *Pi1* et *Pi2(t)* (Didier Tharreau, communication personnelle). L'intérêt de la réunion de ces trois gènes de résistance dans une seule variété pour aboutir à une résistance durable du riz à *M. grisea* est actuellement en cours d'étude.

Tableau C5 : Cartographie fine de gènes de résistance du riz à la pyriculariose.

Gène	Espace entre les deux marqueurs les plus proches	Type de marqueurs	Référence
<i>Pi-ta</i>	2,8 cM	RAPD	Bryan <i>et al.</i> , 2000
<i>Pi-b</i>	0,5 cM (+ 3 marqueurs qui cosegrègent)	RFLP & RAPD	Miyamoto <i>et al.</i> , 1996
<i>Pi-co39(t)</i>	1,2 cM (+2 marqueurs qui cosegrègent)	RFLP	Chauhan <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi3 - Pi5</i>	?	AFLP	Jeon <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi2(t) - Pi9(t)</i>	0,25 cM (+ un marqueur qui cosegrège)	RAPD	Liu <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi33</i>	1,6 cM	RFLP	Cette étude (Berruyer <i>et al.</i> , sous presse)

CARTOGRAPHIE PHYSIQUE DE *Pi33*, TESTS DE COMPLEMENTATION, ET ETUDE DE LA SEQUENCE AU NIVEAU DE CE GENE

Note : La cartographie physique détaillée de la zone s'étendant du marqueur G1010 au marqueur Y2643R est présentée dans la figure D1. Cette figure n'a pas été intégrée dans le volume de la thèse, mais est fournie sous la forme de cinq feuillets à assembler.

I) Cartographie physique de *Pi33* chez IR64 et Azucena

☼ *Stratégie utilisée*

Afin de cloner le gène de résistance *Pi33*, celui-ci doit être placé dans une carte physique d'une variété résistante, en partant des données de cartographie génétique. Différentes banques BAC du riz sont disponibles (cf. chapitre « matériel et méthodes » § I.3, p. 87 et le tableau B3). La banque de la variété Nipponbare présente l'avantage d'être ordonnée en contigs, ce qui permet une marche plus rapide. Cependant, cette variété ne possède pas l'allèle résistant de *Pi33*. En revanche, si la variété IR64 possède cet allèle, la banque de cette variété n'est pas ordonnée. En conséquence, la cartographie s'est faite en quatre étapes :

- (i) Identification de contigs. Des marqueurs déjà définis au cours de la cartographie génétique de *Pi33* ont été cartographiés physiquement dans la banque BAC OSJNBa de Nipponbare. Des sondes ont été hybridées sur des membranes à haute densité de la banque Nipponbare (OSJNBa). Les résultats de ces hybridations permettent d'identifier dans quels contigs les marqueurs correspondants sont localisés.
- (ii) Marche chromosomique dans la banque Nipponbare. Le but est de relier les différents contigs identifiés dans le (i). Plusieurs méthodes ont été utilisées et sont détaillées dans

le chapitre « Matériel et méthodes », § III.2. p. 96. Le résultat de ce travail est résumé dans la figure D2.

- (iii) Changement de banque. Il consiste à hybrider, sur les membranes de la banque BAC OSIIBb de la variété IR64, les sondes utilisées pour la marche chromosomique. Enfin, le contig de clones de la banque d'IR64 ainsi obtenu a été confirmé en hybridant des sondes d'extrémités de clones de ce contig sur des membranes des banques d'IR64 (OSIIBb) et de Nipponbare (OSJNBa et b). Différents aspects de ce contig sont visibles figures D4, D5, D9.
- (iv) Test de complémentation. Afin de vérifier et d'affiner la cartographie physique de *Pi33*, mais aussi pour démontrer le clonage, un test de complémentation a été réalisé sur une variété sensible (Kassalath), en utilisant les clones BAC de la variété IR64 sélectionnés dans l'étape (iii).

1) Cartographie physique des marqueurs de la zone de *Pi-33*

A partir de la similarité des profils de restriction (fingerprints) des clones BAC des banques Nipponbare *HinDIII* (OSJNBa) et Nipponbare *EcoRI* (OSJNBb), des contigs ont été construits. Il est possible d'obtenir, sur le site Internet de l'Université de Clemson ^{*}, le contig auquel appartient un clone donné et un graphe représentant ce contig, les clones qu'il contient, et la façon dont, d'après fingerprint, on suppose que ceux-ci se superposent. Pour un clone BAC donné, il est aussi possible d'obtenir la séquence de chacune des extrémités de l'insert.

Depuis la publication des premiers contigs, des travaux d'hybridation ont été réalisés sur ces banques par de nombreuses équipes de par le monde. Ils ont permis de réaliser de nouveaux contigs, plus longs, mais aussi de les placer sur les chromosomes du riz^{**} (Chen *et al.*, 2002). Ces nouveaux contigs sont numérotés indépendamment des contigs précédemment publiés. En s'inspirant des programmes permettant de les visualiser, ces nouveaux contigs seront nommés « contigs FPC » et les anciens « contigs PDF ». Dans le texte et les figures, un numéro de contig donné sans plus de précision est un numéro de contig PDF.

^{*} <http://www.genome.clemson.edu/projects/rice/index.html>

^{**} *CGI Rice FPC Map (Dernière version : 06 décembre 2002)* : <http://www.genome.arizona.edu/fpc/rice/>

a) Marqueurs RFLP

Les sondes R1813, G1010, C483, S1633, encadrant le gène *Pi33* (figure C6) ont été hybridées sur des membranes de la banque Nipponbare HindIII (OSJNBa) de l'Université de Clemson.

☉ Sonde G1010

Cette sonde s'hybride fortement avec neuf clones, plus faiblement avec deux autres. Sur les neuf clones qui s'hybrident fortement avec elle, huit appartiennent au contig 852 (figure D1). Le neuvième appartient au contig 475. Les deux clones donnant un signal faible appartiennent aux contigs 551 et 81.

Le nombre de clones donnant un signal (neuf ou onze selon que les signaux faibles sont ou non pris en compte) est cohérent avec le taux de recouvrement de cette banque (dix fois le génome). Parmi les clones donnant un signal fort, la forte proportion (8/9) de ceux appartenant au contig 852 laisse à penser que ce contig est celui contenant le locus de G1010.

Le contig 852 regroupe 61 clones, dont 34 appartiennent à la banque OSJNBa et 27 à la banque OSJNBb. Sa longueur représente approximativement celle de 3,5 inserts BAC, soit 350 à 400 kpb environ (la taille moyenne d'un insert BAC de cette banque est de 128,5 kpb).

L'étude plus fine de ce contig montre que les clones identifiés par hybridation avec G1010 appartiennent à un sous-ensemble de 24 clones contigus. Parmi ces 24 clones, 14 appartiennent à la banque OSJNBb. Les huit clones ayant donné un fort signal d'hybridation comportent, d'après leurs profils de restriction, un segment commun dans lequel se trouve probablement G1010. Ce segment, assez court, se trouve à environ 1,5 clone BAC (150 à 200 kpb) d'une extrémité du contig 852 et deux clones BAC (200 à 250 kpb) de l'autre.

Des études d'homologie de séquences réalisées au cours de la thèse et confirmées par les travaux du TIGR*, montrent que G1010 présente une séquence très proche de celles des extrémités de deux BAC du contig 852 : OSJNBa 89F06 et OSJNBb 31L17. Le fait que le clone BAC OSJNBa 89F06 n'ait pas montré de signal peut être attribué à l'état des membranes, ou à la présence d'une contamination dans la banque. Si l'on considère ces séquences comme identiques, la position de G1010 dans le contig 852 est confirmée, et même précisée.

* <http://www.tigr.org/tadb/e2k1/osa1/mappedbacends/>

☼ *Sonde R1813*

Cette sonde s'hybride fortement avec six clones. Sur ces six clones, quatre appartiennent au contig 1033 (figure D1). Un autre appartient au contig 233. Le dernier n'appartient à aucun contig.

Le nombre de clones donnant un signal (6) est cohérent, bien que faible, avec le taux de recouvrement de cette banque. La relativement forte proportion (4 sur 6) de clones appartenant au contig 1033 laisse à penser que ce contig est celui contenant R1813.

Le contig 1033 regroupe 30 clones, dont 21 appartiennent à la banque OSJNBa et 9 à la banque OSJNBb. Sa longueur représente approximativement celle de trois inserts BAC, soit environ 300 à 350 kpb.

Une étude plus fine de ce contig montre que les quatre clones identifiés par hybridation appartiennent à un sous-ensemble de cinq clones contigus. Parmi ces cinq clones, un appartient à la banque OSJNBb (non hybridée avec R1813). Les quatre clones ayant donné un signal d'hybridation comportent un segment commun, dans lequel R1813 se trouve probablement. Il s'agit d'un segment nettement plus long ($\frac{1}{2}$ insert BAC environ) que dans le cas de G1010, il est situé à environ $\frac{1}{2}$ insert BAC (50 à 70 kpb) d'une extrémité du contig, et deux inserts BAC (200 à 250 kpb) de l'autre extrémité.

☼ *Sonde C483*

Cette sonde s'hybride fortement avec sept clones, plus faiblement (voire si faiblement que l'on ne peut toujours exclure la possibilité d'un artefact) avec cinq autres. Sur ces sept clones à fort signal, six appartiennent au contig 440 (figure D1). Un autre appartient au contig 473.

Le nombre de clones donnant un signal fort (7) est cohérent avec le taux de recouvrement de cette banque. La relativement forte proportion (6/7) de clones appartenant au contig 440 laisse à penser que ce contig est celui contenant C483. Ce résultat est cohérent avec celui du TIGR, qui a montré la forte homologie entre la séquence de C483 et celle de l'extrémité dite « forward » du clone OSJNBa 50C01.

Le contig 440 regroupe 84 clones, dont 53 appartiennent à la banque OSJNBa et 31 à la banque OSJNBb. Sa longueur représente approximativement celle de 3,5 inserts BAC, soit 350 à 420 kpb environ.

Une étude plus fine de ce contig montre que les 6 clones identifiés par hybridation appartiennent à un sous-ensemble de 22 clones contigus. Parmi ces 22 clones, 14 appartiennent à la banque OSJNBb (non testée ici). Les six clones ayant donné un signal d'hybridation comportent un segment commun, dans lequel C483 se trouve probablement. Il s'agit d'un segment plus long ($\frac{1}{4}$ d'insert BAC environ) que dans le cas de G1010, il est situé à environ 1 insert BAC (50 à 70 kpb) d'une extrémité du contig, et 2,5 inserts BAC (200 à 250 kpb) de l'autre extrémité. La forte homologie que présente ce marqueur avec la séquence d'extrémité du BAC OSJNBa 50C01f permet cependant, à l'intérieur de cet espace, de mieux localiser C483 (figure D1).

Le contig 440 appartient au contig FPC 162 qui le regroupe avec les contigs 37 et 1282. Les marqueurs présents sur ce contig FPC montrent, par comparaison avec la carte génétique, que l'on s'éloigne de *Pi33* en passant de 440 à 1282, puis de 1282 à 37. Cette donnée permet d'orienter une éventuelle marche chromosomique à partir de C483.

☉ *Sonde S1633*

Cette sonde s'hybride fortement avec trois clones et plus faiblement avec dix-neuf autres clones. Les trois « clones forts » et deux des clones hybridant faiblement appartiennent au contig 584. Les autres clones hybridant faiblement appartiennent aux contig 180 pour quatre d'entre eux, 458 pour deux autres. Parmi les onze restants, deux n'appartiennent à aucun contig, et neuf à des contigs différents. Il s'agit souvent de clones donnant un signal très faible, l'hypothèse d'un artefact ne peut donc être écartée.

Le contig 584 contient 64 clones. Sa longueur représente 3,5 clones BAC environ (350 à 420 kpb). Le contig 458 contient 29 clones, qui s'étendent sur 2,5 clones BAC environ (250 à 300 kpb). Le contig 180 présente un profil différent de tous les autres contigs observés jusqu'à présent : il comporte 700 clones et représente 6,5 clones BAC, soit un taux de recouvrement moyen de 108× environ, avec une pointe à plus de 400×. Ce taux est très grand comparé au taux moyen de la banque (25×) ou à celui des contigs déjà vus (18× pour 852, 10× pour 1033, 24× pour 440, 18× pour 584 et 15× pour 458). Ce profil particulier peut être dû à un assemblage aberrant de plusieurs groupes de BAC provenant de différentes zones du génome dont les profils de restriction sont très proches, ou bien de la répétition en tandem de grands fragments.

Pour chacun des trois contigs 584, 458 et 180, on peut définir une zone (A, B et C respectivement) où se trouvent les clones hybridant avec S1633.

La zone A est constituée de huit clones, trois appartenant à la banque OSJNBb, les cinq autres hybridant avec S1633. La zone B est constituée des deux clones du contig 458 hybridant avec S1633, qui sont contigus. La zone C comprend 320 clones dont 73 appartiennent à la banque OSJNBb, et 247 à la banque OSJNBa. Quatre de ces clones se sont hybridés avec celle-ci, tandis que les 243 autres, bien que présents sur la membrane, n'ont pas hybridé avec cette sonde, ce qui peut difficilement s'expliquer sans remettre en cause la validité physique de ce contig. Lors de la mise en place des contigs FPC, le contig 180 a été entièrement remanié. Les clones hybridant avec S1633 se retrouvent dans le contig FPC 150, qui, d'après les marqueurs et les séquences qui s'y trouvent, correspond à une zone du chromosome 8 éloignée de celle qui nous intéresse dans le cadre de cette étude.

Il y aurait donc au moins trois sites pour S1633, un hybridant fortement, et se trouvant dans le contig 584, et deux autres, plus faibles, dans les contigs 458 et 180. Ce résultat est cohérent avec les trois résultats suivants :

- (i) Deux loci ont été trouvés par le RGP dans le chromosome 8 pour la sonde S1633 : S1633A, situé à 7,3 cM au delà de R1813, et S1633B, qui nous intéresse ici. Les profils RFLPs de S1633 présentent fréquemment trois bandes, une forte et deux faibles, la forte correspondant à S1633A.
- (ii) Le TIGR a montré l'existence d'une forte homologie de séquence entre S1633 et l'extrémité amont (forward) du clone OSJNBb 40H19, appartenant au contig 584. Cette forte homologie a amené le TIGR à considérer que ce contig porte le marqueur S1633A.
- (iii) Il existe, entre S1633 et deux séquences d'extrémités de BAC appartenant au contig 180 (OSJNBb 35O07 et 01P11) une homologie suffisamment forte (92 %) pour expliquer une hybridation.

☼ *Résumé des résultats*

La sonde S1633 révèle au moins 3 copies dans le génome du riz, correspondant à 3 contigs différents. Il est possible d'écarter deux des trois contigs trouvés comme provenant d'une région du génome extérieure à la portion RM72 – RM44. Le marqueur S1633B serait donc porté par le contig restant, à savoir le contig 458.

Les sondes R1813, C483 et G1010 sont monocopies. Elles correspondent à trois contigs différents : 852 pour la sonde G1010, 1033 pour la sonde R1813, 440 pour la sonde C483.

b) Marqueurs d'extrémité de YACs

Les quatre marqueurs correspondant aux extrémités des deux clones YAC identifiés dans la zone R1813 – C483, nommément Y2643L, Y2643R, Y3140L et Y3140R, (tableau D1) ont été hybridés sur des membranes de la banque OSJNBa de la variété Nipponbare.

☼ Y2643L

Cette sonde s'hybride avec douze clones. Sur ces douze clones à fort signal, dix appartiennent au contig 478 (figures D1 et D4). Un autre appartient au contig 97, un dernier au contig 1385.

Le contig 478 regroupe 32 clones. Sa longueur représente approximativement celle de 1,5 inserts BAC, soit 210 kpb environ. Une étude plus fine de ce contig montre que la position de Y2643L n'est connue qu'avec une précision assez médiocre ($\frac{1}{2}$ BAC environ). Il n'est pas impossible que cette sonde soit proche de l'extrémité du contig 478. Dans ce cas, il se peut que le contig 1385 appartienne aussi à la carte physique de la zone car ce contig ne contient en tout et pour tout qu'un seul clone. Le contig 97 ne peut pas appartenir à la zone entre R1813 et C483, car le contig FPC correspondant contient des sondes du chromosome 4.

☼ Y2643R

Cette sonde s'hybride avec neuf clones. Parmi ces neuf clones, quatre appartiennent au contig 1282, deux au contig 440*, un au contig 37, un au contig 134 et un n'appartient à aucun contig. L'hypothèse selon laquelle cette sonde est répétée se heurte à deux arguments contradictoires :

- (i) le nombre d'hybridations est comparable au taux de recouvrement de la banque (argument faible).
- (ii) Par hybridation avec de l'ADN de riz digéré par diverses enzymes, la sonde Y2643R ne révèle qu'une seule bande, quelle que soit l'enzyme considérée (argument fort).

Les contigs 440, 1282 et 37 appartiennent tous au même contig FPC. Ce contig FPC est validé par cette hybridation : la sonde Y2643R serait donc au milieu du très petit contig 1282 (9 clones, 1,5 BAC de long), et toucherait un clone extrême du contig 37 et deux clones extrêmes du contig 440 (figure D1).

* Ce contig contient le marqueur C483 (cf § I.1.a. du présent chapitre, p. 132)

Tableau D1 : Différentes sondes d'extrémités de clones Nipponbare

Type	Souche	Bord (¹)	Séquence disponible	Séquence copie unique	Synthétisée (²)	Hybridée sur memb. BAC Nipponbare	Hybridée sur memb. BAC IR64	Polymor- phisme (³)	Carto. IR64 x Azucena	
YAC RGP	Y2643	L	N	O	O	O	O	O	O	
		R	N	O	O	O	N	N	N	
	Y3140	L	N	N	O	O	N	C	N	
		R	N	N	O	O	O	C	N	
BAC OSJNBa	17I11	f	O	O	N	N	N	NT	N	
		r	O	N	O	O	N	NT	N	
	25A01	f	O	O	O	O	N	NT	N	
		r	O	N	N	N	N	NT	N	
	27N24	f	O	O	N	N	N	NT	N	
		r	O	N	O	O	O	NT	N	
	29M11	f	O	N	N	N	N	NT	N	
		r	O	O	O*	O	O	N	N	
	38P10	f	O	O	O	O	N	NT	N	
		r	O	O	O	O	O	NT	N	
	42O24	f	O	N	O	O	N	NT	N	
		r	O	O	N	N	N	NT	N	
	53M18	f	O	O	O	O	N	O	O	
		r	O	N	N	N	N	NT	N	
	58C15	f	O	O	O	O	N	NT	N	
		r	O	O	O	O	N	NT	N	
	56M07	f	O	O	N	N	N	NT	N	
		r	O	O	O	O	O	O	O	
	57H10	f	O	N	N	N	N	NT	N	
		r	O	O	O*	O	O	O	O	
	78A03	f	O	N	O	O	O	NT	N	
		r	O	O	O	O	O	NT	N	
	87F21	f	O	O	N	N	N	NT	N	
		r	O	O	O	O	N	NT	N	
	87I15	f	O	N	N	N	N	NT	N	
		r	O	O	O	O	O	NT	N	
	89O21	f	O	O	O*	O	N	NT	N	
		r	O	N	N	N	N	NT	N	
	BAC OSJNBb	61D10	f	O	O	O*	O	N	NT	N
			r	O	N	N	N	N	NT	N

(1) L : gauche (Left), R : droite (Right), r : reverse, f : forward.

(2) Les sondes notées O* ont été synthétisées en définissant des oligonucléotides à partir de la séquence (annexe 4). Celles marquées O (sans astérisque) ont été synthétisées par walking PCR (annexe 6).

(3) Entre IR64 et Azucena. N : pas de polymorphisme, O : polymorphisme simple, C : Polymorphisme complexe, NT : non testé.

☼ *Y3140L*

Cette sonde s'hybride avec 31 clones. Etant donné le taux de recouvrement de la banque, on peut supposer que *Y3140L* présente de l'ordre de trois copies dans le génome de Nipponbare. Pourtant, on observe un nombre de contig plus élevé : parmi les clones qui s'hybrident avec elle, six appartiennent au contig 59, neuf au contig 180, deux au contig 772, cinq au contig 1033^{*}, quatre au 1188, un au contig 6. Quatre autres clones n'appartiennent à aucun contig. L'observation de l'intensité des signaux d'hybridation ne permet pas de dégager une « copie principale » : pour tous les contigs où l'on observe plus d'un clone, au moins l'un de ces clones s'hybride fortement avec *Y3140L*. Par ailleurs, on constate de fortes hybridations pour deux des clones qui n'appartiennent à aucun contig.

Une analyse plus fine de ces contigs montre que pour trois d'entre eux, 772, 1033 et 1188, il n'est pas impossible que la sonde *Y3140L* corresponde au bord de ces contigs. Si l'on considère que deux d'entre eux correspondent à une seule copie se trouvant à cheval entre eux, on arrive à un nombre total de 4 copies, ce qui est cohérent, bien que fort, avec le nombre de clones hybridant avec *Y3140L*.

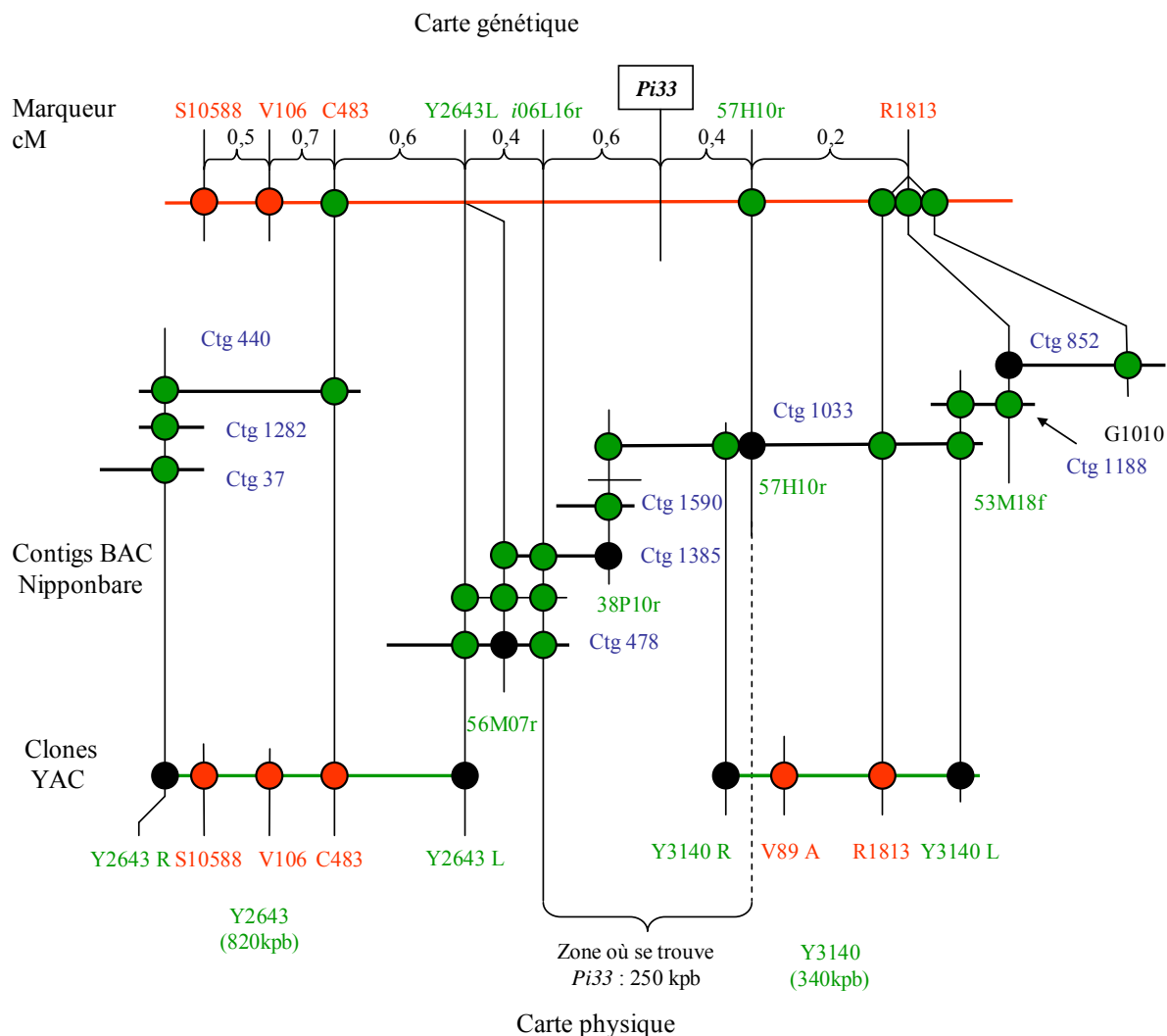
☼ *Y3140R*

Cette sonde s'hybride avec 51 clones. Etant donné le taux de recouvrement de la banque, on peut supposer que *Y3140R* présente de l'ordre de trois à six copies dans le génome de Nipponbare. L'hybridation avec de l'ADN de riz digéré par diverses enzymes montre la présence, chez IR64, d'une bande unique le plus souvent, parfois de deux bandes. Chez Azucena qui est, comme la variété Nipponbare, de type *japonica*, le nombre de bandes varie de deux à cinq selon l'enzyme considérée. La bande ou les deux bandes présentes chez IR64 se retrouvent, inchangées, chez Azucena.

Trois contigs regroupent plus d'un clone : le contig 1033^{*} (5 clones), le contig 46 (17 clones) et le contig 307 (19 clones). L'étude de la position des clones dans les contigs montre que, pour les contigs 46 et 307, il est exclu que *Y3140R* soit au bord et puisse joindre un autre contig. Pour le contig 1033, c'est improbable : bien qu'un clone extrême de ce contig

^{*} Ce contig contient le marqueur *R1813* (cf § I.1.a. du présent chapitre, p. 132)

Figure D2 : Carte physique simplifiée de la zone entourant *Pi33* dans Nipponbare



Légende :

- | | | | |
|---|---|----------|---|
| — | Clone BAC | G1010 | Sonde RGP |
| — | Contig BAC | 57H10r | Sonde synthétisée au cours de cette étude |
| — | Clone YAC | ctg 1033 | N° contig BAC PDF |
| ● | Origine sonde | Y3140 | N° clone YAC du RGP |
| ● | Hybridation obtenue au cours de cette étude | | |
| ● | Hybridation obtenue par le RGP | | |

N.B. : L'échelle n'est pas conservée dans cette figure, ni pour la carte génétique, ni pour la carte physique.

(OSJNBa 29M11) ait hybridé avec Y3140R, la disposition des autres clones de ce contig montre que cette sonde est assez éloignée de l'extrémité du contig 1033 (figure D1). Y3140R aurait donc trois copies dans le génome, ce qui est cohérent avec les profils Southern observés chez Azucena.

☉ *Positions des clones YAC dans la zone de Pi33*

La figure D2 permet de se représenter la position des différentes sondes utilisées ici dans la carte physique.

Etant donné que le clone YAC Y2643 contient le clone C483, on peut s'attendre à ce que ses extrémités encadrent ce marqueur. Y2643R serait la borne la plus éloignée de *Pi33*, et Y2643L la borne la plus proche. Ceci est confirmé par le fait que, génétiquement, Y2643L est plus proche de *Pi33* que C483. En conséquence, le contig 478, qui contient Y2643L, constitue un meilleur départ pour une marche chromosomique que le contig 440 (sondes C483 et Y2643R).

Le YAC Y3140 contient le marqueur R1813. On peut donc en déduire que ses deux extrémités sont de part et d'autre du locus de cette sonde. Ces deux extrémités présentent des répétitions, mais pour chacune d'elles, une copie se trouve sur le contig 1033. De plus, les positions relatives de Y3140L et Y3140R dans le contig 1033, ainsi que la longueur de ce contig sont compatibles avec la longueur du clone Y3140 mesurée par le RGP (300 kpb).

Y3140L hybridant avec des clones des contigs 1188 et 772, ces derniers pourraient être contigus à 1033. Ce sont donc de bons candidats pour la continuation de la marche chromosomique de R1813 vers G1010.

Y3140R s'hybride avec des clones de différents contigs (1033, 307 et 46), mais il semble peu probable que ces contigs soient liés entre eux. En conséquence, ce ne sont pas de bons candidats pour la marche chromosomique de R1813 à C483.

2) Marche chromosomique dans Nipponbare.

☉ *Mise en place d'une stratégie de marche chromosomique*

La taille relativement faible des contigs trouvés dans la zone de *Pi33* ne nous a pas permis de relier les marqueurs encadrant *Pi33*. Nous avons donc été amenés à réaliser une

marche chromosomique de contig à contig entre les différents marqueurs utilisés comme ancres dans cette carte physique. Pour réaliser une telle marche, des sondes d'extrémité de BAC furent synthétisées. Parallèlement, des RFLP de ces mêmes sondes furent recherchés et, le cas échéant, cartographiés génétiquement. Ce travail de cartographie remplit un triple but :

- (i) valider la marche chromosomique en vérifiant que les contigs, réalisés par la comparaison de profils de restriction, correspondent à la réalité de la répartition des clones BAC sur le génome,
- (ii) obtenir une carte génétique plus dense autour de *Pi33* par l'adjonction de ces nouveaux marqueurs,
- (iii) restreindre la zone dans laquelle se trouve *Pi33* au niveau de la carte physique.

Ce travail de synthèse de sondes dans la zone de *Pi33* est résumé dans le tableau D1.

La figure D1 permet de suivre la marche chromosomique de façon détaillée. Le résultat de ce travail est résumé par les figures D2 et D4.

a) De G1010 vers R1813

☼ Du contig 852, contenant G1010 vers le contig 1188

Nous avons vu plus haut que le marqueur G1010 se trouve dans le contig 852.

L'un des quatre clones de la banque OSJNBb appartenant au contig 1188 (OSJNBb 26H20), présente une forte homologie de séquence avec un clone de l'extrémité gauche du contig 852 (OSJNBb 51C12), ce qui suggère l'existence d'un lien entre ces deux contigs.

Par des méthodes PCR, des sondes ont été définies à partir des séquences extrêmes des inserts BAC (BAC end) situés aux extrémités des contigs étudiés. La sonde 33K06f a été synthétisée à partir d'un clone de l'extrémité du contig 852. Elle est monocopie et s'hybride avec un clone du contig 1188 (figure D1). Cette sonde permet de confirmer le lien entre ces deux contigs.

Le contig 1188 comporte neuf clones, et recouvre l'équivalent d'un clone BAC. Sur les neuf clones, cinq proviennent de la banque OSJNBa. Un seul de ces clones a hybridé avec la sonde 33K06f, mais les quatre autres ont montré, par PCR, une amplification de même longueur que la sonde 33K06f avec les oligonucléotides qui ont permis de la synthétiser. Ces clones contiennent donc probablement aussi la séquence de cette sonde, bien que cela n'ait

pas été révélé par l'hybridation. On peut donc considérer que le contig 1188 est adjacent au contig 852.

☉ *Du contig 1188 vers le contig 1033, contenant R1813*

Par comparaison de profils de restriction, des clones des banques OSJNBa et OSJNBb, il a été possible de rechercher, à partir de clones situés à l'extrémité d'un contig, des clones appartenant à un contig adjacent et présentant un profil de restriction semblable.

La ressemblance entre deux profils de restriction est mesurée par un score statistique (Soulston score) qui est d'autant plus bas qu'elle est grande. Deux seuils ont été retenus ici, le seuil de 10^{-9} , qui est proche de celui utilisé au CUGI pour la confection de contigs, et le seuil de 10^{-7} , plus tolérant.

Au niveau de l'extrémité droite du contig 1033, qui contient le marqueur R1813, un ensemble de ressemblances a été remarqué avec des clones du contig 1188 (figure D1). Ce réseau permet de faire l'hypothèse d'une continuité entre les contigs 1033 et 1188 (figures D1 et D2). De plus, la comparaison des profils de restriction des clones OSJNBa 32F17 (contig 1188) et OSJNBa 22F06 (contig 1033) montre une très forte homologie des profils de digestion par EcoRI, HinDIII, et des profils par la double digestion EcoRI - HinDIII. L'analyse, par reverse Southern, des segments répétés de ces digestions montre, là aussi, de fortes homologies de profils (figure D1). Enfin, l'analyse des clones hybridant avec la sonde Y3140L vient confirmer le lien entre les contigs 1033 et 1188.

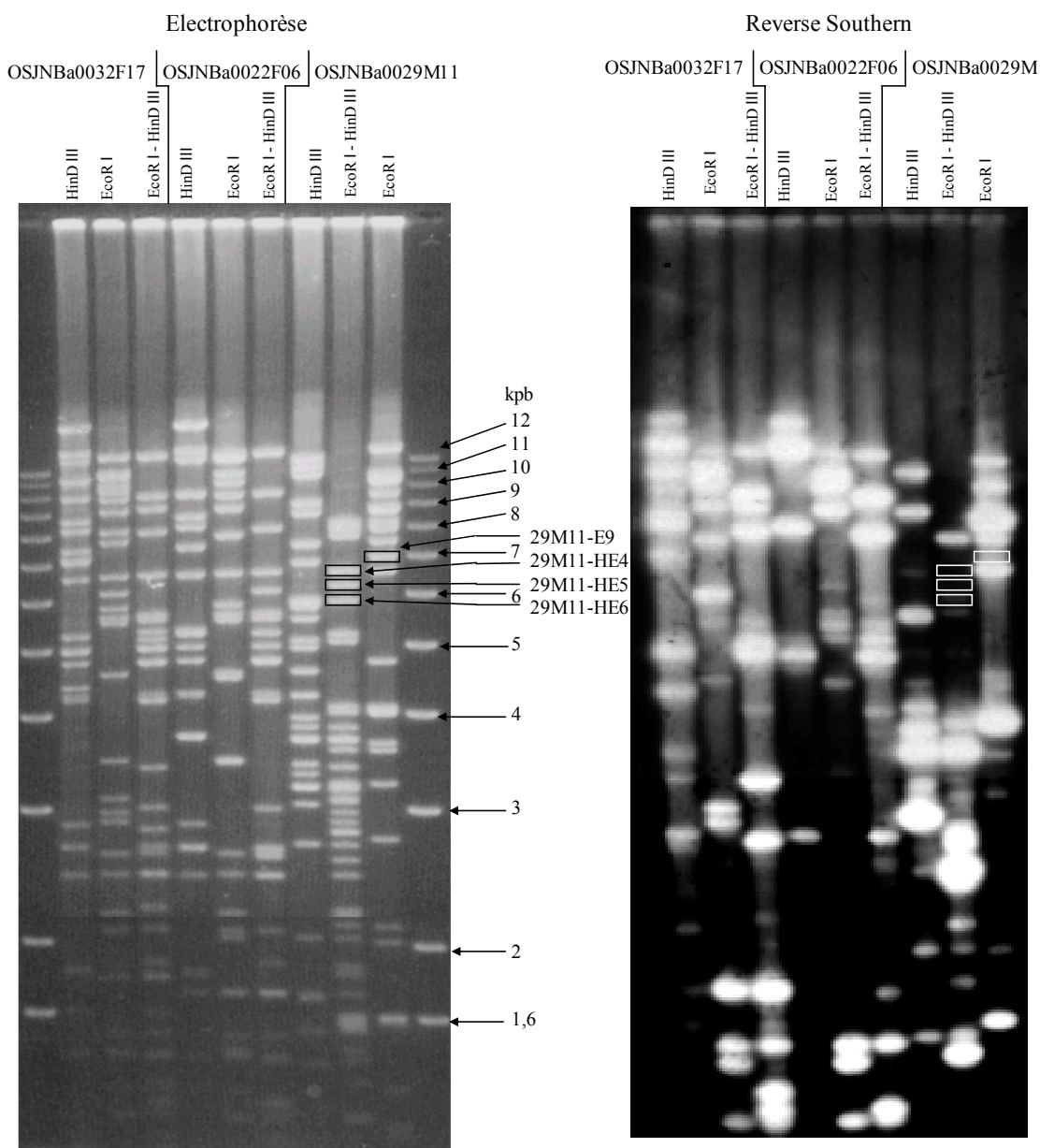
☉ *Conclusion.*

La zone entre R1813 et G1010 a été cartographiée physiquement. Cette carte physique contient les contigs 852, 1188, et 1033 (figure D2). Selon la carte du RGP (figure C3) R1813 est plus proche de *Pi33* que G1010.

Ce lien entre les contigs 852, 1033 et 1188 a été réalisé en parallèle par le CUGI : Le contig FPC 161 regroupe les contigs PDF 852, 1188, 1033, 1590, et des clones n'appartenant à aucun contig.

Il a été montré plus haut que Y2643L et R1813 se trouvent de part et d'autre du gène *Pi33*. La marche chromosomique doit donc logiquement se poursuivre à partir du bord gauche du contig 1033 (opposé au contig 1188 et aux sondes R1813 et G1010), dans le but de rejoindre le contig 478, qui contient Y2643L.

Figure D3 : Reverse southern sur les clones OSJNBa00 29M11, 22F06, 32F17
 Les sondes utilisées pour hybridation sont indiquées, ainsi que la région correspondante sur l'autoradiographie
 On observe, pour les trois digestions, de fortes homologies entre OSJNBa0032F17 et OSJNBa0022F06 que ce soit au niveau du profil de restriction, ou au niveau de la reverse southern.



b) De R1813 vers Y2643L : Echec de diverses tentatives

☼ *Une petite piste...*

Au niveau de l'extrémité gauche du contig 1033, plusieurs clones présentent une forte homologie de profils de restriction avec le clone OSJNBb 90H20, qui n'appartient à aucun contig. Ce clone, ainsi que le clone OSJNBb 42F08 du contig 1033, présentent en outre une homologie de restriction avec le clone OSJNBb 84M17 du contig 1590. Il s'agit d'un petit contig de 3 clones, dont deux appartiennent à la banque OSJNBa (figure D1).

☼ *Utilisation de la PCR en définissant des oligonucléotides spécifiques*

Cette méthode a permis de définir deux sondes (29M11r et 57H10r) qui ont confirmé la validité du contig 1033. Cependant, elle n'a pas permis d'aller plus loin dans la marche car elle n'a pas permis d'identifier de nouveaux clones (figure D4).

Cela est dû, d'une part à la difficulté à définir des oligonucléotides permettant d'amplifier efficacement une séquence donnée et, d'autre part, à la présence d'un grand nombre de séquences BAC end répétées dans cette zone.

☼ *Utilisation de l'hybridation reverse southern*

A partir du clone OSJNBa 29M11, qui est à l'extrémité gauche du contig 1033, une hybridation reverse southern a été réalisée (cf. chapitre « matériel et méthodes », § III.2.a, p. 96). Elle a permis de mettre en évidence des fragments d'ADN non répétés qui ont été utilisés comme sondes. Il s'agit de fragments de 6,6 kpb, 6,2 kpb et 5,9 kpb dans la double digestion *HindIII* - *EcoRI* (sondes 29M11HE4, 29M11HE5, 29M11HE6) et du fragment de 7,0 kpb dans la digestion *EcoRI* (sonde 29M11E9) (figure D4). Ces sondes ont été hybridées sur membranes BAC, mais elles ont provoqué l'apparition d'un fort bruit de fond, lié probablement à des contaminations par de l'ADN bactérien, et/ou par de l'ADN répété provenant de bandes proches. Cependant, dans deux cas (29M11HE4 et 29M11E9), il a été possible, malgré ce bruit de fond, de lire les autoradiographies des membranes. Ces deux sondes sont proches de 29M11r au sein du contig 1033, ne s'hybrident pas avec des clones extérieurs à ce contig, et ne permettent donc pas de le relier à un nouveau contig (figure D1).

☼ *Hybridation d'un clone BAC entier*

De l'ADN du clone BAC OSJNBa 29M11 a été utilisé directement comme sonde pour hybrider la banque OSJNBa. Malgré l'utilisation de l'ADN génomique bactérien non marqué pour une contre-hybridation, l'existence d'un très fort bruit de fond a été constatée. Toutefois, dix-sept clones (outre le clone 29M11, origine de la sonde) ont pu être identifiés. Trois de ces clones proviennent du contig 1033, cinq du contig 100. Les autres clones appartiennent chacun à un contig différent.

De ce résultat, on pourrait déduire que la continuation de la carte physique après le contig 1033 se fait à partir du contig 100.

Cependant, plusieurs arguments viennent infirmer cette hypothèse :

- (i) Le contig 100 est un très grand contig. Il regroupe 139 clones BAC et s'étend sur une longueur de huit clones, soit plus de 1 Mpb, ce qui semble être une forte distance physique pour une distance génétique de 1,4 cM entre 57H10r et Y2643L (argument faible).
- (ii) Les clones présents dans le contig 100 qui s'hybrident avec le clone 29M11 ne sont pas au bord de ce contig (argument fort).
- (iii) Au contig PDF 100 correspond le contig FPC 80 qui appartient, de façon très claire, au chromosome 4. En conséquence, le contig 100 ne peut faire partie d'une marche se déroulant sur le chromosome 8 (argument très fort).

En conséquence, l'hybridation sélective de clones du contig 100 avec l'ADN du BAC 29M11 pourrait être due non pas à une continuité physique de ces deux contigs, mais plutôt à la présence, dans cette zone du contig 100, d'un grand nombre de répétitions d'un fragment d'ADN que l'on retrouve aussi dans le clone OSJNBa 29M11.

☼ *Conclusion*

Différentes approches n'ont pas permis d'avancer dans la marche chromosomique de R1813 vers Y2643L. Une nouvelle méthode, plus fiable, pour synthétiser des sondes a donc été nécessaire pour poursuivre la marche chromosomique. En ce sens, l'utilisation de la PCR walking s'est avérée prometteuse. D'autre part, l'extrémité gauche du contig 1033 semble être une zone où la définition de sondes s'avère particulièrement difficile. **En conséquence, il a été décidé de ne pas continuer la marche à partir du bord gauche du contig 1033, mais plutôt de la réaliser dans l'autre sens, c'est à dire en partant du contig 478.**

c) De Y2643L vers R1813 : Utilisation de la PCR walking.

☉ *1er pas : du contig 478 au contig 1385*

Une synthèse de sondes d'extrémités de BAC a été réalisée pour les clones OSJNBa 03B04 et 56M07 du contig 478 par PCR walking (annexe 8). Les 4 sondes BAC end obtenues ont été hybridées sur des membranes BAC, ce qui a permis de montrer que trois d'entre elles correspondaient non au BAC d'intérêt, mais à des contaminations de la banque.

La quatrième sonde (56M07r) s'hybride avec 12 clones. Dix appartiennent au contig 478, dont elle provient. Le onzième clone (le clone OSJNBa 38P10) appartient au contig 1385 (un seul clone). Le dernier (OSJNBa 27N24) n'appartient à aucun contig.

Etant donné que le clone 38P10, seul membre du contig 1385, a aussi montré une hybridation avec la sonde YAC end Y2643L, qui est monocopie, il a été considéré que ce contig et le contig 478 sont adjacents.

☉ *2ème pas : Du contig 1385 aux contigs 1033 et 1590.*

Les séquences d'extrémités de BAC du clone OSJNBa 38P10 sont disponibles et, d'après les banques de données, elles ne semblent pas répétées. En conséquence, les deux sondes d'extrémités de ce BAC ont été synthétisées, puis hybridées sur les membranes BAC.

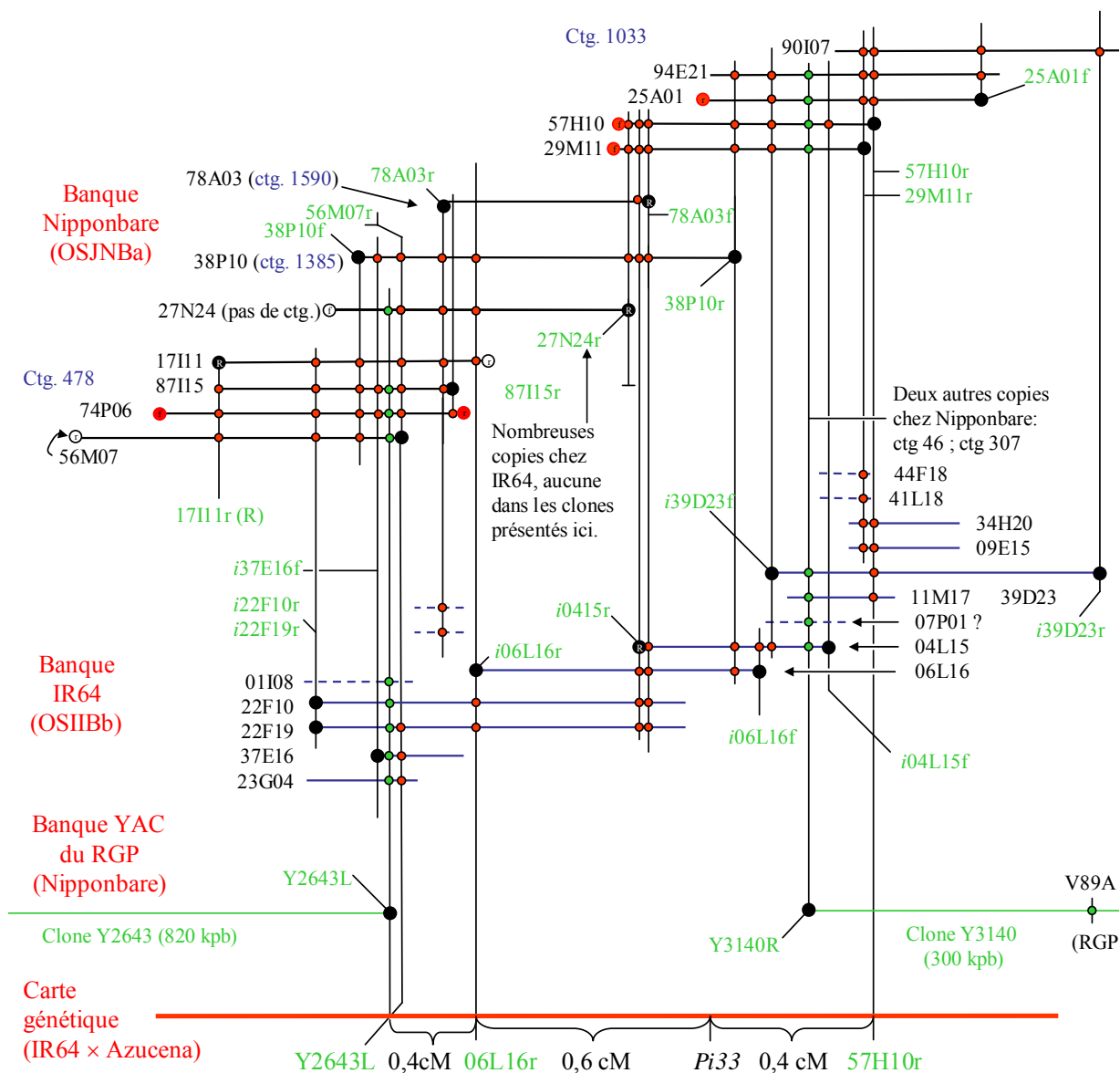
La sonde 38P10f s'hybride, outre sur son clone d'origine, avec 12 clones, tous du contig 478. La sonde 38P10r s'hybride, outre sur son clone d'origine, avec 9 clones. Quatre correspondent à l'extrémité gauche du contig 1033. Un (le clone OSJNBa 56F22) provient du contig 1590. Les quatre autres clones n'appartiennent à aucun contig. L'un d'entre eux provient peut-être d'une contamination : le clone OSJNBa 56G22 qui serait contaminé par 56F22

Les résultats apportés par cette expérimentation ont permis de montrer que le contig 1033 se poursuit par les deux petits contigs 1590 et 1385, puis par le contig 478, porteur de Y2643L. Ces résultats sont résumés sur la figure D2 et montrés de façon plus détaillée dans les figures D1 et D4.

☉ *Densification de la carte physique de *Pi33**

Afin de confirmer le lien entre les contigs 478, 1385, 1590 et 1033, différentes sondes BAC end ont été synthétisées à partir de clones BAC dont l'une des extrémités au moins se trouvaient entre Y2643L et 57H10r. Elles ont été hybridées sur des membranes BAC. Deux

Figure D4 : Cartes physiques de *Pi33* dans IR64 et Nipponbare



Légende:

- Origine sonde BAC ou YAC end
- ⊕ (sonde fortement répétée)
- Hybride avec une sonde BAC end ou reverse southern
- Hybride avec une sonde ancre ou YAC end
- séquence BAC end non répétée (r ou f = extrémité reverse ou forward)
- séquence BAC end répétée
- Clone OSJNBa (Nipponbare). Tout les clones de cette banque présents dans la zone ne sont pas représentés.
- Clone OSIBB (IR64)
- - - Clone OSIBB (IR64) (présence putative)
- Clone YAC RGP
- Ctg. xxx Numéro de contig PDF
- xxAxx Numéro de clone BAC
- Clone Yxxxx Numéro de clone YAC
- xxAxxa sonde BAC ou YAC end

de ces sondes se sont hybridées avec des clones situés en dehors de la zone entre 57H10r et Y2643L. Les sondes 78A03r et 87I15r (copies uniques), ont pu être placées dans cette zone. Les sondes 27N24r et 78A03f ont montré des hybridations typiques de sondes répétées. Cependant, au moins une des copies a pu être localisée dans l'espace séparant Y2643L et 57H10r. Le détail de ces travaux est visible sur les figures D1 et D4.

☼ *Conclusion*

Entre les marqueurs Y2643L et 57H10r, sept sondes d'extrémité de BAC supplémentaires ont été cartographiées physiquement. Trois au cours de la marche chromosomique, 4 pour densifier cette zone. La marche chromosomique a permis d'établir que ces deux marqueurs, qui encadrent *Pi33*, sont séparés par une distance de deux clones BAC, soit 240 kpb. En conséquence, il y a un marqueur cartographié physiquement tous les 40 kpb, en moyenne. La carte physique obtenue est montrée figure D4.

d) Validation de la marche chromosomique par cartographie génétique

Afin de valider la marche chromosomique, il a été décidé de cartographier génétiquement les sondes d'extrémité de BAC non répétées réalisées pour la cartographie physique. Parmi elles, les marqueurs 53M18f, 56M07r et 57H10r se sont révélés polymorphes entre IR64 et Azucena et ont été cartographiés par RFLP.

53M18f a été cartographié sur les 107 premières lignées EGRAM, ce qui a permis de confirmer sa position entre R1813 et G1010. Son profil de restriction, relativement complexe, comporte de 2 à 7 bandes, mais aucune recombinaison n'a été trouvée au cours du travail de cartographie génétique, ce qui laisse à supposer que ce marqueur présente quelques répétitions en tandem toutes situées dans la même région du génome.

57H10r a été cartographié sur 24 des lignées recombinantes disponibles, ce qui a permis de montrer que ce marqueur est distant de 0,3 cM de R1813 (une recombinaison observée).

56M07r a été cartographié sur 44 des lignées recombinantes disponibles. Il coségrège avec le marqueur Y2643L.

e) Conclusion

La cartographie physique de la région de *Pi33* a été réalisée, du marqueur G1010 au marqueur Y2643L, dans la variété Nipponbare. Au niveau de cette zone, il a fallu

réaliser plusieurs étapes de marche chromosomique, car les contigs présents étaient de petite taille.

Au cours de cette marche chromosomique, des marqueurs BAC end furent réalisés. La cartographie génétique de certains d'entre eux a permis de se rapprocher de *Pi33*. Il est désormais encadré par deux marqueurs d'extrémité de BAC, 57H10r et 56M07r. Cette zone correspond à 1,4 cM sur la carte génétique, et à moins de deux clones BAC (200 à 260 kpb environ) sur la carte physique.

3) Cartographie physique de *Pi33* dans la banque IR64 (OSIIBb)

☼ *Nécessité d'un changement de banque*

Le travail de cartographie physique du gène *Pi33* a été réalisé sur les banques OSJNBa et OSJNBb de la variété Nipponbare du riz. Ces banques présentent l'avantage d'avoir été ordonnées en contigs dans le cadre du projet de séquençage du génome du riz.

Cependant, la variété Nipponbare ne contient pas l'allèle résistant de *Pi33*. En conséquence, il a été nécessaire, avant d'entamer le travail de complémentation, de cartographier physiquement ce gène dans la banque d'une variété résistante.

a) Cartographie dans la banque IR64 (OSIIBb) de sondes déjà cartographiées dans la banque Nipponbare (OSJNBa)

☼ *Choix des sondes, résultats obtenus.*

Les sondes qui encadrent *Pi33* dans la carte génétique (Y2643L à gauche, 57H10r à droite) ont été hybridées sur des membranes de la banque OSIIBb de la variété IR64. De plus, les huit sondes localisées entre 57H10r et Y2643L ont été aussi hybridées sur ces membranes. Parmi ces dix sondes, sept (29M11r, 38P10r, 56M07r, 57H10r, 78A03r, 87I15r et Y2643L) sont monocopies chez Nipponbare. Deux (27N24r et 78A03f) sont multicopies. Enfin, une sonde YAC end située entre Y2643L et 57H10r (Y3140R) possède trois copies chez Nipponbare. Ces sondes ont été hybridées sur les membranes de la banque BAC OSIIBb de la variété IR64 (figures D4 et D5).

La sonde Y2643L s'hybride avec cinq clones : OSIIBb 01I08, 22F10, 22F19, 23G04 et 37E16. La sonde 56M07r s'hybride avec trois clones : OSIIBb 22F19, 23G04 et 37E16. La sonde 78A03r s'hybride faiblement avec deux clones : OSIIBb 43D24 et 25B24. La sonde

87I15r n'a pas donné de résultats exploitables. La sonde 27N24r s'hybride avec un grand nombre de clones de la banque OSIIBb. Aucun de ces clones ne s'hybride avec l'une des neuf autres sondes. La sonde 78A03f s'hybride avec quatre clones : OSIIBb 04L15, 06L16, 22F10 et 22F19. La sonde 38P10r s'hybride avec deux clones : OSIIBb 04L15 et 06L16. La sonde Y3140R s'hybride avec quatre clones : OSIIBb 04L15, 07P01, 11M17 et 39D23. La sonde 29M11r s'hybride avec quatre clones : OSIIBb 09E15, 34H20, 41L18 et 44F18. Enfin, la sonde 57H10r s'hybride elle aussi avec quatre clones : OSIIBb 09E15, 11M17, 34H20 et 39D23.

Les hybridations de diverses sondes sur des membranes de la banque OSJNBa (Nipponbare) ont montré que, parfois, certaines adresses lues correspondaient à des artefacts. En conséquence, les clones de la banque OSIIBb n'hybridant qu'avec une sonde n'ont pas été pris en compte. Il peut s'agir (i) de faux positifs, (ii) de clones dont l'insert est de petite taille et ne présente pas d'intérêt pour la carte physique ou (iii) de clones situés en grande partie à l'extérieur de la zone que l'on cherche à cartographier. Ces clones sont indiqués en pointillés dans les figures. A titre d'exemple, dans la figure D4, un clone tel que OSIIBb 07P01 pourrait être dans le cas (i) ou (ii), tandis que OSIIBb 01I08 pourrait être dans le cas (iii).

☼ *Différences entre IR64 et Nipponbare concernant le nombre de copies*

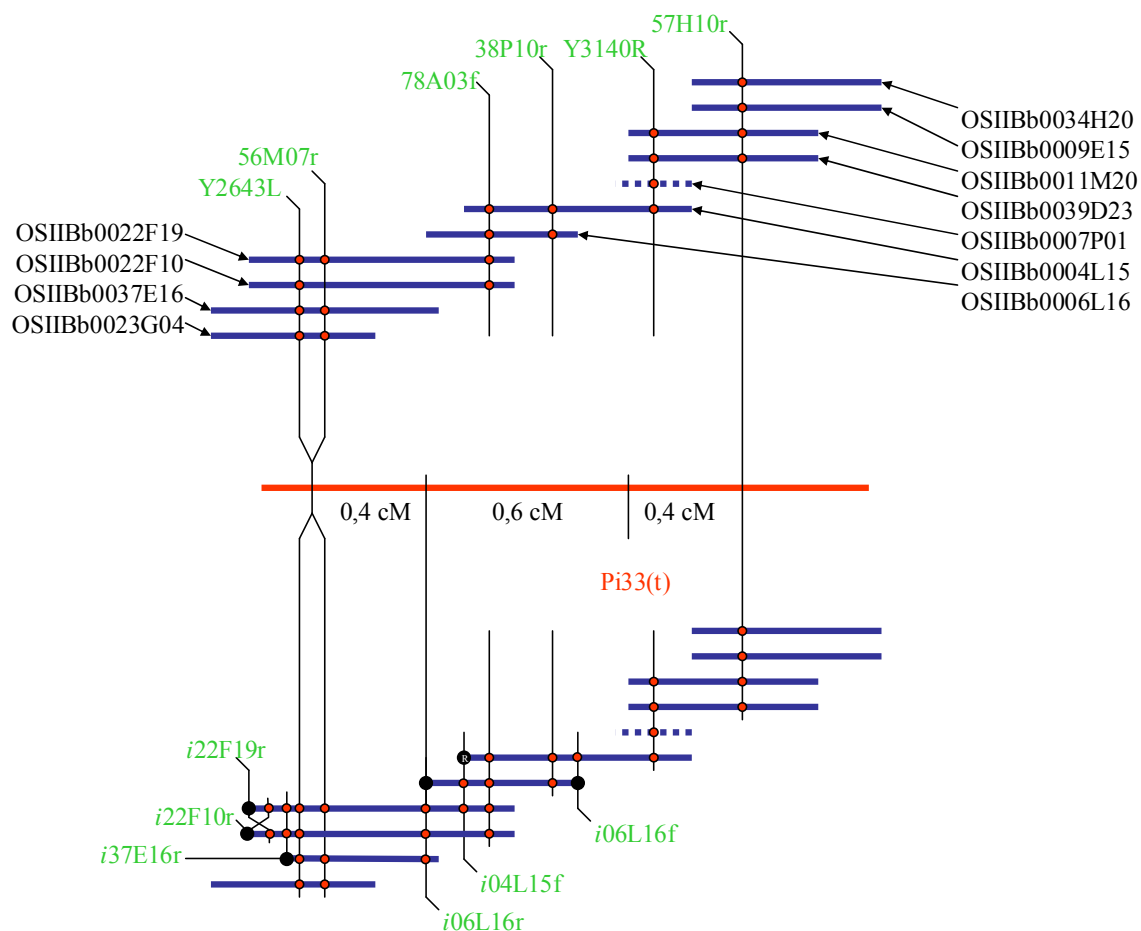
Pour les sondes qui sont monocopies chez Nipponbare (Y2643L, 29M11r, 38P10r, 56M07r, 57H10r, 78A03r et 87I15r), les résultats semblent indiquer qu'elles le sont aussi chez IR64 : chacune de ces sondes s'hybride avec un nombre de clones (2 à 4) compatible avec le taux de recouvrement de la banque (4,6×).

La sonde Y3140R, qui présente 3 copies chez Nipponbare, s'hybride avec 3 clones, dont deux s'hybrident aussi avec la sonde 57H10r. Il semble donc que cette sonde soit monocopie chez IR64. Un résultat comparable a été obtenu avec la sonde 78A03f, multicopies chez Nipponbare et monocopie chez IR64. En revanche, la sonde 27N24r semble présenter un grand nombre de copies dans les deux variétés.

☼ *Vers une carte de la zone de *Pi33* chez IR64*

Les résultats obtenus (figure D5) permettent de réaliser un contig unique de Y2643L à 57H10r dans la banque de la variété IR64. On peut décrire ce contig de Y2643L à 57H10r (de gauche à droite sur la figure D5) : Y2643L s'hybride avec quatre clones de la

Figure D5 : Carte physique de *Pi33* dans la banque OSIBb (IR64) obtenue par hybridation de sondes réalisées au cours de la marche chromosomique, confirmation avec des extrémités de clones BAC OSIBb (IR64).



Légende :

- Clone OSIBb (IR64)
- Origine sonde BAC end IR64
- Sonde répétée
- Hybride avec une sonde BAC end
- 56M07r Nom sonde BAC end Nipponbare
- i06L16r Nom sonde BAC end IR64
- OSIBb00xxAxx Nom clone IR64

NB. Le contig de clones BAC obtenu est représenté deux fois.

banque d'IR64 (OSIIBb) : 22F10, 22F19, 37E16 et 23G04. Deux de ces clones présentent un chevauchement avec les clones OSIIBb 04L15 et 06L16. Enfin, 04L15 recouvre partiellement les clones OSINBb00 11M20 et 39D23.

b) Confirmation de la carte physique du locus de *Pi33* chez IR64

La carte physique du locus de *Pi33* dans la banque OSIIBb doit être complétée et précisée : la position des extrémités des clones de la banque IR64 n'est pas connue, et d'autre part un certain nombre de clones n'ont été hybridés qu'avec une sonde. En conséquence, il a été décidé de réaliser de nouvelles sondes d'extrémités de BAC à partir des clones BAC OSIIBb 04L15, 06L16, 22F10, 22F19, 37E16 et 39D23 de la banque d'IR64 (tableau D2). En effet, dans la carte physique précédemment établie, ces clones suffisent pour recouvrir la zone allant de 56M07r à 57H10r. Ces nouvelles sondes BAC ont ensuite été hybridées sur les membranes des banques BAC OSJNBa (Nipponbare) et OSIIBb (IR64). Ce travail a permis de confirmer la cartographie physique déjà réalisée, mais aussi de préciser la longueur et les positions relatives des clones BAC d'IR64 entre eux et par rapport à Nipponbare.

☼ OSIIBb 22F10, 22F19 et 37E16.

Ces trois clones s'hybrident avec la sonde Y2643L. Ils représentent donc la moitié gauche* de la carte physique de la zone de *Pi33* chez IR64. Pour ces trois clones, il n'a été possible de réaliser une sonde qu'à partir d'une seule des extrémités. L'hybridation des trois sondes BAC ont obtenues sur les membranes de la banque OSJNBa a montré qu'elles étaient monocopies. Ces trois sondes s'hybrident principalement avec des clones du contig 478. Les clones de la banque OSJNBa de Nipponbare qui hybrident avec ces trois sondes sont localisés à gauche de 56M07r, c'est à dire en dehors de la zone définie par les marqueurs qui encadrent *Pi33*. La sonde *i37E16f*** semble très proche de Y2643L, les sondes *i22F10r* et *i22F29r* sont plus éloignées sur le contig 478. Elles semblent en revanche très proches l'une de l'autre (figure D4).

* Les mentions « gauche » et « droite » sont arbitraires. Elles correspondent à la gauche et à la droite des figures D1, D2, D4, D5, D6, D7, D8, D9 et D10. Sur les cartes génétiques présentées verticalement dans les chapitres précédents, ce qui est à droite ici était en haut. Dit autrement, la « gauche » est la direction du centromère, et la « droite » est la direction du télomère.

** Les noms des sondes BAC ont été construit comme ceux des sondes BAC de la banque OSJNBa [nom du clone, puis f (forward) ou r (reverse) selon le bord du clone considéré]. Cependant, afin d'éviter toute confusion avec la banque Nipponbare, ce nom est toujours précédé d'un i (pour IR64).

L'hybridation des sondes *i22F10r* et *i22F29r* sur les membranes de la banque OSIIBb (IR64) laisse à penser que ces deux sondes sont identiques, et que les clones OSIIBb 22F10 et 22F19 présentent une extrémité commune. En effet, *i22F10r* s'hybride avec OSIIBb 22F19 et 22F10 tandis que *i22F29r* s'hybride avec OSIIBb 22F10 et 22F19.

☉ *OSIIBb 04L15 et 06L16*

Ces deux clones ne s'hybrident avec aucune sonde encadrant le locus de *Pi33*. Ils se situent au centre de la carte physique de *Pi33* dans IR64. Une sonde a été synthétisée pour chacune des extrémités de ces deux clones.

Ces quatre sondes ont été hybridées sur la banque OSJNBa de Nipponbare. Les deux extrémités du clone OSIIBb 06L16 sont monocopies. *i04L15f* possède trois copies, l'une se trouvant dans le contig 1033, et les deux autres dans les contigs 46 et 307, à l'instar de la sonde YAC end Y3140R (cf. § I.1.b. du présent chapitre, p. 137). Ces deux sondes correspondraient donc à la même portion du génome copiée trois fois chez Nipponbare. *i04L15r* possède de nombreuses copies chez Nipponbare, l'une se situant dans la carte physique de la zone de *Pi33*.

Tableau D2 : Différentes sondes d'extrémité de BAC OSIIBb (IR64)

Type	Souche	Bord ⁽¹⁾	Séquence disponible	Séquence copie unique	Synthétisée	Hybridée sur memb. BAC Nipponbare	Hybridée sur memb. BAC IR64	Polymorphisme ⁽²⁾	Carto. IR64 x Azucena
BAC OSIIBb	04L15	f	O	O	O	O	N	NT	N
		r	N	N	O	O	O	C*	N
	06L16	f	O	O	O	O	O	O	O
		r	N	O	O	O	O	O	O
	22F10	f	N	O	N	N	N	NT	N
		r	N	O	O	O	O	NT	N
	22F19	f	N	O	N	N	N	NT	N
		r	O	O	O	O	O	NT	N
	37E16	f	N	O	O	O	O	NT	N
		r	N	?	N	N	N	NT	N
	39D23	f	O	O	O	O	N	N	N
		r	O	O	O	O	N	NT	N

(1) r : reverse, f : forward

(2) Entre IR64 et Azucena. N : pas de polymorphisme, O : polymorphisme simple, C : Polymorphisme complexe, NT : non testé.

En étudiant, dans la carte physique obtenue dans Nipponbare, la position des clones s'hybridant avec l'une ou l'autre de ces 4 sondes, il a été possible de déduire leurs positions respectives. La copie de *i04L15f* présente sur le contig 1033 est proche de Y3140R. Il a été supposé qu'elle se trouve à droite de ce marqueur, car OSIBb 04L15 s'hybride avec Y3140R et *i04L15r* semble située nettement plus à gauche, à cheval sur les contigs 1033 et 1590, ainsi que les clones OSJNBa 38P10 et 27N24. La position des deux extrémités monocopies *i06L16f* et *i06L16r* du clone OSIBb 06L16 sur la carte physique obtenue dans Nipponbare semble indiquer que ce clone est situé plus à gauche que OSIBb 04L15.

Ce résultat a été confirmé par les hybridations des deux extrémités *i06L16f* et *r* de ce clone sur les membranes OSIBb (IR64) : la sonde *i06L16f*, bord droit du clone OSIBb 06L16 s'hybride uniquement avec OSIBb 04L15, tandis que la sonde *i06L16r* s'hybride avec les clones OSIBb 22F10, 22F19 et 37E16, mais non 04L15. Enfin, le bord gauche du clone OSIBb 04L15 s'hybride avec OSIBb 06L16, montrant que ce dernier se poursuit dans cette direction.

☼ *OSIBb 39D23*

Ce clone s'hybride avec la sonde 57H10r, extrémité droite de la zone où se trouve *Pi33*. Il a été possible de réaliser deux sondes BAC end (*i39D23f* et *i39D23r*) représentant les deux extrémités de ce clone. Ces deux sondes ont été hybridées sur les membranes de la banque OSJNBa (Nipponbare). Elles sont toutes les deux monocopies, et ne s'hybrident qu'avec des clones du contig 1033. En étudiant, dans ce contig, la position des clones s'hybridant avec l'une ou l'autre de ces deux sondes, il a été possible de déduire leur positions respectives. *i39D23f* se trouve à gauche de 57H0r, tandis que *i39D23r* se trouve à droite de ce marqueur. *i39D23f* est donc plus proche de *Pi33* que *i39D23r*.

☼ *Conclusion*

L'organisation du contig déterminé en hybridant des sondes d'extrémité de BAC de la banque Nipponbare sur la banque IR64 a été confirmée. D'une part, elle l'a été par les hybridations d'extrémités de clones de cette banque sur elle même, d'autre part, par hybridations d'extrémités de clones de cette banque sur celle de Nipponbare. Ce contig est constitué principalement de 5 clones qui couvrent la zone de *Pi33*: OSIBb 04L15, 06L16, 22F10, 22F19 et 39D23.

Comme pour la banque OSJNBa de Nipponbare, on constate dans la banque OSIIBb d'IR64 un taux de recouvrement de la zone inférieur à la moyenne. Chez Nipponbare, ce taux passe par un minimum de 4 alors que la banque est 11× ; chez IR64, il passe par un minimum de 1 (entre *i06L16f* et *i39D23f*) et ne dépasse jamais 4 alors que la banque est 4,6×.

c) Confirmation de la cartographie physique par cartographie génétique

Afin de valider la cartographie physique de *Pi-33* réalisée dans la banque OSIIBb (IR64), mais aussi de réduire la zone où se trouve *Pi-33*, des marqueurs d'extrémité de BAC de cette banque ont été cartographiés génétiquement parmi les lignées IR64 × Azucena.

Sur les neuf sondes générées à partir des clones BAC OSIIBb (IR64), quatre se trouvaient à l'extérieur de la zone de *Pi33*. Sur les cinq situées à l'intérieur de cette zone, une (*i04L15r*) présentait de nombreuses copies. Une autre (*i04L15f*) présentait trois copies. L'une d'entre elle correspond à une bande monomorphe, les deux autres à des bandes polymorphes. Les deux bandes polymorphes ne se sont pas cartographiées dans la zone située entre RM72 et R1813. La copie de cette sonde située dans la zone de *Pi33* doit donc correspondre à la bande monomorphe*. Sur les trois sondes monocopies restantes, *i39D23f* s'est révélée monomorphe entre IR64 et Azucena avec les diverses enzymes utilisées. Il a été en revanche possible de détecter un polymorphisme pour les sondes *i06L16f* et r.

Le marqueur *i06L16r* s'est cartographié entre *Pi33* et 56M07r (qui coségrège avec Y2643L, cf. § I.2.d. du présent chapitre, p. 147), à 0,6 cM de *Pi33*. Le marqueur *i06L16f* a été aussi cartographié. Le manque de données concernant certaines lignées fait que sa position par rapport à *Pi33* et 57H10r ne peut pas être déterminée avec précision. Cependant, on peut établir que ce marqueur se trouve bien dans cette région du génome.

En conséquence, l'espace dans lequel se trouve le gène *Pi33* a encore été réduit sur la carte génétique, et représente 1 cM, entre les marqueurs *i06L16r* et 57H10r.

4) Recherche d'homologues à des gènes de résistance (RGA)

Les gènes de résistance appartiennent pour la plupart à un petit nombre de familles bien définies (NBS-LRR et TM-LRR chez les monocotylédones). Afin de rechercher de tels gènes candidats, des amplifications PCR ont été réalisées en utilisant des oligonucléotides dégénérés

inspirés des séquences consensus *Pto*-like et NBS. En effet, les consensus LRR ne permettent pas de définir des amorces dégénérées universelles.

En utilisant ces deux paires d'amorces, des amplifiats ont été obtenus à partir d'ADN génomique des variétés Nipponbare, IR64 et Azucena. En revanche, aucun amplifiat spécifique n'a été observé en utilisant l'ADN des clones BAC OSJNBa 38P10 et 29M11 qui couvrent la carte physique de *Pi33* chez Nipponbare, ni celui de clones BAC OSIIBb 04L15, 06L16, 22F10, 22F19 et 39D23, qui couvrent la zone de *Pi33* dans la carte physique obtenue chez IR64. Un tel résultat semble montrer que *Pi33* n'est pas de type NBS-LRR ni *Pto*-like, mais l'hypothèse de mutations ponctuelles au niveau des séquences consensus utilisées ne peut être exclue.

II) Test de complémentation

Afin de connaître plus précisément la position de *Pi33* sur la carte physique réalisée précédemment, mais aussi d'initier le clonage de ce gène, il a été décidé de réaliser un test de complémentation. Le principe d'une telle expérimentation est de transformer des plantes sensibles à l'aide des clones BAC identifiés au cours de la cartographie physique. Les plantes ayant acquis, à la suite de cette transformation, une résistance spécifique à *ACE1* permettent d'identifier les clones portant *Pi33*.

Au cours de cette thèse, certains résultats nous ont amené à faire l'hypothèse qu'il existait un ensemble de facteurs génétiques pouvant inhiber l'expression de la résistance liée à l'interaction *ACE1* – *Pi33* (cf. chapitre « Caractérisation et cartographie fine d'un nouveau gène de résistance, *Pi33* », § II.1.a.). Nous avons montré que, dans le croisement IR64 × Azucena, il est possible qu'un ensemble de gènes provenant d'Azucena inhibe l'expression de *Pi33*. Il est possible que ces gènes se trouvent chez plusieurs variétés de la même sous espèce qu'Azucena (*japonica*). Pour limiter le risque de suppression de la résistance apportée par *Pi33*, il a été décidé de compléter une variété *indica*.

La variété Kassalath est une variété *indica* ne possédant pas le gène de résistance *Pi33* (tableau C1). En général, la culture *in vitro* des variétés *indica* du riz est difficile, que ce soit au niveau de la calogénèse ou à celui de la régénération (Abe & Futsuhara, 1986). Cependant, parmi les variétés *indica* pour lesquelles des expérimentations de culture *in vitro* furent réalisées au laboratoire, Kassalath est l'une de celles donnant les résultats les plus satisfaisants

* Une grande similitude entre les sondes Y3140R et i04L15f est à nouveau observée (cf. § I. 1. b, p. 137 et § I. 3. b, p. 151)

Tableau D3 : Efficacité des transformations

ADN utilisé ⁽¹⁾	Nombre de		
	lignées transformées	lignées régénérantes	plantes sevrées ⁽²⁾
<i>i04L15</i>	9	3	23
<i>i06L16</i>	12	2	45
<i>i22F10</i>	15	7	72
<i>i22F19</i>	6	5	94
<i>i39D23</i>	9	4	47
Tv	15	10	95
Tt	14	12	158
Tciv	-(³)	-	121
Total	80	43	655
Valeur théorique ⁽⁴⁾		6.14	
χ^2 (6 d.d.l.)		13.49	
proba associée		0,035	

(1) Tt : témoin de transformation (transformé avec un insert GFP), Tciv : témoin de culture in vitro (non transformé), Tv : témoin vecteur (transformé avec le vecteur pBeloBAC11)

(2) Le sevrage est considéré comme réussi lorsque les plantes obtenues ont survécu au moins 6 semaines.

(3) Ce témoin n'étant pas transformé, "nombre de lignées transformées" n'a aucun sens.

(4) Hypothèse: toutes les transformations donnent le même nombre de lignées régénérantes. En conséquence la valeur théorique est égale à la moyenne des différentes transformations

(Donaldo Meynard, résultats non publiés). En conséquence, il a été décidé de l'utiliser pour réaliser les expérimentations de transformation présentées ici.

1) Efficacité de la transformation

La transformation de cals de riz par bombardement présente l'avantage de ne pas nécessiter la construction d'un vecteur de transformation particulier. L'ADN à étudier peut directement être inséré dans le génome végétal, en mélange avec un vecteur de sélection. Il a donc été possible, en utilisant cette méthode, de transformer directement des cals d'une variété sensible de riz (Kassalath) avec de l'ADN purifié de clones BAC de la variété IR64. Cependant, une telle méthode présente l'inconvénient de ne permettre que la génération d'un petit nombre de lignées transformées. De plus, le grand nombre de copies intégrées dans le génome au cours des événements de transformation favorise les phénomènes de silencing qui inhibent l'expression des gènes introduits.

Sept expérimentations de transformation de cals de riz ont été réalisées en utilisant sept fragments d'ADN différents : un insert GFP (témoin de transformation Tt), le vecteur pBeloBAC11 (témoin sans insert Tv), et les 5 clones BAC de la variété IR64 couvrant le locus du gène *Pi33* (OSIIBb 04L15, 06L16, 22F10, 22F19 et 39D23). Enfin, des cals de la variété Kassalath furent cultivés puis régénérés, afin d'obtenir des plantes issues de culture *in vitro* (témoins sans transformation Tciv).

Les résultats de ces expérimentations sont présentés dans le tableau D3. De façon significative, le nombre de lignées régénérantes obtenues est deux à trois fois supérieur pour les témoins transformés avec de petits fragments (Tt, Tv) que pour les transformations par de gros fragments (clones BAC IR64) (tableau D3).

2) Tests de résistance

Après sevrage, les plantes obtenues par régénération furent inoculées avec la souche PH14-D31C12 de *M. grisea* possédant l'allèle avirulent du gène *ACE1*. La variété Kassalath est sensible à la souche PH14-31C12. En conséquence, une résistance à cette souche peut être due à la présence du gène *Pi33* dans le fragment d'ADN utilisé pour la transformation.

Une importante proportion de plantes résistantes fut observée chez les lignées témoins (19 à 25 % de plantes totalement résistantes, plus 11 à 24 % partiellement résistantes). Ces

Tableau D4 : Etude de la résistance des lignées transformées

réaction à PH14- D31C12	Nombre de plantes observées										Nombre théorique de plantes ⁽³⁾							
	B1 ⁽¹⁾	B2	B3	B4	B5	Tt	Tciv	Tv	Total témoins	Total	B1 ⁽¹⁾	B2	B3	B4	B5	Tt	Tciv	
R ⁽²⁾	6	16	23	20	20	28	22	22	72	157	5.5	10.8	16	23	11.8	36	28.5	
MR	7	8	7	19	10	17	30	21	68	119	5.25	10.3	15.5	22	11.2	35	27.205	
S	9	19	35	53	17	101	62	45	208	341	11.3	22.3	33	47	24	75	58	
R+MR	13	24	30	39	30	45	52	43	140	276	10.8	21	31.8	44.9	23	71.3	55.705	
S+MR	16	27	42	72	27	118	92	66	276	460	16.5	32.3	48.8	69	35.3	109	85.5	
tot	22	43	65	92	47	146	114	88	348	617	22	43	65	92	47	146	114	
%plantes R	27	37	35	22	43	19	19	25	21	25	25	25	25	25	25	25	25	
%plantes R+MR	59	56	46	42	64	31	46	49	40	45	49	49	49	49	49	49	49	
		R+MR / S ⁽⁴⁾		valeur χ^2		0.92	0.83	0.19	1.54	4.21	19	0.48						
				proba (%)		34	36	66	21	4.1	0.0012	48						
		R / MR+S ⁽⁵⁾		valeur χ^2		0.0606	3.42	3.74	0.52	7.72	2.63	1.98						
				proba (%)		80	6.4	5.3	47	0.54	10	16						

(1) B1, B2, B3, B4, B5 : Plantes transformées avec les clones BAC OSIIBb00 04L15, 06L16, 22F10, 22F19, 39D23. Tt : témoin de transformation (transformé avec un insert GFP), Tciv : témoin de culture in vitro (non transformé), Tv : témoin vecteur (transformé avec le vecteur pBeloBAC11)

(2) R = plantes résistantes, MR plantes partiellement résistantes, S = plantes sensibles.

(3) Hypothèse testée: les proportions sont les mêmes que pour le témoin Tv.

(4) Les plantes partiellement résistantes sont considérées comme résistantes

(5) Les plantes partiellement résistantes sont considérées comme sensibles.

résistances ne sont pas dues à la présence de *Pi33* mais à l'état physiologique des plantes testées. Dans ce contexte, il est impossible de faire la différence entre une résistance induite par le transgène et une résistance induite par le stress physiologique. En revanche, seule une étude statistique des résultats pourrait permettre d'identifier les lignées ayant reçu un transgène induisant la résistance. La proportion de plantes résistantes est plus grande chez les plantes transformées avec le clone BAC OSIIBb 39D23 que chez toutes les autres catégories de plantes testées (tableau D4). Un ensemble de tests de χ^2 a été réalisé à partir de ces données en utilisant les hypothèses suivantes :

- (i) La répartition des plantes entre les diverses catégories est la même partout, elle est identique à celle observée pour le témoin Tv (c'est dans ce témoin que l'on trouve la plus forte proportion de plantes résistantes)
- (ii) Les plantes partiellement résistantes (MR) sont considérées soit comme résistantes, soit comme sensibles.

Quelle que soit l'hypothèse prise en compte concernant le statut des plantes MR, 7 tests sont réalisés. En conséquence, en appliquant une correction de Bonferoni (Rice *et al.*, 1989), le seuil retenu a été de $5 \% \div 7 = 0,71 \%$. En utilisant ce seuil, seuls deux résultats sont significatifs :

- (i) En considérant que les plantes MR sont résistantes, seul le témoin Tt se distingue : il y a significativement moins de plantes résistantes dans cette catégorie. Le groupe des plantes transformées avec le BAC OSIIBb 39D23 est celui où l'on trouve le plus de plantes résistantes, mais ce résultat n'est significatif qu'au seuil de 5 %.
- (ii) En considérant que les plantes MR sont sensibles, **seul le groupe des plantes transformées avec le clone BAC OSIIBb 39D23 d'IR64 comporte un nombre d'individus résistants significativement plus élevé que le témoin. Un tel résultat nous amène à faire l'hypothèse que c'est ce clone qui porte le gène *Pi33*.**

Actuellement, les plantes transformées au cours de cette expérimentation (plantes T0) sont en cours de multiplication. Les descendances de ces plantes (plantes T1) seront testées pour la résistance vis à vis de *ACE1* afin de confirmer ce résultat.

III) Etude de la séquence du locus de *Pi33*

☼ *Présentation générale*

Au cours de la réalisation de la carte physique du locus de *Pi33* dans les variétés Nipponbare et IR64, des séquences génomiques de riz sont devenues disponibles. Chez Nipponbare, dans le cadre du RGP, une séquence complète de cette variété est en cours d'obtention et d'annotation (Feng *et al.*, 2002 ; Sasaki *et al.*, 2002). La zone allant de 56M07r à 57H10r recouvre trois clones BAC chevauchants séquencés par le RGP : les clones OSJNBa 38P10, OSJNBb 90H20 et le clone OJ1221-H04. Nous avons superposé ces trois séquences et les avons fusionnées en une seule, allant de 56M07r (que nous nommerons extrémité gauche*) à 57H10r (extrémité droite*). Cette zone du génome du riz correspond à 227479 pb. Bien que le test de complémentation semble indiquer que *Pi33* se trouve dans le clone *i39D23* (soit dans les 58 kpb séparant *i39D23f* et 57H10r), nous avons préféré réaliser cette étude de séquence sur l'intégralité de la zone. Cette séquence sera dorénavant nommée « séquence du locus de *Pi33* », et la zone du chromosome 8 située entre les marqueurs 56M07r et 57H10r « locus de *Pi33* ».

Par ailleurs, des séquences shotgun d'une variété *indica* de riz ont été publiées (Yu *et al.*, 2001 ; Yu *et al.*, 2002). Il s'agit de fragments de séquence dont la longueur peut aller de quelques centaines de paires de bases à quelques dizaines de kpb. Les limites de ces contigs de séquences correspondent généralement à des zones fortement répétées. A l'aide du programme BLAST, nous avons recherché les séquences *indica* les plus homologues aux séquences non répétées du locus de *Pi33* chez Nipponbare. A l'aide du même programme, les séquences des extrémités des clones BAC d'IR64 et Nipponbare de la zone ont été replacées sur la séquence.

De plus, le programme Rice HMM** a été utilisé pour prédire les gènes présents sur la zone. Ce programme est intégré dans le système d'annotation automatique du RGP (Rice GAAS***). Ce système permet entre autres de repérer les séquences répétées, les gènes prédits par différents programmes, et les zones homologues à des EST ou à d'autres séquences exprimées ou non.

* la « gauche » et la « droite » de cette séquence sont les mêmes que pour la carte physique (cf. § I. 3. b. du présent chapitre, p. 151)

** Adresse : <http://rgp.dna.affrc.go.jp/RiceHMM/>

*** Adresse : <http://ricegaas.dna.affrc.go.jp/>

1) Structure de la séquence de Nipponbare

a) Séquences répétées

Les séquences répétées de plus de 1 kpb représentent 97 kpb, soit environ 43 % de la zone entre 56M07r et 57H10r. De plus, de nombreuses séquences répétées simples de petite taille, telles que des microsatellites, des Long Terminal Repeats (LTR) et des zones à faible complexité sont présentes. Ces répétitions courtes couvrent 12 % de la zone. Les méthodes utilisées pour détecter ces séquences et les analyser sont indiquées dans le chapitre « Matériels et méthodes », § III.3.a., p. 99.

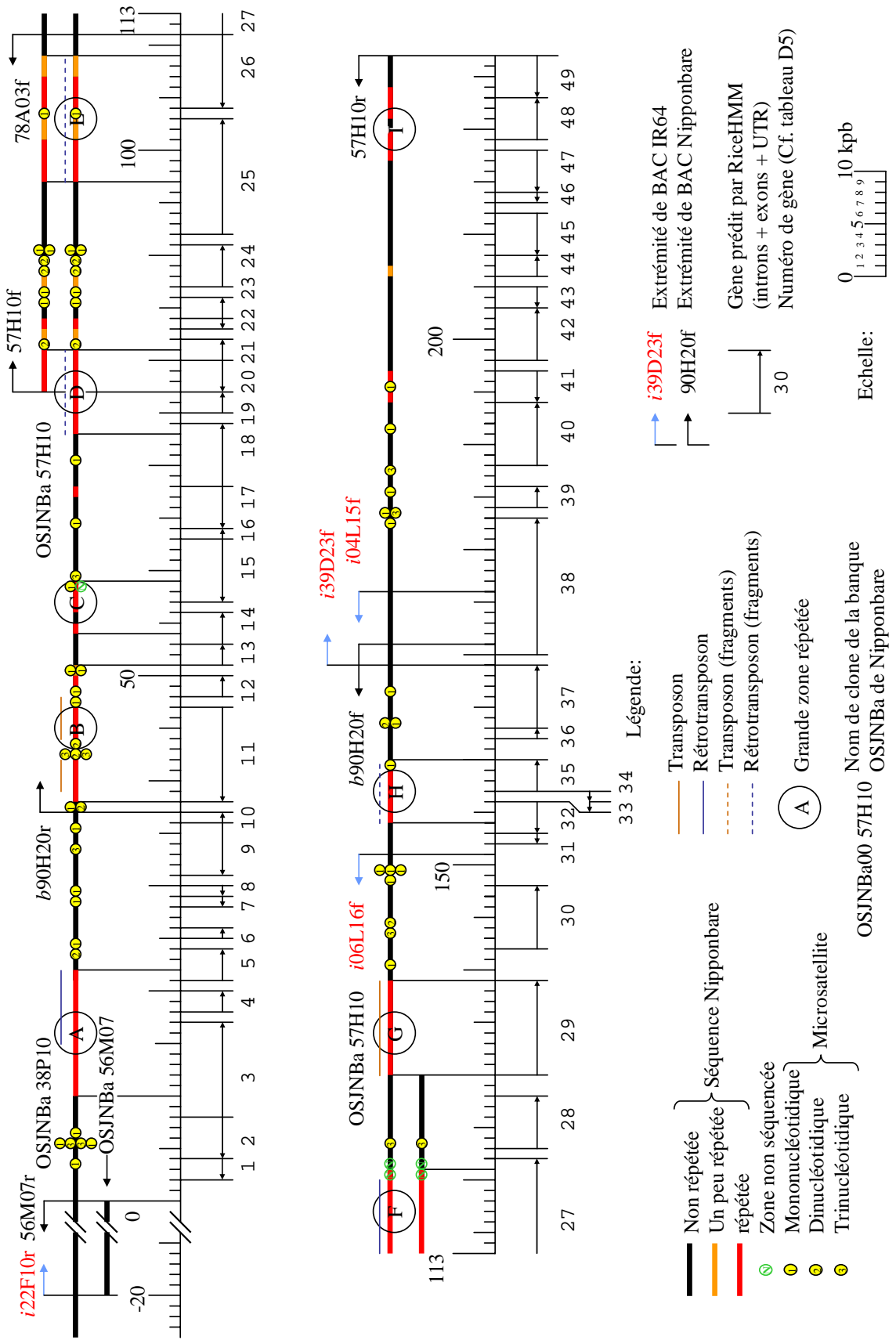
☼ *Éléments transposables*

Huit larges zones répétées nommées de A à I (figure D6) ont été comparées à l'aide du programme BLAST à la base de données des séquences répétées du riz du TIGR. Elles contiennent toutes des éléments transposables ou des fragments d'éléments transposables. Elles contiennent principalement des transposons (CACTA), des retrotransposons (*Ty1-copia* et *Ty3-gypsy*) et des MITE (MITE-adh typeB et Gaijin). Certains sont entiers, comme les retrotransposons *Ty1-copia* de la région A et *Ty3-gypsy* de la région F, d'autres sont très remaniés, comme les retrotransposons *Ty3-gypsy* des régions D, E et H.

☼ *Microsatellites*

On trouve dans cette région de nombreuses répétitions simples de type microsatellites. Entre 56M07r et 57H10r, le programme Repeatmasker met en évidence 38 zones portant des répétitions oligomériques. On trouve parmi elles deux monomères, huit dimères, onze trimères, cinq tétramères, dix pentamères, et deux hexamères. Cependant, ces microsatellites sont souvent imparfaits, et certains microsatellites sont trop courts pour être repérés par le programme. En cherchant « à la main », on trouve 34 monomères parfaits ayant plus de 10 bases, neuf dimères parfaits de plus de huit répétitions, et dix trimères parfaits de plus de cinq répétitions. Ces microsatellites « parfaits » sont représentés figure D6.

Figure D6: Gènes prédits et séquences répétées entre 56M07r et 57H10r sur la séquence de Nipponbare du RGP



☼ *Autres*

D'autres répétitions simples ont pu être mises en évidence. Il s'agit principalement de zones riches en GC ou en AT, ou parfois en A, G ou T (89 occurrences), ou de petits éléments transposables (ou fragments d'éléments transposables) (31 occurrences). On trouve enfin des séquences de type LTR bordant des transposons déjà détectés auparavant, ou non (24 occurrences).

b) Gènes

☼ *De la difficulté de prédire les séquences exprimées*

Il est très difficile de prédire à l'avance les régions du génome du riz codant pour des protéines. De nombreux programmes furent mis en place pour réaliser une telle prédiction, mais les résultats qu'ils fournissent sont parfois contradictoires. Les gènes du riz possèdent une structure qui n'avait pas été observée précédemment dans les autres génomes. Leur contenu en GC est variable, et a tendance à augmenter entre le début et la fin de la séquence exprimée. Une telle conformation de ces gènes aboutit à une difficulté de fonctionnement des programmes de prédiction (Yu *et al.*, 2002). Afin de déterminer la présence de gènes putatifs dans la zone, nous avons donc utilisé trois indicateurs :

(i) les données issues du programme Rice HMM^{*} qui présente l'avantage d'être basé sur une analyse probabiliste utilisant les séquences d'EST de riz déjà publiées. Selon ce programme, environ 45 kpb (19 % de la zone étudiée) correspondent à de la séquence codant pour des protéines.

(ii) la confirmation des gènes prédits par RiceHMM par d'autres programmes de prédiction, en particulier Autopredgenset.

(iii) la présence, dans la zone d'EST de riz. Ces EST correspondent à des régions du génome qui sont exprimées.

☼ *Homologies*

Le programme rice HMM a prédit la présence de 49 gènes répartis sur les 227 kpb de la zone de *Pi33* (figure D6). Ces gènes putatifs ont été analysés au moyen de différents outils (cf. chapitre « matériel et méthodes », § III.3.b., p. 99). Les résultats de ces analyses sont indiquées dans le tableau D5. Au cours de cette analyse, certains gènes contigus ont été réunis

^{*} Adresse : <http://rgp.dna.affrc.go.jp/RiceHMM/>

Tableau D5 : gènes prédits par riceHMM, homologies et domaines structuraux

Numéro ORF	Homologies BLASTX	Info sur P. (PSORT SOSUI)	Homologies ESTs	Remarques
1	P. inconnues <i>A. thaliana</i>	P. transmembranaire	O ⁽¹⁾	
2, 6, 8 ⁽³⁾	N ⁽²⁾	rien	N ⁽²⁾	
3 et 4 ⁽⁴⁾	polyprotéine rétrotransposon	P. soluble	O	
5	N	P. soluble nucléaire	O (inversion introns-exons)	
7, 9, 12	N	rien	O	
10	N	P. soluble	N	
11	transposase	rien	O	
13	N	transmembranaire (m.plasmique?)	N	
14	N	P. soluble	O	
15	N	P. soluble nucléaire	N	
16	P. putative <i>O. sativa</i>	P. soluble	N	
17, 21, 22, 23, 24	N	P. soluble	N	
18	N	rien	N	
19	P. du circumsporozoïte (<i>Plasmopodium vivax</i>)	P. soluble nucléaire, nombreux sites de N-myristoylation.	N	4 répétitions AQRRHNRPAVQAET + 4 répétitions AQRRHKGQPCRRKHQS
20	plusieurs homologies avec des P. hypothétique riz dont: putative HGWP repeat containing P.	P. soluble	O	6 répétitions HGWP (rôle inconnu). Domaine extensin-like
25	P. hypothétiques riz	P. soluble nucléaire, nombreux sites de N-myristoylation, de P. kinase phosphorylation	N	
26	P. inconnues <i>A. thaliana</i> et <i>O. sativa</i>	domaines, BTP/POZ, et MATH P. soluble de la mitochondrie	O	BTP / POZ = partie des doigts de zinc. MATH = Meprin And TRAF Homology très fréquente chez <i>C. elegans</i>
27	GAG-POL polymérase rétrotransposon	domaine rétrotranscriptase, intégrase, GAG P. de rétrotransposon	O	
28	N	P. soluble	N	
29	transposase	Transposase Tnp2	N	
30	N	P. soluble	N	

Tableau D5 (suite et fin)

Numéro ORF	Homologies BLASTX	Info sur P. (PSORT SOSUI)	Homologies ESTs	Remarques
31	Putative reverse transcriptase (faible)	P. soluble (nucléaire?)	N	
32 et 33 et 34	P. hypothétiques riz	P. soluble, HGWP repeat containing P.	N	8 répétitions HGWP (rôle inconnu). Domaine extensin-like
35, 36	N	P. soluble	N	
37	P. hypothétiques riz	P. soluble	N	
38	putative gag-pol polyprotein	reverse transcriptase, P. GAG	N	
39	P. putatives riz	prot soluble, domaine BTP/POZ	AU065266 (AU065266) Oryza sativa cDNA, partial sequence (E60947_1A). Homologie très forte	BTP / POZ = partie des doigts de zinc.
40	N	P. soluble, domaine BTP/POZ	N	BTP / POZ = partie des doigts de zinc.
41, 44, 49	N	rien	N	
42	N	P. soluble nucléaire	N	
43	P. putatives <i>A. thaliana</i> et <i>O. sativa</i>	P. soluble, domaine BTP/POZ	N	BTP / POZ = partie des doigts de zinc.
45	snRNP protein-like [<i>Oryza sativa</i> (<i>japonica</i> cultivar-group)] BAC OJ1221_H04	P. soluble	N	snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) participe à l'exision des exons
46	N	rien (seq trop courte)	N	
47	N	P. soluble (mitochondriale?)	N	
48	N	P. soluble	N	

- (1) Simple homologie, cet EST ne correspond pas à ce gène
(2) Pas d'homologie significative (homologie significative : Blast Score >100)
(3) Ces différents gènes prédits par rice HMM ont les mêmes caractéristiques
(4) Ces différents gènes prédits par rice HMM semblent n'en former qu'un
P. : protéine.

en un seul (nommément : les gènes 3 et 4 ; et les gènes 32, 33 et 34), sur la base des prédictions réalisées par d'autres programmes, et de leurs homologies de structures.

Trente huit de ces gènes sont dits « sans homologue » : neuf d'entre eux ne présentent que des homologies avec des gènes inconnus ou putatifs (c'est à dire prédits sur la base de séquences génomiques). Les vingt neuf autres n'ont montré aucune homologie avec une séquence protéique connue. Parmi eux, 5 présentent des homologies avec des EST de riz, mais ces homologies ne sont pas suffisamment fortes pour supposer qu'elles correspondent au fragment considéré.

Parmi ces 38 séquences « sans homologue », 31 ne présentent pas de domaines clairement définis (hormis des domaines transmembranaires calculés sur l'hydrophobicité des acides aminés). Quatre présentent des domaines BTP/POZ, que l'on retrouve dans certaines protéines à « doigts de zinc », l'une d'entre elles présente aussi un domaine MATH, au rôle inconnu, qui est très fréquent dans les gènes de *Caenorhabditis elegans*. Deux autres présentent des répétitions HGWP, au rôle inconnu. Enfin, une de ces séquences présente de nombreux domaines kinase et de N-myristoylation. Ces domaines ne correspondent cependant qu'à un petit nombre de résidus, et cette séquence ne présente pas d'homologie significative avec des kinases connues.

Sept de ces gènes prédits présentent des homologies avec des gènes liés à des éléments transposables (transposase, GAG-POL polymérase, reverse transcriptase, etc...).

Enfin, deux gène putatif ayant une forte homologie avec un gène connu non lié aux éléments transposables est présent. Il s'agit des gènes 19 et 45. Le gène 19 présente de fortes homologies avec le gène de la protéine entourant le sporozoïte (circumsporozoite protein) de *Plasmodium vivax*. Cependant, cette homologie correspond à des séquences répétées présentes dans cette protéine, et qui pourraient correspondre à des fragments vestigiaux d'éléments transposables (Lebrun, communication personnelle). Le gène 45 été prédit par le RGP comme codant pour une snRNP (small nuclear ribonucleoprotein), protéine qui participe à l'excision des introns.

Parmi tous ces gènes prédits, aucun homologue de gène de résistance n'a été trouvé. En particulier, on ne trouve ni motif LRR, ni motif *Pro*-like kinase.

Un tel résultat nous a amené à faire trois hypothèses :

(i) Le gène de résistance *Pi33* ne se trouve pas dans la zone où on l'a cartographié. Cela pourrait être dû à la présence des individus « sensibles en contexte résistant » qui nous

ont induits en erreur sur sa position dans la carte génétique, ou bien à l'existence de recombinaisons asymétriques parmi les descendants IR64 × Azucena. Cette hypothèse semble cependant contredite par le test de complémentation présenté dans le § II. de ce chapitre.

(ii) Le gène *Pi33* n'existe pas chez Nipponbare. L'allèle sensible correspond à une délétion.

(iii) Le gène *Pi33* n'est pas un gène de type NBS-LRR ou *Pto*-like kinase.

2) Les contigs de séquence *indica*

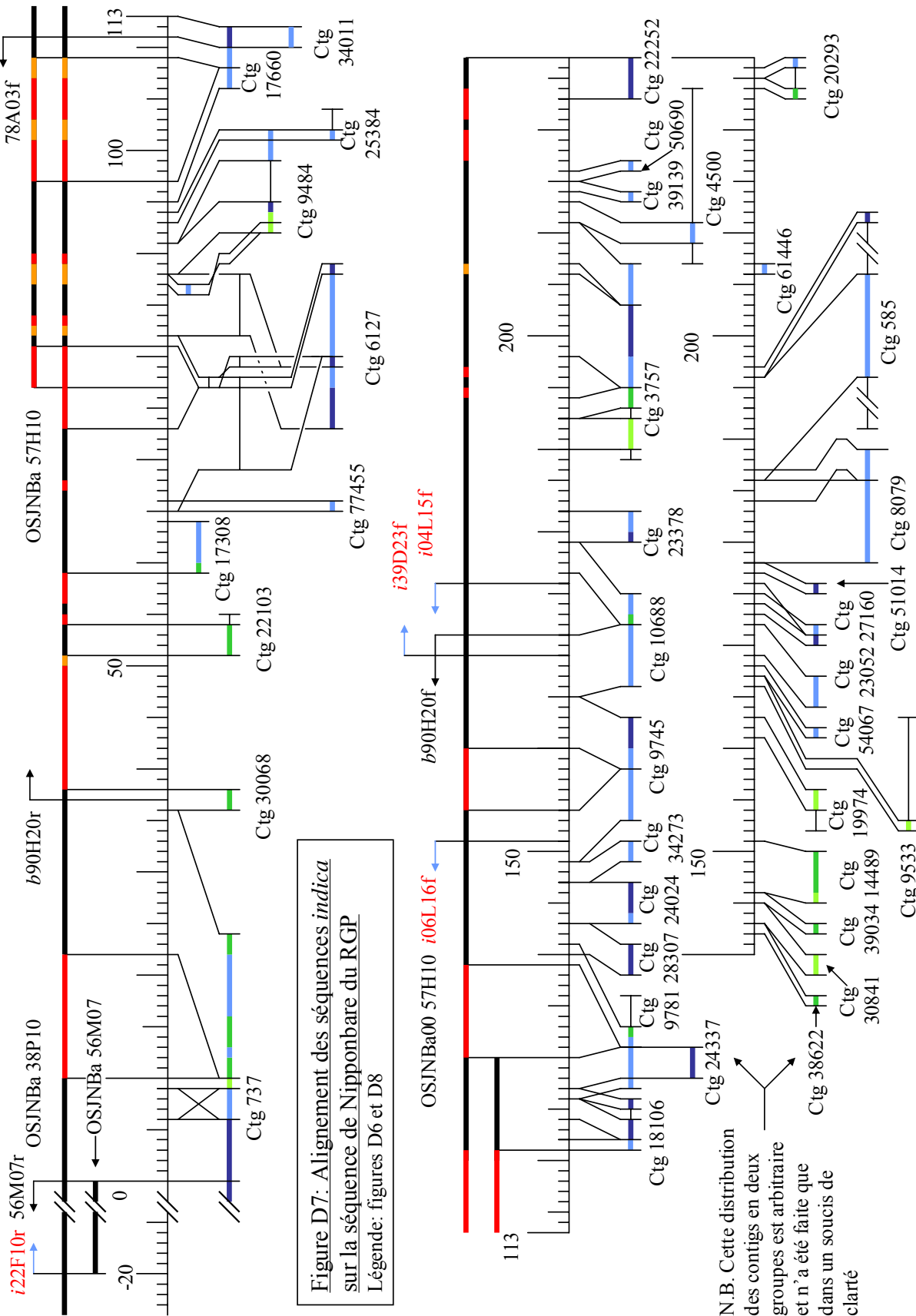
a) **Présentation de cette séquence, utilité de son étude**

Le gène de résistance *Pi33* n'est porté, à notre connaissance, par aucune des variétés *japonica*. En particulier, la variété Nipponbare (*japonica*) ne porte pas *Pi33*. Par ailleurs, la variété résistante IR64, qui a été utilisée pour les cartographies génétiques et physiques de *Pi33* est une variété *indica*. Dans l'absolu, c'est l'étude de la séquence d'une variété résistante du riz qui aurait apporté les informations les plus pertinentes sur *Pi33*. Malheureusement, une telle séquence n'est pas actuellement disponible. En conséquence, nous nous sommes intéressés à la séquence de la variété 93-11 (*indica*) du riz, qui a été récemment publiée (Yu *et al.*, 2002). Bien que la présence de *Pi33* dans cette variété n'ait pas été testée, il est possible que sa séquence se rapproche plus de celle des variétés résistantes *indica* que celle de Nipponbare (*japonica*).

La séquence de la variété *indica* 93-11 (Yu *et al.*, 2002) provient d'un séquençage de type « whole shotgun ». Elle se présente sous la forme de « contigs » dont la longueur varie de quelques centaines de paires de bases à plusieurs dizaines de kpb. La position physique de ces séquences sur le génome du riz est inconnue. En conséquence, nous nous sommes basés sur la séquence *japonica* sur laquelle nous avons aligné les contigs présentant les plus fortes homologies et qui sont donc supposés orthologues.

b) **Alignement des séquences *indica* et *japonica***

Les zones non répétées de la séquence *japonica* ont été comparées aux contigs de séquences *indica* produites par Yu *et al.* (2002) et disponibles sur la base de données



DDBJ/EMBL/GenBank. Les résultats de ces travaux sont résumés dans la figure D7. Une présentation plus détaillée de ces alignements est disponible en annexe 16.

L'observation de ces alignements met en évidence différents phénomènes :

(i) L'existence d'éléments transposables présents dans le génome de *japonica* et non dans le génome *indica*. Au moins cinq « insertions » de ce type peuvent être observées. De plus, des « insertions » de séquences ne présentant pas d'homologies avec des éléments transposables sont observées.

(ii) Des remaniements de séquence entre *indica* et *japonica*. L'exemple du contig de séquence 6127 correspondant à la zone entre 65 et 88 kpb est le plus frappant. La comparaison entre les séquences *indica* et *japonica* met en évidence 3 blocs : un premier, à gauche du contig 6127 et à droite dans la séquence *japonica* ; un second, plus petit, central dans la séquence *japonica* et dupliqué dans la séquence *indica*, une copie se retrouvant à l'extrême droite, l'autre au centre, mais inversée ; et enfin un troisième bloc, se trouvant à gauche dans la séquence *japonica* mais à droite du contig 6127, entouré des deux copies inversées du second bloc. Enfin, un rétrotransposon s'intercale entre les blocs 2 et 3 dans la séquence *japonica*, ou plus exactement (annexe 16 p. 332), dans une partie du bloc 2 qui est proche du bloc 3.

(iii) Des duplications. On trouve, dans de nombreux cas, deux contigs *indica* homologues à une section donnée de la séquence *japonica*. Cela est surtout vrai et même presque systématique entre 140 et 200 kpb, mais d'autres exemples peuvent être trouvés ailleurs sur de petites portions de la séquence *japonica*.

c) Etude de certains contigs *indica*

Certains des contigs *indica* ne sont homologues à la séquence *japonica* que sur une partie de leur longueur. Un tel état de fait laisse à penser qu'une partie de la séquence séparant 56M07r de 57H10r chez les *indica* n'est pas représentée chez les *japonica*, ou bien qu'elle se trouve ailleurs dans le génome. Dans l'hypothèse où *Pi33* serait délété chez Nipponbare, l'une de ces zones homologues pourrait correspondre à l'emplacement de ce gène. Il a donc été décidé d'étudier ces séquences, c'est à dire celles des contigs 585, 4500, 9484, 9533, 9781 de la séquence *indica*. Les principaux résultats de ces études sont présentés dans le tableau D6. Sur 22 gènes prédits à partir des séquences de ces contigs, aucun n'a montré des structures typique des gènes de résistance. Six sont homologues à des EST de riz, dont 2 fortement.

Figure D8 : Deux contigs de la séquence *indica* en partie homologues à la séquence du locus de *Pi33*.
Homologies avec les séquences *japonica* disponibles, gènes prédits.

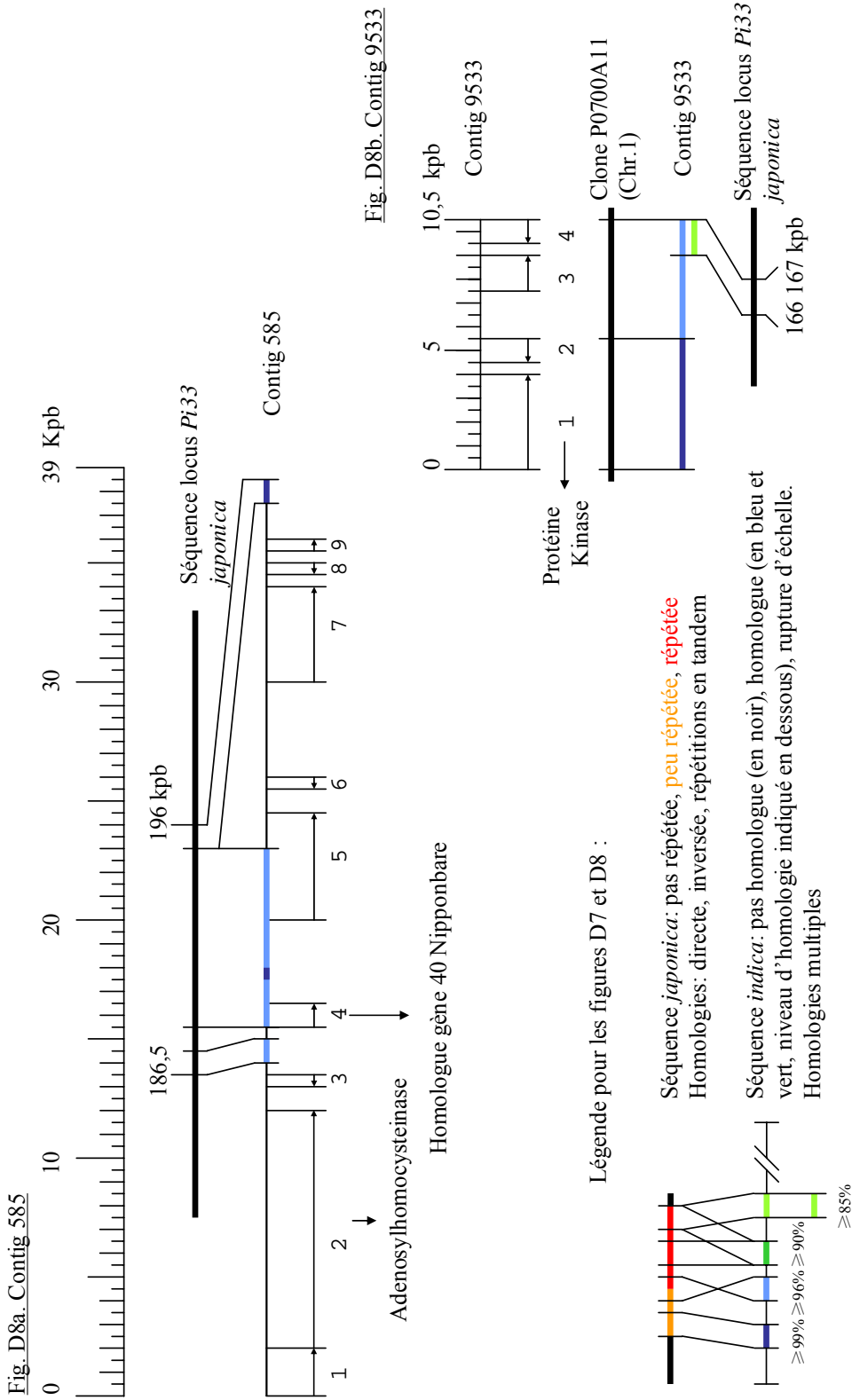


Tableau D6 : gènes prédits par riceHMM, sur les contigs *indica* partiellement homologues à la séquence *japonica*

Tableau D6a : contig 585

Numéro ORF	Homologies BLASTX	Info sur P. (PSORT SOSUI)	Homologies ESTs	Remarques
1	N ⁽²⁾	rien	N ⁽²⁾	
2	gi 417745 sp P32112 SAHH_WHEAT Adenosyl homocysteinase. Très forte homologie + fortes homologues avec Adenosyl homocysteinases d'autres plantes	domaines S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, TrkA-N, NAD binding domain	<i>Oryza sativa (japonica)</i> cDNA, partial sequence (S20409_1A).	On retrouve le domaine TrkA-N dans de nombreuses P. dont des phosphoesterases et des transporteurs d'ions. Le NAD binding domain se retrouve dans de nombreuses P. catalytiques.
3, 5 ⁽³⁾	N	P. soluble nucléaire	N	
4	N	P. soluble	O ⁽¹⁾	homologie avec protéine 40 de la séquence <i>japonica</i>
6, 8, 9	N	P. soluble	N	
7	O	P. soluble nucléaire	N	

Tableau D6b : contig 4500

Numéro ORF	Homologies BLASTX	Info sur P. (PSORT SOSUI)	Homologies ESTs	Remarques
1	P. hypothétiques de riz	P. soluble	N	
2	P. inconnue de riz	P. soluble	O	
3, 4, 5, 6	N	P. soluble	N	
7	O	rien	forte homologie avec : >AU090491 (AU090491) AU090491 Rice panicle shorter than 3cm <i>Oryza sativa</i> cDNA clone E31980, mRNA sequence.	

Tableau D6c : contig 9533

Numéro ORF	Homologies BLASTX	Info sur P. (PSORT SOSUI)	Homologies ESTs	Remarques
1	100% d'homologies avec: >gi 20160990 dbj BAB89924.1 P. kinase putative du riz (chromosome1)	P. soluble	O	
2, 4	N	P. soluble	N	
3	O 100% gène hypothétique chromosome 1	P. soluble	O	

Tableau D6d : contigs 9484 et 9781

Numéro ORF	Homologies BLASTX	Info sur P. (PSORT SOSUI)	Homologies ESTs	Remarques
1 (ctg 9484)	reverse transcriptase putative	P. soluble, domaine GAG-POL	N	
1 (ctg 9781)	O	P. soluble	N	

NB: Mêmes notes que le tableau D5.

Trois de ces séquences présentent des structures connues. Une de reverse transcriptase (contig 9484), une de kinase (contig 9533, figure D8b), une d'adénylhomocystéine hydrolase (contig 585, figure D8a). Le contig 9533 présente de très fortes homologies (≥ 96 % sur toute sa longueur, ≥ 99 % sur la moitié de sa longueur) avec un clone BAC *japonica* du chromosome 1. On peut donc supposer que ce contig ne provient pas du chromosome 8, et que l'homologie observée entre ce contig et la séquence du locus de *Pi33* est due à un événement de duplication ancien. En revanche, le contig 585 n'a pas montré d'homologie avec d'autres parties du génome *japonica*. Ce résultat pourrait indiquer que le gène d'adénylhomocystéine hydrolase qu'il porte se trouve dans le locus de *Pi33* dans le génome *indica*, et qu'il est ailleurs dans le génome *japonica*. En effet, si la séquence complète du locus de *Pi33* chez Nipponbare est disponible dans les bases de données, elle reste partielle pour d'autres portions du génome.

IV) Discussion

Nous avons réalisé une marche chromosomique sur une banque ordonnée en contigs. Dans un premier temps, les marqueurs encadrant le gène *Pi33* ont été hybridés sur la banque ordonnée OSJNBa de la variété Nipponbare (sensible). Les contigs correspondant à ces marqueurs ont ensuite été reliés entre eux au cours d'une marche chromosomique de part et d'autre de *Pi33*. Au cours de cette marche, de nouveaux marqueurs ont été créés. Ils ont été hybridés sur les membranes d'une nouvelle banque, la banque OSIIBb de la variété IR64 (résistante). Ces hybridations permirent de réaliser un contig sur cette banque couvrant le locus de *Pi33*.

A partir de ces cartes physiques, nous avons recherché des homologues à des gènes de résistances connus (RGA), en utilisant des oligonucléotides dégénérés basés sur les séquences consensus des séquences NBS et *Pto*-like. Aucune séquence de ce type n'a été amplifiée dans la zone correspondant à *Pi33* dans la carte physique, ni chez IR64, ni chez Nipponbare.

Nous avons aussi réalisé un test de complémentation en transformant des plantes sensibles avec les clones BAC de la carte physique de *Pi33* dans IR64. Les résultats de ce test permettent d'émettre l'hypothèse selon laquelle *Pi33* se trouve sur l'un des clones BAC de cette carte, le clone OSIIBb 39D23. Cependant, cette hypothèse a été émise sur une base

Tableau D7 : Cartographie physique de différents gènes de résistance du riz. Précision de la cartographie génétique.

Gène	Marqueurs encadrant le gène			Nombre de pas de la marche	Nombre de lignées	Référence
	Distance génétique	Distance physique cartographiée ⁽¹⁾	Rapport ⁽¹⁾			
<i>Pib</i>	0,06 cM (+3 marqueurs qui cosegrègent)	80kpb	1300 kpb/cM	0	3305	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>Pita</i>	2,8 cM	> 850 kpb	> 300 kpb/cM	2 + 5 ⁽²⁾	429	Wu <i>et al.</i> , 1995; Bryan <i>et al.</i> , 2000
<i>Pita</i> ²	0,6 cM (+2 marqueurs qui cosegrègent)	800 kpb	1000 kpb/cM	3 + 2 ⁽²⁾	300	Nakamura <i>et al.</i> , 1997
<i>Pi-co39</i> (t)	1,2 cM (+2 marqueurs qui cosegrègent)	650 kpb	540 kpb/cM	0 ⁽³⁾ , puis 2	1200	Chauhan <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi3 - Pi5</i>	?	150 kpb	?	?	?	Jeon <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi2</i> (t) et <i>Pi9</i> (t)	0,25 cM (+ un marqueur qui cosegrègent)	~90 kpb	~360 kpb/cM	1	596	Liu <i>et al.</i> , 2002
<i>Pi33</i>	1,6 cM	>354 kpb	>324 kpb/cM	1+2	784	Présente étude
<i>Xa1</i>	0,11 cM (+7 marqueurs cDNA qui cosegrègent)	? ⁽⁴⁾	? ⁽⁴⁾	0 ⁽⁴⁾	4225	Yoshimura <i>et al.</i> , 1998
<i>Xa4</i>	8,2 cM (+ 1 marqueur RGA qui cosegrègent)	~350 kpb	43 kpb/cM	0	1401	Wang <i>et al.</i> , 2001
<i>Xa21</i>	1 marqueur cosegrègent	? ⁽⁴⁾	? ⁽⁴⁾	0 ⁽⁴⁾	1100	Song <i>et al.</i> , 1995

(1) Parfois, la zone cartographiée physiquement ne correspond pas totalement à l'intervalle entre les deux marqueurs encadrant le gène.

(2) X + Y : marche chromosomique de X pas dans un sens, puis de Y pas dans l'autre.

(3) Dans la banque Nipponbare. Utilisation d'un changement de banque selon le principe utilisé au cours de cette thèse, suivi d'une marche chromosomique en deux étapes sur cette deuxième banque.

(4) Utilisation d'une méthode gène-candidat.

statistique, car de nombreuses plantes des lignées témoins ont montré une résistance face à la souche PH14-D31C12.

Enfin, nous avons exploité les données de séquence actuellement disponibles concernant les variété Nipponbare (*japonica*) (RGP^{*}) et 93-11 (*indica*) (Yu *et al.*, 2002). L'étude de ces séquences a révélé qu'aucune séquence de type RGA ne se trouve au niveau de *Pi33* dans le génome de Nipponbare. En ce qui concerne 93-11, nous n'avons pas non plus trouvé de séquence RGA, mais il se peut que cela soit dû à des événements de type insertion-délétion. En effet, il n'est pas toujours possible de détecter ces événements avec les données de séquence dont nous disposons, et moins encore de les caractériser.

1) Marche chromosomique

Bien qu'entre R1813 et Y2643L les contigs trouvés soient relativement petits, leur présence a permis d'accélérer le processus de cartographie physique du locus de *Pi33*.

En effet, l'observation d'autres travaux de cartographie physique de gènes de résistance du riz sur des banques non ordonnées montrent que soit (i) le nombre de pas de la marche chromosomique a été plus grand (*Pita* : Bryan *et al.*, 2000 ; *Pita*² : Nakamura *et al.*, 1997), soit (ii) le travail de cartographie génétique fine réalisé auparavant a été plus important, et a nécessité un plus grand nombre de lignées et de marqueurs (*Pib* : Wang *et al.*, 1999 ; *Pi2* et *Pi9* : Liu *et al.*, 2002), soit (iii) une stratégie de gène candidat a été développée, parfois en corrélation avec l'utilisation d'une grande descendance (*Xa1* : Yoshimura *et al.*, 1998 ; *Xa4* : Wang *et al.*, 2001 ; *Xa21* : Song *et al.*, 1995) (tableau D7).

En terme de moyens mis en œuvre, le travail présenté ici peut être mis en parallèle avec ceux de Chauhan *et al.* (2002) ayant abouti à la cartographie physique de *Pi-CO39(t)*. Cette équipe a tout d'abord cartographié ce gène dans la banque HindIII de Nipponbare utilisée ici. Cette cartographie s'est réalisée directement, sans marche chromosomique, car les marqueurs encadrant *Pi-CO39(t)* appartiennent au même contig. Ensuite, la cartographie physique de ces marqueurs, ainsi que de sondes BAC end de la banque Nipponbare dans une banque de la variété CO39 (possédant le gène *Pi-CO39(t)*), suivie d'une marche chromosomique en deux étapes dans cette banque, a abouti à la construction d'un contig. Elle a cependant révélé que le

* Adresse : <http://rgp.dna.affrc.go.jp>

taux de couverture de la banque de CO39 utilisée est insuffisant pour avoir une couverture complète du génome de cette variété.

2) Cartographie physique comparée.

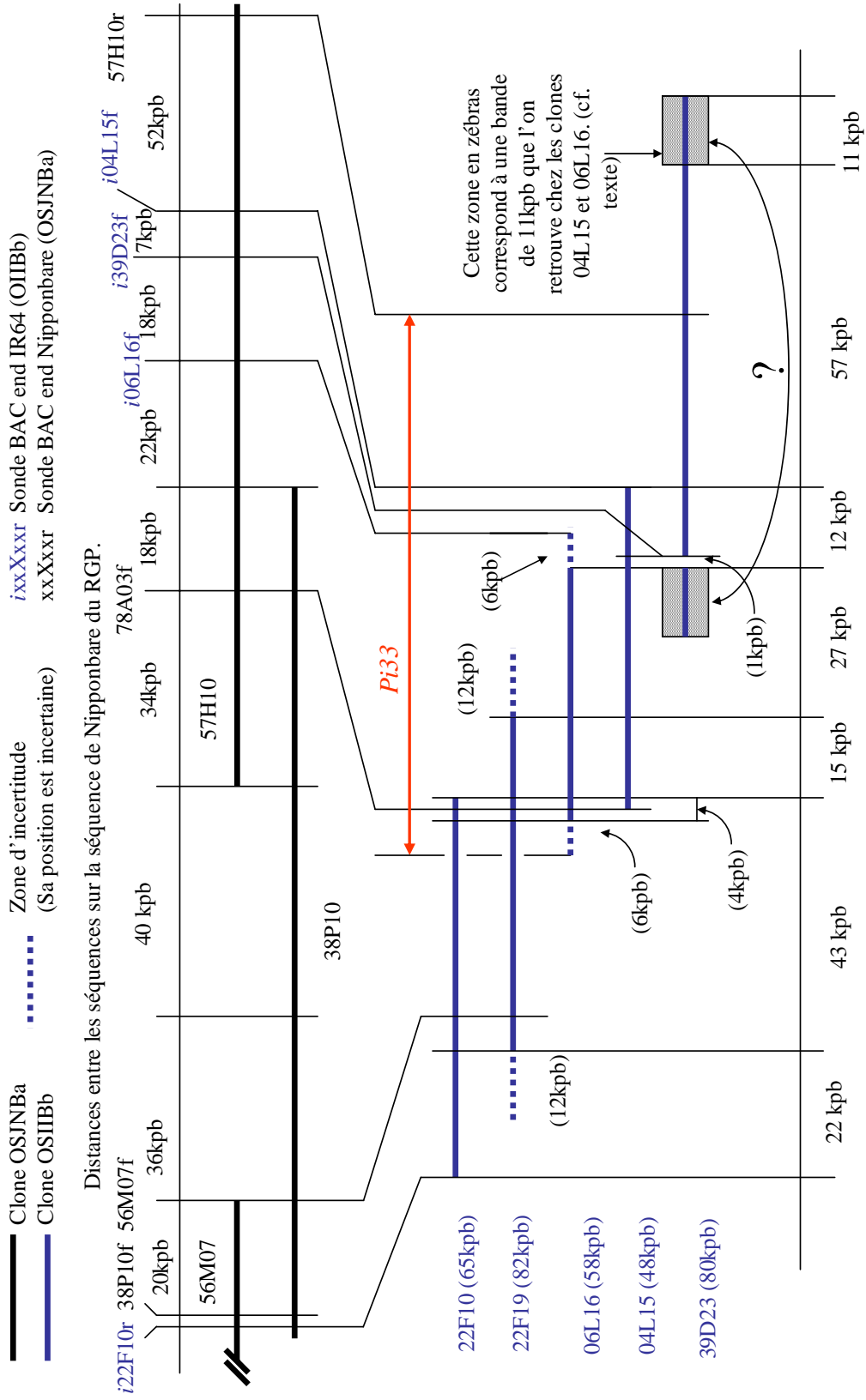
Le résultat des hybridations croisées de sondes BAC end d'une banque sur l'autre banque semble montrer qu'il y a une synténie sur le locus de *Pi33* entre les sous espèces *indica* et *japonica*. Du moins, il ne semble pas que des translocations aient eu lieu : l'ordre des sondes est le même dans les deux contigs.

La sonde OSJNBa 78A03r constitue cependant une exception, puisqu'elle s'hybride avec deux clones de la banque IR64 qui semblent sans rapport avec la carte physique établie par ailleurs. Cependant, il se peut que ces deux clones correspondent à des artefacts (cf. § I.3.a. du présent chapitre, p. 149).

Pour vérifier ou infirmer cette hypothèse de synténie, il a été décidé de réaliser des digestions des clones OSIIBb 04L15, 06L16, 22F10, 22F19 et 39D23, afin de connaître leur longueur respective et la façon dont ils se superposent. La figure D9 montre le résultat de ces expérimentations. En premier lieu, ces inserts BAC semblent relativement courts par rapport à la moyenne de la banque (67 kpb contre 100 kpb en moyenne). Il se peut cependant que cette faible longueur moyenne soit sous estimée car il est possible que certaines bandes n'aient pas été prises en compte (bandes de faible poids moléculaire difficiles à détecter, bandes doubles...). OSIIBb 22F19 est l'insert le plus long (82 kpb), OSIIBb 04L15 le plus court (49kpb).

Ces résultats ont été comparés à la séquence de Nipponbare dans la zone obtenue au RGP (figure D10). Ils mettent en évidence une nette différence de longueur entre les différents marqueurs pour ces deux génotypes. Ainsi, le clone 22F10 (65kpb) couvre une région qui, chez Nipponbare, correspond à plus de 130kpb. Cette différence de longueur peut s'expliquer par des évènements d'insertion-délétion, ou par des translocations. De tels évènements d'insertions délétion ont d'ailleurs été observés ailleurs dans le génome lors de comparaison de séquences *indica* et *japonica* (Sasaki *et al.*, 2002b). Le fait que la sonde répétée 22N24r soit présente dans la zone de *Pi33* chez Nipponbare et absente chez IR64 pourrait être la trace d'un tel remaniement.

Figure D9 : Cartographie physique de *Pi33* : Comparaison des distances physiques chez IR64 et Nipponbare



Distance estimées par la mesure de la longueur des bandes des profils de restriction des clones BAC d'IR64

Enfin, il est possible d'émettre une hypothèse concernant une rupture de synténie au niveau des sondes *i06L16f* à *i39D23f*. En effet, les profils de digestion des clones OSIIBb 04L15, 06L16 et 39D23 présentent une bande commune de 11kpb. (i) Si cette bande correspond réellement à une portion du génome d'IR64 partagée par ces trois clones, alors, la synténie est rompue : la sonde *i39D23f* se trouverait à gauche des sondes *i04L15f* et *i06L16f* chez IR64, et à droite chez Nipponbare. (ii) Il se peut aussi que cette bande corresponde à une partie du génome partagée seulement par OSIIBb 04L15 et 06L16. Par hasard, OSIIBb 39D23 présenterait une bande de même longueur, mais correspondant à une autre portion de cet insert. Peut-être même présente-t-elle une différence de longueur que l'on ne peut voir sur le gel, à cause de la faible résolution de celui-ci pour les forts poids moléculaires. Cependant, même dans ce cas, il reste une différence entre les deux génomes à ce niveau. Chez Nipponbare, les sondes *i06L16f* et *i39D23f* sont séparées par 18 kpb. Le profil de digestion de OSIIBb 04L15 ne laisse voir qu'une bande de faible poids moléculaire qui ne se retrouve pas dans OSIIBb 06L16 ni 39D23. Autrement dit, la distance entre *i06L16f* et *i39D23f* serait faible, chez IR64.

3) Tentative d'affinement de la cartographie physique par un test de complémentation

Une forte proportion (19 à 49 %) des plantes n'a pas montré de symptômes de sensibilité à la souche PH14-31C12 de *M. grisea* portant le gène d'avirulence *ACE1*, y compris chez des témoins non transformés, ou bien transformés avec des inserts ne pouvant pas contenir *Pi33*. Ce résultat ne peut être dû à l'expression du gène de résistance *Pi33* que la variété Kassalath ne possède pas (tableau C1, p. 104). Ces résistances pourraient être dues à des modifications physiologiques liées à la culture *in vitro*^{*}, ou à des réactions de la plante au stress du sevrage.

Quelles qu'en soient les causes, ces réactions de résistance ont induit un bruit de fond qui empêche la sélection à coup sûr d'individus complémentants. Cependant, une analyse

^{*}Deux à trois semaines de culture sur milieu gélosé + quatre à six semaines de culture après sevrage (cf. chapitre « Matériel et méthodes » §§ IV.2.b. et c., p. 102), ce qui est défavorable au développement de la maladie (Didier Tharreau, communication personnelle)

statistique des résultats obtenus a permis de montrer que la fréquence de plantes résistantes était significativement plus élevée pour les lignées transformées avec le clone OSIIBb 39D23. Ce clone BAC pourrait donc contenir *Pi33*.

Afin de confirmer cette hypothèse, **il a été décidé de multiplier les plantes issues de ces expérimentations**. L'étude de la résistance parmi les descendances de ces lignées sera facilité par le fait qu'il s'agira de plantes issues de semis. Actuellement (03/01/03), des graines ont déjà été récoltées. Elles seront semées prochainement.

4) *Pi33* est-il un gène centromérique ?

D'après notre travail de cartographie, le locus de *Pi33* se trouve dans le centromère du chromosome 8 (Sing *et al.*, 1996), ou près de celui-ci (Harushima *et al.*, 1998). Les centromères des chromosomes du riz sont caractérisés entre autres par trois propriétés : (i) faible taux de recombinaison (Chen *et al.*, 2002) (ii) présence d'une forte proportion de séquences répétées spécifiques (Dong *et al.*, 1998), (iii) présence d'un élément transposable spécifique : le retrotransposon Ty3-*gypsy* (Li *et al.*, 2000).

Pour quatre combinaisons de marqueurs, il est possible de calculer précisément la distance physique qui les sépare chez Nipponbare. Pour deux autres, une approximation de cette distance peut être faite. Chez IR64, les travaux de cartographie physique permettent de se faire une idée des distances séparant les marqueurs, mais l'incertitude concernant la position de 57H10r dans le clone OSIIBb 0039D23 fait que seule une borne supérieure peut être donnée. Les résultats de ces calculs sont montrés dans le tableau D8.

Tableau D8 : Rapport distance physique / distance génétique chez IR64 et Azucena au niveau du locus de *Pi33*

Marqueurs	Distance génétique	Nipponbare		IR64	
		Distance physique	Distance génétique / distance physique	Distance physique	Distance génétique / distance physique
G1010 - R1813	0,5 cM*	300 à 480 kpb	600 à 960 kpb/cM	?	?
R1813 - 57H10r	0,2 cM	125 kpb	625 kpb/cM		
57H10r - i06L16f	1 cM	>117 kpb	>117 kpb/cM	<80kpb	<80 kpb/cM
57H10r - 56M07r	1,4 cM	227 kpb	162 kpb/cM	<187kpb	<135 kpb/cM
56M07r - C483	0,55 cM	343 kpb	625 kpb/cM		
R1813 - C483	2,15 cM	697 kpb	324kpb/cM		

Chez le riz, la mesure de la longueur de la carte génétique comparée à celle du génome indique que ce rapport varie de 100 kpb/cM à 300 kpb/cM (Saito *et al.* 1991, Causse *et al.*, 1994) avec une moyenne de 244 kpb/cM (Chen *et al.*, 2002). La comparaison entre la distance physique et la distance génétique séparant les marqueurs 57H10r et 56M07r a permis d'établir un rapport distance génétique / distance physique conforme aux moyennes connues sur le génome du riz (163 kpb/cM). Cependant, de part et d'autre de cet intervalle, ce rapport augmente brusquement, que ce soit en se rapprochant (625 kpb/cM entre 56M07r et C483) ou en s'éloignant (625 kpb/cM entre 57H10r et R1813) du centromère. Une telle variation brutale du rapport distance physique/distance génétique se retrouve dans la carte physique d'un autre gène de résistance proche du centromère, *Pita* (Bryan *et al.*, 2000). En effet, le marqueur p7C3 coségrégant avec ce gène délimite deux domaines, l'un où le rapport distance physique / distance génétique est de l'ordre de 115 kpb/cM, l'autre (contenant *Pita*) où ce rapport est supérieur à 470kpb/cM (Bryan *et al.*, 2000). Cependant, ce rapport n'atteint nulle part la valeur observée lors de la cartographie de *Pita*² (> 1 000 kpb/cM, Nakamura *et al.*, 1997). **Ces résultats tendraient à montrer que le locus de *Pi33*, située dans une zone proche du centromère où le taux de recombinaison est faible, serait un lieu privilégié pour la recombinaison.**

Cependant, l'analyse de la séquence de Nipponbare entre 56M07r et 57H10r a montré que 55 % seulement de cette région sont constitués de séquences répétées. Ce taux correspond à celui observé en moyenne dans la séquence *indica* (59,3 %, Yu *et al.*, 2002). Enfin, à l'exception de plusieurs séquences de rétrotransposons de type Ty3-*gypsy*, aucune séquence typique des centromères n'a été trouvée dans cette zone. **Ces données nous incitent à privilégier l'hypothèse selon laquelle *Pi33* n'appartiendrait pas au centromère du chromosome 8, mais qu'il en serait proche.**

5) Etude des gènes prédits dans la séquence Nipponbare

L'étude de la séquence des gènes prédits dans la séquence Nipponbare, ainsi que dans certains contigs de la séquence *indica*, a montré qu'aucun analogue de gène de résistance ne se trouve dans la zone. De plus, une recherche de RGA par PCR en utilisant des amorces dégénérées des domaines conservés NBS et de *Pto* s'est révélée infructueuse dans le locus de

Fig D10a.

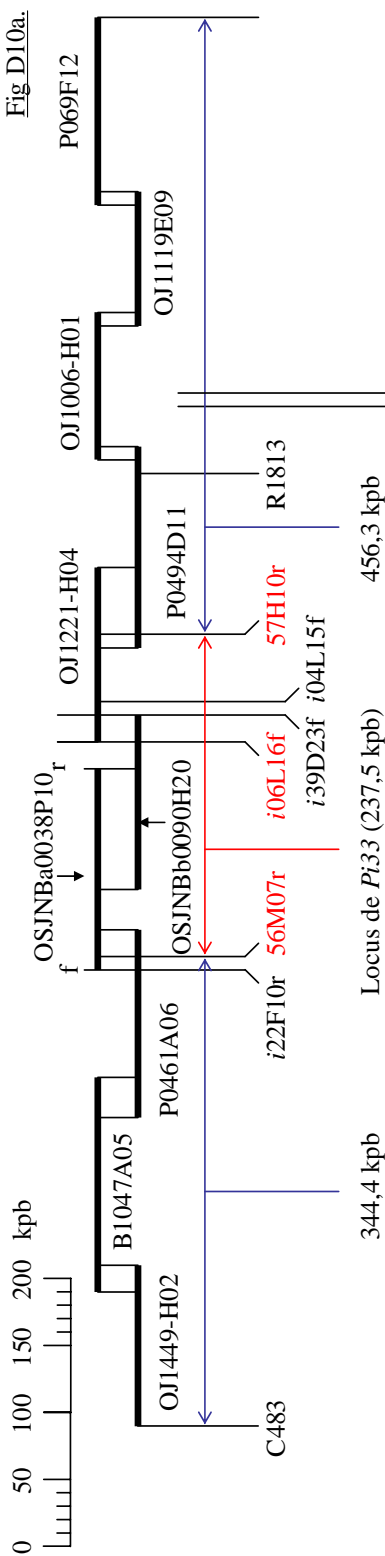


Fig D10b.

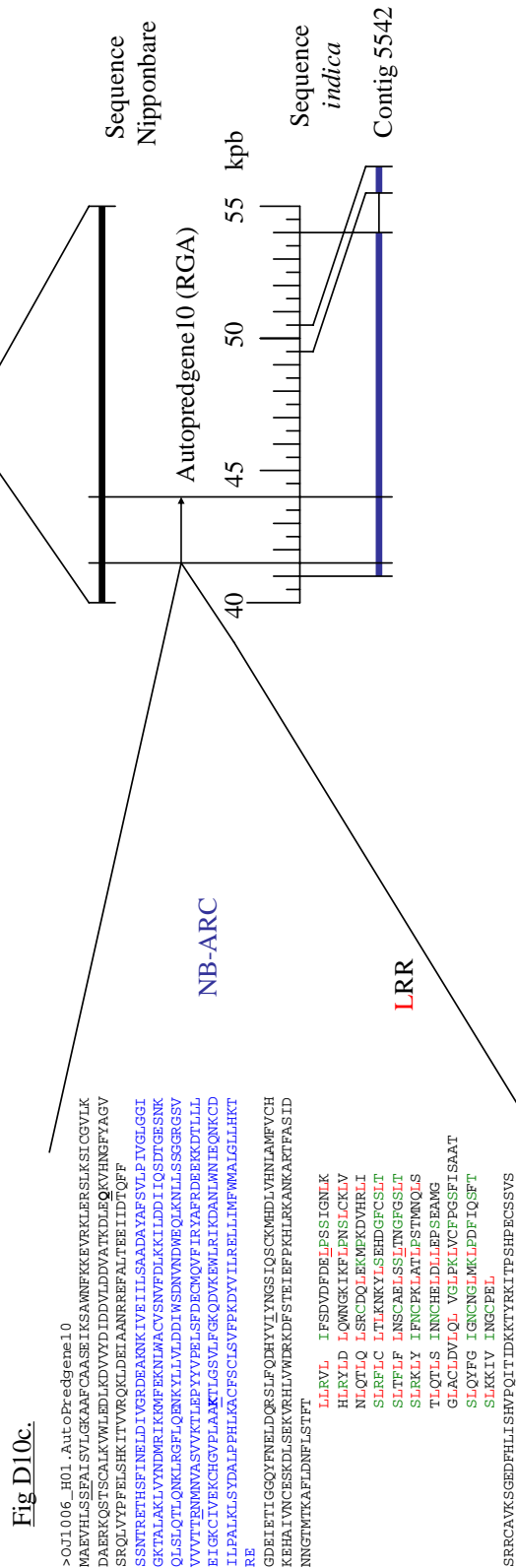


Figure D10: Recherche de RGA dans la zone entourant le locus de *Pi33*

Fig. D10a : présentation des séquences disponibles autour de *Pi33* et de leur utilisation au cours de la thèse : en rouge au centre : séquence étudiée en détail. En bleu de chaque côté : des RGA ont été recherchés au moyens de BLAST sur la base de données nr

Fig. D10b : Alignement d'une portion du clone BAC OJ1006_H01 portant un analogue de gène de résistance avec les contigs de séquence *indica* en gras sont remplacés par des codons stop dans ce contig.

Pi33 pour les variétés IR64 et Nipponbare. Un tel résultat nous a amené à faire trois hypothèses :

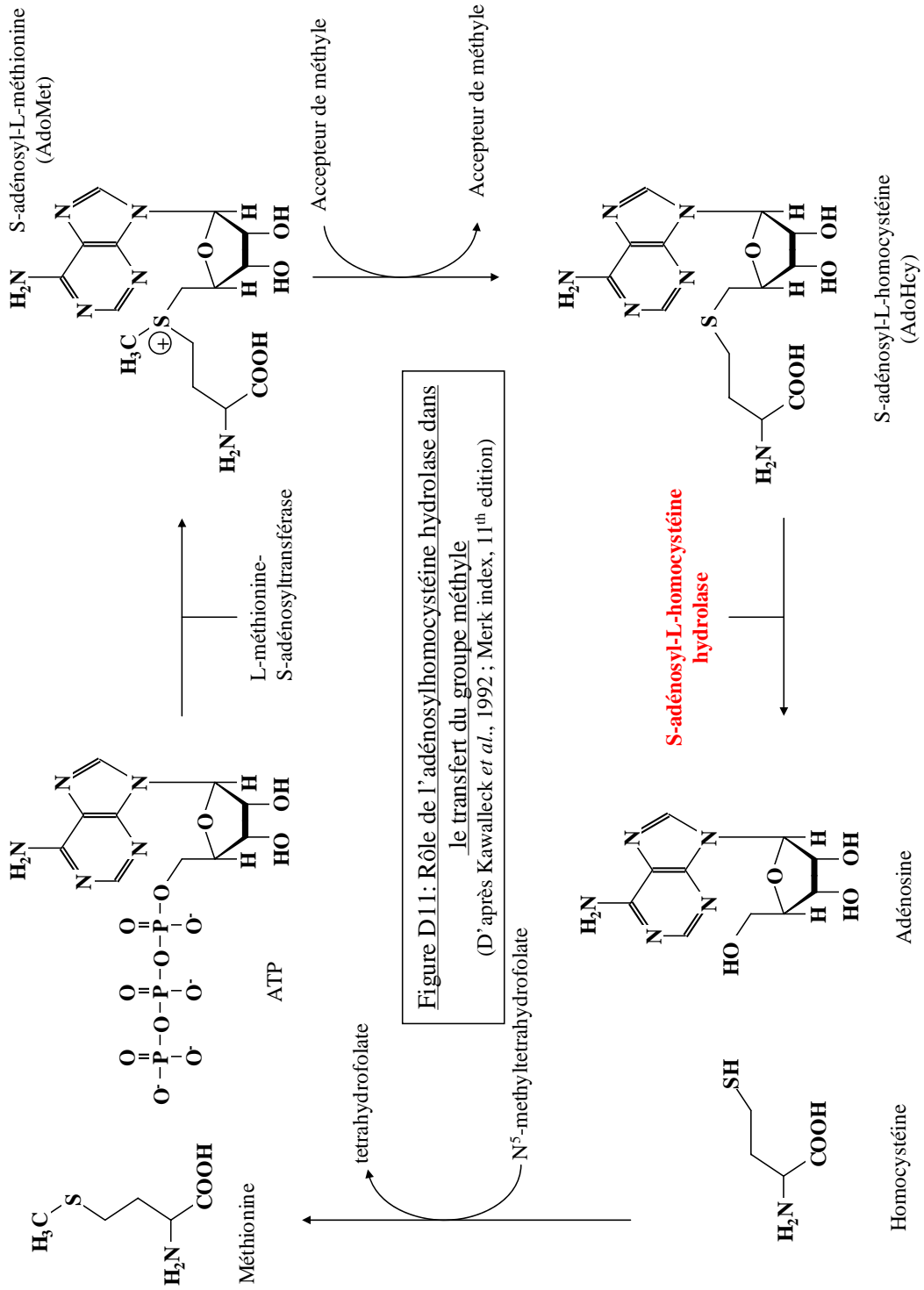
- (i) le gène de résistance *Pi33* ne se trouve pas dans la zone où on l'a cartographié,
- (ii) le gène *Pi33* n'existe pas chez Nipponbare,
- (iii) le gène *Pi33* n'est pas un gène de type NBS-LRR.

☉ *Analyse de la séquence de Nipponbare au delà du locus de $\text{PI}33$*

Afin de tester l'hypothèse (i), nous avons réalisé des analyses de séquences pour les BAC séquencés par le RGP bordant la zone du locus de *Pi33*, en particulier les clones OJ1449-H02, B1047A05, P0461A06, P0494D11, OJ1006H01, OJ1119E09, et P069F12. Ces clones couvrent une séquence de 824 318 pb, dont 800 699 pb se trouvent en dehors du locus de *Pi33* (456 306 pb à droite de 57H10r, et 344 393 pb à gauche de 56M07r, voir figure D10). Dans la séquence du clone OJ1006-H01, on trouve une séquence RGA complète, à 170 044 pb à droite de 57H10r. Il se peut que ce RGA corresponde à un gène s'exprimant réellement car aucun codon stop n'a été trouvé. La séquence de ce RGA présente un site NB-ARC (NBS) et 9,5 répétitions riches en leucine (LRRs) (figure D10). Son alignement avec d'autres RGA du riz, de la laitue et du maïs, ainsi qu'avec le gène de résistance le plus homologue (*I2* de la tomate, Simons *et al.*, 1998 ; Ori *et al.*, 1997) est montré en annexe 17.

Il est à noter que la présence d'un seul RGA dans la zone étudiée ($800\ 699 + 237\ 479 = 1\ 037\ 978$ pb) est comparable à ce que l'on aurait pu prévoir. En effet, Goff *et al.* (2002) mettent en évidence la présence de 1050 RGA dans le génome du riz (600 NBS-LRR, et 450 LRR extracytoplasmiques), qui mesure 430 Mpb, soit un RGA pour 410 kpb (et un NBS-LRR pour 716 kpb) en moyenne.

Dans la séquence *indica*, un contig a été trouvé (contig 5542), qui présente une forte homologie avec la séquence de OJ1006_H01, en particulier au niveau de ce RGA. Cependant, il est à noter que deux codons stops, dont un dans le domaine NB-ARC ont été trouvés. Si ce RGA correspond à un gène vraiment exprimé, il serait a priori exprimé chez des variétés *japonica* comme Nipponbare, plutôt que dans des variétés *indica*, comme 93-11 ou IR64. Il semble donc improbable qu'il corresponde à *Pi33* qui n'a été trouvé que chez des *indica* et en particulier pas chez Nipponbare.



☼ *Recherche d'autres gènes candidats*

L'absence de RGA dans la zone du locus de *Pi33* nous a amené à faire l'hypothèse que ce gène ne présente pas les structures classiques des gènes de résistance. Cependant, il est difficile de déterminer des gènes candidats car la majorité des gènes prédits codent pour des protéines pour lesquelles aucun homologue ayant un rôle connu n'a été découvert. De plus, les domaines protéiques prédits ont le plus souvent un rôle inconnu.

Il est à noter que l'on trouve un certain nombre de domaines BTP-POZ, identifiés également dans certaines protéines à doigts de zinc.

Enfin, on trouve dans le contig 585 de la séquence *indica* un gène très homologue à des adénylhomocystéine-hydrolases de différents végétaux. Les enzymes de cette classe sont impliquées dans le processus de méthylation de différents composés métaboliques tels que des acides gras, des protéines, des dérivés de l'acide phénylpropanoïque, des acides nucléiques (Tabor & Tabor, 1984). Au cours de ce processus, le groupe méthyle est transféré de la S-adényl-L-méthionine vers le composé d'intérêt. On obtient alors le composé d'intérêt méthylé et de la S-adényl-L-homocystéine, qui est hydrolysée par la S-adényl-L-homocystéine-hydrolase (= Adénylhomocystéine-hydrolase) pour donner de l'adénosine et de l'homocystéine. cette dernière est recyclée en méthionine, et le cycle est bouclé par la L-méthionine-S-adenosyltransferase qui catalyse la synthèse de la S-adényl-L-méthionine à partir d'ATP et de méthionine (figure D11).

Kawalleck *et al.* (1992) ont montré que, chez le persil, ce gène était activé par un éliciteur extrait à partir du straménopile phytopathogène *Phytophthora megasperma*, ce qui pourrait indiquer qu'il joue un rôle dans les mécanismes de défense. Il faut noter que les cycles de méthylation dans lesquels cette enzyme est impliquée participent à la synthèse de molécules de défense (Michel Droux, communication personnelle). Enfin, la zone du génome *japonica* correspondant n'a pas été séquencée pour l'instant.

Ces arguments nous amènent à penser que ce gène pourrait être un candidat : la protéine qu'il synthétise pourrait jouer un rôle dans la détoxification du composé synthétisé par l'enzyme codée par *ACE1*. Bien sûr, il est impossible pour l'instant d'aller plus loin dans les hypothèses, car aucune autre activité que l'hydrolyse de la S-adényl-L-homocystéine n'a été montrée pour la S-adényl-L-homocystéine hydrolase, et car on ne peut exclure que le contig 585, construction basée sur des comparaisons de séquences, soit chimérique.

6) Perspectives

A la suite des travaux présentés ici, plusieurs expérimentations sont prévues à court terme. En premier lieu, les données obtenues lors du test de complémentation seront confirmées en utilisant les plantes T₁ issues des semences récoltées sur les plantes T₀ qui sont actuellement en cours de multiplication. En effet, ces plantes, issues de semis, ne présenteront probablement pas les résistances physiologiques mises en évidence par les plantes issues de culture *in vitro*. De plus, il sera possible, pour ces plantes, d'obtenir un plus grand nombre d'individus, et donc de pouvoir réaliser des tests de résistance en utilisant la paire de souches quasi-isogéniques PH14 \ PH14-D31C12.

Des oligonucléotides dégénérés sont actuellement mis au point pour amplifier les séquences de S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase. Ils seront utilisés pour vérifier si le gène codant pour cette protéine mis en évidence dans le contig *indica* 585 est présent dans les clones BAC de IR64 composant la carte physique de *Pi33*.

Enfin, le clone BAC OSIIBb 39D23 est actuellement en cours de séquençage (à partir de son extrémité forward). En effet ce clone est le candidat mis en évidence au cours du test de complémentation. Pour la zone correspondant à ce clone, il sera ainsi possible de connaître la séquence exacte d'une variété résistante (IR64).

Parallèlement aux travaux d'étude de séquence, les sondes utilisées pour la cartographie génétique et la cartographie physique de *Pi33* nous ont servi à étudier le polymorphisme de différentes variétés du riz (dont les parents de IR64). Les résultats obtenus au cours de ces travaux sont présentés dans le chapitre suivant.

*

*

*

DIVERSITE AU NIVEAU DU LOCUS DE *Pi33*, RECHERCHE DE L'ORIGINE DE CE GENE PARMI LES PARENTS D'IR64

Il peut être intéressant de retrouver la variété d'origine de *Pi33* à la fois d'un point de vue appliqué et d'un point de vue fondamental.

- (i) D'un point de vue appliqué, la découverte de la variété d'origine de *Pi33* permettra peut-être de comprendre la raison pour laquelle ce gène de résistance est présent chez plusieurs variétés améliorées. Elle permettra aussi d'orienter la recherche de ce gène dans les variétés cultivées en étudiant leur généalogie. Une telle connaissance sera utile dans la gestion de ce gène.
- (ii) D'un point de vue fondamental, il se peut que la connaissance de la ou les variété(s) originelle(s) amène des connaissances en terme de co-évolution. Dans le cas d'une variété traditionnelle, une forte pression de sélection s'est exercée sur les populations locales de *M. grisea* sur une longue période dans la zone où cette variété a été cultivée de façon régulière. L'étude de la virulence des souches originaires de cette zone peut donc apporter des informations sur la capacité de *M. grisea* à contourner cette résistance.

Dans le but de rechercher les origines de ce gène, nous avons étudié le polymorphisme moléculaire de plusieurs variétés de riz, dont des parents de la variété IR64, au niveau du locus de *Pi33*, en utilisant les marqueurs définis au cours des précédents chapitres. Par ailleurs, nous avons testé la présence ou l'absence du gène *Pi33* dans ces variétés en utilisant les couples de souches de *M. grisea* isogéniques pour *ACE1*.

I) Résultats

☼ *Présentation de la généalogie d'IR64 et des lignées testées*

La généalogie d'IR64 est bien documentée. Il est possible de la connaître sur un grand nombre de croisements (jusqu'à 14 dans certaines branches). Il s'agit d'une généalogie complexe où l'on retrouve divers schémas de sélection dont des cultivars issus de sélection dans des variétés – population, des introgressions par backcross suivi d'autofécondations (figure B1). Les membres de cette généalogie peuvent être divisés en trois ensembles (figure E1) :

- (i) Des géniteurs primaires, c'est à dire des lignées parentes de IR64 qui ne possèdent pas elles même de parents connus.
- (ii) Des individus hybrides issus directement d'un croisement. Il s'agit parfois d'hybrides F_1 issus du croisement de deux lignées, d'autre fois d'individus issus de croisements plus complexes (Backcross, croisements trois voies, hybrides issus de deux individus F_1 de deux croisements différents etc.). Ces individus ne sont évidemment plus accessibles à présent.
- (iii) Des lignées fixées, le plus souvent par plusieurs générations d'autofécondations. Il s'agit d'un ensemble hétéroclite comprenant des variétés utilisées en grande culture [exemples : Taichung Native 1 (TN1), IR8, IR24] et des lignées utilisées uniquement comme géniteurs (exemples : IR773A-1-36-2-1, IR747B-2-6-3-3-1).

De plus, la même lignée apparaît fréquemment plusieurs fois dans cette généalogie. On appellera « entrée » chacune des positions prises par la même lignée dans la généalogie d'IR64. Ainsi, la variété IR8 constitue 20 des entrées de la généalogie d'IR64, et la lignée IR2061-465-1-4 en constitue deux autres : c'est à la fois l'un des deux parents du croisement ayant abouti à IR64, et l'un des 4 grands-parents de l'autre parent de ce croisement (figure B1).

Figure E1 : Les types de parents de IR64

En dehors de quelques accessions, cette généalogie est muette. Pour obtenir le nom de chaque parent, se reporter à la figure B1

Légende:

- Géniteur primaire. Issu d'une variété traditionnelle, d'une accession sauvage ou d'une mutation spontanée.
- Lignée fixée
- Individu hybride (cf. p. 186)

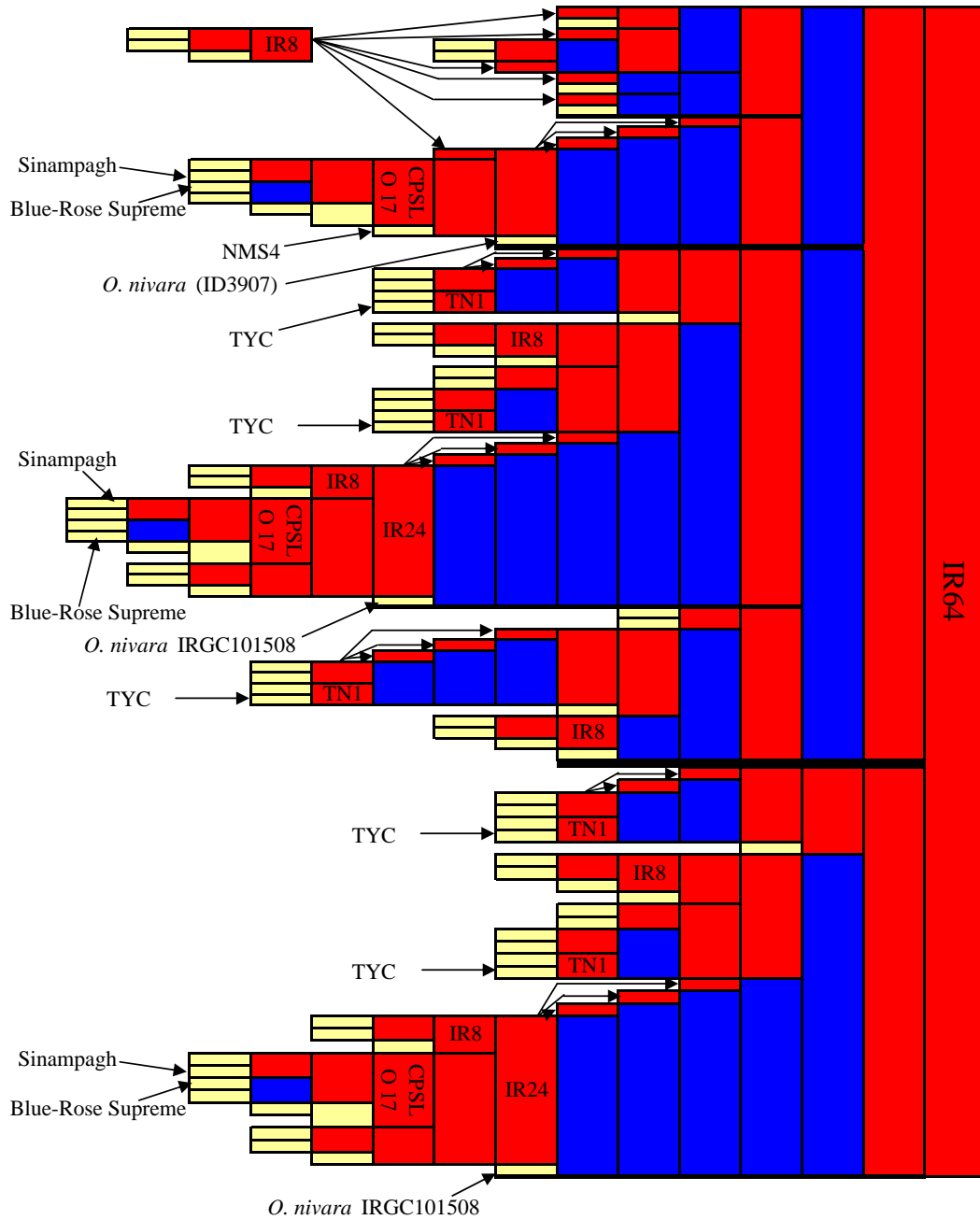
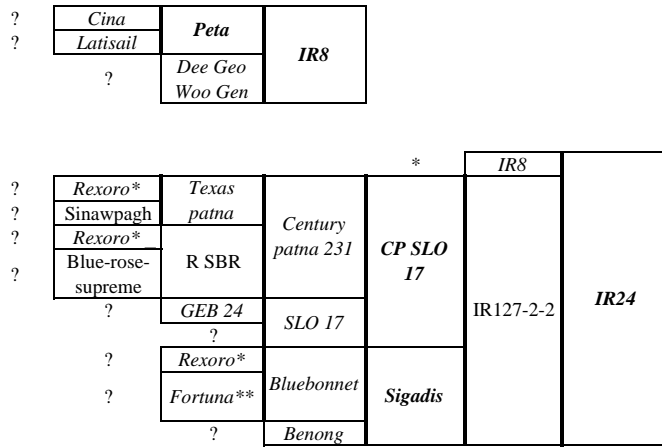


Figure B1b: généalogie de IR8, Sigadis, CPSLO 17, IR24, Peta et Taichung Native 1



* isolée de Marong Paroc. ** isolée de Pa-Chiam.



Figure B1c: légende des généalogies

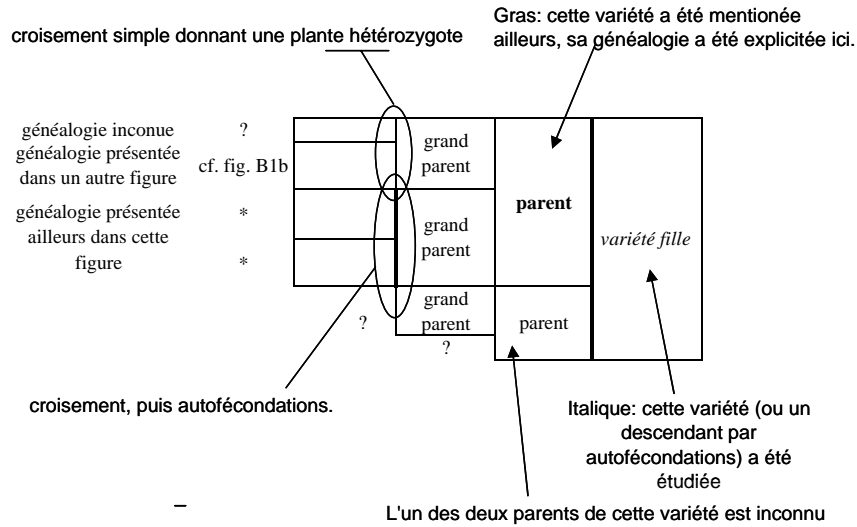
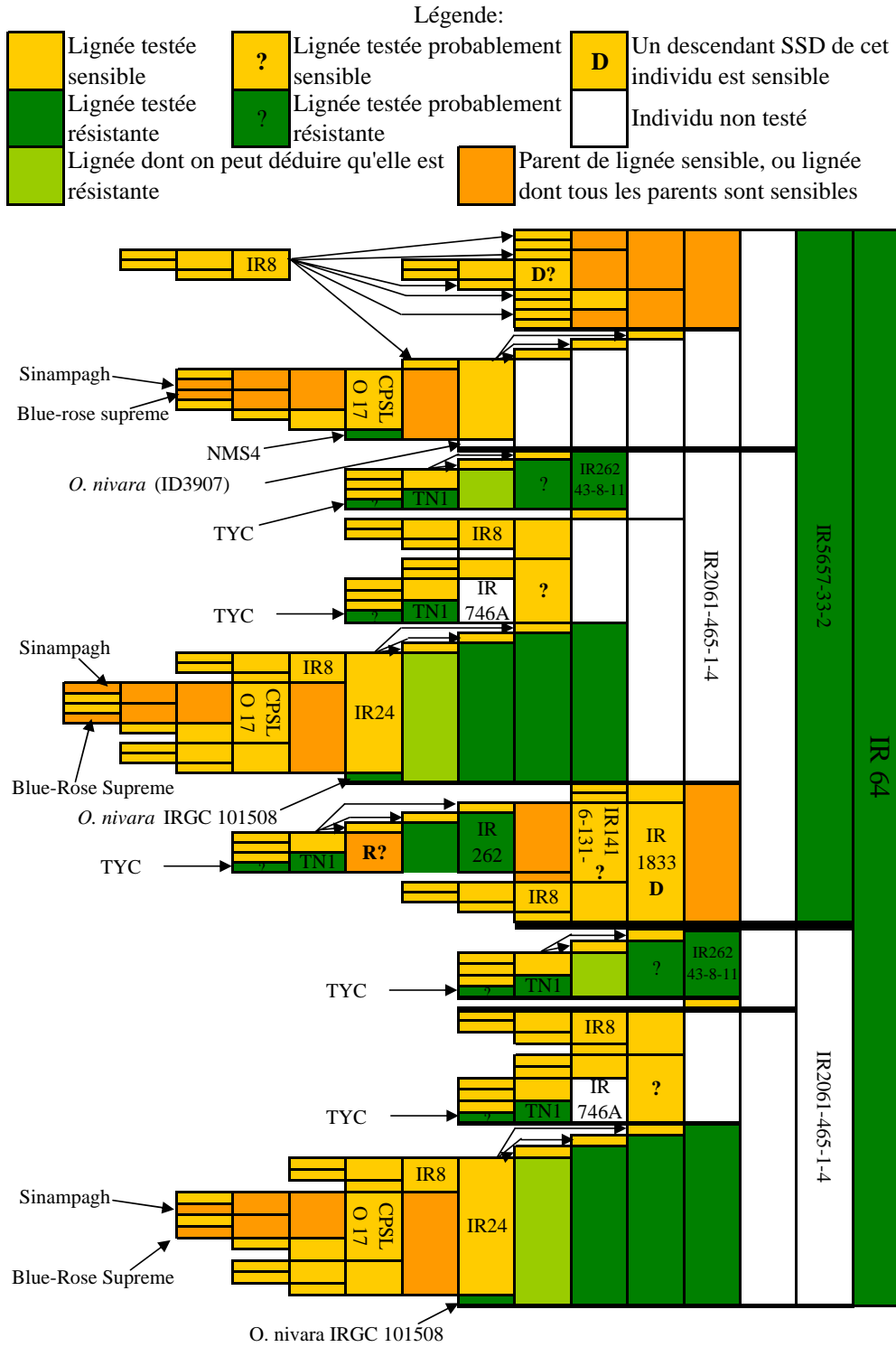


Figure E2 : Présence de *Pi33* dans la généalogie d'IR64

En dehors de quelques accessions, cette généalogie est muette. Pour obtenir le nom de chaque parent, se reporter à la fig.B1



1) Recherche du gène de résistance *Pi33* dans la généalogie d'IR64

La recherche de la source du gène de résistance *Pi33* chez IR64 s'est déroulée en quatre étapes :

- (i) Reconstitution de la généalogie d'IR64 à partir des données mises à disposition par l'IRRI, dans la base de données IRIS*. Cette généalogie est accessible figure B1.
- (ii) Recherche des géniteurs primaires, c'est à dire des parents d'IR64 n'ayant pas eux-mêmes de parents connus. Il s'agit le plus souvent de lignées isolées de variétés traditionnelles, ou bien d'accessions d'espèces sauvages du riz.
- (iii) Etude de la résistance de ces géniteurs primaires : toutes ces lignées [à l'exception des variétés Sinampagh et Blue-Rose Supreme, et d'une accession de *O. nivara* non référencée par l'IRGC (*O. nivara* ID3907)] furent testées pour la résistance, en utilisant les couples de souches quasi-isogéniques CM28 \ CM28-D31C12, PH14 \ PH14-D31C12 et 2/0/3 \ 2/0/3-D31C12.
- (iv) Suivi de *Pi33* dans la généalogie de IR64 : à partir des géniteurs primaires résistants, des lignées intermédiaires ont été testées pour la résistance, afin de vérifier si *Pi33* était sélectionné ou non au cours des croisements. Ces lignées peuvent se subdiviser en deux groupes. (i) Les lignées ou variétés fixées : il a été possible, pour certaines de ces lignées d'obtenir des semences et de réaliser des tests de résistance. (ii) Les descendants des individus hybrides (cf. § (ii) au début du I. du présent chapitre, p. 186) : pour certains d'entre eux, il a été possible de tester des descendants obtenus par autofécondation.

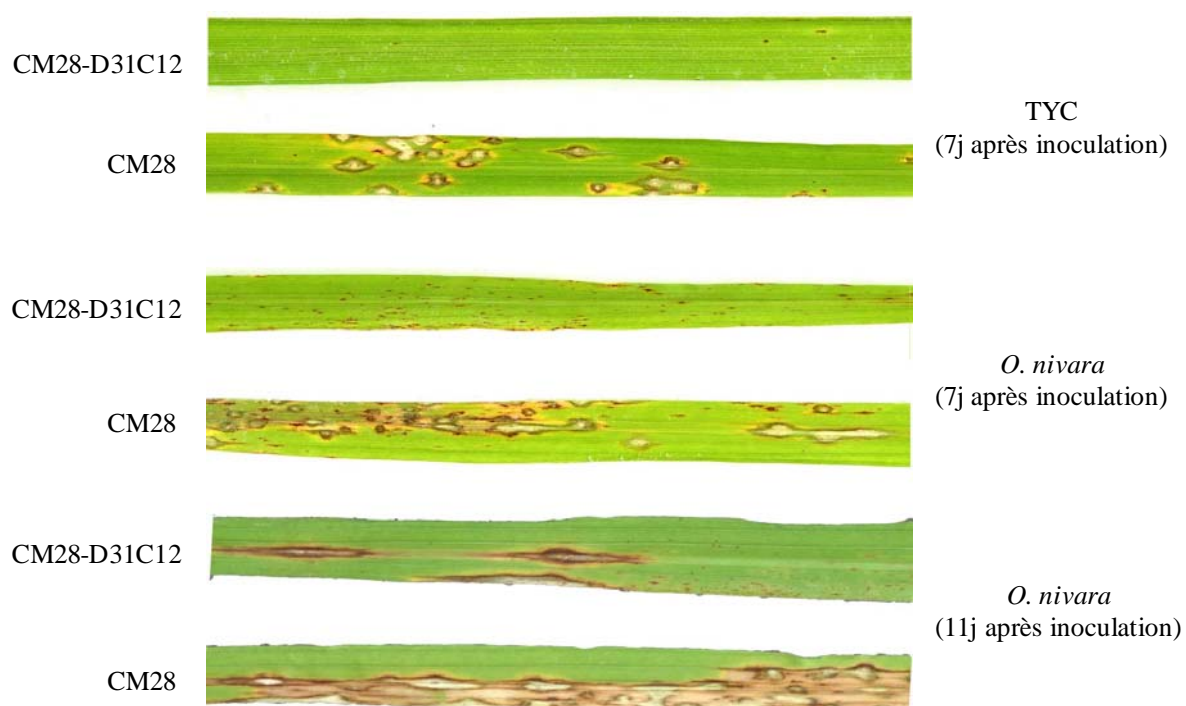
Les résultats des tests de résistance sont présentés dans le tableau E1 et la figure E2.

a) Géniteurs « primaires »

En ce qui concerne les géniteurs primaires testés, tous se sont révélés sensibles à au moins l'une des souches avirulentes de *M. grisea* portant *ACE1*, à l'exception de trois d'entre eux, Tsai Yuan Chung (TYC), *O. nivara* IRGC101508 et Nang-Mon S4 (NMS4). Par ailleurs, il n'a pas été possible de réaliser des tests de résistance pour les géniteurs primaires

* Adresse : <http://www.iris.irri.org/>

Figure E3 : Symptômes observés après inoculation de TYC et *O. nivara* par les souches CM28 et CM28-D31C12



Sinampagh, Blue-Rose Supreme et *O. nivara* ID3907 dont les semences n'ont pu être obtenues.

NMS4 s'est révélée sensible aux souches CM28 et 2/0/3, et résistante aux souches CM28-D31C12 et 2/0/3-D31C12 au cours de deux expérimentations indépendantes*. La sensibilité de NMS4 à PH14 est probable mais n'a pas été clairement établie. En revanche, deux répétitions permettent d'affirmer que NMS4 résiste à PH14-D31C12. **En conséquence, on peut affirmer que NMS4 possède *Pi33*.**

En ce qui concerne l'accession IRGC101508 de *O. nivara*, les tests réalisés dans des conditions standard ont clairement montré que **cette lignée contient *Pi33***. Toutefois, des symptômes apparaissent tardivement sur les feuilles (figure E3), après une période plus longue (11 jours au lieu de 7), et seulement dans certains cas. Ces symptômes sont présents uniquement au niveau de la nervure centrale, peu nombreux, et ne présentent pas la forme classique en losange, mais plutôt celle d'un fuseau allongé et très nettement entouré de cellules nécrosées.

Les tests de résistance réalisés sur la variété Tsai Yuan Chung (TYC), s'ils semblent indiquer que cette variété possède *Pi33*, n'ont pas donné des résultats parfaitement cohérents entre les répétitions. Dans certains cas, un différentiel sensibilité à la souche sauvage / résistance à la souche transformée a clairement été observé (figure E3). Dans d'autres, TYC a montré des symptômes de sensibilité aux deux souches. Cependant, une différence quantitative a toujours été observée : les plantes inoculées avec la souche transformée présentaient moins de symptômes que celles inoculées avec la souche sauvage. Enfin, la présence de *Pi33* dans TYC peut être supposée sur la base de tests de résistance ayant donné des résultats très nets (figure E3) et de données de généalogie : TN1 provient du croisement TYC × DGWG, DGWG est clairement sensible, et TN1 est clairement résistante. Dans TN1, *Pi33* provient donc probablement de TYC.

* C'est à dire une seule répétition pour chaque paire de souches. En conséquence, deux répétitions établissent la présence de *Pi33* dans cette variété, mais la résistance ou la sensibilité à chaque souche n'a été testée qu'une fois, d'où les mentions R? et S? dans le tableau E1.

Tableau E1 : Présence ou absence de *Pi33* chez certains parents de IR64

Dans ce tableau certains résultats obtenus antérieurement et présentés dans le tableau C1 sont reproduits.

Lignées et cultivars de riz	Sous esp. ⁽¹⁾	Parent IR64	Réaction à ⁽²⁾						Présence de <i>Pi33</i> ⁽³⁾
			PH14	PH14-D31C12	CM28	CM28-D31C12	2/0/3	2/0/3-D31C12	
<i>O. nivara</i>	-	O	S	R	S?	S?	S	R	O
IR1006-28-6-1-1	C	O*	R	R	S?	S?	S?	S?	N?
IR1704-13-3-3-2	C	O*	S	R	R?	R?	S?	R?	O
IR1704-32-3	C	O*	S?	R?	R?	R?	S?	R?	O
BPI-121-407	I	O	R?	R?	S	S	S?	S?	N
BPI76	I	O	S?	S?	S?	S?	S?	S?	N
CO18	I	O	S?	S?	S	S	S?	S?	N
DGWG	I	O	S?	S?	S	S	S?	S?	N
Geb 24	I	O	S	S	R?	R?	S	S	N
IR8	I	O	-	-	-	-	S	S	N
IR22	I	O	R	R	S	S	-	-	N
IR579-48-1-2 (Nilo 11)	I	O	R	R	S?	S?	S?	S?	N
Latisail	I	O	R?	R?	S	S	S?	S?	N
Mudgo	I	O	S?	S?	S	S	S?	S?	N
Peta	I	O	R?	R?	S	S	S?	S?	N
Sigadis	I	O	R	R	S	S	S?	S?	N
TKM6	I	O	R?	R?	S?	S?	S	S	N
IR1833-369-1-4	I	O*	R	R	S?	S?	S?	S?	N
IR24	I	O	R	R	S?	S?	S?	S?	N
IR773A-1-36-2-1	I	O	R	R	S?	S?	S?	S?	N
Gam-Pai-15	I	O	R	R	S?	S?	R?	R?	N?
IR747B2-6-3-3-1	I	O	S?	S?	R?	R?	S?	S?	N?
IR1416-131-5	I	O	R	R	R	R	MS	MS	N?
IR1614-389-1-1	I	O*	R?	R?	S?	S?	R?	S?	N?
Cina		O	S?	S?	S	S	S?	S?	N
CPSLO17		O	S	S	R	R	S?	S?	N
Seraup Besar 15		O	S	S	R?	R?	S?	S?	N
SLO17		O	S	S	R?	R?	S	S	N
Tadukan		O	S?	S?	S?	S?	S	S	N
IR64	I	-	S	R	MR	R	R	R	O
IR1529	I	N	S	R	S	R?	S	R	O
IR262-43-8-11	I	O	R	R	S?	R?	S?	R?	O
IR5657-33-2	I	O	R	R	S?	R?	S?	R?	O
IR1721-11-13-25-2-3	I	O*	S	R	R?	R?	S?	R?	O
IR1721-11-6-8-3-2	I	O*	S	R	R?	R?	S?	R?	O
IR1737-19-7-8-3	I	O*	R	R	S?	R?	S?	R?	O
TYC	I	O	S	R?	S	R?	S	R?	O?
IR95-23-1-1-3	I	O*	R	R	S?	R?	S?	R?	O?
IR1614-138-1-3	I	O*	S?	R?	S?	R?	R?	R?	O?
Nanhng Mon S4		O	S?	R	S?	R?	S?	R?	O
Azucena (4)	J	N	S	S	MR	MR	S	S	N
Maratelli (4)	J	N	S	S	S	S	S	S	N
Benong	J	O	S	S	R	R	S	S	N
Bluebonnet	J	O	S	S	S	S	S	S	N
Fortuna	J	O	S?	S?	S	S	S?	S?	N
Texas Patna	J	O	S?	S	R?	R?	R?	R?	N
Chow-Sung		O	S?	S?	S	S	S?	S?	N
Rexoro	J	O	S?	S	R?	R?	R?	S?	N

b) Utilisation des autres membres de la généalogie de IR64.

☼ *Présentation des lignées disponibles*

Les autres membres de la généalogie d'IR64 ont été utilisés pour suivre *Pi33* dans la descendance des lignées primaires résistantes, et pour la rechercher parmi les descendants des lignées primaires qui n'ont pas pu être testés.

On trouve dans cette généalogie des variétés améliorées, certaines ne possédant pas *Pi33* telles que IR24 et IR8, d'autres le possédant comme TN1. Ces cultivars ont tous été obtenus en introgressant le gène de semi-nanisme provenant de la variété Dee Geo Woo Gen (DGWG), qui totalise 25 entrées dans la généalogie de IR64 et qui est sensible.

Pour certains individus résultant directement du croisements de deux plantes appartenant à des lignées fixées ou non, il a été possible d'obtenir des lignées provenant de cycles d'autofécondations à partir de ces individus. L'interprétation des résultats concernant ces lignées permet de faire des hypothèses concernant leur caractère sensible ou résistant mais doit faire l'objet de précautions.

En effet, si des lignées descendant d'individus hybrides sont résistantes, on peut tout à fait supposer que ces individus étaient eux-mêmes résistants, puisqu'ils ont transmis *Pi33* aux lignées que nous étudions aujourd'hui. En revanche, si une lignée provenant d'une plante hybride se révèle sensible, il se peut cependant que l'hybride correspondant ait été résistant, mais hétérozygote pour *Pi33*. L'allèle sensible aurait ensuite été fixé aléatoirement.

Légende du tableau E1 :

(1) I : *indica*, J : *japonica*, C : fond génétique complexe: mélange *indica japonica*, ou mélange *O. nivara* *O. sativa*. La composante majoritaire de ce mélange correspond au plus à trois parents sur quatre.

(2) Les variétés ayant un score entre 1 et 3 sont considérées comme résistantes (R), celles ayant un score entre 4 et 6 comme sensibles (S) La présence de points d'interrogation indique soit qu'une seule répétition a été réalisée, soit que les répétitions présentent des incohérences.

(3) O : présence, N : absence. Le point d'interrogation indique un résultat ne provenant que d'une répétition avec une seule paire de souches isogéniques, ou de répétitions présentant des incohérences.

(4) Témoin sensible

O* : la lignée testée est issue par autofécondations d'un parent de IR64 qui n'était pas une lignée fixée.

Ainsi, la plante IR1614 a donné deux lignées fixées différentes, IR1614-138-1-3 et IR1614-389-1-1. Nous avons pu nous procurer des semences de ces deux lignées. L'une d'entre elles (IR1614-389-1-1) s'est révélée sensible, l'autre (IR1614-138-1-3) résistante. Un tel résultat peut s'interpréter en faisant l'hypothèse que IR1614 était hétérozygote pour *Pi33*. Etant donné le caractère dominant de ce gène (cf. chapitre « Caractérisation et cartographie d'un nouveau gène de résistance : *Pi33* » §§ I.3.a. et b., p. 111-114), IR1614 était résistante vis-à-vis de *ACE1*. Dans l'une des lignées (IR1614-138-1-3), l'allèle résistant s'est fixé, dans l'autre (IR1614-389-1-1), non. Les résultats concernant ces lignées ont permis ainsi d'établir des hypothèses sur la présence ou l'absence de *Pi33* chez des individus désormais inaccessibles.

Les résultats de ces tests sont présentés tableau E1. Leur interprétation a permis de suivre *Pi33* dans la descendance des géniteurs primaires résistants ou dont le statut est inconnu.

☼ *Nang Mon S4*

Bien que NMS4 possède clairement *Pi33*, **il semble peu probable que cette variété soit celle qui ait donné *Pi33* à IR64**. En effet, la lignée IR773A-1-36-2-1 qui se situe deux croisements en aval de NMS4 dans la généalogie de IR64 ne possède pas l'allèle résistant de *Pi33*.

☼ *Oryza nivara* IRGC101508

O. nivara IRGC101508 est présent dans deux entrées de la généalogie d'IR64. L'un des descendants de cette accession, la lignée IR2061-465-1-4, a en effet été utilisé deux fois au cours des croisements ayant abouti à IR64. Entre *O. nivara* IRGC101508 et IR2061-465-1-4, toutes les lignées testées pour la résistance (IR1704-13-3-3-2 et IR1704-32-3 pour IR1704 ; IR1721-11-13-25-2-3 et IR1721-11-6-8-3-2 pour IR1721 ; et IR1737-19-7-8-3 pour IR1737) se sont révélées porter *Pi33*. De plus, la lignée IR5657-33-2, parent direct d'IR64 et descendante de IR2061-465-1-4 après deux croisements, est elle aussi résistante. **Il est donc possible que chez IR64 *Pi33* provienne de l'accession IRGC101508 de *O. nivara*.**

☼ *Tsai Yuan Chung*

Cinq entrées de TYC dans la généalogie de IR64 peuvent être observées. TYC a été utilisée dans les croisements ayant abouti à IR1416-131-5, qui est sensible. En conséquence, *Pi33* ne peut pas provenir de IR1416-131-5.

TYC constitue aussi deux entrées dans la généalogie de la lignée IR2061-465-1-4, qui a elle-même deux entrées dans la généalogie de IR64. Pour l'une de ces entrées, TYC est un parent de la lignée IR747B-2-6-3, qui est probablement sensible. Pour l'autre, des gènes de TN1 (descendant résistant de TYC) furent introgressés dans la variété Peta (sensible)* *via* 3 backcross. Le premier backcross a donné la plante IR86. Aucune lignée issue de cette plante n'a été accessible. Le second backcross (IR86 × Peta), a donné IR95. De cette plante est issue la lignée IR95-23-1-1-3, qui est résistante (tableau E1). On peut donc supposer que la plante IR95 possédait *Pi33*. Le troisième backcross (IR95 × Peta) a donné IR262. A partir de cette plante, la lignée IR262-43-8-11 a été obtenue, puis utilisée pour obtenir la lignée IR2061-465-1-4. IR262-43-8-11 a été testée ici et s'est révélée résistante (Tableau E1). Cette lignée est l'un des parents directs de IR64. Elle a aussi été utilisée pour obtenir l'autre parent direct de IR64, la lignée IR5657-33-2, qui est, elle aussi, résistante. **On peut donc en déduire que, par ce chemin, le gène *Pi33* d'IR64 peut aussi provenir de TYC.**

☼ *Sinanpagh et Blue-Rose Supreme*

Il a été impossible de se procurer des semences, de ces deux variété et de réaliser des tests de résistance. Par l'intermédiaire de CPSLO17, ces variétés représentent 12 entrées chacune dans la généalogie de IR64. Cependant, **elles ne peuvent pas être à l'origine de *Pi33*** car elles ne participent au génome de IR64 que par l'intermédiaire de CPSLO17 qui est sensible, et qui elle-même n'est reliée à IR64 que par des chemins comportant des lignées sensibles (en particulier IR24 et IR773A-1-36-2-1).

☼ *O. nivara ID3907*

Il a été impossible de se procurer des semences et de réaliser des tests de résistance avec cette accession d'*O. nivara*. Il n'a pas non plus été possible de tester la résistance des descendants des croisements réalisés avec cette accession, à l'exception de la lignée IR5657-33-2 qui est résistante, mais qui comprend d'autres lignées résistantes dans sa généalogie, telles que *O. nivara* IRGC101508 et TYC. En conséquence **il est impossible de savoir si cette lignée est ou non résistante, et si elle est une source potentielle de *Pi33*.**

* *Peta (sensible) = Cina (sensible) × Latisail (sensible)*

Tableau E2 : Diversité moléculaire au niveau de la zone de *Pi33*

Variété	Sous esp. ⁽¹⁾	Présence de <i>Pi33</i>	RM	R	57H10r	i06L16f	i06L16r	56M07r	Y2643	C	RM	RM
			72	1813						L	483	483
Azucena	J	Non	6	2	1	-	1	1	-	1	3	4
Benong	J	Non	6	2	1	5	1	1	6	1	6	5
Bluebonnet	J	Non	6	2	1	5	1	1	6	1	6	5
Irat13	J	Non	6	2	1	5	1	1	6	1	3	3
JX17	J	Non	6	2	1	4	1	1	5	2	6	5
Maratelli	J	Non	6	2	1	5	-	1	5	2	1	6
Moroberekan	J	Non	5	2	1	5	1	1	6	1	2	3
Nipponbare	J	Non	6	2	1	4	1	1	5	2	5	6
Pai-Kan-Tao	J	Non	6	2	1	4	1	1	5	2	-	5
Rexoro	J	Non	6	2	1	4	1	1	6	1	4	4
Chow-Sung	?	Non	6	2	1	5	1	1	-	1	3	3
Cina	?	Non	2	1	2	3	1	2	2	4	4	1
CPSLO17	?	Non	2	1	2	3	1	2	2	4	4	5
Fortuna	?	Non	6	2	1	4	1	1	6	1	4	1
Seraup Besar 15	?	Non	2	1	2	3	1	2	2	4	4	5
SLO17	?	Non	2	1	-	1	-	2	2	4	4	5
Texas Patna	?	Non	6	2	1	5	1	1	6	1	4	5
C4-63	?		2	1	2	1	-	2	2	4	5	1
Century Patna 231	?		6	2	1	5	1	1	6	1	4	4
CI5173	?		6	2	1	4	1	1	6	1	-	1
Kichilli Samba	?		2	1	-	-	-	-	1	4	4	5
Sinampaga	?		6	2	1	4	1	1	6	1	?	5
Tadukan	?		2	1	2	3	1	4	4	3	4	5
BPI76	I	Non	2	1	2	3	1	2	2	4	5	1
BPI-121-407	I	Non	2	1	2	1	1	2	2	4	6	5
C101A51	I	Non	2	1	2	1	1	2	2	4	-	3
C104LAC	I	Non	1	1	1	-	1	2	2	4	5	5
CO18	I	Non	4	1	2	1	1	2	2	4	4	5
CO39	I	Non	2	1	2	1	-	2	2	4	-	3
DGWG	I	Non	2	1	2	1	1	2	2	4	4	5
Gam-Pai-15	I	Non	2	1	2	1	1	2	2	4	?	5
GEB24	I	Non	2	-	2	2	1	2	-	-	-	5
IR8	I	Non	2	1	2	1	1	2 et 3	2	4	5	5
Latisail	I	Non	1	1	2	3	1	2	2	4	-	5
Mudgo	I	Non	3	1	2	1	1	2	2	4	3	4
Peta	I	Non	1	1	1 et 2	3	1	2	2	4	6	5
Sigadis	I	Non	2	1	1	1	1	2	1	4	7	5
Tetep	I	Non	2	-	2	3	-	3	3	-	-	5
IR36	I		3	1	2	3	2	2	2	4	3	2
Bala	I	Oui	1	1	1	1	1	2	2	4	6	5
C101LAC	I	Oui	1	1	1	1	1	2	2	4	6	5
IR1529	I	Oui	2	1	1	2	1	2	1	4	5	5
IR64	I	Oui	3	1	2	3	2	2	2	4	5	5
Irat7	I	Oui	1	1	1 et 2	1	1	2	-	4	5	-
<i>O. nivara</i>												
IRGC 101508	-	Oui	3	1	2	3	2	2	2	4	3	1
TN1	I	Oui	1	1	1	1	1	2	2	4	4	5
TYC	I	Oui	1	1	1	-	-	2	-	4	4	5
ZYQ8	I	Oui	1	1	1	3	1	2	2	4	7	5

(1) I : *indica*, J : *japonica*, ? : non déterminé (d'après Glaszmann *et al.*, 1987)

c) Conclusion

Il est à noter en premier lieu qu'aucun résultat incohérent n'a été obtenu. Par exemple, aucune lignée n'ayant que des parents résistants ne s'est révélée sensible. A l'inverse, toutes les lignées résistantes se sont révélées avoir au moins un parent résistant.

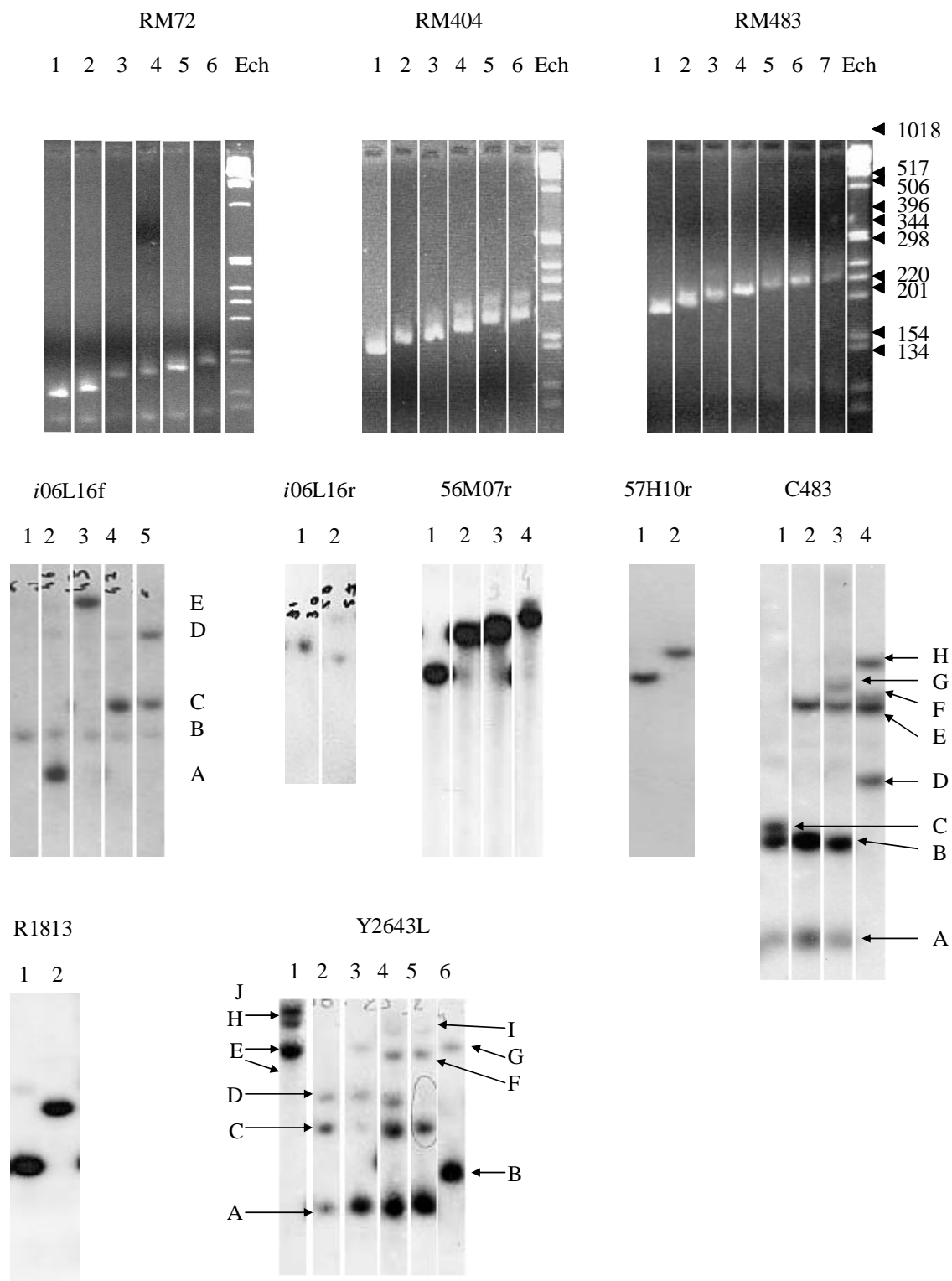
Parmi les géniteurs primaires, trois sources semblent possibles pour *Pi33* chez IR64 : TYC, *O. nivara* IRGC101508, et *O. nivara* ID3907. Pour cette dernière, aucune donnée n'est disponible. Pour les deux autres, le gène de résistance peut être suivi sur plusieurs générations.

2) Analyse de la diversité dans la zone de *Pi33* : Etude moléculaire des parents de IR64 et d'autres variétés

Dans le but d'obtenir des informations supplémentaires sur l'origine de *Pi33*, que ce soit en général ou dans la généalogie d'IR64, il a été décidé de réaliser une étude de la diversité des marqueurs moléculaires entourant le locus de ce gène. Dans le cadre de cette étude, nous avons utilisé un ensemble de variétés et de lignées différentielles sensibles ou résistantes, dont des parents de IR64. Les variétés résistantes sont : Bala, C101LAC, IR1529, Irat7, ZYQ8, ainsi que IR64, et parmi ses parents : *O. nivara* IRGC101508, TN1, TYC. Parmi les variétés sensibles, des parents d'IR64 comme IR8, Fortuna, Gam-Pai-15, d'autres variétés comme Irat13, JX17, CO39 et les lignées quasi-isogéniques C104LAC et C101A51 issues de CO39 peuvent être citées. En tout, 32 variétés sensibles furent testées (dont 22 parents de IR64, 15 lignées *indica*, 10 *japonica* et sept variétés dont la sous espèce n'est pas connue). Enfin, la présence de *Pi33* n'est pas connue dans sept variétés [l'une de ces variétés (IR36) est de la sous espèce *indica*, pour les autres, la sous espèce n'est pas connue]. Il est à noter qu'aucune variété *japonica* ne s'est révélée résistante, ni dans cet échantillon, ni au cours des autres tests de résistance réalisés au laboratoire.

L'ensemble de ces lignées (tableau E2) a été génotypé en utilisant les marqueurs suivants (du centromère vers le télomère du bras court du chromosome 8) : RM404, RM483, C483, Y2643L, 56M07f, i06L16r, i06L16f, 57H10r, R1813, RM72. Nous rappelons (cf. chapitres précédents) que les marqueurs dont le nom commence par RM sont de type SSR, tous les autres étant des marqueurs RFLP. Nous rappelons aussi que *Pi33* se trouve dans un

Figure E4 : Polymorphisme des marqueurs RFLP et SSR



espace de 1 cm, entre *i06L16r* et *57H10r*. L'ensemble de ces marqueurs couvre une zone de 10,6 cm.

a) Diversité des marqueurs SSR

Ces trois marqueurs présentent un niveau de polymorphisme comparable, avec six (RM72, RM404) ou sept allèles (RM483) identifiés dans l'échantillon étudié ici (figure E4). Le profil est le plus souvent constitué d'une seule bande, parfois d'une bande de forte intensité et d'une bande de faible intensité (RM72). Les allèles sont numérotés en fonction de la longueur de l'insert amplifié, du plus court au plus long.

Les allèles de RM72 sont très nettement séparés entre les variétés *indica* (allèles 1, 2, 3 et 4) et *japonica* (allèles 5 et 6). Pour RM483, les allèles 3 à 6 sont présents chez les *indica* et les *japonica*. On ne trouve l'allèle 7 que chez des *indica*, et les allèles 1 et 2 chez des *japonica*. Pour RM404, les allèles 1, 3, 4 et 5 peuvent être observés chez les variétés *indica* et *japonica*. Chez les *indica* comme chez les *japonica*, l'allèle 5 est le plus fréquent, mais il ne représente que 38 % des individus chez les *japonica* contre 74 % chez les *indica*. Enfin, certains allèles moins fréquents sont propres à l'une ou l'autre des sous espèces : l'allèle 2 (1 individu soit 3 %) chez les *indica*, l'allèle 6 chez les *japonica* (2 individus, soit 13 %).

b) Diversité des marqueurs RFLP

Ces sept marqueurs peuvent être divisés en deux groupes. Dans le premier (R1813, *57H10r*, *i06L16r*, *56M07r*), les marqueurs présentent une seule bande, et le polymorphisme est faible (2 à 4 profils) (figure E4). Dans le second (*i06L16f*, *Y2643L*, *C483*), le profil est plus complexe car constitué de plusieurs bandes, et son polymorphisme est plus important (4 à 8 allèles) (figure E4). La majorité de ces marqueurs permet de distinguer aisément les individus des groupes *indica* et *japonica*.

R1813 présente deux allèles. Le premier est présent chez toutes les variétés *indica* et le second chez toutes celles de type *japonica*.

57H10r présente deux allèles. Toutes les lignées *japonica* testées, ainsi que la moitié des lignées du groupe *indica* possèdent le premier allèle. Le second ne se trouve que chez des *indica*. Un troisième profil est constitué de deux bandes correspondant aux deux premiers. Il est présent dans deux lignées *indica* : *Irat7* et *Peta*. On ne peut pas exclure que ce profil soit dû à une allopollinisation, à un reste d'hétérozygotie ou à un mélange. Les deux

Tableau E3 : Fréquence des différents allèles

Allèle	RM 72					R 1813					57H10r					i06L16f					i06L16r				
	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T
1	67	14	28	-	19	100	100	100	-	65	78	11	30	100	54	50	53	52	-	34	75	100	88	100	93
2	11	76	56	-	38	-	-	-	100	35	22	89	70	-	46	13	5	7	-	5	25	-	12	-	7
3	22	5	13	-	8										38	42	41	-	27						
4	-	5	3	-	2										-	-	-	47	16						
5	-	-	-	6	2										-	-	-	53	18						
6	-	-	-	94	31																				
7																									

Allèle	56M07r					Y2643L					C 483					RM 483					RM 404				
	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T	IR	IS	IT	J	T
1	-	-	-	100	35	86	10	28	-	19	-	-	-	75	26	-	-	-	8	3	13	10	13	13	13
2	100	89	93	-	61	14	80	66	-	45	-	-	-	25	9	-	-	-	8	3	-	-	3	-	2
3	-	5	3	-	2	-	5	3	-	2	-	5	3	-	2	11	7	12	23	15	-	10	6	19	11
4	-	5	3	-	2	-	5	3	-	2	100	95	97	-	63	22	53	38	31	36	-	5	3	19	9
5						-	-	-	23	7						33	20	27	8	21	88	76	74	38	62
6						-	-	-	8	2						22	13	15	23	18	-	-	-	13	4
7						-	-	-	69	21						11	7	8	-	5					

Nombre de lignées				
IR	IS	IT	J	T
9	21	32	16	48

IR : Lignées du groupe *indica* résistantes
 IS : Lignées du groupe *indica* sensibles
 IT : Ensembles des lignées du groupe *indica*
 J : Lignées du groupe *japonica*
 T : Ensemble des lignées étudiées ici

parents de la variété Peta portent le deuxième allèle. Le profil de 57H10r chez Irat7 laisse à penser qu'un mélange a eu lieu, la bande 1 étant plus forte que la bande 2.

i06L16r révèle deux allèles. L'un, rare, se trouve dans deux lignées *indica* (IR64 et IR36) et chez *O. nivara* IRGC101508. L'autre a été trouvé dans toutes les autres lignées étudiées.

56M07r présente 4 allèles. L'allèle 1 se trouve chez tous les individus *japonica*. L'allèle 2, chez la grande majorité des individus *indica*. Un individu *indica* (Tetep) porte l'allèle 3. Tadukan, dont la sous espèce n'est pas connue, présente l'allèle 4. Enfin, IR8 présente un profil double combinant les bandes des allèles 2 et 3. Ce profil pourrait être dû à un mélange ou à une allofécondation, car les deux parents d'IR8, DGWG et Peta (*indica*) portent l'allèle 2.

L'hybridation du marqueur *i06L16f* révèle un à trois fragments selon les individus. En comparant toutes lignées testées entre elles, cinq longueurs de bandes différentes, nommées A à E, de la plus légère à la plus lourde, peuvent être observées. La bande B a été trouvée chez tous les individus. La présence ou l'absence des autres bandes permet de distinguer 5 profils (figure E4). Les profils 1, 2 et 3 ne se trouvent que chez les variétés *indica*, tandis que les deux autres profils (4 et 5) ne se trouvent que chez les *japonica*.

L'hybridation du marqueur Y2643L révèle un à cinq fragments homologues selon les individus. En comparant toutes les lignées testées entre elles, 10 longueurs de bandes différentes, nommées A à J de la plus légère à la plus lourde, furent observées (figure E4). La présence ou l'absence de ces bandes permet de distinguer 6 profils (figure E4). Les profils 1, 2 et 3 ne se trouvent que chez les variétés *indica*, tandis que les profils 5 et 6 ne se trouvent que chez les *japonica*. La sous-espèce de la seule variété (Tadukan) ayant un profil 4 n'a pas été déterminée.

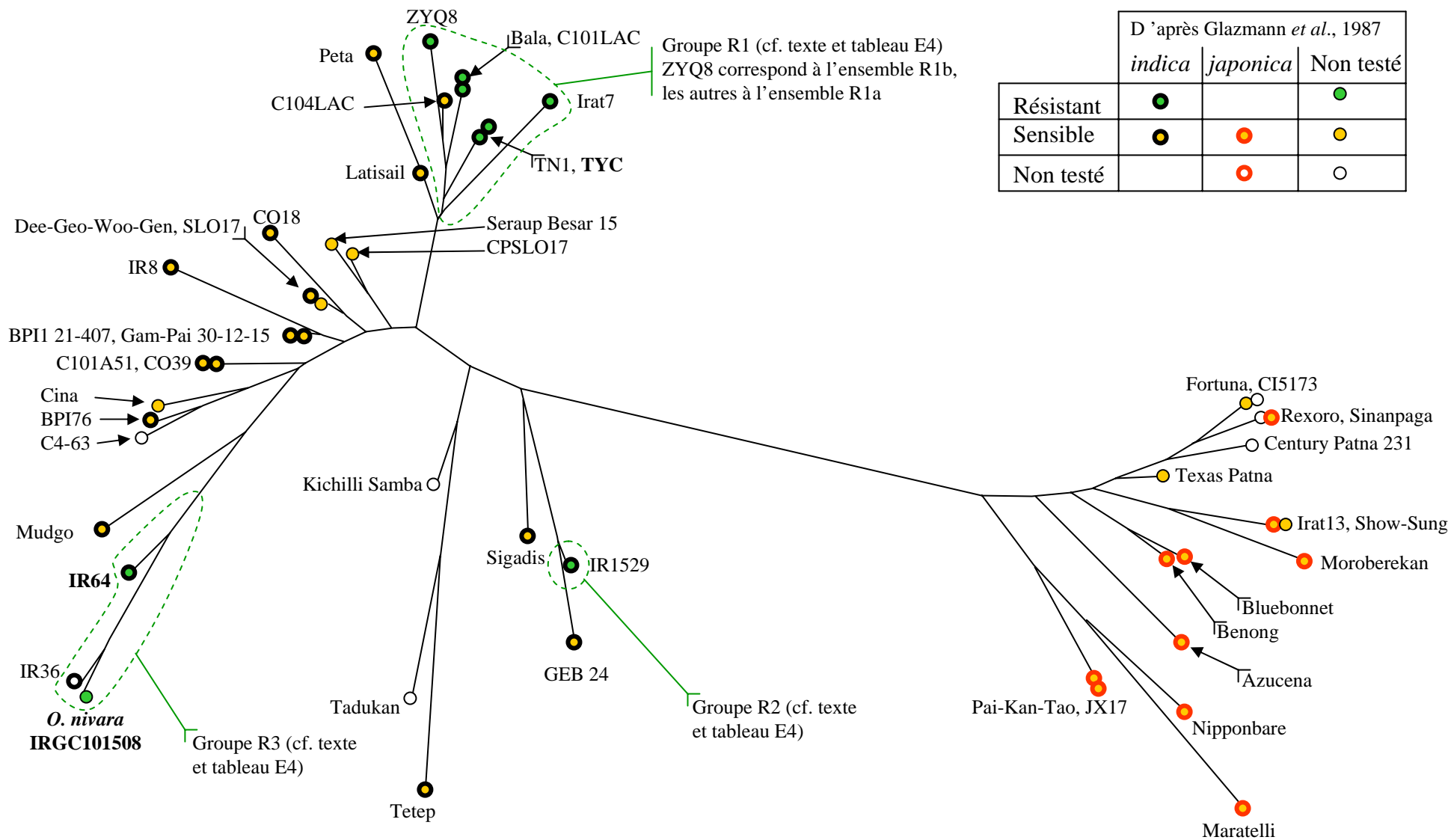
L'hybridation du marqueur C483 révèle un à quatre fragments homologues selon les individus. En comparant toutes les lignées testées, 8 longueurs de bandes différentes, nommées A à H de la plus légère à la plus lourde, ont été observées. La présence ou l'absence de ces bandes permet de distinguer 4 profils (figure E4). Les profils 1 et 2 ne se trouvent que chez les *japonica*, tandis que le profil 4 ne se trouve que dans les lignées *indica*. Tadukan, dont la sous espèce n'a pas été déterminée, est la seule variété à présenter le profil 3.

Figure E5 : Diversité moléculaire au niveau de la zone de *Pi33*

Arbre construit par Neighbor Joining, à partir des valeurs de dissimilarités calculées par l'indice « Simple Maching »

Légende:

D 'après Glazmann <i>et al.</i> , 1987			
	<i>indica</i>	<i>japonica</i>	Non testé
Résistant	●		●
Sensible	●	●	●
Non testé		○	○



Diversité au niveau du locus de *Pi33*

c) Structure de la diversité génétique du locus de *Pi33*.

L'étude des fréquences alléliques a permis de montrer que la majorité des marqueurs utilisés ici (RM72, R1813, *i06L16f*, 56M07r, Y2643L, C483, soit 6 marqueurs sur 10) permettent de distinguer les variétés *indica* des variétés *japonica* (tableau E4). Les autres présentent des allèles que l'on retrouve dans les deux sous espèces.

Afin de mieux étudier la structure de la diversité de ces marqueurs, un dendrogramme a été réalisé pour l'ensemble des variétés et de lignées étudiées ici en se basant sur les valeurs de dissimilarité calculées par l'indice de « simple matching » et en utilisant la méthode du « neighbour joining ». Une représentation de ce dendrogramme est montrée dans la figure E5. On y retrouve la division très nette entre les lignées *indica* (branche gauche) et *japonica* (branche droite). On retrouve dans chacun de ces deux groupes des lignées dont la sous-espèce n'était pas connue. Etant donné que les tests moléculaires réalisés ici ne portent pas sur tout le génome mais seulement sur une faible portion du chromosome 8, aucune hypothèse ne sera faite en ce qui concerne ces lignées, et ce d'autant plus que parmi elles se trouve une accession sauvage du riz (*O. nivara* IRGC101508). Le groupe comprenant l'ensemble des individus *japonica* sera nommé « groupe *japonica* », tandis que l'autre sera appelé « groupe *indica* ».

d) Présence de *Pi33* et diversité des marqueurs

☉ *Discrimination des lignées sensibles et des lignées résistantes.*

La totalité des variétés et des lignées possédant le gène de résistance *Pi33* pour lesquelles des données moléculaires sont disponibles se trouve dans le groupe *indica*. Pour quasiment l'ensemble des marqueurs, on peut trouver, pour chaque allèle présent dans le groupe *indica*, une lignée résistante et une lignée sensible qui le porte.

Cependant, la fréquence d'apparition des différents allèles n'est pas la même chez les lignées sensibles du groupe *indica* et chez les lignées résistantes (tableau E3). Dans un premier temps, le marqueur R1813 peut être utilisé pour éliminer toutes les lignées *japonica*. En dehors du marqueur R1813, qui ne présente aucun polymorphisme dans le groupe *indica*, les marqueurs les plus proches de *Pi33* (RM72, 57H10r et *i06L16f*) permettent de discriminer presque entièrement les lignées résistantes des lignées sensibles (tableau E4).

Ainsi, il est possible, en utilisant uniquement les marqueurs RM72 et 57H10r de séparer les lignées résistantes d'une grande partie des lignées sensibles. Parmi les 12 combinaisons

Tableau E4 : Classification des lignées résistantes et des lignées sensibles à l'aide des marqueurs RM72, 57H10r et *i*06L16f

Variété	Groupe ⁽¹⁾	Présence de <i>Pi33</i>	RM72	57H10r	<i>i</i> 06L16f	Ensembles ⁽²⁾			
						Sans <i>i</i> 06L16f	Avec <i>i</i> 06L16f		
Bala	I	Oui	1	1	1	R1	R1a		
C101LAC	I	Oui	1	1	1				
TN1	I	Oui	1	1	1				
Irat7	I	Oui	1	1?	1				
C104LAC	I	Non	1	1	-				
TYC	I	Oui	1	1	-				
ZYQ8	I	Oui	1	1	3			R1b	
Latisail	I	Non	1	2	3	S1	S1		
Peta	I	Non	1	2?	3	R2	Sa R2		
Sigadis	I	Non	2	1	1				
IR1529	I	Oui	2	1	2				
BPI-121-407	I	Non	2	2	1				
C101A51	I	Non	2	2	1	S2	S2		
CO39	I	Non	2	2	1				
DGWG	I	Non	2	2	1				
Gam-Pai-15	I	Non	2	2	1				
IR8	I	Non	2	2	1				
C4-63	I		2	2	1				
GEB24	I	Non	2	2	2				
Cina	I	Non	2	2	3				
CPSLO17	I	Non	2	2	3				
Seraup Besar 15	I	Non	2	2	3				
BPI76	I	Non	2	2	3				
Tetep	I	Non	2	2	3				
Tadukan	I		2	2	3				
SLO17	I	Non	2	-	1			?	?
Kichilli Samba	I		2	-	-			?	?
Mudgo	I	Non	3	2	1			R3	Sb R3
IR64	I	Oui	3	2	3				
<i>O. nivara</i> IRGC 101508	I	Oui	3	2	3				
IR36	I		3	2	3				
CO18	I	Non	4	2	1	S3	S3		
Moroberekan	J	Non	5	1	5	S4	S4		
JX17	J	Non	6	1	4				
Nipponbare	J	Non	6	1	4				
Pai-Kan-Tao	J	Non	6	1	4				
Rexoro	J	Non	6	1	4				
Fortuna	J	Non	6	1	4				
CI5173	J		6	1	4				
Sinampaga	J		6	1	4				
Benong	J	Non	6	1	5				
Bluebonnet	J	Non	6	1	5				
Irat13	J	Non	6	1	5				
Maratelli	J	Non	6	1	5				
Chow-Sung	J	Non	6	1	5				
Texas Patna	J	Non	6	1	5				
Century Patna 231	J		6	1	5				
Azucena	J	Non	6	1	-				

(1) Tels que définis par les marqueurs.

(2) Ensembles de lignées présentant les mêmes profils pour les marqueurs RM72 et R1813 (colonne "sans *i*06L16f") ou pour les marqueurs RM72, R1813 et *i*06L16f (colonne "avec *i*06L16f")

(ou profils multilocus) possibles (6 allèles de RM72 × 2 allèles de 57H10r) et les 8 combinaisons observées, seules 3 sont présentes chez les variété résistantes (tableau E4). Ces trois combinaisons sont présentes chez treize lignées dont les neuf lignées résistantes, trois lignées sensibles, et une lignée (IR36) qui n'a pas été caractérisée. Les cinq autres combinaisons pour lesquelles toutes les plantes testées se sont révélées sensibles sont observées chez 33 lignées dont l'ensembles des 16 lignées du groupe *japonica* et 17 lignées du groupe *indica*.

L'utilisation du marqueur *i06L16f* permet de mieux discriminer les lignées sensibles des lignées résistantes. Les deux lignées sensibles présentant le même profil multilocus pour les marqueurs RM72 et 57H10r que des lignées résistantes et caractérisés pour le marqueur *i06L16f* n'ont pas le même profil pour ce marqueur que les lignées résistantes.

☼ *Diversité des lignées résistantes*

Parmi les lignées résistantes, on observe trois profils multilocus différents pour les marqueurs RM72 et 57H10r. Nous appellerons ces trois profils, R1 (6 lignées résistantes), R2 (une lignée résistante) et R3 (deux lignées résistantes et une au statut inconnu), selon les modalités du tableau E4. De plus, le marqueur *i06L16f* présente deux profils différents chez les lignées R1, ce qui le permet distinguer deux profils multilocus que nous nommerons R1a et R1b.

TN1, Bala et Irat7 présentent le profil R1, ainsi que leur ancêtre commun TYC. On peut donc supposer que, chez ces variétés, *Pi33* provient de TYC. Cette supposition permet de penser que TYC à un profil R1a à l'instar de TN1, Bala et Irat7.

Les géniteurs primaires de IR1529 sont tous sensibles à l'exception de TYC (figure B4). Chez cette variété, TYC serait aussi l'origine de *Pi33*. Cependant, IR1529 ne présente pas le profil R1a, mais un profil R2 (figure E5 et tableau E4). Des recombinaisons survenues à proximité de *Pi33* au cours des croisements pourraient peut être expliquer cet état de fait.

TYC n'entre pas dans la généalogie de la variété chinoise ZYQ8. Ce fait pourrait valider la séparation entre ZYQ8 et les autres variétés du groupe R1, c'est à dire l'existence de deux groupes proches ayant les profils R1a et R1b. Etant donné la proximité des profils des différents marqueurs entre TYC et ZYQ8, il se pourrait cependant que ces deux variétés aient un parent inconnu commun.

IR64, IR36 et l'accession IRGC101508 d'*O. nivara* présentent un profil R3 tandis que TYC et TN1 ont un profil différent (R1). Ce fait nous amène à supposer que **chez IR64, *Pi33* provient de l'accession IRGC101508 d'*O. nivara*.** Cette supposition est renforcée par le fait que les marqueurs proches de *Pi33* sont très conservés dans le groupe R3 (tableau E2). En particulier, il faut noter qu'il se caractérise par la présence d'un allèle rare du marqueur *i06L16r*, que nous n'avons détecté que dans ces trois lignées.

II) Discussion

1) Intérêt de cette étude dans le cadre de la détection de *Pi33* et d'une stratégie de sélection assistée par marqueurs.

L'étude de la diversité des marqueurs entourant *Pi33* chez des lignées sensibles ou résistantes se base sur l'hypothèse de l'existence de déséquilibres de liaison entre marqueurs physiquement liés, comme cela a déjà été montré chez d'autres espèces végétales ayant un fort taux d'autofécondation. Ainsi, chez *Arabidopsis*, de tels déséquilibres de liaisons existent pour des distances de l'ordre du cM (Nordborg *et al.*, 2002).

Les déséquilibres de liaison entre chacun des marqueurs utilisés et *Pi33* se sont tous révélés significatifs (résultats non montrés). Cependant, aucun de ces marqueurs n'est corrélé à 100 % avec la présence du gène de résistance *Pi33*. L'utilisation des trois marqueurs RM72, 57H10r et *i06L16f* a permis de discriminer presque entièrement les lignées sensibles de lignées résistantes testées ici. Cependant, cette discrimination s'est faite *a posteriori*. De plus, une observation plus attentive des groupes R1a, R1b et R3 montre que chacun d'entre eux est constitué soit d'une seule variété (ZYQ8 dans le groupe R1b), soit d'un géniteur primaire (TYC dans le groupe R1a et *O. nivara* IRGC 101508 dans le groupe R3) et de lignées ayant ce géniteur dans leur généalogie*. Il se pourrait donc que la diversité des marqueurs RM72,

* *C101LAC* est un cas particulier, puisque cette lignée appartenant au groupe R1a ne possède pas TYC dans sa généalogie. Cependant, les deux parents de cette lignée isogénique résistante sont sensibles à des souches portant *ACE1*, ce qui pourrait laisser à penser qu'une allopollinisation a eu lieu au cours de l'élaboration de cette lignée. [cf. supra, chapitre « Caractérisation et cartographie fine d'un nouveau gène de résistance, *Pi33* », § I. 2. a., p. 109, et Berruyer *et al.* (sous presse) présenté en annexe 15]. *C101LAC* a été obtenue à l'IRRI, où de nombreux croisements ont été réalisés à partir de descendants de TYC. L'hypothèse selon laquelle le parent accidentel de *C101LAC* soit un descendant de TYC portant *Pi33* ne peut donc être totalement exclue.

57H10r et *i06L16f* chez les lignées portant *Pi33* n'a pas été totalement explorée pour l'instant. Autrement dit, les travaux réalisés ici ne permettent pas de proposer un test de détection efficace à 100 %.

Cependant, l'utilisation de ces marqueurs en combinaison peut permettre, dans un premier temps, de séparer les lignées susceptibles de porter *Pi33* de celles qui sont probablement sensibles. En effet, il est possible d'identifier sans équivoque les lignées *japonica* (toutes sensibles) avec les marqueurs R1813, RM72 et *i06L16f*. De plus, ces marqueurs permettent aussi de discriminer une grande partie des lignées *indica* sensibles qui ont été regroupées dans les ensembles S1 et S2, tableau E4.

Enfin, l'utilisation de ces marqueurs, et en particulier de RM72 qui présente l'avantage d'être simple d'emploi, pourra permettre le suivi du gène *Pi33* dans la descendance de croisements, permettant ainsi la mise en place d'une sélection assistée par marqueurs.

2) Diversité autour de *Pi33*

Trois groupes de lignées résistantes se dégagent donc : R1a qui réunit TYC et ses descendants résistants, R1b qui correspond à ZYQ8 et R3 qui réunit *O. nivara*, IR36 et IR64. Deux hypothèses pourraient expliquer cette diversité des variétés résistantes vis-à-vis de *ACE1* au locus de *Pi33* : dans une première hypothèse, plusieurs gènes de résistance vis à vis de *ACE1* seraient apparus indépendamment, tandis que dans la seconde, il n'y aurait qu'un seul gène, *Pi33*, qui serait apparu antérieurement à la séparation des groupes que l'on observe à présent.

a) Plusieurs gènes ?

Dans la première hypothèse, la résistance à *ACE1* est apparue indépendamment au moins deux fois au cours de l'évolution. Les deux groupes observés ici correspondraient donc à au moins deux gènes de résistance différents, portés l'un par TYC (groupe R1a), l'autre par *O. nivara* IRGC101508 (groupe R3). Un argument qui pourrait militer en faveur de cette hypothèse est la diversité des origines des résistances à *ACE1* : ZYQ8 est une variété chinoise, TYC provient d'une île (Taiwan), et l'accession IRGC 101508 d'*O. nivara* a été récoltée au Népal, de l'autre côté de l'Himalaya. Dans cette hypothèse, les gènes de résistance à *ACE1* étant apparus dans des fonds génétiques différents, et même dans des espèces

différentes (*O. nivara* et *O. sativa*), ils n'ont aucune raison de se trouver au même locus. Pourtant, les travaux réalisés au cours de la thèse ont permis de montrer, au contraire, que la résistance à *ACE1* se trouve au même locus dans ces groupes : la cartographie génétique réalisée sur les croisements Azucena × Bala (groupe R1a, origine TYC) et Azucena × IR64 (groupe R3, origine *O. nivara*) a donné la même position pour le locus de *Pi33* sur le chromosome 8. Enfin, le test d'allélisme réalisé sur le croisement JX17 × ZYQ8 (groupe R1b) a montré que le gène de résistance à *ACE1* se trouve aussi sur le chromosome 8 dans cette variété. Cette constance de la position de *Pi33* chez les variétés appartenant aux ensembles R1a, R1b et R3 semble invalider l'hypothèse d'une origine multiple.

b) Une origine ancienne ?

La seconde hypothèse qui pourrait être formulée serait que *Pi33* soit un gène ancestral, dont l'apparition serait antérieure à la domestication du riz. La présence de *Pi33* dans l'accession IRGC101508 de *O. nivara* apporte un argument fort en faveur de cette hypothèse.

Un autre argument provient des marqueurs moléculaires. Bien que l'utilisation de ceux-ci permette de distinguer la majorité des lignées sensibles des lignées résistantes, il est frappant de constater que certains marqueurs proches de *Pi33* ne semblent pas strictement corrélés avec la présence de ce gène. Ainsi le marqueur 57H10r présente deux allèles, l'un présent chez la majorité des *indica* résistants, mais aussi chez tous les *japonica*, qui sont tous sensibles ; tandis que l'autre allèle est absent chez les *japonica*, présent chez la majorité des *indica* sensibles, mais aussi chez certains *indica* résistants, ceux du groupe R3. Peut-être que le cas du marqueur 57H10r pourrait indiquer que l'apparition de ce gène serait antérieure à la séparation des populations ayant abouti aux sous-espèces *indica* et *japonica*.

Par la suite, cette résistance aurait disparu chez l'ensemble des ancêtres des riz *japonica* ainsi que chez une partie des ancêtres des riz *indica*. L'une des hypothèses qui pourraient être faites sur les causes de cette disparition de *Pi33* chez les lignées *japonica* pourrait être qu'une délétion est survenue au niveau de ce gène. Cela expliquerait pourquoi aucun gène impliqué potentiellement dans la résistance n'a été détecté dans la zone chez Nipponbare.

On retrouverait donc *Pi33* dans des fonds génétiques différents, qui auraient évolué postérieurement à l'apparition de ce gène. L'analyse comparée des différentes séquences de *Pi33* après son clonage chez différentes variétés sensibles ou résistantes pourra peut-être permettre d'étayer cette hypothèse, et de préciser les raisons d'une telle disparition de la

résistance : délétion du gène, mutations ponctuelles aboutissant à la formation d'un codon stop ou bien à un changement de spécificité de la protéine codée, méthylations de *Pi33* qui inhiberaient son expression dans certaines lignées sans pour autant modifier sa séquence. D'ores et déjà, l'absence de gène candidat dans la séquence de Nipponbare alors que le test de complémentation semble confirmer la présence de *Pi33* dans la zone pourrait être un argument en faveur de l'hypothèse d'une délétion de *Pi33* chez la sous espèce *japonica* du riz.

Cette hypothèse d'une origine antérieure à la domestication n'a encore été proposée pour aucun autre gène de résistance à la pyriculariose du riz. Le seul autre cas dans l'interaction riz – *Magnaporthe grisea* où l'origine du gène a été recherchée est *Pib* (Miyamoto *et al.*, 1996 ; Wang *et al.*, 1999). Les résultats semblent indiquer que *Pib* possède une origine unique parmi des variétés traditionnelles d'Indonésie et de Malaisie. De plus, les marqueurs entourant *Pib* n'ont pas montré de polymorphisme entre les différentes variétés résistantes. L'apparition de ce gène semble donc récente et probablement postérieure à la domestication du riz.

En revanche, il existe d'autres cas, et en particulier chez la tomate, où un polymorphisme entre lignées résistantes a été détecté au niveau du gène de résistance. Dans ce cas, qui correspond à un gène cloné (*Cf-9*), il a été montré qu'un gène ancestral chez une espèce sauvage de la tomate a abouti à deux allèles différents (*Cf-9* et *9DC*) (van Der Hoorn *et al.* 2001a).

☼ *Implications de cette hypothèse*

Si le gène de résistance *Pi33* a une origine ancienne et est encore présent chez un certain nombre de variétés cultivées de riz, alors les populations de *M. grisea* ont longtemps été confrontées à sa présence. Cependant, l'allèle virulent de *ACE1* n'a été trouvé que chez un petit nombre de souches de *M. grisea*, qui elles-mêmes résultent d'un petit nombre d'évènements (I. Fudal et M. H. Lebrun, communication personnelle). Le fait que la majorité des souches de *M. grisea* soient avirulentes malgré la longue période au cours de laquelle elles furent confrontées à *Pi33* pourrait indiquer que le contournement de la résistance liée à *Pi33* par *M. grisea* est un évènement rare ou contre-sélectionné.

3) Perspectives

Les résultats apportés par ces travaux méritent d'être étayés car ils présentent une certaine originalité par rapport aux autres travaux réalisés dans ce domaine sur le riz. En premier lieu, l'étude moléculaire des variétés des riz au niveau de *Pi33* doit être poursuivie, en particulier en intégrant d'autres variétés dont des variétés résistantes traditionnelles telles que Carreon. Cela permettrait de savoir si les variétés résistantes appartiennent toutes aux ensembles mis en évidence ici (R1a, R1b, R3), ou bien si d'autres environnements génétiques existent pour *Pi33*.

D'autre part, dans le cadre de l'hypothèse d'une origine ancestrale, il a été décidé de rechercher *Pi33* dans différentes accessions des espèces sauvages du genre *Oryza*, afin de confirmer la validité de cette hypothèse et d'évaluer la répartition de *Pi33* dans les populations sauvages de riz.

Après le clonage et la caractérisation de *Pi33* le polymorphisme pourra être étudié au niveau de la séquence même de *Pi33*, prioritairement chez les lignées représentatives des trois groupes mis en évidence ici.

Enfin, les marqueurs microsatellites encadrant *Pi33*, et en particulier RM72 peuvent d'ores et déjà être utilisés dans un programme de sélection assistée par marqueurs. Des marqueurs plus proches pourront être recherchés à partir des données de séquence disponibles.

*

*

*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de ces travaux, nous avons eu comme objectif de caractériser et de cloner un gène de résistance du riz correspondant au gène d'avirulence *ACE1* de *Magnaporthe grisea*. En effet, l'étude de l'interaction entre les facteurs de résistance et les facteurs d'avirulence est limitée par le faible nombre de couples gène de résistance – gène d'avirulence caractérisés à ce jour. De plus, le gène d'avirulence *ACE1* ne présente pas les caractéristiques habituelles des gènes d'avirulence fongiques. Il code pour une protéine de grande taille ayant une activité enzymatique liée au métabolisme secondaire. Cette caractéristique particulière d'*ACE1* renforce l'intérêt que représente le clonage du gène de résistance correspondant.

D'un point de vue appliqué, l'allèle avirulent d'*ACE1* est porté par la majorité des souches de *M. grisea* testées à ce jour. Les souches virulentes appartiennent à un groupe génétique particulier et seraient issues d'un petit nombre de mutations (Isabelle Fudal, communication personnelle). Parmi les nombreuses souches testées dans différents laboratoires de par le monde, aucune souche ne s'est révélée virulente à la fois vis-à-vis de *Pi1*, *Pi2* et *Pi33* (Didier Tharreau, communication personnelle). En conséquence, il est possible que l'association de ces trois gènes de résistance dans un seul génotype puisse être utilisée dans une stratégie de gestion durable de la résistance à la pyriculariose.

I) Cartographie génétique et diversité

Au cours de cette thèse, nous avons caractérisé le gène de résistance *Pi33* correspondant au gène d'avirulence *ACE1*. Il s'agit d'un gène de résistance unique et dominant porté par le bras court du chromosome 8, différent des gènes *Pi29(t)* et *Pi11* déjà décrits sur ce chromosome.

Ce gène est présent dans de nombreuses variétés traditionnelles et améliorées du riz et, en particulier, dans différents environnements génétiques. Ce résultat nous a amenés à faire l'hypothèse que ce gène a une origine ancienne, peut-être antérieure à la domestication du riz. Cette hypothèse semble renforcée par le fait que *Pi33* ait été trouvé dans une accession d'un parent sauvage du riz cultivé, *Oryza nivara*. Les variétés sensibles auraient perdu ce gène tardivement, peut être à la suite d'une délétion, en particulier chez les variétés *japonica*, ou

Conclusion

bien auraient vu son expression inhibée par d'autres facteurs génétiques, comme nous pouvons le supposer pour certaines lignées du croisement IR64 × Azucena.

Les travaux réalisés pour étudier la diversité au niveau de la zone de *Pi33* ainsi que l'origine de ce gène de résistance ont apportés des résultats qui méritent cependant d'être approfondis. En particulier, nous considérons qu'un plus grand nombre de répétitions des tests de résistance est nécessaire pour certaines variétés. Ces expérimentations supplémentaires sont actuellement en cours. De plus, l'hypothèse selon laquelle le gène de résistance *Pi33* a une origine antérieure à la domestication sera testée en recherchant *Pi33* dans diverses accessions d'*O. rufipogon* et *O. nivara*, espèces sauvages proches du riz cultivé, et en étudiant leur diversité moléculaire autour de *Pi33*.

Le gène *Pi33* a été cartographié finement dans un espace de 1,0 cM entre les marqueurs d'extrémité de BAC 57H10r et i06L16r des banques OSJNBa (Nipponbare) et OSIIBb (IR64) respectivement. Cette cartographie génétique fine a été utile pour la réalisation de la cartographie physique, mais pourrait aussi servir pour la sélection assistée par marqueurs. Dans ce cadre, il est possible d'utiliser les séquences des variétés Nipponbare et 93-11 actuellement disponibles. En particulier, la présence de séquences microsatellites devrait faciliter l'identification de marqueurs permettant d'affiner encore la carte génétique de cette région du bras court du chromosome 8. Le fort polymorphisme observé dans cette région entre *indica* et *japonica*, mais aussi parmi les variétés *indica*, devrait rendre possible leur cartographie et l'étude de leur diversité. De plus, ces marqueurs sont plus simples d'emploi que les marqueurs RFLP, et permettront donc au sélectionneur de réaliser un suivi précis et aisé du gène *Pi33*, dans le cadre de ses plans de croisements. Ce travail a été initié dans le cadre d'un projet d'introgession des gènes *Pi1*, *Pi2* et *Pi33* dans des variétés élite. Dans ce cadre, les marqueurs 57H10r et i06L16r pourraient aussi être convertis en marqueurs PCR-RFLP.

Au cours des travaux de cartographie, il est apparu que, dans certaines lignées, le gène *Pi33* était présent mais ne s'exprimait pas. Les causes de cette inhibition n'ont pas pu être clairement établies, mais elles semblent génétiques. Afin de mieux les étudier, et même peut être de cartographier génétiquement ces facteurs d'inhibition, il pourrait être envisagé de réaliser un croisement entre une lignée résistante et l'une de ces lignées qui se sont révélées sensibles alors qu'elles présentent les profils du parents résistant pour les marqueurs

encadrant *Pi33*. Au cours de cette thèse, de telles lignées ont en effet été multipliées et leurs semences sont disponibles.

II) Cartographie physique et clonage

La cartographie physique comparée de la région de *Pi33* entre les variétés Nipponbare et IR64 a montré que *Pi33* se trouve dans une zone synthénique entre les deux sous-espèces du riz. En effet, l'ordre des marqueurs semble conservé entre les variétés Nipponbare (*japonica*) et IR64 (*indica*). Cependant, l'étude comparée des séquences des variétés Nipponbare (*japonica*) et de 93-11 (*indica*) au niveau de ce gène a montré que des évènements de remaniement du génome ont eu lieu dans cette région.

Des tests de complémentation semblent indiquer que *Pi33* est présent dans l'un des clones BAC de la carte physique de *Pi33* dans IR64. La présence d'individus classés comme résistants chez les témoins non transformés doit cependant relativiser ce résultat qui, bien que significatif, n'est que statistique. De plus, aucune séquence homologue à des gènes de résistance précédemment décrits n'a été trouvée dans cette zone chez la variété Nipponbare (sensible), et des expérimentations par PCR semblent indiquer qu'aucune séquence homologue à *Pto* ni aux gènes de type NBS-LRR n'est présente au niveau du locus de *Pi33* chez la variété IR64 (résistante).

Bien que, sous certains aspects, le test de complémentation réalisé puisse être considéré comme un clonage, il n'a pas été possible de caractériser moléculairement *Pi33*. En particulier, l'absence de séquence homologue à des gènes de résistance déjà connus ne nous permet pas de désigner un gène candidat avec certitude.

Le caractère fragmentaire des données de séquence « whole shotgun » de la variété *indica* 93-11 ne permet pas, de façon sûre, d'identifier la séquence *indica* de la région de *Pi33*. En effet, l'existence d'évènements d'insertion – délétion ne peut être exclue. Du fait de la faible longueur de contigs de séquence de 93-11, seules les séquences de 93-11 homologues à la séquence de Nipponbare sont accessibles. Une portion de séquence présente chez 93-11 et absente chez Nipponbare au niveau de *Pi33* ne pourrait pas être détectée. De plus, la présence de *Pi33* dans 93-11 n'est pas connue. En conséquence, il a été décidé de faire réaliser le séquençage du clone 39D23 de la banque OSIIBb de la variété résistante IR64. D'après les tests de complémentation réalisés, ce clone est celui qui a la plus grande probabilité de contenir le gène *Pi33*.

Conclusion

☼ *Poursuite du clonage de Pi33*

Les plantes T₀ obtenues à la suite du test de complémentation sont actuellement en cours de multiplication. Les descendants de ces individus (plantes T₁) seront testés pour la résistance vis-à-vis des souches PH14 et PH14-D31C12. Des résultats plus probants qu'en T₀ sont attendus. En effet, les plantes T₁ étant issues de semis, et non de culture *in vitro* l'expression de la résistance sera conforme aux conditions habituelles des tests. De plus, une plus grande quantité de matériel végétal sera disponible. Enfin, si des « résistances non spécifiques » comparables à celles observées en T₀ apparaissent, elles pourront être distinguées des résistances spécifiques liées à l'insertion de *Pi33* par l'observation du caractère différentiel de la réaction des lignées aux souches PH14 (virulente) et PH14-D31C12 (avirulente).

Un vecteur TAC vient d'être obtenu au laboratoire. Ce vecteur peut permettre de transformer *Agrobacterium tumefaciens* avec un large insert de type BAC, puis de transformer une plante avec cet insert. Si les plantes T₁ du test de complémentation actuellement en cours ne permettent pas d'obtenir un résultat satisfaisant, ce vecteur pourra être utilisé pour réaliser un nouveau test de complémentation. En effet, la transformation par *Agrobacterium* permet d'obtenir un grand nombre de lignées transformées différentes ayant un nombre faible de copies, ce qui limite les problèmes de silencing (J.-C. Breitler, communication personnelle).

Par la suite, si la présence de *Pi33* dans le BAC OSIIBb 39D23 de la banque OSIIBb d'IR64 est confirmée, un nouveau test de complémentation sera réalisé en utilisant des sous-clones de ce BAC. Cette nouvelle complémentation, combinée avec le séquençage de OSIIBb 39D23 doit aboutir à la caractérisation moléculaire du gène de résistance *Pi33*.

☼ *Après le clonage*

Une telle caractérisation moléculaire permettra de répondre à un grand nombre de questions posées au cours de ces travaux, et en particulier :

- (i) Quelle est la nature de *Pi33* ? S'agit-il d'un nouveau type de gène de résistance ?
- (ii) Quelle est l'origine de *Pi33* ? En particulier, existe-t-il des allèles de ce gène issus de l'évolution de cette région du génome ? En effet, si l'on observe une grande diversité des marqueurs moléculaires proches de ce gène, il se pourrait qu'une telle diversité existe aussi au niveau de la séquence exprimée de *Pi33* comme cela existe par exemple pour le gène *Cf9* de la tomate, au niveau duquel deux allèles conférant une résistance spécifique à *Avr9* de *C. fulvum* ont été observés. A l'instar des marqueurs proches de *Pi33*, l'ancêtre de ce gène a pu

Conclusion

accumuler des mutations qui, selon les cas, soit sont silencieuses, soit modulent la résistance vis-à-vis de *ACE1*.

Lorsqu'elle sera connue, la nature de *Pi33* influera grandement le cours des recherches. Cependant, il sera intéressant, dans tous les cas, d'étudier les pistes suivantes :

Pi33 est-il exprimé constitutivement, à l'instar de nombreux gènes de résistances (Hulbert et al., 2001) ou bien est-il induit par l'attaque de l'agent pathogène, ou par d'autres types de stress, à l'instar de gènes comme *Xa1* (Yoshimura *et al.*, 1998) ?

Quel est le rôle de *Pi33* vis-à-vis du facteur d'avirulence lié à *ACE1* ? Il a été montré au sein de l'équipe de M.-H. Lebrun, et en particulier par H. Böhnert et I. Fudal que ce gène code pour une protéine de grande taille, non sécrétée par le champignon, et donc incapable d'interagir directement avec le facteur de résistance correspondant. De plus, cette protéine est une polykétide synthétase, comportant aussi des domaines de peptide synthétase non ribosomique. Une telle activité enzymatique, liée au métabolisme secondaire, pourrait amener à la synthèse d'une toxine, ou, tout au moins, d'un composé de faible poids moléculaire qui serait reconnu, directement ou indirectement, voire détoxifié par *Pi33*.

Directement ou indirectement, justement ? Actuellement, deux théories ont été émises concernant le rôle des protéines de résistance*. Dans l'une d'entre elles, que nous avons nommée « théorie du récepteur » (Staskawicz *et al.*, 1995), la protéine de résistance reconnaît directement le facteur d'avirulence. Dans l'autre, que nous avons appelée « théorie du protecteur » (Dangl & Jones, 2001), la protéine de résistance reconnaît des modifications de conformation de protéines liées à l'action du facteur d'avirulence. Enfin, il ne faut pas négliger un éventuel rôle de détoxification de la protéine *Pi33*, à l'instar de la protéine codée par le gène de résistance *Hm1* du maïs (Johal & Briggs, 1992).

Ce qui est en revanche certain, c'est que l'étude de ce gène mérite encore de nombreux efforts, car il se peut qu'elle amène des résultats scientifiques nouveaux, mais aussi qu'elle aboutisse à l'obtention d'une résistance forte et durable à la pyriculariose.

* Ces deux théories sont abordées plus en détail dans l'introduction générale, §§ II.4.6 et c, pp 55-60

BIBLIOGRAPHIE

1. Abe, T. & Futsuhara, Y. (1986) Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet* **121**, 111-118.
2. Ahn, S. N., Kim, Y. K., Han, S. S., Choi, H. C., Moon, H. P. & McCouch, S. R. (1996) Molecular mapping of a gene for resistance to a Korean isolate of rice blast. *Rice Genet Newsl* **13**, 74-76.
3. Ahn, S. N., Kim, Y. K. & Han, S. S., (1997) Molecular mapping of a gene for resistance to Korean isolates of rice blast. *in* Armonizing agricultural productivity and conservation of biodiversity: Breeding and ecology. Proceedings of the 8th SABRAO congress and annual meeting of Korean breeding society. pp. 345-436.
4. Allard, R. W. (1975) The mating system and microevolution. *Genetics* **79**, 115-26.
5. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D. J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
6. Anderson, P. A., Lawrence, G. J., Morrish, B. C., Ayliffe, M. A., Finnegan, E. J. & Ellis, J. G. (1997) Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region. *Plant Cell* **9**, 641-651.
7. Arumuganathan, K. & Earle, E. D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant mol Biol Rep* **9**, 208-218.
8. Bai J., Choi S. H., Ponciano, G., Leung, H. & Leach. J. E. (2000) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* avirulence genes contribute differently and specifically to pathogen aggressiveness. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1322-1329.
9. Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S. P. (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**, 726-733.

10. Balzergue, S., Dubreucq, B., Chauvin, S., le Clainche, I., le Boulaire, F., de Rose, R., Sazmson, F., Biaudet, V., Lacharny, A., Cruaud, C., Weissenbach, J., Caboche, M. & Lepiniec, L. (2001) Improved PCR walking for large-scale isolation of plant tDNA Borders. *BioTechniques* **30**, 496-504.
11. Barret, G. C. (1985) Chemistry and biochemistry of the amino-acids. Chapman and Hall, U.K.
12. Bastiaans, L. (1991) Quantifying the effect of rice leaf blast on leaf photosynthesis, crop growth, and final yield using an ecophysiological model of crop growth. *in* Rice blast modelling and forecasting. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp 89-99.
13. Bendahmane, A., Kanyuka, K. & Baulcombe, D. C. (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* **11**, 781-792.
14. Bendahmane, A., Kohn, B. A., Dedi, C. & Baulcombe, D. C. (1995) The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of *Rx1*-mediated virus resistance in potato. *Plant J* **8**, 933-941.
15. Benett, M. B., & Smith, J. B. (1976) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil Trans Royal Soc London* **B 274**, 227-274.
16. Benett, M. B., & Smith, J. B. (1991) Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phil Trans Royal Soc London* **B 334**, 309-345.
17. Bent, A. F., Kunkel, B. N., Dahlbeck, D., Brown, K. L., Schmidt, R., *et al.* (1994) *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* **265**, 1856-1860.
18. Berruyer, R., Adreit, H., Milazzo, J., Gaillard, S., Berger, A., Dioh, W., Lebrun, M. H. & Tharreau, D. (2003) Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*. *Theor Appl Gen* (sous presse).

19. Biffen, R. H. (1905) Mendel's laws of inheritance and wheat breeding. *J Agric Sci* **1**, 4-48.
20. Birren, B., Fink, G. & Lander, E. (2002) Fungal Genome Initiative. White paper developed by the Fungal Research Community. February 8, 2002. Center for Genome Research, 320 Charles Street, Cambridge, MA 02141 USA. 26 pp. http://www-genome.wi.mit.edu/seq/fgi/FGI_whitepaper_Feb8.pdf.
21. Bittner-Eddy, P. D., Crute, I. R., Holub, E. B. & Beynon, J. L. (2000) *RPP13* is a simple locus in *Arabidopsis thaliana* for alleles that specify downy mildew resistance to different avirulence determinants in *Peronospora parasitica*. *Plant J* **21**, 177-188.
22. Blatt, M. R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosak, K. & Jones, J. D. G. (1999) K⁺ channels of *Cf-9* transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J* **19**, 453-462.
23. Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B. & Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1474.
24. Bolwell, G. P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 287-294.
25. Böhnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. L. & Lebrun, M. H. (2000) Identification of the avirulence gene *Avr-irat7* of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. in 4th International Rice Genetics Symposium (Abstract). International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines.
26. Böhnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. L. & Lebrun, M. H. (2001) A fungal polyketide synthase is controlling recognition of avirulent *Magnaporthe grisea* by resistant rice. in 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 10-14th July, 2001. Madison, Wisconsin, USA. p 122 (résumé). Adresse: <http://www.Plantpath.wisc.edu/mpmi/>.

27. Böhnert, H. U., Fudal, I., Berruyer, R., Tharreau, D., Notteghem, J. L. & Lebrun, M. H. (2002) Role of the developmentally regulated polyketide synthase *ACE1* in specific recognition of avirulent *M. grisea* isolates by resistant rice plants and its evolution in natural populations. in 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants, p. 7 (résumé).
28. Bonman, J. M., Vergel de Dios, T. J. & Khin, M. M. (1986) Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. *Plant dis* **70**, 767-769.
29. Bourret, T. M. & Howard, R. J. (1990) *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can J Bot*, **68**, 329.
30. Botella, M. A., Coleman, M. J., Hughes, D. E., Nishimura, M. T., Jones, J. D. & Somerville, S. C. (1997) Map positions of 47 *Arabidopsis* sequences with sequence similarity to disease resistance genes. *Plant J* **12**, 1197-1211.
31. Botella, M. A., Parker, J. E., Frost, L.N., Bittner-Eddy, P. D., Beynon, J. L., *et al.* (1998) Three genes of the *Arabidopsis RPP1* complex resistance locus recognize distinct *Peronospora parasitica* avirulence determinants. *Plant Cell* **10**, 1847-1860.
32. Boyes, D. C., Nam, J. & Dangl, J. F. (1998) The *Arabidopsis thaliana RPM1* disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15849-15854.
33. Brading, P. A. Z., Hammond-Kosack, K. E., Parr, A. & Jones, H. D. (2000) Salicylic acid is not required for *Cf-2*- and *Cf-9*- dependent resistance of tomato to *Cladosporium fulvum*. *Plant J* **23**, 305-318.
34. Brar, D. S. & Kush, G. S. (1997) Alien introgression in rice. *Plant Mol Biol* **35**, 35-47.
35. Brito, B., Aldon, D., Barberis, P., Boucher, C. & Genin, S. (2002) A signal transfer system through three compartments transduces the plant cell contact-dependent signal controlling *Ralstonia solanacearum hrp* genes. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 109-119.

36. Brommonschenkel, S. H., Frary, A. & Tanksley, S. D. (2000) The broad-spectrum tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene *Mi*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1130-1138.
37. Bryan, G. T., Wu, K. S., Farrall, L., Jia, Y., Hershey, H. P., McAdams, S. A., Faulk, K. N., Donaldson, G. K., Tarchini, R. & Valent, B. (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast gene *Pi-ta*. *Plant Cell* **12**, 2033-2045.
38. Burr, B. (2002) Mapping and sequencing the rice genome. *Plant Cell* **14**, 521-523.
39. Buschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F. & Schulze-Lefert, P. (1997) The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**, 695-705.
40. Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H. J., Sandal, N. N., *et al.* (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science* **275**, 832-834.
41. Caicedo, A. L., Schaal, B. A. & Kunkel, B. N. (1999) Diversity and molecular evolution of the *RPS2* resistance gene in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 302-306.
42. Castano, J., McKenzie, D. R. & Nelson, R. R. (1989) Component analysis of race non specific resistance to blast disease of rice caused by *Pyricularia oryzae*. *J phytopathol* **127**, 89.
43. Causse, M. A., Fulton, T. M., Cho, Y. G., Ahn, S. N., Chunwongse, J., Wu, K., Xiao, J., Yu, Z., Ronald, P. C., Harrington, S. E., Segond, G., McCouch, S. R. & Tanksley, S. D. (1994) Saturated Molecular map of the rice genome based on interspecific backcross population. *Genetics* **138**, 1251-1274.
44. Chair, H. (1995) Transformation génétique de protoplastes haploïdes des variétés méditerranéennes de riz (*Oryza sativa* L.). Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier. 81 pp.

45. Chang, J. H., Rathjen, J. P., Bernal, A. J., Staskawicz, B. J. & Michelmore, R. W. (2000) *avrPto* enhances growth and necrosis caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in tomato lines lacking either *Pto* or *Prf*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 568-571.
46. Chaudhary, D. & Rao, M. J. B. K. (1982) Breeding rice varieties for dry and drought-prone areas of India. in Drought resistance in crops with emphasis on rice. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp 265-272.
47. Chauhan, R. S., Farman, M., Hirt, J., Ronald, P., Zhang, H. & Leong, S. (2000) Molecular genetic analysis of blast resistance locus in rice line CO39 corresponding to avirulence locus *AVRI-CO39* of *Magnaporthe grisea*. in 4th International Rice Genetics Symposium International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. p. 119 (Abstract).
48. Chauhan, R. S., Farman, M. L., Zhang, H. B. & Leong, S. A. (2002) Genetic and physical mapping of a rice blast resistance locus, *Pi-CO39(t)*, that corresponds to the avirulence gene *AVRI-CO39* of *Magnaporthe grisea*. *Mol Genet Genomics* **267**, 603-612.
49. Chen, D. H., de la Vina, M., Inukai, T., Mackill, D. J., Ronald, P. C. & Nelson, R.J. (1999) Molecular mapping of the blast resistance gene *Pi44(t)*, in a line derived from a durably resistant rice cultivar. *Theor Appl Genet* **98**, 1046-1053.
50. Chen, X., Presting, G., Barbazuk, W. B., Goi-Coechea, J. L., Blackmon, B., Fang, G., Kim, H., Frish, D., Yu, Y., Sun, S., Higingbottom, S., Phimphilai, J., Phimphilai, D., Thurmond, S., Gaudette, B., Li, P., Liu, J., Hatfield, J., Main, D., Farrar, K., Henderson, C., Barnett, L., Costa, R., Williams, B., Walsr, S., Atkins, M., Hall, C., Budiman, M. A., Tompkins, J. P., Luo, M., Bancroft, I., Salse, J., Regad, F., Mohapatra, T., Nagendra, K., Tyagi, A. K., Soderlund, C., Dean, R. A. & Wing, R. D. (2002) An integrated physical and genetic map of the rice genome. *Plant Cell* **14**, 537-545.
51. Chen, X., Temnykh, S., Xu, Y., Cho, Y. G. & McCouch, S. R. (1997) Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **94**, 553-567.

52. Chen, Z., Kloek, A. P., Bosh, J., Katagiri, F. & Kunkel, B. N. (2000) The *Pseudomonas syringae* *AvrRpt2* gene product promotes pathogen virulence from inside plant cells. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1312-1321.
53. Cho, Y. G., Ishii, T., Temnykh, S., Chen, X., Lipovich, L., McCouch, S. R., Park, W. D., Ayres, N. & Carinhour, S. (2000) Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.) *Theor Appl Genet* **100**, 713-722.
54. Collins, N. C., Webb, C. A., Seah, S., Ellis, J. G., Hulbert, S. H. & Pryor, A. (1998) The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 242-252.
55. Conquist, A. (1988) The evolution and classification of flowering plants. The New York Botanical Garden Editions, Second Edition. 555 pp. ISBN 0-89327-332-5.
56. Cooley, M. B., Pathirana, S., Wu, H. J., Kachroo, P. & Klessing, D. F. (2000) Members of the *Arabidopsis* *HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell* **12**, 663-676.
57. Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
58. Dangl, J. L., Ritter, C., Gibbon, M. J., Mur, L. A. J., Wood, J. R., Goss, S., Mansfield, J., Taylor, J. D., & Vivian, A. (1992) Functional homologs of the *Arabidopsis* *RPM1* disease resistance gene in bean and pea. *Plant Cell* **4**, 1359-1369.
59. Day, P. R. (1974) Genetics of host-parasite interaction. Freeman, W. H. (ed.) San Fransisco, USA, 238 pp.
60. de Feyter, R., Yang, Y. & Gabriel, D. W. (1993) Gene – for – gene interactions between cotton *R* genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* *avr* genes. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 225-237.

61. de Wit, P. J. G. M. (1992) Molecular characterization of gene – for – gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **30**, 391-418.
62. Devic, M., Albert, S., Delseny, M. & Roscoe, T. J. (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol Biochem* **35**, 331-339.
63. Dioh, W. (1998) Clonage positionnel de gènes d'avirulence chez le champignon pathogène du riz *Magnaporthe grisea*. Thèse de Docteur ès Sciences. Université Paris-Sud, Orsay, France. 149 pp.
64. Dixon, D. R., Dixon, L. R. J., Pascoe, P. L. & Wilson, J. T. (2001) Chromosomal and nuclear characteristics of deep-sea hydrothermal-vent organisms: correlates of increased growth rate. *Marine Biol* **139**, 251-255.
65. Dixon, M. S., Jones, D. A., Keddie, J. S., Thomas, C. M., Harrison, K. & Jones, J. D. G. (1996) The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* **84**, 451-459.
66. Dixon, M. S., Hatzixanthis, K., Jones, D. A., Harrison, K. & Jones, J. D. G. (1998) The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* **10**, 1915-1925.
67. Dodds, P. N., Lawrence, G. J. & Ellis, J. G. (2000) Six amino acid changes confined to the Leucine-Rich Repeat B-strand/B-turn motif determine the difference between the *P* and *P2* rust resistance specificities in flax. *Plant Cell* **13**, 163-178.
68. Dong, F., Miller, J. T., Jackson, S. A., Wang, G. L., Ronald, P. C. & Jiang, J. (1998) Rice (*Oryza sativa*) centromeric regions consist of complex DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8135-8140.
69. Ellis, J. G., Lawrence, G. J., Luck, J. E. & Dodds, P. N. (1999) Identification of regions in alleles of the flax rust resistance gene *L* that determine differences in gene – for – gene specificity. *Plant Cell* **11**, 495-506.

70. Ellis, J., Dodds, P. & Pryor, T. (2000) Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 278-284.
71. Ezuka, A. (1979) Breeding for and genetics of blast resistance in Japan. *in* Rice blast workshop. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. pp. 27-48.
72. Farman, M. L. & Leong, S. A. (1998) Chromosome walking to the *AVRI-CO39* avirulence gene of *Magnaporthe grisea*: discrepancy between the physical and genetic maps. *Genetics* **150**, 1049-1058.
73. Farrer, W. (1898) The making and improvement of wheats for australian conditions. *Agric Gaz NSW* **9**, 131-168.
74. Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. & Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**, 265-276.
75. Feng, Q., Zhang, Y., Hao, P., Wang, S., Gang, F., Huang, Y., Li, Y., Zhu, G., Liu, Y., Hu, X., Jia, P., Zhang, Y., Zhao, Q., Ying, K., Yu, S., Tang, Y., Weng, Q., Zhang, L., Lu, Y., Mu, J., Lu, Y., Zhang, L. S., Yu, Z., Fan, D., Liu, X., Lu, T., Li, C., Wu, Y., Sun, T., Lei, H., Li, T., Hu, H., Guan, J., Wu, M., Zhang, R., Zhou, B., Chen, Z., Chen L., Jin, Z., Wang, R., Yin, H., Cai, Z., Ren, S., Lu, G., Gu, W., Zhu, G., Tu, Y., Jia, J., Zhang, Y., Chen, J., Kang, H., Chen, X., Chao, C., Sun, Y., Hu, Q., Zhang, X., Zhang, W., Wang, L., Ding, C., Shang, H., Gu, J., Chen, S., Ni, L., Zhu, F., Chen, W., Lan, L., Lai, Y., Cheng, Z., Gu, M., Jiang, J., Li, J., Hing, G., Xue, Y. & Han, B. (2002) Sequence and analysis of rice chromosome 4. *Nature* **420**, 316-320.
76. Fillingham, A. J., Wood, J., Beven, J. R., Crute, I. R., Mansfield, J. W., *et al.* (1992) Avirulence genes from *Pseudomonas syringae* pathovars *phaseolicola* and *pisi* confer specificity towards both host and non-host species. *Physiol Mol Plant Pathol* **40**, 1-10.
77. Flor, H. H. (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* **28**, 365-391.
78. Flor, H. H. (1971) Current status of the gene – for – gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**, 275-296.

79. Flor, H. H. (1956) The complementary genic system in flax rust. *Adv genet* **8**, 29-54.
80. Fudal, I., Böhnert, H. U. & Lebrun, M. H. (2002) Expression of the avirulence gene *ACE1* of *Magnaporthe grisea* is under development control. in 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants. p. 9 (résumé).
81. Fujii, K., Hayano-Saito, Y., Shumiya, A. & Inoue, M. (1995) General mapping based on the RFLP analysis for the panicle blast resistance derived from a rice parental line St.No.1. *Breed Sci***45** (supplement 1), 209. [en japonais]
82. Fujii, K., Hayano-Saito, Y., Shumiya, A., Izawa, T. & Iwazaki, M. (1997a) Inheritance of *Pb-st(t)*, a panicle blast resistance gene and detection of RFLP markers with link to *Pb-st(t)*. *Breed Sci***47** (supplement 1), 38. [en japonais]
83. Fujii, K., Hayano-Saito, Y., Shugiura, N., Kato, T., Izawa, T., Inoue, M. & Iwazaki, M. (1997b) Relationship between the difference in panicle blast resistance among line groups of 'Aichi 21', a rice stripe resistant line and their graphical genotypes on short arm part of chromosome 11. *Breed Sci***47** (supplement 2), 130. [en japonais]
84. Fujii, K., Shumiya, A., Shugiura, N., Izawa, T., Inoue, M. & Ito, T. (1998) Characteristics and durability of panicle blast resistance *Pb-st(t)*, originated from a rice parental line St.No.1. *Breed Sci***45** (supplement 1), 209. [en japonais]
85. Fukushi, A., Suzuki, Y., Hiroshika, H. & Kikushi, F. (1992) Linkage relations between the photoperiod sensitivity gene *Se-1* and two other genes, *Pi-z¹* and *Pgi-2*. *Rice Gen Newsl* **9**, 47-50.
86. Gabriel, D. W. (1999) Why do pathogens carry avirulence genes? *Physiol Mol Plant Pathol* **55**, 205-214.
87. Gabriel, D. W. & de Feyter, R. (1992) RFLP analyses and gene tagging for bacterial identification and taxonomy. in Gurr, S. J., McPherson, M. J. & Dowles, D., J. (ed.) *Molecular plant pathology*, Vol. 1, A practical approach. IRL Press, Oxford, 5166.
88. Galan, J. E. & Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.

89. Gassmann, W., Hinsh, M. E. & Staskawicz, B. J. (1999) The *Arabidopsis RPS4* bacterial resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *The Plant J* **20**, 265-277.
90. Ge, S., Sang, T., Lu, B. R. & Hong, D. Y. (2001) Phyllogeny of the genus *Oryza* as revealed by molecular approaches. in G. S. Kush, D.S. Brar & B. Hardy. Rice genetics IV. Proceedings of the fourth international rice genetics symposium, 22-27 oct 2000. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. pp. 89-106.
91. Giufu, L., Guodong, L., Shaohong, Q., Bo, Z., Lirong, Z. & Guo-liang, W. (2002) The two broad spectrum blast resistance genes, *Pi9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6. in 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants. p. 7 (résumé).
92. Glazmann, J. C. (1987) Isozymes and classification of asian rice varieties. *Theor Appl Genet* **74**, 21-30.
93. Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T. H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H., Hadley, D., Hutcxhison, C., Martin, C., Katagiri, F., Lange, B. M., Moughammer, T., Xia, Y., Budworth, P., Zhong, J., Miguel, T., Paszkovsky, U., Zhang, S., Colbert, M., Sun, W. N., Chen, L., Cooper, B., Park, S., Wood, T. R. C., Mao, L., Quail, P., Wing, R., Dean, R., Yu, Y., Zharkikh, A., Shen, R., Sahasrabudhe, S., Thomas, A., Canings, R., Gutin, A., Pruss, D., Reid, J., Tavtigian, S., Mitchell, J., Eldredge, G., Scholl, T., Miller, R. M., Bathnagar, S., Adey, N., Rubano, T., Tusneem, N., Robinson, R., Feldhaus, J., Macalma, T., Oliphant, A. & Briggs, S. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. Spp *japonica*). *Science* **296**, 92-100.
94. Goto, I. (1970) Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus. I. Inheritance of resistance in crosses Sensho x H-79 and Imochishirazu x H-79. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **36** 304-312. [en japonais]
95. Goto, I. (1976) Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus. II. Difference in resistance to the blast disease between Fukunishiki and its parental cultivar, Zenith. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **42** 235-260. [en japonais]

96. Goto, I., Jaw, Y. L. & Baluch, A. A. (1981) Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus. IV. Linkage analysis of four genes. *Pi-a*, *Pi-k*, *Pi-z* and *Pi-i*. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **47** 252-254. [en japonais]
97. Goto, I. & Balush, A. A. (1983) Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus. V. Introduction of *Pi-se* of Sensho to Rikutonorin-moshi-No.4 and to No. 26. *Bull Yamagata Univ Agric Sci* **9** 121-125. [en japonais, résumé en anglais]
98. Goto, I. & Balush, A. A. (1984) Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus. VI. Additive effects of blast resistance genes of Sensho under natural infection. (Preliminary report). *Bull Yamagata Univ Agric Sci* **9** 273-283. [en japonais, résumé en anglais]
99. Goto, I. (1988) Genetic studies on the resistance of rice plant to the blast fungus. VII. Blast resistance genes of Kuroka. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **54** 460-465. [en japonais]
100. Goto, K., Yamanaka, S., Narita, T., Iwata, T., Shimoyama, M., Kondo, M. & Tomiki, T. (1961) Joint work on the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* (Fascicle 1). *Special reports on forecasting of occurrence of disease and insect pest*, No.5. [en japonais]
101. Goto, K., Kozaka, T., Yamada, M., Matsumoto, S., Yamanaka, S., Shindo, K., Narita, T., Iwata, T., Shimoyama, M., Indo, T., Nakanishi, I., Nishioka, M., Kumamoto, Y., Kondo, M., Fujikawa, T., Okadome, Z. & Tomiki, T. (1964) Joint work on the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* (Fascicle 2). *Special reports on forecasting of occurrence of disease and insect pest*, No.18. [en japonais]
102. Goto, K. (1965) Estimating losses from rice blast in Japan. in *The rice blast disease*, Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland. pp. 195-202.
103. Greco, R., Ouwerkerk, P. B., Sallaud, C., Kohli, A., Colombo, L., Puigdomenech, P., Guiderdoni, E., Christou, P., Hoge, J. H. & Pereira, A. (2001a) Transposon insertional mutagenesis in rice. *Plant Physiol* **125**, 1175-1177.
104. Greco, R., Ouwerkerk, P. B., Taal, A. J., Favalli, C., Beguiristain, T., Puigdomenech, P., Colombo, L., Hoge, J. H. & Pereira, A. (2001b) Early and multiple Ac transpositions in rice suitable for efficient insertional mutagenesis. *Plant Mol Biol* **46**, 215-227.

105. Grant, M. & Mansfield, J. (1999) Early events in host – pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 312-319.
106. Grant, M. R., McDowell, J. M., Sharpe, A. G., de Torres Zabala, M., Lydiate, D. J. & Dangl, J. F. (1998) Independent deletion of a pathogen-resistance gene in *Brassica* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 15483-15848.
107. Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W. & Dangl, J. L. (1995) Structure of the *Arabidopsis RPM1* gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**, 843-846.
108. Guiderdoni, E., Galinato, E., Louistro, J. & Vergara, G. (1992) Anther culture of tropical *japonica* × *indica* hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* **62**, 219-224.
109. Guttman, D. S. & Greenberg, J. T. (2001) Functional analysis of the type III Effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single copy genomic integration system. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 145-155.
110. Haansra, J. P. W., Laugé, R., Meijer-dekens, F., Bonnema, G., de Wit, P. J. G. M. & Lindhout, P. (1999) The *Cf-ECP2* gene is linked to, but not part of, the *Cf-4/Cf-9* cluster on the short arm of chromosome 1 in tomato. *Mol gen genet* **262**, 839-845.
111. Hamer, J. E., Howard, R. J., Chumley, F. G. & Valent, B. (1988) A mechanism for surface attachment in spores of plant pathogenic fungus. *Science* **239**, 288-290.
112. Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1997) Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 575-607.
113. Hammond-Kosack, K. E., Harrison, K. & Jones, J. D. G. (1994) Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene *Avr9* in tomato seedlings carrying the disease resistance gene *Cf-9*. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10445-10449.
114. Hammond-Kosack, K. E., Tang, S., Harrison, K. & Jones, J. D. G. (1998) The tomato *Cf-9* disease resistance gene functions in tobacco and potato to confer responsiveness to the fungal avirulence gene product Avr9. *Plant Cell* **10**, 1251-1266.

115. Harushima, Y., Yano, M., Shomura, A., Sato, M., Shimano, T., Kuboki, Y., Yamamoto, T., Lin, S. Y., Antonio, B. A., Parco, A., Kajiya, H., Huang, N., Yamamoto, K., Nagamura, Y., Kurata, N., Khush, G. S. & Sasaki, T. (1998) High-density rice genetic linkage map with 2275 markers using a single F₂ population. *Genetics* **148**, 479-494.
116. Hayasaka, H., Miyao, A., Yanno, M., Matsunaga, K. & Sasaki, T. (1996) RFLP mapping of a rice blast resistance gene, *Pi-k*. *Breed Sci***46** (supplement 2), 68. [en japonais]
117. Hayasaka, H., Takamatsu, M., Kuboki, Y., Yano, M., Matsunaga, K. & Sasaki, T. (1995) Mapping genes conferring rice blast resistance in rice variety Kassalath using RFLP markers. Linkage analysis of the resistance gene on chromosome 6. *Breed Sci***45** (supplement 2), 168. [en japonais]
118. Hayashi, N., Ando, I. & Naito, H. (1996) Gene analysis of a new blast resistance in the paddy rice variety Aichi Asahi. *Breed Sci***46** (supplement 2), 168. [en japonais]
119. Hayashi, N., Ando, I. & Imbe, T. (1998) Identification of a new resistance gene to a chinese blast fungus isolate in the Japanese rice cultivar Aichi Asahi. *Phytopathology* **88**, 822-827.
120. Heath, M. C., Valent, B., Howard, R. J. & Chumley, F. G. (1990) Interaction of two strains of *Magnaporthe grisea* with rice, goosegrass, and weeping lovegrass. *Can J Bot* **68**, 1627-1637.
121. Heath, M. C. (1991) the role of gene – for – gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* **81**, 127-130.
122. Hebert, T. T. (1971) The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* **61**, 83-87.
123. Hennin, C., Höfte, M. & Diederichsen, E. (2001) Fonctionnal expression of *Cf9* and *Avr9* genes in *Brassica napus* induces enhanced resistance to *Leptosphaeria maculans*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 1075-1085.
124. Hinsch, M. & Staskawicz, B. (1996) Identification of a new *Arabidopsis* disease resistance locus, *RPS4*, and cloning of the corresponding avirulence gene, *avrRps4*, from *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi*. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 55-61.

125. Higham, C. F. W. (1989) La civilisation du riz en asie du sud-est. *La Recherche* **207**, 178-186.
126. Hittalmani, S., Foolad, M. R., Mew, T., Rodrigez, R. L. & Huang, N. (1995) Developpement of a PCR-based marker to identify rice blast resistance gene, *Pi-2(t)*, in a segregating population. *Theor Appl Genet* **91**, 9-14.
127. Hoisington, D., Khairallah, M. & Gonzalès de leòn, D. (1994) Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Second Edition, CIMMYT, Mexico city, Mexico.
128. Honée, G., Buitnink, J., Jabs, T., de Kloe, J., Sijbolts, F., Apotheker, M., Weide, R., Sijen, T., Stuiver, M. & de Wit, P. J. G. M. (1998) Induction of defence related responses in *Cf-9* tomato cells by the AVR9 Elicitor of *Cladosporium fulvum* is developmentally regulated. *Plant Physiol* **117**, 809-820.
129. Howard, R. J. & Ferrarri, M.A. (1989) Role of melanin in appressorium function. *Exp Mycol* **13**, 403-418.
130. Howard, R. J., Ferrarri, M. A., Roach, D. H. & Money, N. P. (1991) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 11281-11284.
131. Howard, R. J. & Valent, B. (1996) Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 491-512.
132. Hsieh, S. C. (1976) Recent advances in rice breeding and genetical studies in Taiwan. *Scientific Agric* **4**, 48-68.
133. Hulbert, S. H., Hu, G. & Drake, J. A. (1997) Kansas rust-resistant sweet corn populations A and B. *Hortscience* **32**, 1130-1131.
134. Hulbert, S. H., Webb, C.A., Smith, S. M. & Sun, Q. (2001) Resistance gene complexes : Evolution and utilisation. *Annu Rev Phytopath* **39**, 285-312.

135. Hwang, C. F., Bhakta, A. V., Truesdell, G. M., Pudlo, W. M. & Moroz Williamson, V. (2000) Evidence for a role of the N terminus and leucine rich repeats region of the *Mi* gene product in regulation of localized cell death. *Plant Cell* **12**, 1319-1330.
136. Imbe, T. & Matsumoto, S. (1985) Inheritance of resistance of rice varieties to the blast fungus strains virulent of the variety "Reiho". *Jap J Breed* **35**, 332-339. [en japonais, résumé en anglais]
137. Imbe, T., Oba, S., Yanoria, M. J. T. & Tsunematsu, H. (1997) A new gene for blast resistance in rice cultivar IR24. *Rice Genet Newsl* **14**, 60-62.
138. Innes, R. W., Bisgrove, S. R., Smith, N. M., Bent, A. F., Staskawicz, B. J. & Liu, Y. C. (1993) Identification of a disease resistance locus in *Arabidopsis* that is functionally homologous to the *RPG1* locus of soybean. *Plant J* **4**, 813-820.
139. Inukai, T., Nelson, R. J., Sarkarung, S. & Zeigler, R. S (1993) Allelism between blast (Bl) resistance genes *Pi-4a(t)* and *Pi-ta*. *Internat Rice Res Notes* **18**, 15.
140. Inukai, T., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Sarkarung, S. Mackill, D. J., Bonman, J. M., Takamure, I. & Kinoshita, T. (1994) Allelism of blast resistance genes in near isogenic lines of rice. *Phytopathology* **84**, 1278-1283.
141. Inukai, T., Zeigler, R. S., Sarkarung, S., Bronson, M., Dung, L. V., Kinoshita, T. & Nelson, R. J. (1996a) Development of pre-isogenic lines for rice blast-resistance by marker-aided selection from a recombinant imbred population. *Theor Appl Gen* **93**, 560-567.
142. Inukai, T., Nelson, R. J., Zeigler, R. S., Sarkarung, S. S., Mackill, D. J., Bonman, J. M., Takamure, I. & Kinoshita, T. (1996b) Genetic analysis of blast resistance in tropical rice cultivars using near-isogenic lines. in Rice genetics III. Kush, G. S. (ed). Proceedings of the third international rice genetics symposium. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. pp. 447-450.
143. Inukai, T & Sako, A. (1997) Determination of chromosomal location of blast resistance gene in West African upland cultivar Moroberekan. *Breed Sci* **47**(supplement 1), 268. [en japonais]

144. Ise, K. (1991) Linkage analysis of some blast resistance genes in rice, *Oryza sativa* L. *Jap J Breed* **42** (supplement 2), 388-389. [en japonais]
145. Iwamoto, M., Kukobi, Y., Monna, L., Hayasaka, H., Yano, M., Matsunaga, K. & Sasaki, T. (1996) Fine scale linkage mapping of blast resistance gene *Pi-b* using pooled sampling method. *Breed Sci* **46** (supplement 1), 91. [en japonais]
146. Izawa, T., Ohnishi, T., Nakano, T., Ishida, N., Enoki, H., Hashimoto, H., Itoh, K., Terada, R., Wu, C., Miyazaki, C., Endo, T., Ida, S. & Shimamoto, K. (1997) Transposon tagging in rice. *Plant Mol Biol* **35**, 219-229.
147. Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4800-4805.
148. Jackson, R. W., Athanassopoulos, E., Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Sesma, A., *et al.* (1999) Identification of a pathogenicity island, which contains genes for virulence and avirulence, on a large native plasmid in the bean pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10875-10880.
149. Jacqot, M. & Clement, G. (1995) Une richesse porteuse d'avenir. Riz. Du débouché à la culture. ITCF et CFR. pp. 8-12.
150. Jeon, J. & An, G. (2001) Gene tagging in rice: a high throughput system for functional genomics. *Plant Sci* **161**, 211-219.
151. Jeon, J. S., Yi, G. H., Dahu, C., Guo-Liang, W., Lee, S., Han, M. J., An, G. & Ronald, P. (2002) Molecular characterization of two loci, *Pi3* and *Pi5*, associated with durable resistance to rice blast. *in* 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants, p. 24 (résumé).
152. Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. & Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* **19**, 4004-4014.

153. Johal, G. S. & Briggs, S. P. (1992) Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science* **258**, 985-987.
154. Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond- Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J., Jones, J. D. G. 1994. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**, 789-793.
155. Joosten, M. H., Cozijnsen, T. J. & de Wit P. J. (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single pair change in an avirulence gene. *Nature* **367**, 384-386.
156. Kahn, R. P. & Libby, J. L. (1958) The effect of environmental factors and plant age on the infection of rice by the blase fungus, *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* **48**, 25-30.
157. Kaji, R., Ogawa, T. & Mishimura, M. (1997a) RFLP mapping of blast resistance gene, *Pi-t*, in rice. *Breed Sci* **47** (supplement 1), 37. [en japonais]
158. Kaji, R., Ogawa, T. & Mishimura, M. (1997b) Screening of RAPD markers for blast resistance gene *Pi-t*, in rice. in *Armonizing agricultural productivity and conservation of biodiversity: Breeding and ecology*. Proceedings of th 8th SABRAO congress and annual meeting of Korean breeding society. pp. 405-406.
159. Kaji, R. & Ogawa, T. (1996a) RFLP mapping of blast resistance gene *Pi-k^m*, in rice. *Intern Rice Res Notes* **21**, 2-3.
160. Kaji, R. & Ogawa, T. (1996b) RFLP mapping of blast resistance gene *Pi-k^m*, in rice. *Breed Sci* **46** (supplement 1), 70. [en japonais]
161. Kamoun, S., Klucher, K. M., Coffey, M. D. & Tyler, B. M. (1993). A gene encoding a hostspecific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 573-581.
162. Kamoun, S., van West, P., de Jong, A. J., de Groot, K. E., Vleeshouwers, V. G. A. A. & Govers, F. (1997) A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is downregulated during infection of potato. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 13-20.

163. Kamoun, S., van West, P., Vleeshouwers, V. G. A. A., de Groot, K. E. & Govers, F. (1998) Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **10**, 1413-1425.
164. Kanazin, V., Marek, L. F. & Shoemaker, R. C. (1996) Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11746-11750.
165. Kang, S., Sweigard, J. A. & Valent, B. (1995) The *PWL* host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 939-948.
166. Kato, H. (1974) Epidemiological aspect of sporulation by blast fungus on rice plants. *Jap Agric Res Quarterly* **8**, 19-22.
167. Kato, H. & Yamagushi, T. (1982) The perfect state of *Pyricularia oryzae* cav. From rice plants in culture. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **48**, 607-612.
168. Kato, S., Kosaka, H. & Hara, S. (1928) On the affinity of rice varieties as shown by the fertility of rice plants. *Centr Agric Kyushu Imp Univ* **2**, 241-276.
169. Kato, H., Harada, M., Tsuchiya, K. & Moriwaki, K. (1980). Absence of correlation between DNA repair in ultraviolet irradiated mammalian cells and life span of the donor species. *Jap J Genet* **55**, 99-108.
170. Katsube, T. & Koshimizu, Y. (1970) Influence of blast disease on harvests in rice plant. 1. Effects of panicle infection on yield components and quality. *Bull Tohoku Natl Agric experimental station* **39**, 55-96.
171. Kawazaki, S., Nakamura, S., Suzuki, T., Wisniewska, I., Sasaki, N., Seki, H. & Shinosaki, K. (1997) Delineation of rice blast resistance gene *Pi-b* region on a BAC contig spanning flanking markers and a trial of cDNA search within the region. *Breed Sci* **47**(supplement 1), 36. [en japonais]
172. Kawazaki, S., Rybka, K., Miyamoto, M., Tanaka, Y., Kataoka, M., Saito, A. & Ando, I. (1996) Positional cloning of rice blast resistance genes. in Rice Genetics III. Kush, G. S. (ed) Proceedings of the third international rice genetics symposium. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. pp. 675-680.

173. Kawalleck, P., Plesch, G., Hahlbrock, K. & Somssich, I. E. (1992) Induction by fungal elicitor of S-adenosyl-L-methionine synthetase and S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase mRNAs in cultured cells and leaves of *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4713-4717.
174. Kearney, B. & Staskawicz, B. J. (1990) Widespread distribution and fitness contribution of *Xanthomonas campestris* avirulence gene *avrBs2*. *Nature* **346**, 385-386.
175. Keen, N., Kobayashi, D., Tamaki, S., Shen, H., Stayton, M., *et al.* (1991). Avirulence gene *D* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and its interaction with resistance gene *Rpg4* in soybean. *Adv Mol Genet Plant Microbe Interact* **1**, 37-44.
176. Keen, N., Tamaki, S., Kobayashi, D., Gerhold, D., Stayton, M., *et al.* (1991) Bacteria expressing avirulence gene *D* produce a specific elicitation of the soyabean hypersensitive reaction. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 112-121.
177. Kinoshita, T. & Kiyosawa, S. (1997) Some considerations on linkage relationships between *Pi-i* and *Pi-z* in the blast resistance of rice. *Rice Genet Newsl* **14**, 57-59.
178. Kinoshita, T. (1998) Report of the comete of gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genetics Newsl* **15**, 13-74.
179. Kiyosawa, S., Mackill, D. S., Bonman, J. M., Tanak, Y & Ling, Z. Z. (1986) An attempt of classification of world's rice varieties based of reaction pattern to blast fungus strains. *Bull Natl Instit agrobiol Res* **2**, 13-39.
180. Kiyosawa, S. (1971) Genetical approach to the biochemical nature of plant disease resistance. *Jap Agric Res Quater* **6**, 72-80.
181. Kiyosawa, S. (1972) Genetics of blast resistance. *in* Genetics of blast resistance, International Rice Research Institute (ed.), Los Baños, The Philippines, pp. 203-225.
182. Kiyosawa, S. (1978) Identification of blast resistance genes in some rice varieties. *Jap J Breed* **28**, 287-296.
183. Kiyosawa, S. (1984) Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast fungus. *Rice Genet Newsl* **1**, 95-97.

184. Knogge, W., Gierlich, A., Hermann, H., Wernert, P. & Rohe, M. 1994. Molecular identification and characterization of the *nip1* gene, an avirulence gene from the barley pathogen *Rhynchosporium secalis*. in *Advances in Molecular Genetics of Plant- Microbe Interactions*. Daniels, M. J., Downie, J. A. & Osbourn, A. E. (eds). Kluwer (Dordrech). pp. 207-214.
185. Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem* **19**, 415-421.
186. Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1995) A structural basis of the interactions between leucine rich repeats and protein ligands. *Nature* **374**, 183-186.
187. Kooman-Gersmann, M., Vogelsang, R., Hoogendijk, E. C. M. & de Wit, P. J. G. M. (1997) Assignment of amino acid residues of the AVR9 peptide of *Cladosporium fulvum* that determine elicitor activity. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 821-829.
188. Kooman-Gersmann, M., Vogelsang, R., Vossen, P., van der Hooven, H. W., Mahé, E., Honée, G. & de Wit, P. J. G. M. (1998) Correlation between binding affinity an necrosis-inducing activity of mutant AVR9 peptide elicitors. *Plant Physiol* **117**, 609-618.
189. Kozaka, T. (1965) Control of rice blast by cultivation practices in Japan. in *The rice blast disease, proceedings of a symposium at IRRI, july, 1963*. International Rice Research Institute (ed.), John Hopkins press, baltimore, Maryland, USA. pp. 421-438.
190. Kozaka, T. (1975) Recent advances in studies on horizontal resistance to blast disease of rice in Japan. in *Proceedings of the seminar on horizontal resistance to the blast disease of rice*. CIAT, Cali, Colombie, pp. 101-116.
191. Krogh, A., Brown, M., Mian, I. S., Sjolander, K. & Haussler, D. (1994) Hidden Markov models in computational biology: Applications to protein modeling. *J Mol Biol* **235**, 1501-1531.
192. Kurata, N., Nagamura, Y., Yamamoto, K., Harushima, Y., Sue, N., Wu, J., Antonio, B. A., Shomura, A., Shimizu, T., Lin, S. Y., *et al.* (1994) A 300 kilobases interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* **8**, 365-372.

193. Lagudah, E. S., Moullet, O. & Appels, R. (1997) Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat. *Genome* **40**, 659-665.
194. Lam, E., Kato, N. & Lawton, M. (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853
195. Laugée, R., Goodwin, P. H., de Wit, P. J. G. M. & Joosten, M. H. A. J. (2000) Specific HR-associated recognition of secreted proteins from *Cladosporium fulvum* occurs in both host and non-host plants. *Plant J* **23**, 735-745.
196. Laugée, R., Joosten, M. H. A. J., Haanstra, J. P. W., Goodwin, P. H., Lindhout, P. & de Wit, P. J. G. M. (1998) Successful search for a resistance gene in tomato targeted against a virulence factor of a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9014-9018.
197. Lawrence, G. J., Finnegan, E. J., Ayliffe, M. A. & Ellis, J. G. (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.
198. Leach, J. E. & White, F. F. (1996) Bacterial avirulence genes. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 153-179.
199. Leach, J. E., Vera Cruz, C. M., Bai, J. & Leung, H. (2001) Pathogen fitness penalty as a predictor of durability of disease resistance genes. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 187-224.
200. Lebrun, M. H. (1991) Role d'une phytotoxine, l'acide ténuazonique, dans les relations riz-*pyricularia oryzae*. Thèse de doctorat ès sciences, Université Paris-Sud, Orsay, France. 332 pp.
201. Lee, Y. H. (2002). Pathogenomics approaches in rice-*Magnaporthe grisea* interactions. in 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants. p. 3 (résumé).

202. Leong, S. A., Chauhan, R. S., Farman, M. L., Lazaro, D., Durfee, T., Zhang, H. B., Holt, J. R., Blattner, F., Nakao, T., Eto, Y., Tosa, Y., Nakayashiki, H. & Mayama, S. (2002) The *Avr1-CO39/Pi-CO39(t)* gene system. *in* 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants, p. 23 (résumé).
203. Leung, H., Borromeo, E. S., Bernardo, M. A. & Nottoghem, J. L. (1988) Molecular genetic approach to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology* **78**, 1227-1233.
204. Leister, D., Kurth, J., Laurie, D. A., Yano, M., Sasaki, T., Devos, K., Graner A. & Schultze-Lefert, P. (1998) Rapid reorganisation of resistance genes homologues in cereal genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 370-375.
205. Leister, D., Kurth, J., Laurie, D. A., Yano, M., Sasaki, T., Graner, A. & Schultze-Lefert, P. (1999) RFLP and physical mapping of resistance genes homologues in rice (*O. sativa*) and Barley (*H. vulgare*). *Theor Appl Genet* **98**, 509-520.
206. Leister, R. T., Ausubel, F. M. & Katagiri, F. (1996) Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the *Arabidopsis* genes *RPS2* and *RPM1*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 15497-15502.
207. Leister, R. T. & Katagiri, F. (2000) A resistance gene product of the nucleotide binding site – leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins in vivo. *Plant J* **22**, 345-354.
208. Li, Z. Y., Chen, S. Y., Zheng, X. W. & Zhu, L. H. (2000) Identification and chromosomal localization of a transcriptionally active retrotransposon of Ty3-gypsy type in rice. *Genome* **43**, 404-408.
209. Liu, G., Lu, G., Qu, S., Zho, B, Zeng, L. & Wang, G. L. (2002) The two broad spectrum blast resistance genes, *Pi-9(t)* and *Pi2(t)*, are physically linked on rice chromosome 6 *in* 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants, p. 23 (résumé).

210. Luck, J. E., Lawrence, G. J., Dodds, P. N., Shepherd, KW & Ellis, J. G. (2000) Regions outside of the leucine-rich repeats of flax rust resistance proteins play a role in specificity determination. *Plant Cell* **12**, 1367-1378.
211. Luderer, R., Rivas, S., Nurnberger, T., Mattei, B., van den Hooven H. W., van der Hoorn R. A., Romeis, T., Wehrfritz, J. M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., de Lorenzo, G., Jones, J. D., de Wit, P. J. & Joosten, M. H. (2001) No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 867-876.
212. Mackill, D. J. & Bonman, J. M., Suh, S. H. & Srilingam, R. (1985) Genes for resistance to Philippines isolates of the rice blast pathogen. *Rice Genet Newsl* **2**, 80-81.
213. Mackill, D. J. & Bonman, J. M. (1992) Inheritance of Blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology* **82**, 746-749.
214. Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., *et al.* (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**, 1432-1436.
215. Martin, G. B. (1999) Functionnal analysis of plant disease resistance and their downstream effectors. *Curr Op Plant Biol* **2**, 273-279.
216. Matsumura, K. & Tosa, Y. (1995) The rye mildew fungus carries avirulence genes corresponding to the weat genes for resistance to races of the wheat mildew fungus. *Phytopathology* **85**, 735-765
217. McCouch, S. R., Kochert, G., Yu, Z. H., Kush, G. S., Coffman, W. R. & Tanksley, S. D. (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* **76**, 815-829.
218. McCouch, S. R., Nelson, R. J., Tohme, J. & Zeigler, R. S. (1994) Mapping of the blast resistance genes in rice. *in* Rice blast disease. Zeigler, R. S., Leong, S. & Teng, P. S. (eds). CAB international, Wallingkord (UK) and International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. pp. 167-186.

219. McDowell, J. M., Dhandaydham, M., Long, T. A., Aarts, M. G., Goff, S., *et al.* (1998) Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1861-1874.
220. the Merk Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Eleventh edition (1989). Budave, S., O'Neil, M. J., Smith, A. & Heckelman, P. E. (eds.). Merk & Co., Inc. Rahway, New Jersey, USA. 2371 pp.
221. Mew, T. V., Parco, A. S., Hittlamani, S., Inukai, T., Nelson, R., Zeigler, R. S. & Huang, N. (1994) Fine mapping of major genes for blast resistance in rice. *Rice Genet Newsl* **11**, 126-128.
222. Meyers, B. C., Chin, D. B., Shen, K. A., Sivaramakrishnan, S., Lavelle, D. O., *et al.* (1998) The major resistance gene cluster in lettuce is highly duplicated and spans several megabases. *Plant Cell* **10**, 1817-32.
223. Meyers, B. C., Dickerman, A. W., Michelmore, R. W., Sivaramakrishnan, S., Sobral, B. W. & Young, N. D. (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide binding superfamily. *Plant J* **20**, 317-332.
224. Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. & Williamson, V. A. (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. *Plant Cell* **10**, 1307-1319.
225. Minsavage, G. V., Dahlbeck, D., Whalen, M. C., Kearney, B., Bonas, U., *et al.* (1990) Gene – for – gene relationships specifying disease resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*-pepper interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **3**, 41-47.
226. Miyamoto, M., Ando, I., Rybka, K., Kodama, O. & Kawazaki, S. (1996) High resolution mapping of the *indica*-derived rice blast resistance genes. I. *Pi-b*. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 6-13.

227. Monna, L., Miyao, A., Zhong, H. S., 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*. *Theor Appl Genet* **94**, 170-176.
228. Morgenstern, B. (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment to segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **15**, 211-218.
229. Mundt, C. C. (2002) Use of multiline cultivars and cultivar mixture for disease management. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 381-410.
230. Nakamura, D., Tiersch, T. R., Douglass, M. & Chandler R. W. (1990). Rapid identification of sex in birds by flow cytometry. *Cytogenet Cell Genet* **53**, 201-205.
231. Nakamura, S., Rybka, K., Asakawa, S., Akiyama, K., Ohmido, N., Fukui, K., Shimizu, N. & Kawazaki, S. (1996) BAC contig construction around the rice blast resistance genes *Pi-b* and *Pi-ta2* which is located in the centromeric region of chromosome 12. *Breed Sci* **46** (supplement 2), 51. [en japonais]
232. Nakamura, S., Asakawa, S., Ohmido, N., Fukui, K., Shimizu, N. & Kawasaki, S. (1997) Construction of an 800 kb contig in the near-centromeric region of the rice blast resistance gene *Pi-ta2* using a highly representative rice BAC library. *Mol gen Genet* **254**, 611-620.
233. Naqvi, N. I., Bonman, J. M., Mackill, D. J., Nelson, R. J. & Chato, B. B. (1995) Identification of RAPD markers linked to a major rice resistance gene in rice. *Mol Breed* **1**, 341-348.
234. Naqvi N. I. & Chato B. B. (1996a) development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast resistance gene in rice. *Genome* **39**, 26-30.

235. Naqvi N. I. & Chatoo B. B. (1996b) Molecular genetic analysis and sequence characterized amplified region-assisted selection of blast resistance in rice. *in* Rice genetics III Kush, G. S. (ed). Proceedings of the third international rice genetics symposium. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. pp. 570-576.
236. Nordborg, M., Borevitz, J. O., Bergelson, J., Berry, C. C., Chory, J., Hagenblad, J. U., Kreitman, M., Maloof, J. N., Noyes, T., Oefner, P. J., Stahl, E. A. & Weigel, D. (2002) The extend of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet* **30**, 190-193.
237. Nottoghem, J. L. (1977) Etude de la résistance d'*Oryza sativa* à *Pyricularia oryzae* par application au parasite des techniques de mutagenèse. *in* Induced mutations against plant diseases. I. A. E. agency (ed.), Vienne, Autriche, pp. 121-130.
238. Nottoghem, J. L. (1983) Définition d'une stratégie d'utilisation de la résistance par analyse génétique des relations hôte-parasite. Cas du couple riz-*Pyricularia oryzae*. Thèse de Docteur Ingénieur, Université Paris-Sud, Orsay, France, 70 pp.
239. Nottoghem, J. L. & Silué, D. (1992) Distribution of the mating type alleles in *Magnaporthe grisea* populations pathogenis on rice. *Phytopathology* **82**, 421-424.
240. Oka, H. I. (1974) Experimental studies on the origin of cultivated rice. *Genetics* **78**, 475-486
241. Orbach, M. J., Farrall, L., Sweigard, J. A., Chumley, F. G. & Valent, B. (2000) A telomeric avirulence gene determines efficacy for the rice blast resistance gene *Pi-ta*. *Plant Cell* **12**, 2019-2032.
242. Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., *et al.* (1997) The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* **9**, 521-532.
243. Ou, S. H. (1985) Fungus diseases : The rice blast. *in* Rice Diseases. Commonwealth Agricultural Bureau Publications, UK. 2nd edition.

244. Pan, Q. H., Wang, L. Ikehashi, H. & Tanisaka, T. (1996a) Identification of a new blast resistance gene in the *indica* rice cultivar Kassalath using japanese differential cultivars and isozyme markers. *Phytopathology* **86**, 1071-1075.
245. Pan, Q. H., Ikehashi, H. & Tanisaka, T. (1996b) Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice V. Identification of two blast resistance genes in a Yunnan native variety, Maowangu. *Breed Sci* **46** (supplement 1), 79. [en japonais]
246. Pan, Q. H., Tanisaka, T. & Ikehashi, H. (1996c) Studies on the genetics and breeding of blast resistance in rice VI. Gene analysis for the blast resistance of two Yunnan native cultivars GA20 and GA25. *Breed Sci* **46** (supplement 2), 70. [en japonais]
247. Pan, Q. H., Tanisaka, T. & Ikehashi, H. (1996d) Report of cometeo of gene symbolization, nomenclature and linkage groups (by N. Iwata) *Rice Genet Newsl* **13**, 12-18.
248. Pan Q. H., Wang, L. Ikehashi, H., Yamagata, H., & Tanisaka, T. (1998a) Identification of two new genes conferring resistance to rice blast in the chinese native cultivar 'Maowangu'. *Plant Breed* **117**, 27-31.
249. Pan, Q. H., Wang, L., Tanisaka, T. & Ikehashi, H. (1998b) Allelism of rice blast resistance genes in two chinese rice cultivars, and identification of two new resistance genes. *Plant Pathol* **47**, 165-170.
250. Pan, Q. H., Wang, L. & Tanisaka, T. (1999) A new resistance gene identified in the Indian native rice ultivar Aus373 through allelism and linkage tests. *Plant Pathol* **48**, 288-293.
251. Pan, Q., Wendel, J. & Fluhr, R. (2000) Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance genes homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol* **50**, 203-213.
252. Panaud, O., Chen, X. & McCouch, S. R. (1996) Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol gen Genet* **252**, 597-607.

253. Parker, J. E., Coleman, M. J., Szabo, V., Frost, L. N., Schmidt, R., *et al.* (1997) The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *Rpp5* shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell* **9**, 879-894.
254. Parniske, M. & Jones, J. D. G. (1999) Recombination between diverged clusters of the tomato *Cf-9* plant disease resistance gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 5850-5855.
255. Parniske, M., Wulff, B. B. H., Bonnema, G., Thomas, C. M., Jones, D. A. & Jones, J. D. G. (1999) Homologues of the *Cf-9* disease resistance gene (*Hcr9s*) are present at multiple loci on the short arm of the tomato chromosome 1. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 93-102.
256. Pécès, G. (1991) Experimental demonstration of the tomatotropic organization in the soprano (*Cantatrix sopranica* L.). in *Cantatrix sopranica* L. et autres écrits scientifiques, Seuil, collection "La Librairie du XXe siècle"
257. Perez-Garcia, A., Snoeijsers, S. S., Joosten, M. H. A. J., Goosen, T. & de Wit, P. J. G. M. (2001) Expression of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by the global nitrogen response factor NRF1. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 316-325.
258. Pfitzner, U. M. & Pfitzner, A. J. (1992) Expression of a viral avirulence gene in transgenic plants is sufficient to induce the hypersensitive defense reaction. *Mol Plant Microbe Interact* **5**, 318-321.
259. Piedras, P., Hammond-kosak, K. E., Harisson, K. & Jones, J. D. G (1998) Rapid, *Cf-9* and *Avr9* dependant, production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1155-1166.
260. Piedras, P., Rivas, S., Dröge, S., Hillmer, S. & Jones, J. D. G. (2000) Functionnal, c-myc-tagged *Cf-9* resistance gene products are plasma-membrane localized and glycoposphorylated. *Plant J* **21**, 529-536.
261. Prabhu, A. S. & de Faria, J. C. (1982) Quantitative relationships between leaf and panicle blast and their effect on grain filling and grain weight in upland rice. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **17**, 219-223. [en portugais]

262. Price, A. H. & Tomos, A. D. (1997) Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.). II: Mapping Quantitative trait loci using molecular markers. *Theor Appl Gen* **95**, 143-152.
263. Primavesi, A. M., Primavesi, A. & Veiga, C. (1972) Influence of nutritional balances of paddy rice on resistance to blast. *Agrochimica* **16**, 459-471.
264. Pryor, A. J. (1987) The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants. *Trends Genet* **3**, 157-161.
265. Puri, N., Jenner, C., Bennett, M., Stewart, R., Mansfield, J., Lyons, N. & Taylor, J. (1997) Expression of *avrPphB*, an avirulence gene from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, and the delivery of signals causing the hypersensitive reaction in bean. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 247-256.
266. Ranomanjanahari, S. (1987) Etude du rôle de l'acide ténuazoïque dans les relations riz-*Pyricularia oryzae*. Thèse de 3^{ème} cycle. Université de Paris-sud, Centre d'Orsay.
267. Reuber, T. L., Plotnikova, J. M., Dewdney, J., Rogers, E. E., Wood, W. & Ausubel, F. M. (1998) Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J* **16**, 473-485.
268. Rice, W. R. (1989) Analysis tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225
269. Ritter, C. & Dangl, J. L. (1996) Interference between two specific pathogen recognition events mediated by distinct plant disease resistance genes. *Plant cell* **8**, 251-257.
270. Rivas, S., Romeis, T. & Jones, J. D. G. (2002) The Cf-9 Disease resistance protein is present in an ~420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated complex at one molecule per complex. *Plant Cell* **14**, 689-702.
271. Rohe, M., Gierlich, A., Hermann, H., Hahn, M., Schmidt, B., *et al.* (1995) The race specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the *Rrs1* resistance genotype. *EMBO J* **14**, 4168-4177.
272. Romeis, T., Ludwig, A. A., Martin, R. & Jones, J. D. G. (2001) Calcium-dependant protein kinases play an essential role in plant defense response. *EMBO J* **20**, 5556-5567.

273. Romeis, T., Piedras, P & Jones, J. D. G. (2000) Resistance gene-dependant activation of a calcium-dependant protein kinase in the plant defence response. *Plant Cell* **12**, 803-815.
274. Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H. & Jones, J. D. G. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-287.
275. Ronald, P. C., Salmeron, J. M., Carland, F. M. & Staskawicz, B. J. (1992) The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene. *J Bact* **174**, 1604-1611.
276. Rossi, M., Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E. & Williamson, V. M. (1998) The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9750-9754.
277. Rybka, K., Miyamoto, M., Kataoka, M., Ando, I. & Kawazaki, S. (1994) Improved high resolution mapping of the *indica* derived rice blast resistance genes. *Breed Sci* **44** (supplement 2), 190. [en japonais]
278. Rybka, K., Miyamoto, M., Ando, I., Saito, A. & Kawazaki, S. (1997) High resolution mapping of the *indica* derived rice blast resistance genes II. *Pi-ta*² and *Pi-ta* and a consideration of their origin. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 517-524.
279. Saito, A., Yano, M., Kuhara, S., Ukai, Y., Kawase, M., Nagamine, T., Yoshimira, S., Ideta, O., Oshawa, R., Yagano, Y., Iwata, N. & Sugiura, M. (1991) Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. *Jap J Breed* **41**, 665-670.
280. Saji, S., Umehara, Y., Antonio, B. A., Yamane, H., Tanoue, H., Baba, T., Aoki, H., Ishige, N., Wu, J., Koike, K., Matsumoto, T. & Sasaki, T. (2001) A physical map with yeast artificial chromosome (YAC) clones covering 63% of the 12 rice chromosomes. *Genome* **44**, 32-37.

281. Sallaud, C., Lorieux, M., Roumen, E., Tharreau, D., Berruyer, R., Svestasrani, P., Garsmeur, O., Guesquiere, A. & Notteghem, J. L. (2002a) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast resistant variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor Appl Gen* (sous presse)
282. Sallaud, C., Gay, C., Larmande, P., Bourgeois, E., Piégu, B., Regad, F., Bès, M., Crouzet, M. P., Portefaix, M., Ryo, M. A., Vignes, H., Venturoli, F., Raynal, M. & Matthieu, T. (2002b) Creation of a genome-wide library of insertion lines in rice. *in* Proceedings of the 1st Plant Genomic European Meeting. Berlin, September 29th to October 2nd, 2002. (résumé)
283. Salmeron, J. M., Oldroyd, G. E. D., Tommens, C. M. T., Scofield, S. R., Kim, H. S., *et al.* (1996). Tomato *Prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell* **86**, 123-133.
284. Sasaki, A., Ashikari, M., Uegushi-tanaka, M., Itoh, H., Nishimura, A., Swapan, D., Ishiyama, K., Saito, T., Kobayashi, M., Kush, G. S., Kitano, H. & Matsuoka, M. (2002) A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. New insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago. *Nature* **416**, 701-702.
285. Sasaki, T., Matsumoto, T., Yamamoto, K., Sakata, K., Baba, T., Katayose, Y., Wu, J., Niimura, Y., Cheng, Z.A., Nagamura, Y., Antonio, B. A., Kanamori, H., Hosokawa, S., Matsukawa, M., Arikawa, K., Chiden, Y., Hayashi, M., Okamoto, M., Ando, T. Aoki, H., *et al.* (2002) The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature* **420**, 312-316.
286. Seebold, K. W., Kucharek, T. A., Datnoff, L. E., Correa-Victoria, F. J. & Marchetti, M. A. (2001) The influence of silicon on components of resistance to blast in susceptible, partially resistant, and resistant cultivars of rice. *Phytopathology* **91**, 63-69.
287. Segond, G. (1982) Origin of the genic diversity of cultivated rice (*Oryza spp.*): Study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jap J Genet* **57**, 25-57.

288. Shan, L., He, P., Zhou, J. M. & Tang, X. (2000) A cluster of mutations disrupt the avirulence but not the virulence function of *AvrPto*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 592-598.
289. Shen, K. A., Meyers, B. C., Islam-Faridi, N., Stelly, D. M. & Michelmore, R. W. (1998) Resistance gene candidates identified using PCR with degenerate oligonucleotide primers map to resistance gene clusters in lettuce. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 815-23.
290. Shen, M. & Lin, J. Y. (1994) The economic impact of rice blast disease in China. *In* Rice blast disease. Zeigler, R. S., Leong, S. & Teng, P. S. (eds). CAB international, Wallingford (UK) and International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines. pp. 167-186.
291. Shigyo, T., Kuchii, Y., Araki, Y. & Sawada, H. (2002) Efficacy of carpropamid against mutants of *Magnaporthe grisea* at codon 75 on scytalone dehydratase. *in* 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants, p. 7 (résumé).
292. Shimamoto, K. & Kyojuka, J. (2002) Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annu Rev Plant Biol.* **53**, 399-419.
293. Shinoda, H., Toriyama, K., Yunoki, T., Ezuka, A. & Sakurai, Y. (1971) Studies on the vertical resistance of rice to blast, IV. Linkage groups of genes for blast resistance. *Bul Chugoku Natl Agric Exp Station Series A* **20** 1-25. [en japonais, résumé en anglais]
294. Silué, D., Notteghem, J. L. & Tharreau, D. (1992a). Evidence for a gene – for – gene relationship in the *Oryza sativa* – *Magnaporthe grisea* pathosystem. *Phytopathology* **82**, 577-580.
295. Silué, D., Tharreau, D. & Notteghem, J. L. (1992b) Identification of *Magnaporthe grisea* avirulence genes to seven rice cultivars. *Phytopathology* **82**, 1462-1467.
296. Silué, D., & Notteghem, J. L. (1991) Compatibilité et fertilité de souches de *Magnaporthe grisea*, agent de la pyriculariose du riz. *Cryptogammie, Mycologie* **12**, 87-95.

297. Simons, G., Groenendijk, J., Wijbrandi, J., Reijans, M., Groenen, J., *et al.* (1998) Dissection of the *Fusarium I2* gene cluster in tomato reveals six homologs and one active gene copy. *Plant Cell* **10**, 1055-1068.
298. Singh, K., Ishii, T., Parco, A., Huang, N., Brar, D. S. & Khush, G. S. (1996) Centromere mapping and orientation of the molecular linkage map of rice (*oryza sativa* L.). *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6163-6168.
299. Skinner, D. Z., Budde, A. D., Farman, M. L., Smith, J. R., Leung, H. & Leong, S. A. (1993). Genome organization of *Magnaporthe grisea*: Genetic map, electrophoretic karyotype, and occurrence of repeated DNAs. *Theor Appl Genet* **87**, 545-557.
300. Smith, M. J., Mazzola, E. P., Sims, J. J., Midland, S. L., Keen, N. T., *et al.* (1993) The syringolides: bacterial c-glycosyl lipids that trigger plant disease resistance. *Tetrahedron Lett.* **34**, 223-226.
301. Smith, J. R. & Leong, S. A. (1994) Mapping of a *Magnaporthe grisea* locus affecting rice (*Oryza sativa* L.) specificity. *Theor appl genet* **88**, 901-908.
302. Snoeijers, S. S., Vossen, P., Goosen, T., van der broek, H. W. J. & de Wit, P. J. G. M. (1999) Transcription of the avirulence gene *Avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by a GATA-type transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and general genetics* **261**, 653-659.
303. Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., *et al.* (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**, 1804-1806.
304. Song, W. Y., Pi, L. Y., Wang, G. L., Gardner, J., Holsten, T. & Ronald, P. C. (1997) Evolution of the Rice *Xa21* Disease Resistance Gene Family. *Plant Cell* **9**, 1279-1287.
305. Soubabere, O. (1997) Développement et utilisation de marqueurs SCAR (Sequence Characterised Amplified Region) pour l'analyse des populations de *Magnaporthe grisea*. Stage réalisé sous la responsabilité de D. Tharreau, soutenu le 26 septembre 1997. Université Bordeaux II.

306. Stahl, E. A., Dwyer, G., Mauricio, R., Kreitman, M. & Bergelson, J. (1999) Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis*. *Nature* **400**, 667-671.
307. Staskawicz, B., Dahlbeck, D. & Keen, N. T. (1984) Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycines max* (L.) Merr. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 6024-6028.
308. Staskawicz, B. J., Ausubel, F. M., Baker, B. J., Ellis, J. G. & Jones, J. D. (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**, 661-667.
309. Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N. & Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bact* **169**, 5789-5794.
310. Sun, Q., Collins, N. C., Ayliffe, M., Smith, S. M., Drake, J., *et al.* (2000) Recombination between paralogues at the *rpl* rust resistance locus in maize. *Genetics* **158**, 423-438.
311. Sun, C., Xiaolei, L., Shanti, S. & Naqvi, N. (2002) MaqFST: A novel flanking sequence tag database representing a collection of *Agrobacterium* t-DNA based insertions in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. in 3rd International Rice Blast Conference, Tsukuba, Japan. Abstracts, program, list of participants, p. 3 (résumé).
312. Suzuki, H. (1975) Meteorological factors in the epidemiology of rice blast. *Annu Rev Phytopathol* **13**, 239.
313. Swarup, S., de Feyter, R., Brlansky, R. H. & Gabriel, D. W. (1991) A pathogenicity locus from *Xanthomonas citri* enables strains from several pathovars of *X. campestris* to elicit canker-like lesions on citrus. *Phytopathology* **81**, 802-809.
314. Swarup, S., Yang, Y., Kingsley, M. T. & Gabriel, D. W. (1992) A *Xanthomonas citri* pathogenicity gene, *pthA*, pleiotropically encodes gratuitous avirulence factors on nonhosts. *Mol Plant Microbe Interact* **5**, 204-213.
315. Sweigard, J. A., Carroll, A. M., Kang, S., Farrall, L., Chumley, F. G. & Valent, B. (1995) Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell* **7**, 1221-1233.

316. Swiderski, M. R. & Innes, R. W. (2001) The *Arabidopsis* resistance gene *Pbs1* encodes a member of a novel protein kinase subfamily. *Plant J* **26**, 101-112.
317. Swords, K. M. M., Dahlbeck, D., Kearney, B., Roy, M. & Staskawicz, B. J. (1996) Spontaneous and induced mutations in a single open reading frame alter both virulence and avirulence in *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria avrBs2*. *J Bact* **178**, 4661-4669.
318. Tabien, R. E., Li, Z., Paterson, A. H., Marchetti, M. A., Stansel, J. W. & Pinson, S. R. M. (2000) Mapping of four major rice blast resistance genes from 'Lemont' and 'teqing' and evaluation of their combinatorial effects for field resistance. *Theor Appl Genet* **101**, 1215-1225.
319. Tabor, C. W. & Tabor, H. (1984) Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **56**, 251-382.
320. Tanksley, S. D., Ahn, N., Causse, M., Coffman, W. R., Fulton, T., McCouch, S. R., Second, G., Tai, T., Wang, Z. Y., Wu, K. S. & Yu, Z. H. (1991) RFLP mapping of the rice genome. in Rice Genetics II. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp. 435-442.
321. Tai, T. H., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M. C., Stall, R. E. & Staskawicz, B. J. (1999) Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 14153-14158.
322. Takahashi, Y. (1965) Genetics of resistance to rice blast disease. in The rice blast disease. Proceedings of a symposium at IRRI, July, 1963. IRRI (ed.) Johns Hopkins Press, Baltimore, Maryland, USA, pp. 303-329.
323. Takken, F.L., Thomas, C.M., Joosten, M.H., Golstein, C., Westerink, N., et al. (2000) A second gene at the tomato *Cf-4* locus confers resistance to *Cladosporium fulvum* through recognition of a novel avirulence determinant. *Plant J*. **20**, 279-288.
324. Talukder, Z. I. (2002) Mapping quantitative trait loci for rice blast resistance : Stability across fungal isolates and leaf nitrogen environments. PhD Thesis (N° AB24 3UU), University of Aberdeen, Scotland, UK. 245 pp.

325. Temnyck, S., Park, W. D., Ayres, N., Cartinhour, S., Hauch, N., Lipovich, L. Cho, Y. C., Ishii, T. & McCouch, S. R. (2000) Mapping and genome organisation of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* **100**, 697-712.
326. Teng, P. S., Klein-Gebbinck, H. W. & Pinnschmidt, H. (1991) An analysis of the blast pathosystem to guide modeling and forecasting. *in* Rice blast modelling and forecasting. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp. 1-30.
327. Thangavelu, R. & Ramabadrán, R. (1992) Effect of humic acid (HA) on severity of rice blast (B1) *Int Rice Res Newsl* **17**, 18.
328. Tharreau, D. (1994) Etude génétique des interaction hôte-pathogène dans le cas du pathosystème *Oryza sativa* – *Magnaporthe grisea*. Thèse de Docteur ès Sciences (N° d'ordre 3150). Université Paris-Sud, Orsay, France. 86 pp.
329. Tharreau, D., Roumen, E., Lorieux, M., Price, A., Dioh, W., Ghesquière, A., Lebrun, M. H. & Notteghem, J. L. (2000) New tools for resistance gene characterisation in rice. Tharreau, D., Lebrun, M. H., Talbot, N. J. & Notteghem, J. L. (ed) Advances in rice blast research. Proceedings of the 2nd International Rice Blast Conference, 4-8 August 1998, Montpellier, France.
330. The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
331. Thompson J. N. & Burdon, J. J. (1992). Gene – for – gene coevolution between plants and parasites. *Nature* **360**, 121-125
332. Thomas, C. M., Jones, C. A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, P. J., Hatzixanthis, K. & Jones, J. D. (1997) Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *Plant Cell* **9**, 2209-2224.
333. Tokunaga, Y. & Furuta, T. (1959) Studies on rice blast disease of rice in humus-rich paddy fields, with special reference to soil conditions. 3. Influence of peat on the blast resistance of rice. *Ann Phytopath Soc Jpn*, **15**, 16-20.

334. Toriyama, K. (1975) Recent progress of studies on horizontal resistance in rice breeding for blast resistance in Japan. *in* Proceedings of the seminar on horizontal resistance to the blast disease of rice. CIAT, Cali, Colombia, pp. 65-100.
335. Tosa, Y., Tsujimoto, H. & Ogura, H. (1987) A gene involved in the resistance of wheat to wheat grass powdery mildew fungus. *Genome* **29**, 850-230.
336. Tosa, Y., Tokunaga, H. & Ogura, H. (1988). Identification of a gene for resistance to wheatgrass powdery mildew fungus in the common wheat cultivar chinese spring. *Genome* **30**, 312-314.
337. Tosa, Y. & Sakai, K. (1990) The genetics of resistance of hexaploid wheat to the wheat grass powdery mildew fungus. *Genome* **33**, 225-230.
338. Tosa, Y. & Tada, S. (1990) Operation of resistance genes in wheat to *Eryzyphe graminis* f. sp. *tritici* against *E. graminis* f. sp. *Agropyri*. *Genome* **33**, 231-234.
339. Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Hockenhull, R., Jackson, R. W., Sesma, A., *et al.* (2000) Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *AvrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *EMBO J* **19**, 3204-3214.
340. Tsunoda, Y., Nakamura, S., Jwa, N. S., Sasaki, N., Okabe, Y., Kodama, O. & Kawazaki, S. (1997) Characterization of cDNAs in the region of rice blast resistance gene *Pi-b*. *Breed Sci* **47** (supplement 2), 7. [en japonais]
341. Umehara, Y., Tanoue, H., Kurata, N., Ashikawa, I., Minobe, Y. & Sasaki, T. (1996) An ordered Yeast Artificial Chromosome library covering over half of rice chromosome 6. *Genome res* **6**, 935-942.
342. Ueyama, A. & Tsuda M. (1975) Formation of the perfect stage in culture of *Pyricularia* sp. from some gramineous plants. *Trans Mycol Soc Japan* **16**, 420-428.
343. Valent, B. (1990) Rice blast as a model system for plant pathology. *Phytopathology* **80**, 33-36

344. Valent, B., Farall, L. & Chumley, F. G. (1991) *Magnaporthe grisea* genes for pathogenicity and virulence identified through a series of backcrosses. *Genetics* **127**, 87-101.
345. van den Ackerveken, G. F., van Kan, J. A. & de Wit, P. J. (1992) Molecular analysis of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene – for – gene hypothesis. *Plant J* **2**, 359-366.
346. van den Ackerveken, G. F., Vossen, P. & de Wit, P. J. (1993) The *Avr9* race-specific elicitor of *Cladosporium fulvum* is processed by endogenous and plant proteases. *Plant Physiol* **103**, 91-96.
347. van den Ackerveken, G. F., van Kan, J. A., Joosten, M. H., Muisers, J. M., Verbakel, H. M. & de Wit P. J. (1993) Characterization of two putative pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 210-215.
348. van der Biezen, E. A. & Jones, J. D. G. (1998) Plant disease resistance proteins and the “gene – for – gene” concept. *Trends Biochem Sci* **23**, 454-456.
349. van der Hoorn, R. A. L., Laurent, F., Roth, R., & de Wit, P. J. G. M. (2000) Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of *Avr9* / *Cf-9*-induced and *Avr4* / *Cf4* -induced necrosis. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 439-446.
350. van der Hoorn, R. A. L., Kruijt, M., Roth, R., Branwagt, B. F., Joosten, M. H. A. J. & de Wit, P. J. G. M. (2001a) Intragenic recombination generated two distinct *Cf* genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10493-10498.
351. van der Hoorn, R. A. L., Roth, R. & de Wit, P. J. G. M. (2001b) Identification of distinct specificity determinants in resistance protein *Cf-4* allows construction of a *Cf-9* mutant that confers recognition of avirulence protein *Avr4*. *Plant Cell* **13**(2), 273-285.
352. van der Plank, J. E. (1968) *Disease Resistance in Plants*. London-New York: Academic press. 206 pp.

353. van der Vossen, E. A. G., Rouppe van der Voort J. N. A. M., Kanyuka, K., Bendahmane, A., Sandbrink, H., *et al.* (2000) Homologues of a single resistance gene cluster in potato confer resistance to distinct pathogens: a virus and a nematode. *Plant J.* **23**, 567-576.
354. van Kan, J. A., van den Ackerveken, G. F. & de Wit, P. J. (1991) Cloning and characterisation of cDNA of avirulence gene *Avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol Plant Microbe Interact* **4**, 52-59.
355. Vaughan, D. A. (1989) The genus *Oryza* L. Current status of taxonomy. IRRI research papers series **138**, 21pp.
356. Vervoort, J., van den Hooven, H. W., Berg, A., Vossen, P., Vogelsang, R., Joosten, M. H., A., J. & de Wit, P. J. G. M. (1997) The race specific elicitor AVR9 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: a cystine knot protein. Sequence-specific ¹H NMR assignments, secondary structure and global fold of the protein. *FEBS Lett* **404**, 153-158.
357. Wang, G. L., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R., Champoux, M. C. & Nelson, R. J. (1994) RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* **136**, 1421-1434.
358. Wang, G. L., Ruan, D. L., Song, W. Y., Sideris, S., Chen, L., *et al.* (1998) *Xa21D* encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**, 765-780.
359. Wang, Z. X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., *et al.* (1999) The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J* **19**:55-64.
360. Wang, Z. X., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Sasaki, T. & Yano, M. (2001) Expression of the *Pib* rice-blast-resistance gene family is up-regulated by environmental conditions favouring infection and by chemical signals that trigger secondary plant defences. *Plant Molecular biology* **47**, 653-661.
361. Wang, Z. X., Yano, M., Yamanouchi, U., Iwamoto, M., Monna, L., Hayasaka, H. & Sasaki, T. (1999) The *Pi-b* gene for blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J* **19**, 55-64.

362. Warren, R. F., Henk, A., Mowery, P., Holub, E. & Innes, R. W. (1998) A mutation within the leucine-rich repeat domain of the *Arabidopsis* disease resistance gene *RPS5* partially suppresses multiple bacterial and downy mildew resistance genes. *Plant Cell* **10**, 1439-1452.
363. Warren, R. F., Merritt, P. M., Holub, E. & Innes, R. W. (1999) Identification of three putative signal transduction genes involved in *R* gene-specified disease resistance in *Arabidopsis*. *Genetics* **152**, 401-412.
364. Wei, F., Govelman-Werner, K., Morrol, S. M., Kurth, J., Mao, L., *et al.* (1999) The *Mla* (powdery mildew) resistance cluster is associated with three NBS-LRR gene families and suppressed recombination within a 240 kb-DNA interval on chromosome 5s (1HS) of barley. *Genetics* **153**, 1229-1248
365. Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F. & Staskawisz, B. J. (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell* **3**, 49-59.
366. Whitham, S., McCormick, S. & Baker, B. (1996) The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8776-8781.
367. Williams, N. (1995) Closing in on the complete yeast genome sequence. *Science* **268**, 1560-1561.
368. Woloshuk, C. P., Sisler, H. D. & Vigil, E. L. (1983) Action of the antipenetrant, tricyclazole on appressoria of *Pyricularia oryzae*. *Physiol Plant Pathol* **22**, 245-251.
369. Wood J. R., Vivian, A., Jenner, C., Mansfield, J. W. & Taylor, J. D. (1994) Detection of a gene in pea controlling nonhost resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 534-537
370. Wu, K. S. & Tanksley, S. D. (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol gen Genet* **241**, 225-235.

371. Wu, K.S., Martinez, C., Lentini, Z., Tohme, J., Chumley, F. G., Scolnik, P. A. & Valent, B. (1996) Cloning a rice resistance gene by chromosome walking. *in* Rice genetics III. Kush, G. S. (ed). Proceedings of the third international rice genetics symposium. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp. 669-674.
372. Wulff, B. B. H., Thomas, C. M., Smoker, M., Ghrant, M. & Jones, J. D. G. (2001) Domain swapping and gene shuffling identify sequences required for induction of an *avr*-dependant hypersensitive response by the tomato Cf-4 and Cf-9 proteins. *Plant Cell* **13**, 255-272.
373. Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., *et al.* (2001) Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by *Rpw8*. *Science* **291**, 118-120.
374. Yaegashi, H. & Asaga, K. (1981) Further studies on the inheritance of pathogenicity in crosses of *Pyricularia oryzae* with *Pyricularia sp.* From finger millet. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **47**, 677.
375. Yamazaki, Y. & Kiyosawa, S. (1966) Studies of inheritance of resistance of rice varieties to blast, 1. Inheritance of resistance of Japanese varieties to several strains of the fungus. *Bull Natl Inst Agric Sci Series D14*, 39-69. [en japonais]
376. Yang, Y., Yuan, Q. & Gabriel, D. W. (1996) Watersoaking function(s) of XcmH1005 are redundantly encoded by members of the *Xanthomonas avr/pth* gene family. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 105-113
377. Yoder, O. C. (2002) A machanostic view of the fungal/plant interaction based on host-specific toxin studies. *in* Kohmoto, K. & Yoder, O. C. (éds.), Molecular genetics of host specific toxins in plant disease, Kluwer academic publishing, Netherlands. pp. 3-15.
378. Yoshimura, S., Yamanouchi, U., Katayose, Y., Toki, S., Wang, Z. Y., 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. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 1663-1668.
379. Young, N. D. (2000) The genetic architecture of resistance. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 285-290.

380. Yu, J., Hu, S., Wang, J., Li, S., Wong, K. S. G., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, W., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zheng, W., Tao, L., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Xia, H., Li, G., Gao, H., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Li, Z., Zhou, C., Chen, R., Hao, B., Zeng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., huang, G., Tao, M., Wang J., Zhu, L., Yuan, L., & Yang, H. (2001) A draft sequence of the rice (*Oryza sativa* ssp. *indica*) genome. *Chinese Sci Bull* **46**, 1937-1942.
381. Yu, J., Hu, S., Wang, J., Li, S., Wong, K. S. G., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, W., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zheng, W., Tao, L., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Xia, H., Li, G., Gao, H., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Li, Z., Zhou, C., Chen, R., Hao, B., Zeng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., huang, G., Tao, M., Wang J., Zhu, L., Yuan, L., & Yang, H. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* ssp. *indica*). *Science* **296**, 79-92.
382. Yu, Z. H., Mackill, D. J. & Bonman, J. M. (1987) Inheritance of resistance to blast in some traditional and improved rice cultivars. *Phytopathology* **77**, 323-326.
383. Yu, Z. H., Mackill, D. J., Bonman, J. M. & Tanksley, S. D. (1991a) Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. *Theor Appl Gen* **81**, 471-476.
384. Yu, Z. H., Mackill, D. J., Bonman, J. M. & Tanksley, S. D. (1991b) RFLP tagging of blast resistance genes in rice. *in* Rice Genetics II International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp. 451-458.

385. Yu, Z. H., Mackill, D. J., Bonman, J. M., McCouch, S. R., Guiderdoni, E., Notteghem, J. L. & Tanksley, S. D. (1996) Molecular mapping of genes for resistance to rice blast (*Pyricularia grisea* Sacc.). *Theor Appl Genet* **93**, 859-863.
386. Yucel, I., Midland, S. L., Sims, J. J. & Keen, N. T. (1994) Class I and Class II *avrD* alleles direct the production of different products in gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 148-150.
387. Yucel, I., Slaymaker, D., Boyd, C., Murillo, J., Buzzell, R. I. & Keen, N. T. (1994) Avirulence gene *avrPphC* from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 3121: a plasmid borne homologue of *avrC* closely linked to an *avrD* allele. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 677-679.
388. Yunoki, T., Ezuka, A., Morinaka, T., Sakurai, Y., Shinoda, H. & Toryama, K. (1970a) Studies on the varietal resistance of rice blast. 3. Testing method for field resistance on young seedlings grown in greenhouse. *Bull Chugoku Natl Agric Exp Station Series E* **6**, 21-41. [en japonais, résumé en anglais]
389. Yunoki, T., Ezuka, A., Morinaka, T., Sakurai, Y., Shinoda, H. & Toryama, K. (1970b) Studies on the varietal resistance of rice blast. 4. Variation of field resistance due to fungus strains. *Bull Chugoku Natl Agric Exp Station Series E* **6**, 21-41. [en japonais, résumé en anglais]
390. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7**, 203-214.
391. Zheng, K. L., Zhuang, J. Y., Lu, J., Qian, H. R. & Lin, H. X. (1996) Identification of DNA markers tightly linked to blast resistance genes in rice. in Rice genetics III. Kush, G. S. (ed). Proceedings of the third international rice genetics symposium. International Rice Research Institute, Los Baños, The Philippines, pp. 565-569.
392. Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Vale, G., *et al.* (2000) Cell-autonomous expression of barley *Mla1* confers race-specific resistance to the powdery mildew fungus via a *Rar1* independent signaling pathway. *Plant Cell* **13**, 337-350.

Bibliographie

393. Zhu, L. H., Chen, Y., Xu, Y. B., Xu, J. C., Cai, H. W. & Ling, Z. Z. (1993) Construction of a molecular map of rice and gene mapping using double haploid population of a cross between *indica* and *japonica* varieties. *Rice Genet Newsl* **10**, 132-135.
394. Zhu, Y., Chen, H., Fan, J., Wang, Y., Li, Y., Chen, J., Fan, J. X., Yang, S., Hu, L., Leung, H., Mew, T. W., Teng, P. S., Wang, Z. & Mundt, C. (2000) Genetic diversity and disease control in rice. *Nature* **406**, 718-722.

*

*

*

Annexes

Annexe 1 : Culture du riz en serre, préparation de l'inoculum, inoculation

a) Culture du riz en serre

Substrat :

Terreau (Neuhaus n°9)	7/8 ^{èmes}
Pouzzolane	1/8 ^{ème}

Les semis sont réalisés sur des terrines de semis de 30 × 50 × 7 cm. On sème 200 graines par terrine environ (8 rangs de 25).

Arrosage au goutte à goutte, léger en début de croissance (éviter l'anoxie des racines)

Fertilisation :

Premier apport 10 à 15 jours après semis, puis tous les 7 à 10 jours.

Solution nutritive :

Engrais NPK 17/7/22	1,5 g/l
Hortrillon (Oligo-éléments)	0,25 g/l
Chelate EDTA 6% Fe	0,25g/l

Le pH de la solution nutritive utilisée pour fertiliser les plantes issues de la C. I. V. a été ajusté à 6,2 avec de l'acide sulfurique concentré.

L'extraction d'ADN se fait sur des plantes âgées de 3 à 5 semaines.

Pour des multiplications, quelques plantes (au mieux, sept par lignée) sont repiquées individuellement dans des pots de 15 cm de diamètre.

b) Préparation de l'inoculum

Les souches de *M. grisea* sont cultivées 10 jours sur milieu farine de riz, à 28°C, avec une alternance de lumière et d'obscurité de 12h/12h. Afin de limiter l'évaporation, les boîtes sont scellées avec du ruban adhésif (Tesa[®] 5280).

Les spores sont prélevées en versant sur la boîte 5 ml d'eau stérile, puis en prélevant la suspension ainsi obtenue. Cette suspension est calibrée par comptage sur cellule de Malassez.

c) Inoculation, lecture des symptômes

L'inoculation se fait 20 à 30 jours après semis, soit au stade 3-4 feuilles.

Elle se fait par injection dans la gaine, à l'aide d'une seringue, de la suspension étalonnée à 25000 spores/mℓ décrite plus haut ; ou par pulvérisation, à l'aide d'un pistolet à air comprimé, d'une suspension à 50000 spores/mℓ dans une solution à 1% de gélatine (mouillant).

La lecture des symptômes se fait 7 à 10 jours après l'inoculation. Des notes sont attribuées aux symptômes à l'aide d'une échelle dérivée de celle de Notteghem (1981, *in* Tharreau, 1994) (cf. fig. B5, p. 90).

1	Pas de symptôme.
2	Lésions nécrotiques de diamètre inférieur à 2 millimètres.
3	Lésions à centre clair limitées par une bordure nécrotique
4	Lésions à centre grisâtre plus ou moins limitées
5	Lésions à centre gris et forme losangique typiques
6	Zones décolorées coalescentes non limitées par une bordure nécrotique

Annexe 2 : Milieux de culture pour les micro-organismes, antibiotiques.
--

a) Milieu LB

Bactotryptone	10 g/l	
Extrait de levure	5 g/l	
NaCl	10 g/l	
Agar	20 g/l	(Seulement pour LB solide)
H ₂ O	q.s.p.	1 l
Autoclavage 20 min à 120°C.		
Ajouts éventuels :		
Ampiciline (200mg/ml)	250 µl/l	
X-gal (20mg/ml)	800 µl/l	
Chloramphénicol (12,5mg/ml)	1 ml/l	

b) Milieu 2YT

Extrait de levure	10 g/l	
Tryptone	16 g/l	
NaCl	5 g/l	
Agar	20 g/l	(Seulement pour 2 YT solide)
H ₂ O	q.s.p.	1 l
Autoclavage 20 min à 120°C.		
Ajouts éventuels :		
Chloramphénicol (125mg/ml)	1 ml/l	

c) Milieu YPD

Il est utilisé pour la culture des levures (souches YAC).

Yeast extract	10 g	
Peptone	20 g	
Glucose	20 g	
Agar	20 g	(Seulement pour YPD solide)
H ₂ O q.s.p.	1 l	
Autoclavage 20 min à 120°C.		

d) Milieu « Farine de riz »

Il est utilisé pour cultiver les souches de *Magnaporthe grisea* au laboratoire

Agar	15 g
Farine	20 g
Extrait de levure	1,5 g

Annexe 3 : Protocoles d'extraction d'ADN

a) ADN plasmidique : miniprep lyse alcaline

Une colonie bactérienne contenant le plasmide d'intérêt est mise en culture 24h à 37°C en agitation dans 2 ml de milieu LB + ampicilline.

Récupérer les bactéries par centrifugation (3 mn, 10 000 g), puis les resuspendre dans 100 µℓ de tampon P1. Elles sont ensuite lysées dans 200µℓ de tampon P2.

L'ajout de 150µℓ de tampon P3 provoque la précipitation des protéines, des déchets cellulaires et des grands fragments d'ADN (i.e. de l'ADN génomique).

Après centrifugation (5 mn, 10 000 g, à 4°C), récupérer le surnageant. L'ajout de 1 ml d'éthanol pur provoque la précipitation de l'ADN plasmidique. Le récupérer par centrifugation (10 mn, 10 000 g, à 4°C).

Nettoyer le culot avec 1 ml d'éthanol à 70%, puis, après une nouvelle centrifugation, jeter le surnageant. Sécher ensuite le culot 5 min au Speedvac, puis le reprendre dans 50µℓ d'eau Merk + 0.5µℓ RNase à 10 mg/ml.

3µℓ d'ADN sont utilisés pour une restriction.

5µℓ d'ADN dilué 1000 fois suffisent pour une réaction de PCR de 25 µℓ.

Composition des tampons :

☼ P1 :

Tris/HCl	50 mM
EDTA	10 mM
pH	Ajusté à 8 avec HCl

☼ P2 :

NaOH	200 mM
SDS	1 %

☼ P3 :

Acétate de potassium 3 M, pH 5,5.

b) ADN BAC : protocoles d'extraction

Extraction petit volume (Choi *et* Wing, 2000) :

Préparer 5 ml de culture BAC dans du LB chloramphénicol (125 µg/ml). Laisser O/N à 37°C. Centrifuger la culture à 2000 ×g, 4°C, 15 min Jeter le surnageant, resuspendre le culot dans 0,2 ml de GTE glacial.

Transférer la suspension dans un tube de 1,5 ml. Mélanger un volume de solution NaOH et un volume de solution SDS. Ajouter 0,4 ml de mélange, mélanger par inversions, laisser 5 min sur la paillasse. Ce mélange lyse les bactéries.

Ajouter 0,3 ml de PAS et mélanger doucement. Les protéines et déchets cellulaires sont précipités, ainsi que l'ADN génomique.

Centrifuger le mélange 7 min à 12000 g, faire faire un demi-tour à chaque tube, centrifuger à nouveau 7 min à 12000g (ATTENTION pas de froid !). transférer 0,75 ml de surnageant sans déranger le culot vers un tube propre.

ajouter 0,6 volume d'isopropanol froid (0,45 ml) et centrifuger à 12 000 g pendant 15 min pour culoter l'ADN. Enlever le surnageant, rincer l'ADN avec de l'éthanol à 70 %, laisser le tube sécher à l'envers jusqu'à ce que le culot devienne transparent, ajouter 40 µl de TE.

Extraction grand volume (D'après Choi *et* wing, 2000) :

A partir de stock -80°C, préparer une préculture BAC de 3 ml LB. Incuber O/N à 37°C. Inoculer avec cette préculture 50 ml de LB chloramphénicol (125 µg/ml). Incuber O/N à 37°C. Centrifuger la culture à 8500 rpm, 4°C, 10 à 15 min Jeter le surnageant, resuspendre le culot dans 2 ml de GTE glacial.

Transférer la suspension dans un tube de 15 ml. Mélanger un volume de solution NaOH et un volume de solution SDS. Ajouter 4 ml de mélange, mélanger par inversions, laisser 5 min sur la paillasse.

Ajouter 3 ml PAS et mélanger doucement. Centrifuger le mélange 15 min à 10 000 rpm. Retourner le tube et centrifuger de nouveau 5 min à 10 000 rpm (ATTENTION pas de froid !). Transférer 8 ml de surnageant sans déranger le culot vers un tube propre.

Ajouter 0,6 volume d'isopropanol froid (5 ml) et centrifuger à 330 rpm pendant une heure dans une centrifugeuse à godets mobiles pour culoter l'ADN. Enlever le surnageant, rincer l'ADN avec 1 ml d'éthanol à 70%, laisser le tube sécher à l'envers jusqu'à ce que le culot devienne transparent

Ajouter 400µl de TE. Laisser O/N sur agitateur pendulaire. Transférer vers un microtube.

Solutions :

☉ GTE :		☉ Solution NaOH : 0,4 N	
Glucose	1,8 g	NaOH paillettes	16 g
Tris HCl 1 M pH 8.0	5 ml	H ₂ O	q.s.p. 1 ℓ
EDTA 0.5 M pH 8.0	4 ml	☉ Solution SDS :	
RNase	0,1 mg/ml	SDS 20%	10 ml
ddH ₂ O	q.s.p. 200 ml	ddH ₂ O	90 ml
☉ PAS :		☉ 5M Potassium acetate :	
5M Potassium acétate	60 ml	Acétate de potassium	98 g
acide acétique glacial	28,5 ml	H ₂ O q.s.p.	200 ml
ddH ₂ O	11,5 ml		
pH	4,8-5,2		

c) maxiprep d'ADN génomique bactérien (D'après Gabriel et De Feyter, 1992)

A partir de stock -80°C , préparer une préculture de 3 ml LB chloramphénicol. Incuber O/N à 37°C . Inoculer avec cette préculture 900 ml de LB chloramphénicol (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Incuber O/N à 37°C .

Centrifuger 300 ml de culture dans six tubes 50 ml 8500 rpm, 4°C , 5 min Jeter le surnageant. Ajouter 50 ml de culture fraîche dans chaque tube, centrifuger de même, jeter le surnageant, répéter l'opération une troisième fois.

Resuspendre les six culots dans 33 ml de tampon A par tube. Centrifuger 5 min à 8500 rpm. Resuspendre les culots dans 20 ml de tampon A par tube.

Ajouter 300 μl de protéinase K à 20 mg/ml, puis 1 ml de SDS à 20%.

Incubation 1h à 50°C .

Ajouter 21 ml de CIAA. Mélanger puis placer les tubes 10 min dans de la glace. Les centrifuger ensuite 15 min à 8500 rpm.

Récupérer le surnageant. Ajouter 21 ml de CIAA. Mélanger puis placer les tubes 10 min dans de la glace. Les centrifuger ensuite 15 min à 8500 rpm.

Ajouter 2 ml D'acétate de sodium 3 M par tube, puis 13 ml d'isopropanol. De très grosses pelotes blanches se forment. Les placer dans un seul tube de 50 ml contenant 40 ml d'éthanol à 70%.

Laver la pelote dans 10 ml de solution de lavage 1 une minute, puis dans 10 ml de solution de lavage 2 quelques secondes. La sécher sur un kimwipe. La resuspendre 48h dans 4 ml H₂O.

Diviser la suspension en deux lots de 2 ml dans des tubes de 10 ml. Ajouter 4 ml de tampon 2 par tube

Ajouter 3 ml de PCIAA, mélanger, centrifuger 15 min à 8500 rpm.

Récupérer la phase aqueuse, ajouter 3 ml de CIAA, centrifuger 15 min à 8500rpm.

Récupérer la phase aqueuse, y ajouter 0,6 volume d'isopropanol

Récupérer les pelotes, les laver dans 10 ml de solution de lavage 1 une min, puis dans 10 ml de solution de lavage 2 quelques secondes. Les sécher sur un kimwipe. Les resuspendre 48h dans 4 ml H₂O.

Concentration obtenue : 1 µg/µl, soit une quantité totale d'ADN de 4 mg.

Solutions :

☉ Tampon 1 :

EDTA	9,5 g (50 mM)
Tris	3,03 g (50 mM)
NaCl	4,9 g (150 mM)
H ₂ O milliQ	q.s.p. 500 ml

☉ Tampon 2 :

MATAB	10g/l
NaCl	1,5 M

☉ Solution de lavage 1 :

Ethanol absolu	76 ml
Acétate de sodium 3M	6.6 ml
H ₂ O milliQ	17.4 ml

☉ Solution de lavage 2 :

Ethanol absolu	76 ml
Acétate d'ammonium 1M	1 ml
H ₂ O milliQ	23 ml

☉ CIAA

Chlorophorme	240 ml
Acool Isoamylique	10 ml

☉ PCIAA

CIAA	100 ml
Phénol saturé de Tris	100 ml

d) Extraction d'ADN végétal (Hoisington *et al.*, 1994)

Broyer 5 g de feuilles de riz de la lignée considérée dans de l'azote liquide, puis les placer dans un tube Corning[®] de 50 ml. Ajouter 27 ml de tampon d'extraction à 65°C, puis placer le tube 90 min au bain marie à 65°C, avec agitation.

Ajouter 13 ml de CIAA, et agiter doucement le tube par inversions pendant 10 min. Centrifuger le mélange 10 min à 1500g, puis récupérer la phase supérieure en la transférant vers un tube Corning[®] propre. On lui fera subir le même traitement : ajout de CIAA, agitation, centrifugation, transfert du surnageant.

Ajouter 50 µl de RNaseT1 à 0,05 U/µl, puis placer le tube 30 min à 37°C.

Ajouter ensuite 18 ml (0,6 vol.) d'isopropanol, et mélanger doucement jusqu'à obtention de la pelote d'ADN. La pêcher avec un crochet de verre.

Plonger ensuite la pelote 20 min dans un tube contenant 1 ml de solution de lavage 1, puis quelques secondes dans un tube contenant 1 ml de solution de lavage 2, puis enfin, sécher délicatement la pelote avec un kimwipe[®].

L'ADN est repris dans 500 µl de TE.

Solutions :

☉ Tampon d'extraction :

Tris HCl 1M pH 7.5	100 ml
NaCl 5M	140 ml
EDTA 0.5M pH 8	100 ml
MTAB	10 g
Sulphite de sodium	2.5 g
H ₂ O milliQ	650 ml

☉ Solution de lavage 1 :

Ethanol absolu	76 ml
Acétate de sodium 3M	6.6 ml
H ₂ O milliQ	17.4 ml

☉ Solution de lavage 2 :

Ethanol absolu	76 ml
Acétate d'ammonium 1M	1 ml
H ₂ O milliQ	23 ml

☉ CIAA

Chloroforme	240 ml
Acool Isoamylique	10 ml

e) Extraction de l'ADN génomique de levure

Nota : Ce protocole ne permet pas d'obtenir des chromosomes entiers. En conséquence, il n'est pas possible de séparer les YAC des chromosomes naturels de la levure.

Faire une préculture de 1 ml de la souche dans du YPD liquide, 48h à 28°C, sur une table agitante. Mettre au congélateur : Ethanol 100%, Ethanol 70%, Isopropanol 100%, isopropanol 50%

Inoculer avec cette préculture 30 ml de YPD liquide. Incuber 48h à 28°C, sous agitation. Préparer la solution YAC A, régler le bain marie sur 37°C, y faire fondre la solution YAC 1.

Transférer 30 ml de culture dans un tube de 50 ml, centrifuger 5 min à 2200 g (4000 rpm). Le culot est rose - brun, peu compact.

Éliminer le surnageant en retournant le tube, resuspendre la levure dans 10 ml H₂O. La suspension se fait facilement, elle est rose. La centrifuger 5 min à 2200 g (4000 rpm), éliminer le surnageant par retournement. Le culot est rose, peu compact.

Resuspendre le culot dans 3 ml de solution YAC 1. Transférer la solution vers un tube de 10 ml

Ajouter 200 µl de solution YAC A. Mettre au bain marie à 37°C pendant 40 min, en remuant de temps en temps. Régler ensuite le bain marie sur 65°C.

Centrifuger 5 min à 5 000 ×g, 4°C. Éliminer le surnageant (rosé) et resuspendre le culot de sphéroblastes (rose sombre) dans 3 ml de solution YAC 3 (pas de vortex).

Ajouter 150 µl de SDS 20%. Placer au bain marie à 65°C, 30 min

Ajouter 1 ml de solution YAC 4. Agiter et placer dans la glace 60 min au minimum. Centrifuger 30 min à 10 000 ×g (8000 rpm) 4°C. Le culot est blanc sale, peu compact. Le surnageant est rose, une partie du précipité flotte encore

Récupérer le surnageant, et le transférer vers un nouveau tube de 10 ml. Ajouter 4,3 ml de PCIAA (25 vol phénol, 1 vol alcool isoamylique, 24 vol chloroforme). Mélanger doucement par inversion pendant quelques instants. Centrifuger 20 min à 5000 rpm. Le

PCIAA n'a pas changé d'aspect, la phase aqueuse est moins rose, il n'y a plus de particules en suspension, un précipité se trouve entre les deux phases.

Récupérer la phase supérieure, y ajouter 4,3 ml de CIAA. Centrifuger de même (20 min, 5000 rpm)

Récupérer la phase aqueuse, y ajouter 4 ml d'éthanol 100% glacé, mélanger doucement, centrifuger 30 min à 8500 rpm (10 000 ×g). Un culot se forme, rose au centre

Éliminer le surnageant. Laver le culot avec 5 ml d'éthanol 70% glacé. Centrifuger 15 min à 10 000 ×g (8500 rpm)

Sécher le culot 5 à 10 min dans une cloche à vide. Il se décolle du tube et est irisé.

Resuspendre le culot dans 3 ml de TE, 30 min sur la table agitante. On constate que le TE devient légèrement rosé.

Ajouter 20 µl de RNase. Incuber 30 min à 37°C.

Ajouter 3 ml d'isopropanol glacé. Mélanger doucement, centrifuger 30 min à 8500 rpm (10 000 ×g). Éliminer le surnageant. On ne voit pas le culot.

Ajouter 5 ml d'isopropanol 50% glacé. Mélanger doucement, centrifuger 15 min à 8500 rpm (10 000 ×g). Éliminer le surnageant.

Sécher 5 à 10 min à la cloche à vide.

resuspendre le culot dans 500 µl de TE. Conserver à +4°C

Rendement observé : 30 ng/µl, soit 15 µg en tout.

Solutions :

☉ YAC A

0,4 ml de YAC 2 par mg de zymolyase
Il faut 0,5 mg de zymolyase par extraction

☉ YAC 3

Tris HCl pH 8	50 mM
EDTA	50 mM

☉ YAC 1

Sorbitol	900 mM
EDTA	100 mM
DTT	60 mM

☉ YAC 4

Acétate de potassium	5 M
----------------------	-----

☉ YAC 2

Sorbitol	900 mM
----------	--------

☉ TE

Tris – HCl pH8	10 mM
EDTA	1 mM

f) Extraction grossière d'ADN à partir d'un morceau de gel d'agarose

Coloration du gel d'agarose au BET, visualisation sous lumière U.V., découpage de la bande d'intérêt.

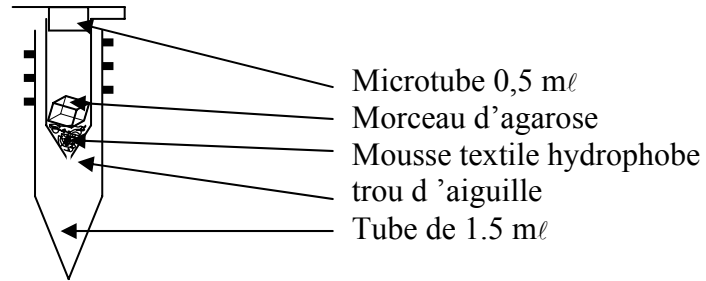
Un tube de 0,5 ml est percé en son fond d'un petit trou à l'aide d'une aiguille de seringue.

Une petite boule de textile hydrophobe (type mousse pour filtre d'aquarium) est placée au fond de ce tube percé, ainsi que le morceau d'agarose.

Le microtube percé est placé dans un tube de 1,5 ml avec un bouchon à vis.

Ce montage, montré page suivante, est centrifugé 30 s à 10 000 rpm.

Le liquide recueilli dans le tube à vis contient l'ADN d'intérêt, plus de nombreuses impuretés... Il peut être utilisé pour synthétiser une sonde radioactive selon le protocole indiqué en annexe 4.



Montage pour l'extraction grossière d'ADN d'un gel d'agarose

*

*

*

Annexe 4 : amplification PCR de séquences connues
--

a) Mélanges PCR

Pour une réaction de 25 $\mu\ell$, oligonucléotides non dégénérés :

Tampon PCR 10 \times *	2,5 $\mu\ell$
DNTP's (10 mM chacunes)	2 $\mu\ell$
Oligonucléotide 1 (10 μM)	0,5 $\mu\ell$
Oligonucléotide 2 (10 μM)	0,5 $\mu\ell$
MgCl ₂ (15mM)	0,25 $\mu\ell$
Taq Polymérase 2U/ $\mu\ell$	0,5 $\mu\ell$
H ₂ O Merk	q.s.p. 25 $\mu\ell$

Pour vérifier leur pureté, les amplifiats sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis coloration au bromure d'éthidium.

Les amplifiats des marqueurs microsatellites sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 4 % puis coloration au bromure d'éthidium. L'utilisation de tels gels donne le plus souvent une résolution du polymorphisme de longueur suffisante (jusqu'à 6 paires de bases de différence).

Pour une réaction de 100 $\mu\ell$ (PCR préparative)

Le mélange est le même : les volumes sont quadruplés

L'intégralité de ce volume est utilisée pour une électrophorèse sur gel à 2% d'agarose à bas point de fusion, puis la zone du gel correspondant à l'ADN de longueur prévue est prélevée au moyen d'une lame de scalpel.

Pour une réaction de 25 $\mu\ell$ avec des oligonucléotides dégénérés :

Tampon Eurobio 10 \times *	2,5 $\mu\ell$
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 $\mu\ell$
dNTP (2,5 mM)	0,5 $\mu\ell$
Oligonucléotide 1 (10 μM)	2 $\mu\ell$
Oligonucléotide 2 (10 μM)	2 $\mu\ell$
Taq 2 U/ $\mu\ell$	1 $\mu\ell$
H ₂ O Merck q.s.p.	25 $\mu\ell$

b) ADN

ADN génomique : 5 $\mu\ell$ à 1 ng/ $\mu\ell$.

ADN plasmidique : 1 $\mu\ell$ de mini prep lyse alcaline diluée 1 000 fois.

ADN BAC : 1 $\mu\ell$ de culture liquide (24h, 37°C sur table d'agitation, milieu LB + chloramphénicol) ou 5 $\mu\ell$ d'ADN dilué 100 fois.

* Tampon PCR 10 \times : Tris-HCl 200mM (pH 8,4), KCl, 500mM

* Tampon Eurobio 10 \times : 670 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 160 mM (NH₄)₂ SO₄, 0,1% Tween 20

c) Cycle

A la température d'annealing près, toutes les réactions PCR avec des oligonucléotides non dégénérés ont suivi le même cycle.

Cycle d'amplification (oligonucléotides non dégénérés) :

95°C	5 min	} 35 cycles
95°C	30 s	
T° annealing	30 s	
72°C	30 s	
72°C	3 min	
4°C	∞ (conservation)	

Cycle d'amplification (oligonucléotides dégénérés) :

95°C	5 min	} 14 cycles
95°C	30 s	
62°C à 55°C (0,5°C de moins par cycle)	45 s	
72°C	1 min 30 s	
95°C	30 s	} 30 cycles
55°C	45 s	
72°C	1 min 30 s	
72°C	5 min	
4°C	∞ (conservation)	

d) Oligonucléotides utilisés

Marqueurs RFLP

G1010 : $T_a = 55^\circ\text{C}$

GAU : CCAAGTATTCTAGCTCTGCTGTC

GAL : TGCTAGAGATTTGAGAAGATGG

R1813 : $T_a = 50^\circ\text{C}$

R1U : TACAATGAGCCTGAGCAGA

R1L : AACTGGGTGAAGACGGCAA

T19 : $T_a = 50^\circ\text{C}$

T19U : TGTTCAGACATTTAGCGTC

T19L : GGATGAGCATAGTATGACTT

S10038C : $T_a = 50^\circ\text{C}$

SCU : GGAGTTCTGAAAGAGGGAGTC

SCL : GCTCTCATCAGGAACTCTGG

Os-r6.3 : $T_a = 60^\circ\text{C}$

R6U3 : GAATGCCATGCTTGGGTCTC

R6L3 : CTGTCAGTTTTGTGGGACGC

S1633 : $T_a = 60^\circ\text{C}$

S163U : TCGCCGCACTTTCTCCA

S163L : CCGACCCTCTCGCGTACTT

C483 : $T_a = 60^\circ\text{C}$

C483U : CACCCACACCGACTAGATAC

C483L : GACCTTATGACTGCTCCATT

E4472S : $T_a = 56^\circ\text{C}$

E4472SU : CGACGAGTGCCAGTTAGGTG

E4472SL : CCGTTACAACACATCGACACAC

C0392SB : $T_a = 46^\circ\text{C}$

C0392SBU : CCTCCGGCGAGAAGGATAAG

C0392SBL : CTTGGATCTGCGCCTCAACG

C1251S $T_a = 50^\circ\text{C}$

C1251SU : CAGAGGCTTTTCTTCTGTTA

C1251SL : CACTGTAAACACAGGCCAAG

Marqueurs Microsatellites

RM44 : $T_a = 55^\circ\text{C}$

RM44U : ACGGCAATCCGAACAACC

RM44L : TCGGGAAAACCTACCCTACC

RM72 : $T_a = 55^\circ\text{C}$

RM72U : CCGGCGATAAAACAATGAG

RM72L : GCATCGGTCCTAACTAAGGG

RM310 : $T_a = 55^\circ\text{C}$

RM310U : CCAAAACATTTAAAATATCATG

RM310L : GCTTGTTGGTCATTACCATTC

RM330B : $T_a = 55^\circ\text{C}$

RM330BU : CAATGAAGTGGATCTCGGAG

RM330BL : CATCAATCAGCGAAGGTCC

RM404 : $T_a = 55^\circ\text{C}$

RM404U : CCAATCATTAACCCCTGAGC

RM404L : GCCTTCATGCTTCAGAAGAC

RM483 : $T_a = 55^\circ\text{C}$

RM483U : CTTCCACCATAAAACCGGAG

RM483L : ACACCGGTGATCTTGTAGCC

RM547 : $T_a = 55^\circ\text{C}$
RM547U : TAGGTTGGCAGACCTTTTCG
RM547L : GTCAAGATCATCCTCGTAGCG

Marqueurs d'extrémités de contig

89O21f : $T_a = 55^\circ\text{C}$ (OSJNBa00 89O21, forward)
2DF2AU : TTTGCATCCTCCGTTCTCC
2DF2AD : GACTACCCCCATTCAAAGA

53M18f : $T_a = 55^\circ\text{C}$ (OSJNBa00 53M18, forward)
2GF4AU : AAATAATTCAAACACTGTA
2GF4AD : CATTCCAACAAAGTGAGAT

57H10r : $T_a = 55^\circ\text{C}$ (OSJNBa00 57H10, reverse)
3GR3AU : AGTTCCGTGCTTCTTGATTA
3GR3AD : CTGTATTCTGTAGTGGTTTC

29M11r : $T_a = 55^\circ\text{C}$ (OSJNBa00 29M11, reverse)
1033G1RU : ATTTGATCGCATCGTTAAGC
1033G1RL : TGTCTGTTCATGGATGCTGC

b61D10f : $T_a = 55^\circ\text{C}$ (OSJNBb00 41N09, forward)
440DBfU3 : ATATGCTTTGATCCAAACTG
440DBfL3 : CGTAGCATTCTCAGTTAATC

Oligonucléotides dégénérés pour la recherche de RGA

Séquence NBS :
RGZs : GGIGGIGTIGGIAAIACIAC
RGZAsb : IAGIGCIAGIGGIAGICC

Séquence *Pto*-like kinase :
P3 : TNGGISAIGGIGKITTYGG
P2r : ACICCRAAIGARTAIACRTC

Signification du code dégénéré :
S : C ou G
K : G ou T
Y : T ou C
R : A ou G
I : Inosine

Annexe 5 : Ligation, transformation par choc thermique.**a) Ligation**

La ligation est réalisée dans le mélange réactionnel suivant :

Vecteur pGEM [®] -T easy (50 ng/ $\mu\ell$)	1 $\mu\ell$
Tampon de ligation 2 \times	5 $\mu\ell$
Ligase phage T4 (1U/ $\mu\ell$)	1 $\mu\ell$
H ₂ O q. s. p.	10 $\mu\ell$
ADN q. s. p.	50 ng

Le mélange réactionnel est incubé une nuit à 4°C.

b) Transformation

Les tubes contenant 100 $\mu\ell$ de cellules super compétentes DH 5 α sont mises à décongeler dans la glace et 5 $\mu\ell$ de mélange de ligation sont ajoutés par tube. Après une incubation de 30 min dans la glace, les cellules sont soumises à un choc thermique : 45 secondes à 42°C, puis deux min dans la glace.

Les bactéries sont alors mises 1h à 37°C sous agitation dans 1 ml de milieu SOC afin de permettre l'expression phénotypique des plasmides au sein des bactéries transformées. 200 $\mu\ell$ de bactéries sont ensuite étalés sur milieu solide LB + Ampicilline (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) + X-Gal (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les colonies transformées génèrent des colonies blanches après 24h d'incubation à 37°C.

Annexe 6 : Séquences des marqueurs G1010, R1813, , S10038C, Os.r6, C483.

a) Sonde G1010

G1010a : séquence publiée.

Nipponbare, Azucena, IR64 : séquence de l'insert amplifié et cloné dans la variété considérée.

Zones : SP6, T7 : séquences flanquantes chez pGEM[®]-T, GAU, GAL : amorces PCR (cf. annexe 2)

	1					50
g1010a	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Nipponbare	---CTATGCA	TCCAACGCGT	TGGGAGCTCT	CCCATATGGT	CGACCTGCAG	
Azucena	---CTATGCA	TCCAACGCGT	TGGGAGCTCT	CCCATATGGT	CGACCTGCAG	
IR64	---CTATGCA	TCCAACGCGT	TGGGAGCTCT	CCCATATGGT	CGACCTGCAG	
Consensus	---ctatgca	tccaacgcgt	tgggagctct	cccatatggt	cgacctgcag	
Zone		SP6				
	51					100
g1010a	-----	-----AAG	CTTTAA	CCAA	GTNATTCTAGC	TCTGCTGTC
Nipponbare	GCGGCCGCG-	-AATTCACTA	GTGATT	CCAA	GT-ATTCTAGC	TC-GCTGTC
Azucena	GCGGCCGCG-	-AATTCACTA	GTGATT	CCAA	GT-ATTCTAGC	TC-GCTGTC
IR64	GCGGCCGCG	TAATTCACTA	GTGATT	CCAA	GT-ATTCTAGC	TC-GCTGTC
Consensus	gc-g-c----	-aattcActa	gTgAtt	CcAa	gt-ATTCTAGC	TC-GCTGTC
Zone	SP6				GAU	
	101					151
g1010a	TCAGACGNGTT	CTCTCAATGG	CTGCAAGTCC	CAGAATTCTG	GATTTAAGAG	
Nipponbare	TCAGACGAGTT	CTCTCAATGG	CTGCAAGTCC	CAGAATTCTG	GATTTAAGAG	
Azucena	TCAGACGAGTT	CTCTCAATGG	CTGCAAGTCC	CAGAATTCTG	GATTTAAGAG	
IR64	TCAGACGAGTT	CTCTCAATGG	CTGCAAGTCC	CAGAATTCTG	GATTTAAGAG	
Consensus	TCAGACGaGTT	CTCTCAATGG	CTGCAAGTCC	CAGAATTCTG	GATTTAAGAG	
Zone			G1010			
	151					200
g1010a	ATTTCCGAAG	GGACTGTTCT	GCATCTGACA	AAGTTCTTTC	CTCTTGGGCT	
Nipponbare	ATTTCCGAAG	GGACTGTTCT	GCATCTGACA	AAGTTCTTTC	CTCTTGGGCT	
Azucena	ATTTCCGAAG	GGACTGTTCT	GCATCTGACA	AAGTTCTTTC	CTCTTGGGCT	
IR64	ATTTCCGAAG	GGACTGTTCT	GCATCTGACA	AAGTTCTTTC	CTCTTGGGCT	
Consensus	ATTTCCGAAG	GGACTGTTCT	GCATCTGACA	AAGTTCTTTC	CTCTTGGGCT	
Zone			G1010			
	201					250
g1010a	ACATCAAGCT	GATAAACTAC	CTCGTTGGCA	ATGATCAACT	GCAATCTTAT	
Nipponbare	ACATCAAGCT	GATAAACTAC	CTCGTTGGCA	ATGATCAACT	GCAATCTTAT	
Azucena	ACATCAAGCT	GATAAACTAC	CTCGTTGGCA	ATGATCAACT	GCAATCTTAT	
IR64	ACATCAAGCT	GATAAACTAC	CTCGTTGGCA	ATGATCAACT	GCAATCTTAT	
Consensus	ACATCAAGCT	GATAAACTAC	CTCGTTGGCA	ATGATCAACT	GCAATCTTAT	
Zone			G1010			

	251				300		
g1010a	GTCTCCAATT	TTTGTAGCTT	T	CCATCTTCT	CAAATCTCTA	GCA	AGTCTTT
Nipponbare	GTCTCCAATT	TTTGTAGCTT	T	CCATCTTCT	CAAATCTCTA	GCA	AATCGAA
Azucena	GTCTCCAATT	TTTGTAGCTT	T	CCATCTTCT	CAAATCTCTA	GCA	AATCGAA
IR64	GTCTCCAATT	TTTGTAGCTT	T	CCATCTTCT	CAAATCTCTA	GCA	AATCGAA
Consensus	GTCTCCAATT	TTTGTAGCTT	T	CCATCTTCT	CAAATCTCTA	GCA	AaTCgaa
Zone		G1010			GAL		T7

	301				346	
g1010a	TTA-----	-----	----	GTTTTA	GATGAAGTCT	TACA--
Nipponbare	TTCCCGCGGC	CGCCATGGCG	GCCGGGAGCA	TGCGACGTCG	GGCCCT	
Azucena	TTCCCGCGGC	CGCCATGGCG	GCCGGGAGCA	TGCGACGTCG	GGCCCT	
IR64	TTCCCGCGGC	CGCCATGGCG	GCCGGGAGCA	TGCGACGTCG	GGCCCT	
Consensus	TTcccgcggc	cgccatggcg	gccgGgagcA	tgcGAcGTCg	ggCcc-	
Zone			T7			

b) Sonde R1813

R1813 : séquence publiée.

Nipponbare, Azucena : séquence de l'insert amplifié et cloné dans la variété considérée.

Zones : R1U, R1L : amorces PCR (cf. annexe 2). Il est à noter que les inserts séquencés présentent un remaniement complexe de la zone correspondant à l'amorce R1U.

	1				30
R1813	-----C	CTG	TACAA		-----
Nipponbare	ATTCTTTTTTA	TTG	T-CAA	G	ATTCTTGTTT
Azucena	-----	---	----	-	ATTCTTGTTT
Consensus	-----	---	TACAA	-	-----
Zone	?	?	?	R1U	?

	31				78
R1813	-----	-----	TG	AGCCTGA	--- (CAAT)
Nipponbare	GATTTGAGTC	GCTTAATT	TG	AGCGTGA	CTT GCCTAGAATT ATTTTCAAT
Azucena	GATTTGAGTC	ACTTAATT	TG	AGCCTGA	CTT GCCTAGAATT ATTTTCAAT
Consensus	-----	-----	---	---	-----
Zone	?	?	?	R1U	?

	79				110
R1813	GCAGA	CTCCAAG	AATTGTGTCT	CTGCTCTCTG	
Nipponbare	GCAGA	CTCCAAG	AATTGTGTCT	CTGCTCTCTG	
Azucena	GCAGA	CTCCAAG	AATTGTGTCT	CTGCTCTCTG	
Consensus	GCAGA	CTCCAAG	AATTGTGTCT	CTGCTCTCTG	
Zone	R1U			R1813	

	111				160
R1813	AATCATATAA	TCCGCATGTC	CGTTATGGTG	CCGCTTTAGC	TGTTGGAATA
Nipponbare	AATCATATAA	TCCGCATGTC	CGTTATGGTG	CCGCTTTAGC	TGTTGGAATA
Azucena	AATCATATAA	TCCGCATGTC	CGTTATGGTG	CCGCTTTAGC	TGTTGGAATA
Consensus	AATCATATAA	TCCGCATGTC	CGTTATGGTG	CCGCTTTAGC	TGTTGGAATA
Zone			R1813		

	161				200
R1813	TCCTGTGCAG	GAACAGGATT	AAGTGATGCC	ATCTCCTTGT	
Nipponbare	TCCTGTGCAG	GAACAGGATT	AAGTGATGCC	ATCTCCTTGT	
Azucena	TCCTGTGCAG	GAACAGGATT	AAGTGATGCC	ATCTCCNTGT	
Consensus	TCCTGTGCAG	GAACAGGATT	AAGTGATGCC	ATCTCCTTGT	

Annexes

	Zone	R1813					
		201					250
	R1813	TGGAGCCTCT	TACATCTGAT	GTTGTTGACT	TCGTGCGGCA	AGGTGCTCTC	
	Nipponbare	TGGAGCCTCT	TACATCTGAT	GTTGTTGACT	TCGTGCGGCA	AGGTGCTCTC	
	Azucena	TGGAGCCTCT	TACATCTGAT	GTTGTTGACT	TCGTGCGGCA	AGGTGCTCTC	
	Consensus	TGGAGCCTCT	TACATCTGAT	GTTGTTGACT	TCGTGCGGCA	AGGTGCTCTC	
	Zone	R1813					
		251					290
	R1813	ATTGCAATGG	CAATGGTCAT	GATCCAAACT	AATGAATCAT		
	Nipponbare	ATTGCAATGG	CAATGGTCAT	GATCCAAACT	AATGAATCAT		
	Azucena	ATTGCAATGG	CAATGGTCAT	GATCCAAACT	AATGAATCAT		
	Consensus	ATTGCAATGG	CAATGGTCAT	GATCCAAACT	AATGAATCAT		
	Zone	R1813					
		291					340
	R1813	ATGACTCTCG	TGTTGGAACA	TTCAGGCGTC	AGTTGGAAAA	GATCATTCTC	
	Nipponbare	ATGACTCTCG	TGTTGGAACA	TTCAGGCGTC	AGTTGGAAAA	GATCATTCTC	
	Azucena	ATGACTCTCG	TGTTGGAACA	TTCAGGCGTC	AGTTGGAAAA	GATCATTCTC	
	Consensus	ATGACTCTCG	TGTTGGAACA	TTCAGGCGTC	AGTTGGAAAA	GATCATTCTC	
	Zone	R1813					
		341					390
	R1813	GACAAGCATG	AGGACACCAT	GAGCAAAATG	GGTGCCATAA	TGGCTACTGG	
	Nipponbare	GACAAGCATG	AGGACACCAT	GAGCAAAATG	GGTGCCATAA	TGGCTACTGG	
	Azucena	GACAAGCATG	AGGACACCAT	GAGCAAAATG	GGTGCCATAA	TGGCTACTGG	
	Consensus	GACAAGCATG	AGGACACCAT	GAGCAAAATG	GGTGCCATAA	TGGCTACTGG	
	Zone	R1813					
		381					430
	R1813	TATCCTTGAT	GCTGGTGGTA	GGGACGTTAC	CATCAGGCTT	CAGTCCAGGT	
	Nipponbare	TATCCTTGAT	GCTGGTGGTA	GGAACGTTAC	CATCAGGCTT	CAGTCCAGGT	
	Azucena	TATCCTTGAT	GCTGGTGGTA	GGAACGTTAC	CATCAGGCTT	CAGTCCAGGT	
	Consensus	TATCCTTGAT	GCTGGTGGTA	GGAACGTTAC	CATCAGGCTT	CAGTCCAGGT	
	Zone	R1813					
		431					482
	R1813	CAAAGCATGA	CAAGCTGACT	GCTGTTGTTG	GCC	TTGCCGT	CTTCACCCAG TT
	Nipponbare	CAAAGCATGA	CAAGCTGACT	GCTGTTGTTG	GCC	TTGCCGT	CTTCACCCAG TT
	Azucena	CAAAGCATGA	CAAGCTGACT	GCTGTTGTTG	GCC	TTGCCGT	CTTCACCCAG TT
	Consensus	CAAAGCATGA	CAAGCTGACT	GCTGTTGTTG	GCC	TTGCCGT	CTTCACCCAG TT
	Zone	R1813					

c) Sonde S10038C

S10038C : séquence publiée.

Nipponbare, Azucena, IR64 : séquence de l'insert amplifié et cloné dans la variété considérée.

Zones : SP6, T7 : séquences flanquantes chez pGEM[®]-T, SCU, SCL : amorces PCR (cf. annexe 2).

		1						50
	S10038c	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	Azucena	-----CCC	AACGCGTTGG	G-AGCTCTCC	CATATGGTCG	ACCTGCAGGC		
	Nipponbare	CTATGCATCC	AACGCGTTGG	GCAGCTCTCC	CATATGGTCG	ACCTGCAGGC		
	IR64	-TATGCATCC	AACGCGTTGG	G-AGCTCTCC	CATATGGTCG	ACCTGCAGGC		
	Consensus	-----cc	aacgcgttgg	g-agctctcc	catatggtcg	acctgcaggc		

Annexes

	Zone		SP6					
		51					100	
	S10038c	-----	----TTTTTT	TT	GCTCTCAT	CAGGAAACTC	TGG	AATGCAT
	Azucena	GGCCGCGAAT	TCAC TAGTGA	TT	GCTCTCAT	CAGGAAACTC	TGG	AATGCAT
	Nipponbare	GGCCGCGAAT	TCAC TAGTGA	TT	GCTCTCAT	CAGGAAACTC	TGG	AATGCAT
	IR64	GGCCGCGAAT	TCAC TAGTGA	TT	GCTCTCAT	CAGGAAACTC	TGG	AATGCAT
	Consensus	ggccgcgaat	tcacTagTga	TT	GCTCTCAT	CAGGAAACTC	TGG	AATGCAT
	Zone		SP6			SCL		S10038C

		101						150
	S10038c	TCCAGTTCCC	TTGGTCAGCA	TCTTGCCCAT	AAGATGATTC	ATCCTTGTTA		
	Azucena	TCCAGTTCCC	TTGGTCAGCA	TCTTGCCCAT	AAGATGATTC	ATCCTTGTTA		
	Nipponbare	TCCAGTTCTC	TTGGTCAGCA	TCTTGCCCAT	AAGATGATTC	ATCCTTGTTA		
	IR64	TCCAGTTCCC	TTGGTCAGCA	TCTTGCCCAT	AAGATGATTC	ATCCTTGTTA		
	Consensus	TCCAGTTcC	TTGGTCAGCA	TCTTGCCCAT	AAGATGATTC	ATCCTTGTTA		
	Zone							S10038C

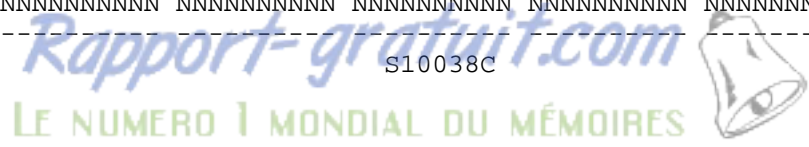
		151						200
	S10038c	TTATAGTCGT	CTCCAGAGTC	AAAGTTAGTT	TTTGCACCCT	CCTTTTTCTT		
	Azucena	TTATAGTCGT	CTCCAGAGTC	AAAGTTAGTT	TTTGCACCCT	CCTTTTTCTT		
	Nipponbare	TTATAGTCGT	CTCCAGAGTC	AAAGTTAGTT	TTTGCACCCT	CCTTTTTCTT		
	IR64	TTATAGTCGT	CTCCAGAGTC	AAAGTTAGTT	TTTGCACCCT	CCTTTTTCTT		
	Consensus	TTATAGTCGT	CTCCAGAGTC	AAAGTTAGTT	TTTGCACCCT	CCTTTTTCTT		
	Zone							S10038C

		201						250
	S10038c	TGAACCTGAG	CTCTTATGCT	TCCCATGTCT	CTTTTTGTAG	TGTGTGTCAT		
	Azucena	TGAACCTGAG	CTCTTATGCT	TCCCATGTCT	CTTTTTGTAG	TGTGTGTCAT		
	Nipponbare	TGAACCTGAG	CTCTTATGCT	TCCCATGTCT	CTTTTTGTAG	TGTGTGTCAT		
	IR64	TGAACCTGAG	CTCTTATGCT	TCCCATGTCT	CTTTTTGGAG	TGTGAGTCAT		
	Consensus	TGAACCTGAG	CTCTTATGCT	TCCCATGTCT	CTTTTTGtAG	TGTGtGTCAT		
	Zone							S10038C

		251						300
	S10038c	CACTGTCTTG	AGACCCATCT	TCAGAACTTG	ACTGCGACTC	ACTTTCCGAC		
	Azucena	CACTGTCTTG	AGACCCATCT	TCAGAACTTG	ACTGCGACTC	ACTTTCCGAC		
	Nipponbare	CACTGTCTTG	AGACCCATCT	TCAGAACTTG	ACTGCGACTC	ACTTTCCGAC		
	IR64	CACTGTCTTG	AGACCCATCT	TCAGAACTTG	ACTGCGACTC	ACTTTCCGAC		
	Consensus	CACTGTCTTG	AGACCCATCT	TCAGAACTTG	ACTGCGACTC	ACTTTCCGAC		
	Zone							S10038C

		301						350
	S10038c	GAGCCATGCT	TTTTGGATGT	TACATTTACA	TTTTTTATGA	CAACTACACT		
	Azucena	GAGCCATGCT	TTTTGGATGT	TACATTTACA	TTTTTTNNNN	NNNNNNNNNN		
	Nipponbare	GAGCCATGCT	TTTTGGATGT	TACATTTACA	TTTTTTANNN	NNNNNNNNNN		
	IR64	GAGCCATGCT	TTTTGGATGT	TACATTTACA	TTTTTTATGN	NNNNNNNNNN		
	Consensus	GAGCCATGCT	TTtggatgt	tacatttaca	tttttta---	-----		
	Zone							S10038C

		351						400
	S10038c	AGGTTTCTTT	TTCCCTGATC	GNTTACCCTT	TTTATGTGAC	TTGTGACCAT		
	Azucena	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN		
	Nipponbare	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN		
	IR64	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNNNNNNNN		
	Consensus	-----	-----	-----	-----	-----		
	Zone							S10038C



	401				436
S10038c	GAG	GACTCCC	TCTTTCAGAA	CTGG	TAACCA TCAATT
Azucena	NNN	NNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNN NNNNNNN
Nipponbare	NNN	NNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNN NNNNNNN
IR64	NNN	NNNNNNNN	NNNNNNNNNN	NNNN	NNNNNNN NNNNNNN
Consensus	---	-----	-----	---	-----
Zone	S		SCU		

d) Sonde Os-r6.3

Os-r6.3 : séquence publiée.

Nipponbare, Azucena, IR64 : séquence de l'insert amplifié et cloné dans la variété considérée.

Zones : SP6, T7 : séquences flanquantes chez pGEM[®]-T, R6U3, R6L3 : amorces PCR (cf. annexe 2).

	1					50
IR 64	-----CGCA	TGCTCCCGGC	CGCCATGGCG	GCCGCGGGAA	TTCGATT	CTG
NIPPONBARE	--ACGTCGCA	TGCTCCCGGC	CGCCATGGCG	GCCGCGGGAA	TTCGATT	CTG
AZUCENA	-----CA	TGCTCCCGGC	CGCCATGGCG	GCCGCGGGAA	TTCGATT	CTG
Os-r6.3	GGGGGAAACC	TTCACATTTA	CTAACTATTT	GTTGTGCTAG	TA-----	CTG
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	CTG
Zone		T7				R6L3

	51					100
IR 64	TCAGTTTTGT	GGGAC	GCTCA	TGGTTTTTAT	C-CTTGGAAA	AGCCGTCTTA
NIPPONBARE	TCAGTTTTGT	GGGAC	GCTCA	TGGTTTTTAT	CTCTTGGAAA	AGCCGTCTTA
AZUCENA	TCAGTTTTGT	GGGAC	GCTCA	TGGTTTTTAT	CTCTTGGAAA	AGCCGTCTTA
Os-r6.3	TCAGTTTTGT	GGGAC	GCTCA	TGGTTTTTAT	CTCTTGGAAA	AGCCGTCTTA
Consensus	TCAGTTTTGT	GGGAC	GCTCA	TGGTTTTTAT	CtCTTGGAAA	AGCCGTCTTA
Zone	R6L3				Os-r6.3	

	101					150
IR 64	CAAAAGAGTT	CCCATGACTT	TTTTTCTGAT	AGAGGCTCTA	GTGTTATCCT	
NIPPONBARE	CAAAAGAGTT	CCCATGACTT	TTTTTCTGAT	AGAGGCTCTA	GTGTTATCCT	
AZUCENA	CAAAAGAGTT	CCCATGACTT	TTTTTCTGAT	AGAGGCTCTA	GTGTTATCCT	
Os-r6.3	CAAAAGAGTT	CCCATGACTT	TTTTTCTGAT	AGAGGCTCTA	GTGTTATCCT	
Consensus	CAAAAGAGTT	CCCATGACTT	TTTTTCTGAT	AGAGGCTCTA	GTGTTATCCT	
Zone			Os-r6.3			

	151					200
IR 64	CTTGTCCGGG	AAAGCGAGGT	GGGCTACACC	ATCAATGCGT	GTTGTCACGA	
NIPPONBARE	CTTGTCCGGG	AAAGCGAGGT	GGGCTACACC	ATCAATGCGT	GTTGTCACGA	
AZUCENA	CTTGTCCGGG	AAAGCGAGGT	GGGCTACACC	ATCAATGCGT	GTTGTCACGA	
Os-r6.3	CTTGTCCGGG	AAAGCGAGGT	GGGCTACACC	ATCAATGCGT	GTTGTCACGA	
Consensus	CTTGTCCGGG	AAAGCGAGGT	GGGCTACACC	ATCAATGCGT	GTTGTCACGA	
Zone			Os-r6.3			

	201					250
IR 64	GAACTCTGCT	CCCCTTGAGA	TTTGAAACAA	ATATGCTAAA	CAAGTCGTTG	
NIPPONBARE	GAACTCTGCT	CCCCTTGAGA	TTTGAAACAA	ATATGCTAAA	CAAGTCGTTG	
AZUCENA	GAACTCTGCT	CCCCTTGAGA	TTTGAAACAA	ATATGCTAAA	CAAGTCGTTG	
Os-r6.3	GAACTCTGCT	CCCCTTGAGA	TTTGAAACAA	ATATGCTAAA	CAAGTCGTTG	
Consensus	GAACTCTGCT	CCCCTTGAGA	TTTGAAACAA	ATATGCTAAA	CAAGTCGTTG	
Zone			Os-r6.3			

Annexes

	251					300
IR 64	ACAGCTTCTG	GTACCCAAAC	ATCATCCAAT	ACGATCAAAT	ACTTCTGATC	
NIPPONBARE	ACAGTTTCTG	GTACCCAAAC	ATCATCCAAT	ACGATCAAAT	ACTTCTGATC	
AZUCENA	ACAGCTTCTG	GTACCCAAAC	ATCATCCAAT	ACGATCAAAT	ACTTCTGATC	
Os-r6.3	ACAGTTTCTG	GTACCCAAAC	ATCATCCAAT	ACGATCAAAT	ACTTCTGATC	
Consensus	ACAGtTTCTG	GTACCCAAAC	ATCATCCAAT	ACGATCAAAT	ACTTCTGATC	
Zone			Os-r6.3			
	301					350
IR 64	CATCAGGAAT	TTCTTCAGTT	CATTTTGGAG	AGTTGCAGTA	TCCATGTCAC	
NIPPONBARE	CATCAGGAAT	TTCTTCAGTT	CATTTTGGAG	AGTTGCAGTA	TCCATGTCAC	
AZUCENA	CATCAGGAAT	TTCTTCAGTT	CATTTTGGAG	AGTTGCAGTA	TCCATGTCAC	
Os-r6.3	CATCAGGAAT	TTATACAGTT	CATTTTGGAG	AGTGGCAGAA	TCCATGTCAC	
Consensus	CATCAGGAAT	TTcTtCAGTT	CATTTTGGAG	AGTtGCAGtA	TCCATGTCAC	
Zone			Os-r6.3			
	351					400
IR 64	CAATGTTACC	CTGAATTTTC	TTTTTTAAAT	CTAATTCAGT	GACCAAACAT	
NIPPONBARE	CAATGTTACC	CTGAATTTTC	TTTTTTAAAT	CTAATTCAGT	GACCAAACAT	
AZUCENA	CAATGTTACC	CTGAATTTTC	TTTTTTAAAC	CTAATTCAGT	GACCAAACAT	
Os-r6.3	CAATGTTACC	CTGAATTTCC	TTTTTTAAAT	CTAATTCCAG	GGACCAAACAT	
Consensus	CAATGTTACC	CTGAATTTtC	TTTTTTAAAt	CTAATTCagt	GacCAAACAT	
Zone			Os-r6.3	???	???	
	401					450
IR 64	TTTAGAACAT	CCTTGATGGA	ATAAGTTTGA	GAGATG GAGA	CCCAAGCATG	
NIPPONBARE	TTTAGAACAT	CCTTGATGGA	ATAAGTTTGA	GAGATG GAGA	CCCAAGCATG	
AZUCENA	TTTAGAACAT	CCTTGATGGA	ATAAGTTTGA	GAGATG GAGA	CCCAAGCATG	
Os-r6.3	TTTAGAACAT	CCTTGATGGA	ATAAGTTTGA	GAGATG GAGA	CCCAAGCATG	
Consensus	TTTAGAACAT	CCTTGATGGA	ATAAGTTTGA	GAGATG GAGA	CCCAAGCATG	
Zone			Os-r6.3		R6U3	
	451					500
IR 64	GCATTC AATC	ACTAGTGAAT	TCGCGGCCGC	CTGCAGGTCG	ACCATATGGG	
NIPPONBARE	GCATTC AATC	ACTAGTGAAT	TCGCGGCCGC	CTGCAGGTCG	ACCATATGGG	
AZUCENA	GCATTC AATC	ACTAGTGAAT	TCGCGGCCGC	CTGCAGGTCG	ACCATATGGG	
Os-r6.3	GCATTC AAAC	TTTTCTCTCT	C-----	-----	-----	
Consensus	GCATTC -----	-----	-----	-----	-----	
Zone	R6U3		SP6			
	501					546
IR 64	AGAGCTCCCA	-CGCGTTGTA	TGCATAGCTC	GTGTATTTTT	CCC---	
NIPPONBARE	AGAGCTCCCA	ACGCGTTGGA	TGCATAGCTT	GAGTATTCTA	TAGTGC	
AZUCENA	AGAGCTCCCA	ACGCGTTGGA	TGCATAGCTT	GAGTATTCTA	TAGTGT	
Os-r6.3	--ATTCTGT	ACACATTGGC	TGCCAAAGTN	GTCTTTCCCC	ACCC--	
Consensus	-----	-----	-----	-----	-----	
Zone			SP6			

e) Sonde C483

Le séquençage s'est fait dans les deux sens, chez les trois variétés, directement après l'amplification PCR.

C483 : séquence publiée.

PU : séquençage « forward ».

PL : séquençage « reverse ».

N (Nipponbare), A (Azucena), I (IR64): séquence de l'insert amplifié et cloné dans la variété considérée.

Zones : C483U, C483L : amorces PCR (cf. annexe 2).

Annexes

	1		50
» c483A-PU	(1)		T-GG
» c483I-PU	(1)		CCC-AC-CGN-GG
» c483N_PU	(1)		GCAT-CCCC-AC-TGT-GG
« c483N-PL	(1)	ACCCANAC-NNATTAAATAA	ACCMNTAA--ATTCCCC--CANGTTGG
« c483I-PL	(1)	ACCCANANNNTT-AAATNC	ANNGMNAAG-TT-CCCCAC-CGT-GG
« c483A-PL	(1)	CNACCCACAC-GAATTAATAN	ACCGGTAA--ATTCCCC-NC-GGT-GG
» C483	(1)	C-ACCCACACCGACT-AGATAC	AGCGGTAAG-AT-CCCC-AC-TGT-GG
Consensus	(1)	CNACCCACACCGAHTTARATAM	ASCGGTAAGCWTTCCCCCACABGTTGG
Zone		C483U	C483

	51		100
» c483A-PU	(6)	CC-CGGTTTGGCGG-ACACCTT-CTCTG-CTGTAAAAAT-TNAAAAGGG-	
» c483I-PU	(15)	CCACGGTTTGGCGG-ACACCTT-CT--G-CTGTAAAAAA-TNAAAATGGA	
» c483N_PU	(21)	CCACGGCTTGGCGG-ACACCTT-CT--G-CTGTAAAAAT-TNAAAATGGG	
« c483N-PL	(49)	CCA-CGNTTTGCGGAATACTTT--T--TGTTGTAAA	
« c483I-PL	(49)	CCACGGTTTGG-GGNACAC-TTACT--G---G	
« c483A-PL	(51)	CCA-GGTTTTGNGGNATACTTT--T--N-TTGTA AAAAT-	
» C483	(51)	CCACGGTTTGGCGG-ACACCTT-CT--G-CTGTAAAAAAATAAAAATGGA	
Consensus	(51)	CCACSGYTTKGC GGAAYACYTTACTCTKGYTGTA AAAAWATAAAA AKGGR	
Zone		C483	

	101		150
» c483A-PU	(56)	GCCG-TCCTTAGG-G-C	
» c483I-PU	(65)	GCAGNTCATAAG	
» c483N_PU	(71)	GCCN-NCCTTAGGGT	
« c483N-PL	(84)		
« c483I-PL	(80)		
« c483A-PL	(90)		
» C483	(101)	GCAG-TCATAAGG-T-CCCCTCCCGTTACGGGGCACGGCAGGCGCCTACC	
Consensus	(101)	GCMGNTCMTWAGGGKACCCCTCCCGTTACGGGGCACGGCAGGCGCCTACC	
Zone		C483	

Annexe 7 : PCR Walking

a) Principe

Le protocole présenté ici s'inspire des travaux de Devic *et al.* (1997) et Balzergue *et al.* (2001). Il permet d'amplifier spécifiquement un segment d'ADN dont la séquence est inconnue, à l'exception de l'une de ses bordures. Ce protocole est adapté de celui mis au point par Emanuelle Bourgeois pour l'identification de rétrotransposons *Tos*. Ce protocole se déroule en trois phases :

— Une double réaction de digestion – ligation, au cours de laquelle l'ADN du YAC est digéré par une enzyme de restriction générant des fragments à bout francs. Simultanément, les extrémités franches sont liguées à un adaptateur tel que le site de restriction disparaît après la ligation.

— Une première réaction de PCR est réalisée en utilisant une amorce spécifique des télomères du YAC (YR1 ou YL1 selon l'extrémité que l'on cherche à amplifier) et une amorce spécifique de l'adaptateur : MA1. Cette dernière amorce se fixe sur l'extrémité 5' de l'adaptateur, simple brin à ce niveau. En effet, l'adaptateur est composé de 2 oligonucléotides de taille différente. Cette propriété permet la fixation spécifique sur le brin le plus long au cours de la première PCR.

Le brin le plus court porte un phosphate en 5 min pour permettre la ligation et un groupement amine en 3 min pour rendre toute élongation impossible par la Taq ADN polymérase à partir de cette extrémité. En conséquence, les fragments d'ADN encadrés par deux adaptateurs ne sont pas amplifiables. L'amplification des extrémités de YAC est donc sélective.

— Une deuxième PCR est réalisée, en utilisant comme matrice ADN une dilution au cinquantième de la première PCR, et des oligonucléotides situés à l'intérieur du fragment généré lors de la première PCR, MA2 du côté de l'adaptateur, YL2 et YR2 du côté des télomères du YAC.

Il se décline ici en deux variantes, utilisées pour la synthèse des sondes extrêmes de BAC, et pour celle des sondes extrêmes de YAC.

b) Préparation de l'adaptateur.

Adema1 (10 μ M)	6 μ l
Adema2 (10 μ M)	6 μ l
Tp React 4 10 \times (Gibco BRL)	1.5 μ l
H2O Merck	1,5 μ l (q.s.p 15 μ l)

Incubation :
 95°C, 5 min
 28°C, 5 min
 4°C, 24 h

On obtient un adaptateur à la concentration de 4 μ M. Le volume obtenu permet de mener 75 ligations différentes.

c) Digestion – Ligation

La digestion et la ligation se font dans le même temps, comme chez Balzergue *et al.* (2001). L'équilibre est poussé dans le sens d'une digestion, puis d'une ligation complète par le fait que le produit de la ligation ne comporte plus le site de restriction.

	Quantité/réaction	Vol/réaction
ADN ⁽¹⁾	*	1 $\mu\ell$
Enz restriction (10 U/ $\mu\ell$) ⁽²⁾	0,25 U	0,25 $\mu\ell$ (dil 10 X)
Ligase (20 U/ $\mu\ell$)	0,05 U	0,25 $\mu\ell$ (dil 100X)
Tampon ligase 10 \times	1 \times	1 $\mu\ell$
Adaptateur (4 μM)	80 nM	0.2 $\mu\ell$
H2O Merck	q.s.p.	10 $\mu\ell$

Incubation à 26°C (étuve), O/N.

(1) Plusieurs quantités d'ADN ont été testées.

Pour les ADN de YAC, ont été testés : 15 ng, 1,5 ng, 150 pg. Les amplifiats les plus purs ont été obtenus avec 150 pg.

Pour les ADN de BAC, ont été testés : 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 0,1 pg. Les amplifiats les plus purs et les plus forts ont été obtenus avec 10 pg.

(2) Plusieurs enzymes de restriction ont été utilisées.

Sept sur les ADN de YAC : Ecl 136II, Dral, EcoRV, HpaI, PvuII, ScaI, StuI ;
quatre sur les ADN de BAC : Dral, EcoRV, PvuII, StuI.

d) Première PCR

La présence d'un groupe amine dans l'adaptateur empêche l'amplification de se faire de façon exponentielle d'adaptateur à adaptateur. En revanche, lorsque la polymérisation se fait à partir de l'oligonucléotide du vecteur, elle aboutit à la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à l'oligonucléotide de l'adaptateur. Ainsi, l'amplification se fait, dans ce cas précis, de façon exponentielle.

Mélange réactionnel :

	Quantité/réaction	Vol/réaction
Dig/lig ⁽¹⁾		1 $\mu\ell$
Tampon Eurobio 10 \times *	1X	2 $\mu\ell$
MgCl ₂ (50 mM)	1 mM	0,4 $\mu\ell$
dNTP (2,5mM)	50 μM	0,4 $\mu\ell$
MA1 10 μM	0,2 μM	0,4 $\mu\ell$
Oligonucléotide vecteur (10 μM) ⁽²⁾	0,2 μM	0,4 $\mu\ell$
Taq Agetrop 1U/ $\mu\ell$	1 U	1 $\mu\ell$
H2O Merck		14,4 $\mu\ell$
Volume final	20 $\mu\ell$	20 $\mu\ell$

* Tampon Eurobio 10 \times : 670 mM Tris-HCl (pH = 8,8), 160 mM (NH₄)₂ SO₄, 0,1% Tween 20

(1) On appelle ainsi le mélange réactionnel résultat de la partie **a)** de ce protocole.

(2) A partir de chaque dig/lig, deux PCR sont réalisées.

Pour ce qui concerne les YACs, l'une utilise YL1 (extrémité gauche du YAC), l'autre, YR1 (Extrémité droite).

Pour ce qui concerne les BACs, L'une utilise Lac283 (extrémité forward), l'autre Lac439 (extrémité reverse).

Cycle :

Il s'agit d'un cycle de type Touch Down, qui permet une amplification à la fois spécifique et efficace.

94°C, 3 min		
94°C, 30s	}	14 fois
65°C à 58°C, 45s		(diminution de 0,5°C par cycle)
72°C, 2 min 30s		
94°C, 30 s		}
58°C, 45 s		
72°C, 2 min 30 s		
72°C, 5 min		
15°C, ∞		

e) Seconde PCR

L'amplifiat de la première PCR est dilué 50 fois.

Il sert de matrice pour la seconde PCR, qui est dite « nested PCR » car les sites d'initiation de cette seconde PCR se nichent entre ceux de la première. Une telle configuration amplifie la spécificité de l'amplification qui est basée non sur deux, mais sur 4 amorces, mais aussi sa puissance, certains auteurs allant jusqu'à affirmer qu'une unique molécule peut ainsi être amplifiée (Devic *et al.*, 1997)

Mélange réactionnel :

	Quantité	Vol.
ADN PCR1 dilué 50×	1 $\mu\ell$	1 $\mu\ell$
Tampon Eurobio 10×	1×	5 $\mu\ell$
MgCl ₂ (50 mM)	1.5 mM	1,5 $\mu\ell$
dNTP (2,5 mM)	50 μM	1 $\mu\ell$
MA2 10 μM	0.2 μM	1 $\mu\ell$
Oligonucléotide vecteur ⁽¹⁾	0,2 μM	1 $\mu\ell$
Taq 2 U/ $\mu\ell$	2 U	2 $\mu\ell$
H ₂ O Merck		37,5 $\mu\ell$
Volume final	50 $\mu\ell$	50 $\mu\ell$

(1) Les oligonucléotides utilisés au cours de la seconde PCR dépendent de ceux utilisés pour la première.

Pour ce qui concerne les YACs, après YL1, on utilise YL2 (extrémité gauche du YAC) ; après YR1, YR2 (extrémité droite)

Pour ce qui concerne les BACs, après Lac283, on utilise T7 (extrémité forward) ; après Lac439, SP6. (extrémité reverse).

Cycle :

94°C, 3 min	}	14 fois (diminution de 0,5°C par cycle)
94°C, 30 s		
65°C à 58°C, 45 s		
72°C, 1 min 30 s	}	30 fois
94°C, 30 s		
58°C, 45 s		
72°C, 1 min 30 s		
72°C, 5 min		
4°C, 24 h		

f) Observation des amplifications, synthèse des sondes.

10µℓ de la seconde PCR sont analysés par électrophorèse sur un gel (1,5% agarose, TBE 1X), puis révélés par la coloration au BET.

Pour chaque souche, on recherche l'enzyme pour laquelle l'amplification est le plus spécifique. Les 40µℓ restants des amplifiats ainsi sélectionnés subissent une électrophorèse sur un gel low melting (1,5% agarose low melting TEBU, TBE 1X) qui est ensuite coloré au BET. Les bandes obtenues sont découpées à l'aide d'un scalpel, et peuvent être utilisées comme sondes.

g) Oligonucléotides utilisés

YL1 : CGCGATCATGGCGACCACAC
 YR1 : ATATAGGCGCCAGCAACC
 YL2 : AAGTTGGTTTAAGGCGCAAGAC
 YR2 : CGCCCGATCTCAAGATTACG
 SP6 : GATTTAGGTGACACTATAG
 T7 : TAATACGACTCACTATA
 Lac283 : ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAT
 Lac439 : AGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTATT
 MA1 : CTGAATCTTGCTGACT
 MA2 : ATCTTGCTGACTAGGT
 Adema1 : CACTGAATCTTGCTGACTAGGTCTGGGGAGGT
 Adema2 : PACCTCCCCAGACNH₂ en C₇^{*}
 P : Phosphate
 NH₂ : = groupement amine

Annexe 8 : Digestion de l'ADN, transfert sur membrane
--

a) Digestion

Pour une digestion :

Dans un microtube 1,5 ml

ADN 5 μg

Spermidine 100 2 μl

Tampon 10 \times ⁽¹⁾ 5 μl

Enzyme (10U/ μl)⁽¹⁾ 1,5 μl

H₂O q.s.p. 50 μl

Placer le tube au bain-marie à 37°C

(1) A chaque enzyme de restriction correspond un tampon différent :

Enzyme	Tampon
Apa I	ReAct 4
BamH I	ReAct 3
Bgl II	ReAct 3
Dra I	ReAct 1
EcoR I	ReAct 3
EcoR V	ReAct 2
HinD III	ReAct 2
Kpn I	ReAct 4
Pst I	ReAct 2
Sca I	ReAct 6
Xba I	ReAct 2

Vérification de la digestion : Prélever 1 μl sur les 50 de chaque digestion, l'analyser par électrophorèse, sur gel d'agarose 0,8% dans 300 ml de TBE, 2h à 150 V. Si l'on observe des digestions incomplètes, les compléter par l'ajout de 1,5 μl d'enzyme au mélange, qui est remplacé 2 à 3h à 37°C.

b) Précipitation

Ajouter à la digestion :

NaCl 5M 2,5 μl (1/20^{ème} Vol.)

Ethanol absolu 125 μl (2,5 Vol.)

Vortexer la digestion, puis la centrifuger 30 min à 12 000 rpm.

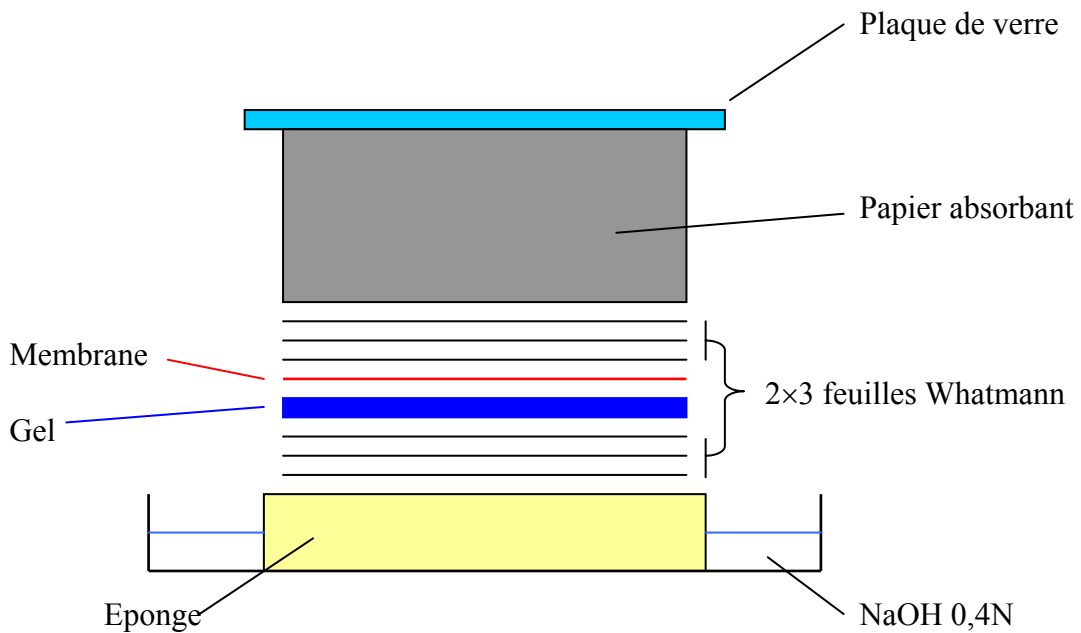
Jeter le surnageant, et laver le culot avec 500 $\mu\ell$ d'éthanol à 70° (10 vol.). Centrifuger 10 min à 12 000 rpm, jeter à nouveau le surnageant, puis sécher le culot 2h à température ambiante. Reprendre le culot dans 15 $\mu\ell$ de TE. On le laisse se resuspendre 24 à 48 heures.

c) Electrophorèse, transfert.

L'électrophorèse se fait dans un gel TAE à 0.8% d'agarose, pendant 15h, et sous 25 Volts (4 séries de puits) ou 50 Volts (1 ou 2 séries de puits).

Le gel est analysé par coloration au BET, puis dépuriné par un bain de 15 min dans du HCl 0,25 N. On le transfère ensuite dans un bain de soude à 0,4 N.

Le transfert se fait ensuite du gel vers la membrane de Nylon (Hybond N⁺, Amersham) selon le montage suivant :



Ce montage est laissé en place O/N, puis démonté le lendemain, la membrane est lavée dans deux bains de 2 \times SSC (cf note p. 295), séchée sur papier absorbant, puis conservée entre deux feuilles de papier absorbant.

Annexe 9 : Marquage radioactif d'une sonde ADN

a) ADN obtenu par PCR préparative (cf. annexe 4) ou par PCR walking (cf. annexe 8)

Il se présente sous la forme d'un petit cube d'agarose à bas point de fusion dans un tube à vis. Il est placé à 60°C afin de faire fondre l'agarose. Le marquage radioactif se fait en utilisant le kit Mégaprime™ (Amersham).

On prélève 2 µl d'ADN auxquels on ajoute :

H ₂ O Merk	28 µl
Amorces*	5 µl

Ce mélange est placé 5 min à 100°C au bain-marie (Dénaturation de l'ADN) puis on y ajoute :

Tampon de marquage**	10 µl
Klenow Polymérase***	2 µl
[α- ³² P]dCTP, 3000 mCi.mol ⁻¹	3 µl

Le mélange incube ensuite pendant 30 min à 37°C, puis est dénaturé 5 min à 95°C au bain sec. Après dénaturation, 500µl de TE sont ajoutés.

La sonde radioactive ainsi obtenue permet de réaliser des marquages. On utilise généralement l'intégralité de la sonde (550 µl).

b) ADN provenant d'une extraction grossière depuis un gel d'agarose (cf. annexe 3)

Il s'agit généralement de sondes reverse southern.

Le principe est le même, les réactifs utilisés aussi, seules les proportions changent, au début :

On prélève 20 µl d'ADN auxquels on ajoute :

H ₂ O Merk	10 µl
Amorces	5 µl

On procède ensuite comme ci-dessus.

c) ADN provenant directement d'un clone BAC (cf. annexe 3)

Le principe est le même, les réactifs aussi, dans un premier temps.

On prélève 100µl d'ADN (5µg) auxquels on ajoute :

H ₂ O Merk	50 µl
Amorces	25 µl

* Mélange aléatoire de nonamères d'ADN simple brin fourni dans le kit Mégaprime™ (Amersham).

** Contenant d'ATP, d'TTP, d'CTP et sels. Fourni dans le kit Mégaprime™ (Amersham).

*** Fournie dans le kit Mégaprime™ (Amersham).



Ce mélange est placé 5 min à 100°C au bain-marie (Dénaturation de l'ADN) puis on y ajoute :

Tampon de marquage	50 $\mu\ell$
Klenow Polymérase	10 $\mu\ell$
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 3000 Ci/mmol	15 $\mu\ell$

Le mélange incube ensuite pendant 30 min à 37°C, puis est dénaturé 5 min à 95°C au bain sec.

Contre - hybridation

On ajoute 1 ml (1 mg) d'ADN génomique bactérien (extrait selon le protocole de l'annexe 3) à la sonde. On place le mélange 45 min à 65°C, puis quelques min à température ambiante.

La sonde ainsi obtenue est utilisée en l'état pour des hybridations BAC. Elle donne un signal très fort mais peu spécifique.

d) ADN génomique de riz

On prélève 1 $\mu\ell$ d'ADN (100 ng) auquel on ajoute :

H ₂ O Merk	59 $\mu\ell$
Amorces	10 $\mu\ell$

Ce mélange est placé 5 min à 100°C au bain-marie (Dénaturation de l'ADN) puis on y ajoute :

Tampon de marquage	20 $\mu\ell$
Klenow Polymérase	4 $\mu\ell$
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, 3000 Ci/mmol	8 $\mu\ell$

Le mélange incube ensuite pendant 30 min à 37°C, puis est dénaturé 5 min à 95°C au bain sec. Après dénaturation, 500 $\mu\ell$ de TE sont ajoutés.

Annexe 10 : Hybridation et deshybridation des membranes
--

a) Membranes RFLP :*Préhybridation*

Enrouler la membrane humidifiée avec du SSC¹ 2×.

La placer dans un tube à hybridation en verre, puis la dérouler contre la paroi intérieure du tube.

Ajouter le mélange de préhybridation suivant dans le tube : 10 ml pour une petite membrane, 20 ml pour une grande. Composition :

SDS	0,2 %
SSC*	5 ×
Tris HCl	0,05 M pH 8
EDTA	10 mM pH 8
Denhart	2 ×
ADN de sperme de saumon dénaturé	0,1 mg/ml

Placer le tubes 5 heures dans une étuve à 65°C, en rotation lente. Lorsque la membrane est hybridée pour la première fois, cette préhybridation se fait en 15 heures environ.

Hybridation

Sortir le tube de l'étuve, jeter la solution de préhybridation. Ajouter le mélange d'hybridation dans le tube : 10 ml pour une petite membrane, 20 ml pour une grande. Composition :

SDS	0,2 %
SSC	5 ×
Tris HCl	0,05 M pH 8
EDTA	10 mM pH 8
Denhart	2 ×
ADN de sperme de saumon dénaturé	0,1 mg/ml
Dextran sulfate	5 %

Ajouter ensuite la sonde radioactive synthétisée selon l'un des protocoles de l'annexe 9, puis dénaturée 5 min à 95°C, et diluée dans 500µl de TE.

Placer le tube dans l'étuve à 65°C, en rotation lente. L'hybridation se fait en 15 heures environ.

* SSC 1× = NaCl et citrate trisodique 0,15 M

Lavages

Sortir le tube de l'étuve, jeter la solution d'hybridation. Ajouter la première solution de lavage. 50 ml pour une petite membrane, 80 ml pour une grande. Mélanger doucement par inversions, ou en faisant tourner le tube dans la main.

Jeter la solution. Ajouter à nouveau de la première solution de lavage neuve. Placer le tube dans l'étuve à 65°C, en rotation lente, pendant 30 min

Jeter la solution. Ajouter la seconde solution de lavage. Placer le tube dans l'étuve à 65°C, en rotation lente, pendant 15 min

Jeter la solution. Sortir la membrane du tube avec des pinces. La placer dans un bac contenant de la seconde solution de lavage. Placer le bac dans l'étuve à 65°C, en agitation lente, pendant 30 min

Sortir la membrane du BAC, l'égoutter sur du papier absorbant.

Première solution de lavage : SSC 0,5 × SDS 0,1 %

Seconde solution de lavage : SSC 0,1 × SDS 0,1 %

Autoradiographie

Placer la membrane dans une pochette transparente A4. elle est ensuite placée à -80°C au contact d'un film photographique (Kodak K2, Kodak) entre deux écrans amplificateurs (Kodak X-Omatic[®] Regular screens, Kodak).

Deshybridation

Immerger la membrane dans un bac contenant du SDS 1% à 99°C.

Placer le bac en agitation 30 min à 65°C, puis 45 min à température ambiante.

Vider le bac contenant la membrane. Y ajouter du SSC 2×.

Vider le bac, égoutter la membrane sur du papier absorbant, puis la conserver entre deux feuilles de papier Wattman.

b) Membranes Haute Densité (HD) BAC.

Le protocole est identique pour la préhybridation, l'hybridation, les lavages et l'autoradiographie, seuls les produits utilisés changent :

Solution de préhybridation : 30 ml par tube.

SDS	7 %
Sodium Phosphate	1,5 M pH 7,2
EDTA	1 mM pH 8
ADN de sperme de saumon dénaturé	0,1 mg/ml

Solution d'hybridation : identique à la solution de préhybridation si les membranes sont neuves ou ont été préalablement deshybridées. Dans le cas contraire (membranes en décroissance) la solution d'hybridation ne contient pas d'ADN de sperme de saumon. On en met là aussi 30 ml par tube.

Première solution de lavage : SSC 1 × SDS 0,1%

Seconde solution de lavage : SSC 0,5 × SDS 0,1%

Il est possible de placer dans le tube 2 membranes, séparées par un intercalaire de tulle.

L'émulsion autoradiographique utilisée est différente. Il s'agit d'un film Fuji Safety[®].

Deshybridation

Placer la membrane dans un bac contenant la solution de deshybridation pendant 10 min à température ambiante sous agitation.

Vider le bac, ajouter de la solution de deshybridation neuve, puis le placer à nouveau pendant 10 min à température ambiante sous agitation.

Vider le bac, ajouter de l'eau milliQ[®] quelques secondes, puis le vider.

Ajouter du 2 × SSC ou du 5 × SSPE. Placer le bac 10 min à température ambiante sous agitation.

Vider le bac, y ajouter à nouveau du 2 × SSC ou du 5 × SSPE, puis le placer 10 min à température ambiante sous agitation.

Vider le bac, égoutter la membrane sur du papier absorbant.

La conserver entre deux feuilles de papier Wattman[®]

Solution de deshybridation :

NaOH 100 mM

EDTA 10 mM

SDS 0,1 %

*

*

*

Annexe 11 : AFLP

Les AFLP ont été réalisées avec le kit AFLP™ Analysis System II, AFLP Small Genome Primer Kit (CAT. NOS. 10717-015, 10719-011, LIFE TECHNOLOGIES™).

a) Digestion**Utiliser des tubes neufs, non autoclavés !**

Dans des microtubes de 1,5 ml :

Tampon 5×	5 $\mu\ell$
ADN à 50 ng / $\mu\ell$	5 $\mu\ell$
EcoR I / Mse I	2 $\mu\ell$
H ₂ O AFLP	13 $\mu\ell$

Pour plusieurs échantillons, faire une solution mère : H₂O + Tampon + EcoR I / Mse I, homogénéiser doucement et ajouter 20 $\mu\ell$ par tube.

Homogénéiser, centrifuger si nécessaire et incuber 2 heures à 37°C.

Inactiver les endonucléases à 70°C pendant 15 min, puis mettre dans la glace en attendant la ligation.

b) Ligation des adaptateurs

Ajouter à l'ADN digéré :

Adaptateurs de ligation	24 $\mu\ell$
T4 ADN ligase	1 $\mu\ell$

Pour plusieurs échantillons, faire une solution mère.

Homogénéiser doucement et laisser incuber à température ambiante (20°C) pendant 2 heures.

Puis diluer au 1/10 la solution (dans un tube de 1,5 ml : 10 $\mu\ell$ de la solution de réaction + 90 $\mu\ell$ Tampon TE), homogénéiser et maintenir la solution inutilisée au congélateur à -20°C.

c) Préamplification

Dans une microplaque, mettre dans chaque puits :

ADN ligué et dilué	5 $\mu\ell$
Amorce de pré-amplification	40 $\mu\ell$
Tampon PCR AFLP 10x	5 $\mu\ell$
Taq (2 U/ $\mu\ell$)	0,2 $\mu\ell$

Pour plusieurs échantillons, préparer une solution mère.

Homogénéiser doucement, ajouter 1 goutte d'huile minérale et lancer le programme PCR :

20 cycles : 94°C 30 s
56°C 60 s
72°C 60 s

Conservation à 4°C.

Dans des microtubes de 1,5 ml neufs, effectuer une dilution au 1 : 30 de chaque échantillon préamplifié.

Pour 60 marquages : 10 µl du produit de la préamplification + 290 µl H₂O Merck®.

Congeler à -20°C la plaque mère, et aliquoter les échantillons à partir des dilutions dans des nouvelles plaques à raison de 5 µl par puits.

d) Marquage de l'amorce

Préchauffer le bain-marie à 37°C. Prévoir un tube à vis de 1,5 ml pour la solution mère.

Marquer l'amorce choisie avec (γ³³P) ATP, en présence d'une T4 polynucléotide kinase.

Pour 100 échantillons :

Amorce EcoR I	18 µl
H ₂ O AFLP	10 µl
Tampon kinase 5×	10 µl
(γ ³³ P) ATP (2 Ci / mmol)	10 µl
T4 kinase	2 µl
Volume total	50 µl

Mettre le tube dans une boîte de plexiglass au bain-marie à 37°C pendant 1 heure.

Désactiver la kinase à 70°C pendant 10 min

e) Amplification AFLP

Dans un tube à vis de 1,5 ml (pour 100 échantillons) :

Eau AFLP	790 µl
Tampon PCR 10x	200 µl
Amorce Mse I ⁽¹⁾ (avec dNTP)	450 µl
Taq polymérase	37,5 µl
Amorce EcoR I ⁽¹⁾ marquée	50 µl

(1) Il existe 8 amorces Mse I qui diffèrent par leurs bases finales dans le kit. Les terminaisons des 8 amorces sont : CAA, CAC, CAG, CAG, CTA, CTC, CTG et CTT. De même, il existe 8 amorces EcoR I qui diffèrent par leur bases finales, leurs terminaisons étant AA, AC, AG, AT, TA, TC, TG et TT. Les combinaisons entre ces amorces permettent de réaliser 64 amplifications AFLP différentes.

Ajouter aux 5 µl d'ADN dilués au 1 : 30 et préalablement aliquotés dans une microplaque, 15 µl de la solution d'amplification. Mettre une goutte d'huile minérale dans chaque puits.

Disposer la plaque dans le thermocycleur programmé ainsi :

1 cycle : 94°C 30 s
 65°C 30 s
 72°C 60 s

Diminuer la température de dénaturation de 0,7°C à chaque cycle durant 12 cycles.

Puis 23 cycles : 94°C 30 s
 56°C 30 s
 72°C 60 s

Conserver à 4°C.

f) Pré-dépôt, Migration, révélation

Afin d'abaisser la température de renaturation, ajouter 20 µl (vol. égal) de bleu formamide 1x par puits.

Homogénéiser à la pipette multicanaux, et mettre la plaque dans le thermocycleur (PTC-100™, MJ RESEARCH, INC.) (92°C pendant 3 min puis 70°C pendant 40 min) déposer durant la phase à 70°C.

La migration est effectuée sur un gel d'acrylamide vertical.

La révélation est réalisée par autoradiographie sur film Kodak® mis en cassette. L'exposition est réalisée sur trois jours.

*

*

*

Annexe 12 : Confection de membranes BAC à haute densité
--

a) repiquage de la banque

La banque est sortie du congélateur à -80°C ou elle est conservée, puis mise à décongeler dans une hotte à flux laminaire. Elle est constituée d'un ensemble de plaques genetix[®] de 384 (16 × 24) puits. Chaque puits contient une souche conservée dans du LB chloramphénicol (cf. annexe 1) contenant 5% de glycérol.

Deux répliques de la banque sont faites à l'aide d'un robot Flexis[®] (genomic solutions). Pour chaque réplique, des plaques genetix[®] de 384 puits sont préparées contenant, dans chaque puits, 55 μl de LB chloramphénicol à 5% de glycérol. L'une de ces répliques servira à réaliser les membranes, l'autre sera conservée à -80°C en remplacement de la banque originale, qui sera détruite après les repiquages.

b) Repiquage des clones sur la membrane.

Chaque membrane de Nylon (Hybond N⁺, Amersham) est placée dans une boîte de pétri de dimensions 22,2 × 22,2 cm contenant du milieu LB chloramphénicol solide. A l'aide du robot Flexis[®] (genomic solutions), 18 432 clones (48 plaques) de la banque considérée sont repiqués sur la membrane selon le plan de la page suivante. La membrane contient six champs, de la taille d'une plaque de 384 puits. Dans chaque champ on retrouve l'agencement 16 × 24 de ces plaques. A chacune des adresses se trouve un domaine de forme carrée contenant 16 colonies (4 × 4) provenant du repiquage de 8 clones en deux endroits.

Chaque boîte ainsiensemencée est placée 15h environ à 28°C , afin d'obtenir une croissance suffisante, mais non excessive, évitant ainsi le mélange entre les colonies.

c) Dénaturation

Afin de détruire les bactéries et de provoquer des liaisons entre leur ADN et la membrane, le protocole suivant est suivi.

Quatre feuilles de papier Wattman sont humidifiées à l'aide de 4 solutions suivantes.

Feuille 1 :	NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M.
Feuille 2 :	NaCl 1,5 M, Tris 0,5M pH 7, EDTA 1 mM.
Feuille 3 :	NaOH 0,4 M
Feuille 4 :	SSC 2× (composition cf. annexe 10)

Les membranes sont placées successivement sur chaque feuille Wattman (qui constitue un bain) pendant 7 min

Les membranes sont ensuite séchées à l'air libre. Elles sont prêtes à être utilisées en hybridation selon le protocole de l'annexe 10.

Annexe 13 : Milieux d'induction, de transformation et de culture des cals et plantules de riz
--

a) solutions mères*MacroN6 (Solution 20×)*

KNO ₃	56,6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	9,26 g
KH ₂ PO ₄	8 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O	3,3 g
MgSO ₄ , 2H ₂ O	3,7 g
H ₂ O q. s. p.	1 ℓ

FeEDTA (Solution 100×)

FeSO ₄ , 7H ₂ O	2,78 g
Na ₂ EDTA	3,72 g
H ₂ O q. s. p.	1 ℓ

Micro B5 (Solution 100×)

MnSO ₄ , H ₂ O	758 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	200 mg
KI	75 mg
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	25 mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2,5 mg
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2,5 mg
H ₂ O q. s. p.	1 ℓ

Vitamines B5 (Solution 100×)

Myo-inositol	10 g
Acide nicotinique	0,1 g
Pyridoxine HCl	0,1 g
Thiamine	1 g
H ₂ O q. s. p.	1 ℓ

Stock 2,4-D

0,25 mg/ml dans EtOH absolu.

Stock hygro

40 mg/ml dans H₂O bidistillée.

Stérilisation de la solution par filtration à travers un filtre de 0,22 µm.

BAP

Benzylaminopurine	0,1 g
H ₂ O q.s.p.	100 ml

ANA

Acide naphthalène acétique	0,1 g
H ₂ O q.s.p.	100 ml

ABA

Jeter une pastille de KOH pur dans 20 ml d'H₂O bidistillée.
Ajouter 500 mg d'acide absicique
Agiter puis ajouter H₂O jusqu'à obtenir un volume de 100 ml
Steriliser par filtration sur un filtre à 0,22 µm.

Macro-micro MS (mélange pulvérulent)

Pour 4,331 g :

Nitrate d'ammonium	1 650 mg
Chlorure de calcium anhydre	332,02 mg
Sulfate de magnésium anhydre	180,70 mg
Nitrate de potassium	1 900 mg
Phosphate de potassium monobasique	170 mg
Acide borique	6,2 mg
Chlorure de cobalt, 6H ₂ O	0,025 mg
Sulfate de cuivre, 5H ₂ O	0,025 mg
Na ₂ - EDTA	37,26 mg
Sulfate de manganèse, H ₂ O	16,90 mg
molybdate de sodium	0,250 mg
Iodure de potassium	0,83 mg
Sulfate de fer, 7H ₂ O	27,80 mg
Sulfate de zinc, 7H ₂ O	8,60 mg

Vitamines MS (mélange pulvérulent)

Pour 103,1 mg :

Glycine	2 mg
myo-Inositol	100 mg
Acide nicotinique (Niacine)	0,5 mg
Pyridoxine HCl (vitamine B ₆)	0,5 mg
Thiamine HCl (vitamine B ₁)	0,1 mg

b) confection des milieux

Après mélange des différents composants et avant autoclavage, le pH de chacun de ces milieux est ajusté à 5.8 en utilisant du KOH 1M.

* après le nom d'un produit signifie qu'il faut l'ajouter au milieu après autoclavage

Milieu NB (milieu d'induction de la callogenèse)

MacroN6	50 ml
MicroB5	10 ml
Vitamines B5	10 ml
FeEDTA	10 ml
Proline	500 mg
Glutamine	500 mg
Hydrolysate de caseine	300 mg
Saccharose	30 g
Stock 2,4-D	8 ml
Phytigel	2,6 g
H ₂ O q. s. p.	1 l

Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH 1N

Milieu NB0 (milieu pour bombardement des cals)

MacroN6	50 ml
MicroB5	10 ml
Vitamines B5	10 ml
FeEDTA	10 ml
Proline	500 mg
Glutamine	500 mg
Mannitol	72,9 g
Sorbitol	72,9 g
Hydrolysate de caséine	300 mg
Saccharose	30 g
Stock 2,4-D	8 ml
Phytigel	2,6 g
H ₂ O q. s. p.	1 l

Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH 1N

Milieu NBH40 (milieu de sélection)

MacroN6	50 ml
MicroB5	10 ml
Vitamines B5	10 ml
FeEDTA	10 ml
Proline	500 mg
Glutamine	500 mg
Hydrolysate de caséine	300 mg
Saccharose	30 g
Stock 2,4-D	8 ml
Phytigel	2,6 g
H ₂ O q. s. p.	1 l

Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH 1N

Stock hygros*	0,8 ml
---------------	--------

Milieu PR (prérégénération)

MacroN6	50 ml
MicroB5	10 ml
Vitamines B5	10 ml
FeEDTA	10 ml
Proline	500 mg
Glutamine	500 mg
Hydrolysate de caséine	300 mg
Saccharose	30 g
BAP	2 ml
ANA	1 ml
Phytigel	2,6 g
H ₂ O q. s. p.	1 l
Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH 1N	
ABA*	2 ml

Milieu PRH50 (pré régénération et sélection)

Comme PRH (cf. supra) plus :

Stock hygro* 1 ml

Milieu RN (régénération de plantules)

MacroN6	50 ml
MicroB5	10 ml
Vitamines B5	10 ml
FeEDTA	10 ml
Proline	500 mg
Glutamine	500 mg
Hydrolysate de caseine	300 mg
Saccharose	30 g
BAP	3 ml
ANA	0,5 ml
Phytigel	2,6 g
H ₂ O q. s. p.	1 l
Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH 1N	

Milieu MS (culture in vitro des plantules)

MS macro-micro	4,3 g
MS vitamines	103 mg
Saccharose	40 g
Phytigel	2,6 g
H ₂ O q. s. p.	1 l
Ajuster le pH à 5,8 avec du KOH 1N	

Annexe 14 : Protocoles liés à la transgénèse

a) Désinfection des grains

Les grains sont débarrassés de leur enveloppe, puis rincés 1 min dans de l'éthanol à 70° en boîte de pétri sous hotte à flux laminaire.

Ils sont ensuite transférés 40 min dans un erlen-mayer autoclavé de 125 ml contenant 40 ml d'eau de javel du commerce diluée à 30%. Une agitation manuelle est réalisée toutes les 5 min pendant les 30 premières min

Les grains sont ensuite rincés trois fois dans de l'eau distillée stérile.

b) Sélection des cals secondaires pour la transformation

Au bout de 20 jours, le scutellum de l'embryon du grain forme un cal compact de 0.5 à 1 cm de diamètre (cal primaire). A la périphérie de ce cal primaire, de petites unités de quelques mm de diamètre (cals secondaires) se forment. Ces cals secondaires sont transférés sur une nouvelle boîte de milieu NB, à raison de 15 par boîte. Le cal primaire, qui n'est pas transféré, peut donner de nouveaux cals secondaires après quelques jours.

Les cals secondaires sont cultivés 14 jours à 28°C dans l'obscurité.

A l'issue de ce temps d'incubation, les cals ont proliféré et ont donné trois types de formation :

- (i) Des cals de forme complexe et de taille supérieure à 2mm qui sont éliminés.
- (ii) Des unités sphériques présentant une surface rugueuse et de taille comprise entre 0,8 et 2 mm qui seront éventuellement sélectionnées pour le bombardement.
- (iii) Des unités d'une taille inférieure à 0,8 mm qui peuvent être transférées sur du milieu frais NB. Après 14 jours d'incubation, ces unités proliféreront en donnant à nouveau les 3 types de cals décrits ici.

Les unités embryogènes sont sélectionnées pour servir de cible au bombardement de particules selon les critères suivant qui garantissent un stade physiologique optimal pour la transformation :

- (i) *Taille* : les unités sélectionnées doivent mesurer entre 0,8 et 1,6mm. L'utilisation de cals plus gros conduisent à des fréquences de transformation inférieures. Les cals de petite taille sont trop endommagés par le bombardement pour être efficacement transformés.
- (ii) *Forme* : les unités sélectionnées doivent être de forme sphérique et présenter une surface rugueuse. Les cals de forme plus complexe présentant une surface lisse et blanche qui sont des signes de différenciation doivent être évités.
- (iii) *Texture* : les cals doivent être compacts et fermes et résister sous la pince. Les cals mous ou mousseux doivent être évités.

c) Préparation des cals pour la transformation

Quatre heures avant le bombardement, 60 à 100 cals secondaires sont placés sur du milieu NBO, dans un cercle de 3cm de diamètre au centre de la boîte correspondant à l'aire qui sera bombardée par le canon. Les unités sont ensuite orientées pour offrir une surface maximale aux microprojectiles. Après avoir maintenu la boîte entr'ouverte sous le flux

laminaire pendant une dizaine de min, la boîte est scellée avec du parafilm[®] et maintenue sous la hotte.

d) Préparation du matériel pour la transformation

Les opérations de préparation du matériel pour la transformation se réaliseront dans l'ordre suivant :

- (i) Nettoyage à l'alcool à 70° de la hotte, de la chambre et du canon à particules, de la plaque de la cible, du support du disque de rupture et des plaques et vis de support du macroprojectile.
- (ii) Mise en désinfection en boîte de pétri dans de l'alcool 100 des accessoires (grilles d'arrêt, disques de rupture, macroprojectiles, supports de macroprojectiles, embout cylindrique rouge utilisé pour positionner les macroprojectiles).
- (iii) Préparation de microprojectiles (cf. *infra*).
- (iv) Mise au séchage des accessoires.
- (v) Enrobage des microprojectiles (cf. *infra*).
- (vi) Montage des macroprojectiles sur leur supports.
- (vii) dépôt des microprojectiles (cf. *infra*).

☼ *Préparation des microprojectiles*

Pour une transformation : Peser dans un tube eppendorf[®] siliconé autoclavé 3 mg d'un mélange 50/50 de billes d'or de 1,6 et 1µm de diamètre.

Stérilisation :

Ajouter 50µl d'alcool 100 et vortexer 1-2 min

Centrifuger 10s et éliminer le surnageant.

Vortexer 1-2 mindans 50 µl d'eau stérile, centrifuger, éliminer le surnageant, puis recommencer l'opération.

Bien resuspendre les particules dans 50µl d'eau bidistillée stérile en vortexant, en tapotant le tube, et par va et vient dans un cône de pipetman[®].

☼ *Enrobage des microprojectiles*

Les étapes suivantes sont réalisées en vortexant modérément le tube en permanence. Elles sont décrites pour un plasmide.

Ajouter 5µg d'ADN*.

Ajouter 20µl de spermidine à 0,1M.

Ajouter doucement, goutte à goutte, 50µl d'une solution 2,5M de CaCl₂.

Bien vortexer le mélange à vitesse moyenne, puis faire reposer 10 min.

L'ADN : Deux témoins ont été réalisés : Pour ces témoins (vecteur pBeloBAC et GFP) le rapport molaire entre le plasmide d'intérêt et le plasmide de sélection (pILTAB227) est de 3 pour 1. En ce qui concerne les transformations par des BACs, le rapport molaire entre le vecteur d'intérêt et le vecteur de sélection est bien plus bas, car le fragment d'intérêt est un grand fragment. En revanche le rapport massique entre les deux est de 1 à 10.

☼ *Dépôt des microprojectiles*

Caler 4 macroprojectiles désinfectés dans leur support à l'aide de l'embout cylindrique en plastique rouge. Centrifuger 10 s la préparation et éliminer le surnageant. Bien resuspendre les particules dans 36 µl d'éthanol à 100° en vortexant, en tapotant le tube, et par va et vient dans un cône de pipetman[®]. Déposer 8µl de la préparation au centre de chaque

macroprojectile. Les particules vont se répartir sur un cercle de 1 cm de diamètre environ. Du fait de l'évaporation de l'éthanol, 4 macroprojectiles pourront être préparés ainsi.

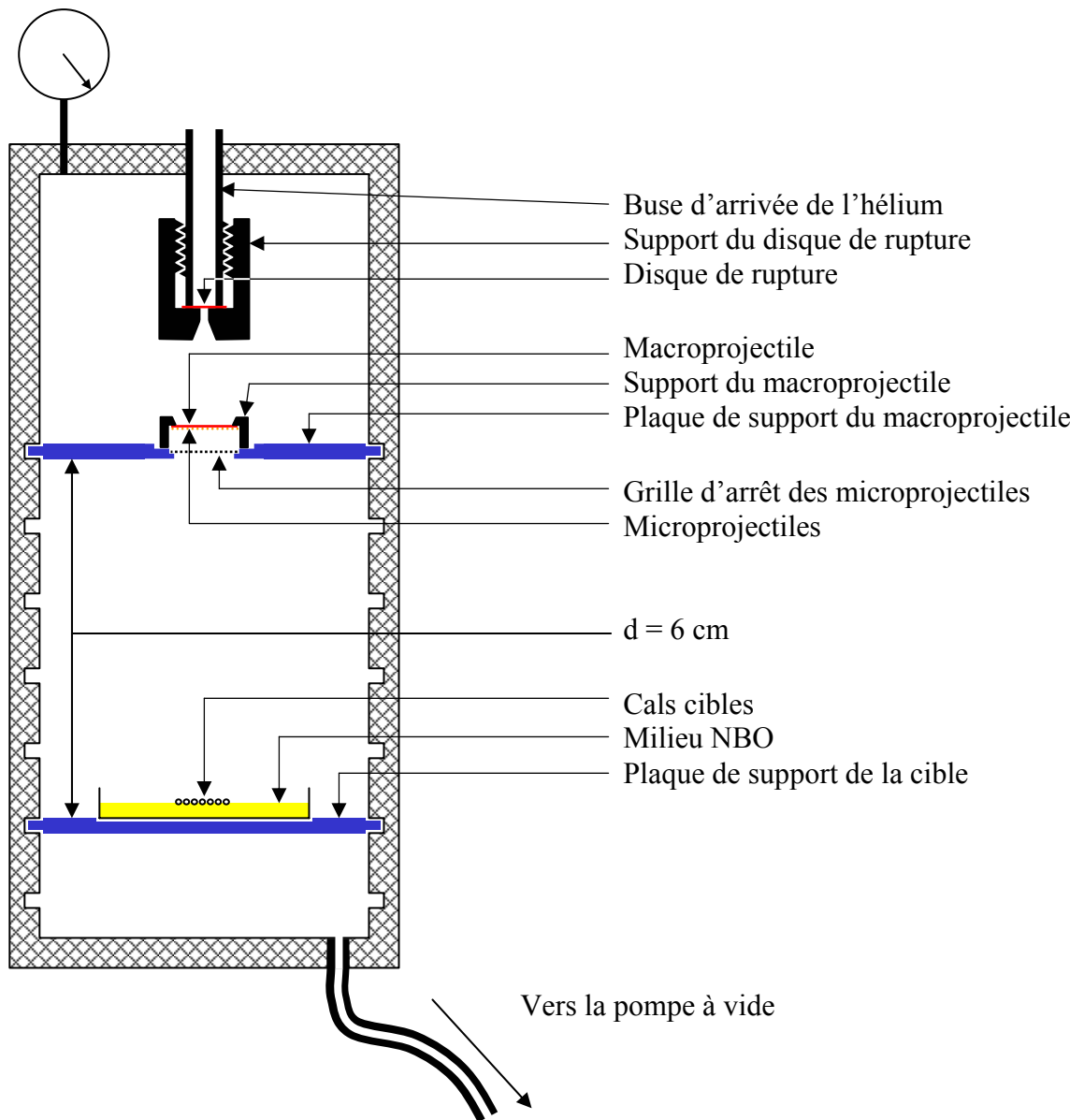


Schéma de montage du canon à particules

e) Réalisation du bombardement.

Le macroprojectile est placé dans une chambre à vide, au dessus de la boîte de pétri contenant les cals à transformer, sa face couverte de microparticules tournée vers le bas. Une fois le vide réalisé, un puissant jet d'hélium catapulte le macroprojectile contre une grille. Les microprojectiles poursuivent leur course vers les cals*. Leur vitesse leur permet de briser un certain nombre de parois cellulaires et de libérer leur enrobage d'ADN à l'intérieur des cellules du cal.

* *A la façon de tomates sur une cantatrice (Perec, 1991)*

Le jet d'hélium est dû à la soudaine rupture d'un disque dont la résistance est calibrée sous la pression de l'hélium. Le jet d'hélium, puis des microparticules est d'autant plus rapide que le vide réalisé limite les frottements entre les particules et l'air.

Les paramètres du bombardement sont les suivants :

- (i) Vide poussé à 0,1 Atm
- (ii) Disque de rupture de 75 Atm
- (iii) Cible positionnée à 6cm de la grille d'arrêt
- (iv) Deux tirs par boîte d'explants en opérant une rotation de 180° de la boîte entre les deux tirs.

Les opérations suivantes sont réalisées.

Le disque de rupture est placé dans son support qui est ensuite vissé à l'orifice d'entrée de l'hélium

La grille d'arrêt est placée au fond de l'orifice de la plaque du macroprojectile et le support de macroprojectile est retourné et mis en place puis fixé par la vis. La plaque du macroprojectile ainsi montée est insérée dans la chambre de tir.

La pompe à vide est actionnée jusqu'à obtenir une dépression de 27 pouces de mercure qui est maintenue.

La vane d'arrivée d'hélium est ouverte jusqu'à rupture du disque. Couper l'arrivée d'hélium et ramener la chambre à pression normale.

Retirer la plaque de la cible et opérer une rotation à 180° de la boîte d'explant. Oter la plaque du macroprojectile et dévisser le support de disque de rupture. Eliminer les restes du disque de rupture et le remplacer. Dévisser la plaque du macroprojectile et changer grille d'arrêt et macroprojectile.

Réaliser le second tir dans les mêmes conditions que le premier.

La boîte est ensuite scellée avec du parafilm[®], et maintenue 16-20h à 28°C.

Annexe 15 : Article sous presse dans TAG

Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*.

R. BERRUYER, H. ADREIT, J. MILAZZO, S. GAILLARD, A. BERGER, W. DIOH, M.-H. LEBRUN, D. THARREAU(✉)

R. Berruyer, H. Adreit, J. Milazzo, S. Gaillard, D. Tharreau

UMR BGPI, CIRAD, TA73-09, 34398 Montpellier CEDEX, France.

A. Berger

UMR GACA, CIRAD, TA80-03, 34398 Montpellier CEDEX, France

W. Dioh

IGM, CNRS-URA 2255, Orsay, France – present address Monsanto, Saint Louis, Missouri, USA.

M.-H. Lebrun

UMR1932, CNRS-Bayer Crop Science, 69269 Lyon, France.

(✉) E-mail: tharreau@cirad.fr

tel.: (33) 4 67 61 55 41

fax.: (33) 4 67 61 56 03

Abstract. Rice blast disease is a major constraint for rice breeding.. Nevertheless, the genetic basis of resistance remains poorly understood for most rice varieties and new resistance genes remain to be identified. We identified the resistance gene corresponding to the cloned avirulence gene *ACE1* using pairs of isogenic strains of *Magnaporthe grisea* differing only by their *ACE1* allele. This resistance gene was mapped on the short arm of rice chromosome 8 using progenies from the crosses IR64 (resistant) x Azucena (susceptible) and Azucena x Bala (resistant). The isogenic strains also permitted the detection of this resistance gene in several rice varieties, including the differential isogenic line C101LAC. Allelism tests permitted us to distinguish this gene from two other resistance genes (*Pi11* and *Pi-29(t)*) that are present on the short arm of the chromosome 8. Segregation analysis in F₂ populations was in agreement with the existence of a single dominant gene, designated as *Pi33*. Finally, *Pi33* was finely mapped between two molecular markers of the rice genetic map that are separated by a distance of 1.6 cM. Detection of *Pi33* in different semi-dwarf indica varieties led to the hypothesis that this gene could originate from either one or few varieties.

Keywords. Resistance gene . *Magnaporthe grisea* . fine mapping . *Pi33* . *ACE1*

Introduction

The rice (*Oryza sativa* L.) – *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr pathosystem is a nice model system to study plant-fungus interactions. Rice blast disease is also a primary concern for rice production worldwide. In this pathosystem, race specific resistance follows the gene-for-gene relationship (Kiyosawa 1971, Silué et al. 1992). Since the seminal works of Sasaki (1922) and Nakatomi (1926) (*in* Takahashi 1965), performed in order to improve resistance to blast of Japanese rice cultivars, several rice blast resistance genes have been discovered in different rice cultivars, and were later mapped.

In the early sixties, Goto et al. and Yamasaki and Kiyosawa identified the first set of resistance genes *Pia*, *Pii*, *Pik*, *Pik^s*, *Pik^h*, *Pik^m*, *Pik^p*, *Piz*, *Piz^t*, *Pita*, *Pita²*, *Pib*, *Pit* and *Pish* (Ezuka 1979, Imbe and Matsumoto 1985). Later, Kiyosawa et al. (1986) elaborated a set of differential cultivars, each of them harboring one or two of these resistance genes. Additional resistance genes were identified in *indica* cultivars. This work was started by the introgression of resistance genes from four cultivars (LAC23, 5173, Pai-Kan-Tao and Tetep) into the susceptible cultivar CO39 that led to Near Isogenic Lines (NILs) harboring one or two resistance gene(s) each. These NILs allowed for the discovery of new resistance genes, namely *Pi1*, *Pi2* (= *Piz⁵*), *Pi3*, and *Pi4^b* (Yu et al. 1991a, Yu et al. 1991b, Mackill and Bonman 1992, Inukai et al. 1994).

Since McCouch et al. (1988) published the first rice genetic map using RFLP markers, the number of available genetic markers has increased dramatically. Fixed populations useful for genetic mapping were obtained (doubled haploid (DH) population: Guiderdoni et al. 1992, Zhu et al. 1993, Huang et al. 1997; single seed descent (SSD) populations: Wang et al. 1994, Price et al. 2000). These populations were useful for mapping a significant number of rice blast resistance genes (for an updated synthetic map of resistance genes to blast, see Sallaud et al. *in press*). The distribution of rice blast resistance genes throughout the genome is not random. Chromosomes 6, 11 and 12 harbor more than nine resistance genes

each, while chromosomes 3 and 9 have none at all. But it is difficult to assess the actual number of resistance genes that are already characterized and mapped, as allelism tests were not always performed for genes mapping in the same area of the genome.

Only two resistance genes have been mapped on chromosome 8: *Pi11* (= *Pizh*) and *Pi29(t)*. *Pi11* mapped 15.8 cM from the RFLP marker RZ617 using DH lines from the cross JX17 x ZYQ8 (Zhu et al. 1993). This gene confers resistance to the *M. grisea* strain Zhong 10-8-14, and comes from Zhai-Ye-Qing 8 (ZYQ8). *Pi29(t)* is a resistance gene that comes from the improved *indica* rice cultivar IR64. This gene, together with another IR64 blast resistance gene (*Pi24(t)*) confers resistance to the Colombian *M. grisea* strain CL26 (Sallaud et al. in press). *Pi29(t)* was mapped near the RFLP marker RZ617 in progeny of 104 IR64 x Azucena DH lines. Because *Pi11* and *Pi29(t)* map in the same area of chromosome 8, it is unclear whether or not they are different genes (Sallaud et al. in press).

Despite the large number of resistance genes (*R* genes) that have been identified and mapped, and despite the fact the rice blast is a model pathosystem, only two blast resistance genes have already been cloned and characterized: *Pita* (Jia et al. 2000, Bryan et al. 2000) and *Pib* (Wang et al. 1999). More generally, while a significant number of plant resistance genes against bacterial or fungal pathogens have been characterized (for a review see Hulbert et al. 2001, Dangl and Jones 2001), few *R* gene - *avr* gene pairs have been cloned for plant - fungal interaction. The characteristics of the cloned avirulence genes suggest that they encode small proteins secreted during infection and that these are directly recognized by the corresponding resistance gene product. One exception to this model comes from the *M. grisea* avirulence gene *ACE1* (Dioh et al. 2000; Böhnert et al. 2001). This gene encodes a large cytoplasmic enzyme that is unlikely to be recognized by the corresponding *R* gene product. Molecular analysis of this interaction requires the isolation of the *R* gene corresponding to *ACE1*.

We report here the genetic characterization of the resistance gene locus that corresponds to *ACE1*. Several resistant rice cultivars were screened for the presence of this *R* gene. Two of these cultivars had been crossed with a susceptible rice cultivar. Doubled Haploids (DH) or Single Seed Descent (SSD) progenies from these crosses were used for the construction of rice genetic maps (IR64 x Azucena and Bala x Azucena). Results from allelism tests and F₂ progeny defined a new resistance gene to blast, *Pi33*, located on the short arm of the rice chromosome 8.

Material and methods

M. grisea strains and culture

Cosmid D31C12 from avirulent isolate Guy11 harbours the avirulence gene *ACE1* (Böhnert et al. unpublished data). This cosmid was introduced by transformation

of fungal protoplasts from the virulent strains PH14, PH19 and 2/0/3. Three avirulent isogenic strains were obtained from these experiments: PH14-D31C12, PH19-D31C12 and 2/0/3-D31C12 (Dioh et al. unpublished data). PH14 (=PO6-6) and PH19 (=IK81-25) are from The Philippines and were kindly provided by the International Rice Research Institute (IRRI). 2/0/3 is a laboratory strain obtained by crossing different isolates (Silué et al. 1992). PO6-6 and IK81-25, were used for the characterization of resistance genes *Pi1(t)*, *Pi2(t)*, *Pi3(t)*, and *Pi4^b(t)* (Mackill and Bonman 1992). CL6 is a Colombian strain of *M. grisea* that was used for characterization of the resistance genes *Pi24(t)* and *Pi29(t)* (Sallaud et al. in press)

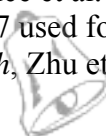
M. grisea strains were grown for 6 d on rice flour agar medium (20 g of rice flour, 15 g of agar, 2.5 g of yeast extract and 1 l of distilled water) under fluorescent light (12h a day) at 26°C. Conidia were harvested by flooding the plate with 10 ml of sterile distilled water.

Rice cultivars and mapping populations

The following rice cultivars were used for the characterization of the resistance gene corresponding to the *ACE1* avirulence gene: Azucena, Bala, BW100, Carreon, CO39, DJ8-341, Hing-Xi 17 (JX17), IR8, IR64, IR1529, IRAT7, Kassalath, LAC23, Maratelli, Nipponbare, Taichung-Native 1 (TN1), Tetep, Tsai-Yuan-Chung (TYC) and Zhai-Ye-Qing 8 (ZYQ8). A set of isogenic rice lines obtained by introgression of different blast resistance genes into the CO39 susceptible rice cultivar (Mackill and Bonman 1992), and a set of differential cultivars established by Kiyosawa (Ezuka 1979, Kiyosawa 1984, Kiyosawa et al. 1986), were also tested for the presence of the resistance gene corresponding to the *ACE1* avirulence gene. Accession numbers in International Rice Germplasm Center (IRGC numbers) of these rice lines and cultivars are shown in Table 1.

Progeny from the cross between an improved semi-dwarf *indica* cultivar (IR64) developed by IRRI and an upland *japonica* cultivar from The Philippines (Azucena) was used to map the resistance gene corresponding to *ACE1*. We performed this mapping with a first set of 105 DH lines from this cross (Guiderdoni et al. 1992) previously used to map 200 molecular markers (Causse et al. 1994, Huang et al. 1997, Sallaud et al. in press). An additional set of 501 DH lines and 284 F₇ SSD lines from F₁ progeny of the cross IR64 x Azucena were obtained from The European comparative gramineae mapping programme (EGRAM) (Filloux et al. 2000). A sample of the F₁ seeds used for the development of DH lines from the cross IR64 x Azucena were kindly provided by the germplasm bank of CIRAD-CA. F₂ seeds were harvested on these plants.

Ninety five F₆ SSD progeny from the cross between Bala (*indica*) and Azucena (Price et al. 2000) were kindly provided by Dr. Adam Price. This population was derived from a F₂ Azucena x Bala progeny obtained by Price and Thomos (1997) and was used to map 101 RFLP and 34 AFLP markers (Price et al. 2000). For allelism tests, 52 DH progeny from the cross ZYQ8 x JX17 used for genetic mapping of the blast resistance gene *Pi11* (also named *Pizh*, Zhu et al. 1993) were



kindly provided by Prof. Lihuang Zhu. ZYQ8 is an *indica* cultivar and JX 17 is a *japonica* cultivar.

Rice cultivation and *M. grisea* inoculation

Rice plants were grown in greenhouse conditions with temperatures between 20 and 30°C and with supplemental light supplied in winter. Fourteen lines of 10 to 15 seeds were sown in trays of 40 x 29 x 7 cm filled with compost (7/8 Neuhaus compost n°9, 1/8 pozzolana). Ten to 15 seeds of each cultivar or DH line were sown in rows in trays containing 14 lines each. Soil was kept moist with water and, once a week, with nutritive solution (1.5 g/l NPK 17/7/22 fertilizer, 0.25 g/l Quelado ADDHA Fe[®] (6%), 0.25 g/l Hortrilon[®]). Nitrogen fertilization with 8.6 g of nitrogen equivalent per tray was done at 10, 3, and 1 d before inoculation to increase susceptibility to blast.

Inoculations were performed three weeks after sowing (4-5 leaf stage) either by injection or by spraying conidial suspensions. Thirty ml of a 50,000 conidia per ml suspension (with 0.5% gelatin) were sprayed on each tray. Subsequently, rice plants were incubated for 16 hours in a controlled climatic chamber at 24°C with 95% relative humidity. They were then transferred back to the greenhouse. For the injection method, plants were inoculated by syringe injection of 0.1 ml of a 25,000 conidia per ml suspension into leaf sheaths. For each cultivar, cross parent, DH or SSD line, 10 to 15 plants were grown and inoculated at least twice. After 7 d, lesion types on rice leaves were observed and scored 1 (no symptoms) to 6 (typical susceptible lesions) according to a standard reference scale (Silué et al. 1992). Individuals with scores between 1 and 3 were considered to be resistant and individuals with scores from 4 to 6 were considered to be susceptible.

Simple Sequence Repeats (SSR) amplification

The four mapped SSR markers RM44, RM72, RM404 and RM483 were amplified following published protocols (Wu and Tanksley 1993, Temnykh et al. 2000). Genomic DNA from IR64, Azucena and their progeny were extracted using CTAB (Murray and Thompson 1980) and used as template for PCR reactions with oligonucleotide pairs RM44U: CGGGCAATCCGAACAACC, RM44L: TCGGGAAAACCTACCCTACC (RM44, Chen et al. 1997), RM72U: CCGGCGATAAAACAATGAG, RM72L: GCATCGGTCCTAACTAAGGG (RM72, Temnykh et al. 2000), RM404U: CCAATCATTAACCCCTGAGC, RM404L: GCCTTCATGCTTCAGAAGAC (RM404, Temnykh et al. 2001), RM483U: CTTCCACCATAAAACCGGAG, RM483L: ACACCGGTGATCTTGTAGCC (RM483, Temnykh et al. 2001). PCR was performed using the protocol of Chen et al. (1997). PCR products were separated by 4% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide, or by 5% polyacrylamide gel electrophoresis using 7.5 M urea as denaturant and radiolabelled oligonucleotides for autoradiographic detection.

RFLP, YAC Probes and Southern analysis

Using the sequences of the RFLP probes mapped by Kurata et al. (1994), we designed the following oligonucleotides for PCR amplification of these sequences from rice genomic DNA: C483U: CTTCCACCATAAAACCGGAG, C483L: ACACCGGTGATCTTGTAGCC, (C483, annealing temperature (Ta) = 50°C); G1010U: CCAAGTATTCTAGCTCGCTGTC, G1010L: TGCTAGAGATTTGAGAAGATGG, (G1010, Ta = 50°C); R1813U: TACAATGAGCCTGAGCAGA, R1813L: AACTGGGTGAAGACGGCAA (R1813, Ta = 55°C); S1633U: TCGCCGCACTTTCTCCA, S1633L: CCGACCCTCTCGCGTACTT (S1633, Ta = 50°C). PCR products were separated by gel electrophoresis on 2% low melting agarose. DNA fragments were purified from the gel and used as templates for the synthesis of radiolabelled probes using the Megaprime™ kit from Amersham Life Science (Saclay, France). Probes from Yeast Artificial Chromosome ends (YAC end probes) were obtained following the protocol of Emmanuelle Bourgeois (personal communication) derived from the walking PCR protocol (Devic et al. 1997). Briefly, YAC DNA was digested and then ligated to an adapter. A nested PCR protocol was then performed to specifically amplify a fragment including a part of the vector and the end of the cloned insert. These probes were obtained using clones Y3140 and Y2643 of the YAC library constructed from Nipponbare (Umehara et al. 1995). Southern transfers and hybridizations were performed according to Hoisington et al. (1994).

Genetic mapping

The resistance gene corresponding to *ACE1*, the four SSR markers RM44, RM72, RM404 and RM483, and the four RFLP markers R1813, G1010, C483 and S1633, were mapped using 105 DH lines from the cross IR64 x Azucena and added to the existing map (Causse et al. 1994). On each side of *Pi33*, the closest SSR marker was chosen. These two closest flanking markers were mapped using an additional set of 501 DH lines and 284 SSD lines from the cross IR64 x Azucena (Filloux et al. 2000). The rice lines that corresponded to recombination events between these two SSR markers, were used to map G1010, R1813, C483 and S1633B. YAC end probes obtained from YAC clones Y2643 and Y3140 were checked for copy number and diversity using IR64 and Azucena DNA digested with several restriction enzymes. Single copy YAC end probes showing polymorphism between IR64 and Azucena were finely mapped as described above for other RFLP probes.

Results

Identification of rice cultivars resistant to *M. grisea* isolates carrying the avirulence gene *ACE1*

Rice cultivars' resistance to *M. grisea* isolates carrying the avirulence gene *ACE1* was assessed using isogenic *M. grisea* strains that only differ by their *ACE1* allele. Cultivars susceptible to PH14, PH19 or 2/0/3 *M. grisea* isolates (virulent for *ACE1*), were inoculated with isogenic PH14, PH19 or 2/0/3 strains carrying the *ACE1* avirulence allele (PH14-D31C12, PH19-D31C12 or 2/0/3-D31C12). If a cultivar was only resistant to the isogenic avirulent strain, we concluded that it carries the resistance gene corresponding to *ACE1*. The rice cultivars DJ8-341 and IRAT7 that are known to carry the resistance gene corresponding to *ACE1* (Dioh et al. 2000), were used as resistant controls. The rice cultivar Maratelli was used as a susceptible control, because it does not carry known blast resistance genes (Silue et al. 1992). The rice cultivars Bala, BW100, Carreon, IR64, IR1529, TN1, TYC and ZYQ8 were resistant to at least one isogenic avirulent *M. grisea* strain, while being susceptible to the corresponding virulent isogenic *M. grisea* strain (Table 1), demonstrating that these cultivars carry the *R* gene corresponding to *ACE1*.

To determine whether the resistance gene corresponding to *ACE1* was an already known gene, a set of differential rice cultivars established by Kiyosawa (Ezuka 1979, Kiyosawa 1984, Kiyosawa et al. 1986) were inoculated with the *M. grisea* isogenic strains 2/0/3 (virulent) and 2/0/3-D31C12 (avirulent for *ACE1*). All except K1 showed susceptibility to both strains (Table 1). These results indicate that the resistance gene corresponding to *ACE1* is not any of the following genes: *Pia*, *Pif*, *Pik*, *Pik^m*, *Pik^p*, *Pik^s*, *Pis^h*, *Pit*, *Pita²*, *Piz*, *Piz^t*. Since K1 was resistant to both strains, no conclusion could be drawn concerning *Pita*. As the *R* gene corresponding to *ACE1* was shown to be absent from the susceptible rice cultivar CO39, we tested the CO39-derived isogenic rice lines that carry different known resistance genes (*Pi1*, *Pi2*, *Pi3*, *Pita*, *Pi4^b*: Mackill and Bonman 1992). All but one of these isogenic differential rice lines were susceptible to the *ACE1* avirulent *M. grisea* strains, suggesting that they do not carry the *R* gene corresponding to *ACE1* (Table 1). The isogenic differential rice line C101LAC, carrying the resistance gene *Pi1* (Mackill and Bonman 1992), was resistant to the *ACE1* avirulent *M. grisea* strains PH19-D31C12 and 2/0/3-D31C12, while being susceptible to PH19 and 2/0/3 virulent isolates. These results indicate that C101LAC carries the *R* gene corresponding to *ACE1* and that it could be *Pi1*. However, the isogenic differential rice lines C104LAC and C103TTP, which also carry *Pi1* were susceptible to the *ACE1* avirulent *M. grisea* strains. Since the differential rice lines that carry *Pi1* react differently to the *ACE1* avirulent strains, we considered that *Pi1* is not the *R* gene corresponding to *ACE1* and that C101LAC must carry at least two resistance genes, *Pi1* and the *R* gene corresponding to *ACE1*.

Surprisingly, the two parents of C101LAC, CO39 and LAC 23 were susceptible to the *ACE1* avirulent *M. grisea* strains, indicating that they do not carry the resistance gene corresponding to *ACE1*. To explain this unexpected result, we hypothesized that the LAC23 seed stock used in this study could be different from

the stock used as the resistant parent for C101LAC. LAC23 was phenotypically characterized as conferring resistance to a set of *M. grisea* strains including PO6-6 (= PH14) (Mackill and Bonman 1992). In this study, LAC23 was susceptible to PH14. This result confirms the hypothesis of non conformity of LAC23 seed lots. No other seed lot was tested since the lot tested in this study was received directly from the institute that developed C101LAC (Genetic Resources Center, International Rice Research Institute) and, thus, was likely to be the best source of LAC23.

Genetic mapping of the *R* gene corresponding to *ACE1*.

IR64 x Azucena cross

The rice cultivar Azucena is susceptible to the *ACE1* avirulent *M. grisea* strain PH14-D31C12, demonstrating that it does not carry the *R* gene corresponding to *ACE1* (Table 1). Since this *R* gene was detected in the rice cultivars IR64 and Bala (Table 1), we used progenies from crosses involving Azucena as the susceptible parent and IR64 or Bala as the resistant parent, to map the *R* gene corresponding to *ACE1*. The 105 DH progeny lines from the cross IR64 x Azucena were inoculated with the virulent strain PH14 and its *ACE1* avirulent isogenic strain PH14-D31C12. We observed a 1:1 segregation for resistance:susceptibility to PH14-D31C12 (avirulent), whereas all DH lines were susceptible to PH14 (virulent). These results demonstrate that the resistance of IR64 corresponding to the avirulence gene *ACE1* is controlled by a single gene.

We mapped the three molecular markers RM72 (SSR marker), R1813 and G1010 (RFLP markers) in the IR64 x Azucena cross and showed that they cosegregated and were closely linked (2 ± 1 cM) to the resistance gene locus. The two molecular markers G104 (RFLP marker) and RM44 (SSR marker) were located on the opposite side of the resistance gene locus (at 4.7 ± 1 and 9.3 ± 1 cM, respectively). Consequently, the resistance gene corresponding to *ACE1* must be on the short arm of the rice Chromosome 8 (Fig. 1), where all these SSR and RFLP markers are located (Kurata et al. 1994, Temnykh et al. 2001, Sallaud et al. in press).

Azucena x Bala cross

To confirm the position of the resistance gene corresponding to *ACE1*, 95 F₆ SSD lines from the cross Azucena x Bala (Price et al. 2000) were inoculated with the *ACE1* virulent/avirulent isogenic strains 2/0/3 and 2/0/3-D31C12. All the SSD progeny were susceptible to 2/0/3, whereas a 1:1 (resistant:susceptible) segregation was observed with 2/0/3-D31C12, demonstrating the segregation of a single resistance gene from Bala. This gene mapped on chromosome 8 at 3.6 ± 1.8 cM from the RFLP marker G1010, confirming the position determined with the IR64 x Azucena cross.

Characterization of *Pi-33*, a new blast resistance gene

Two known rice blast resistance genes are located on chromosome 8. *Pi11* from the ZYQ8 *indica* cultivar, mapped at 14.9 cM from RFLP marker BP127 (Zhu et al. 1993), and *Pi29(t)* from the IR64 *indica* cultivar was mapped close to RZ617 (Sallaud et al. in press). Since we showed that these two rice cultivars carry the *R* gene corresponding to *ACE1* (Table 1), we performed allelism tests between *Pi11*, *Pi29(t)* and the *R* gene corresponding to *ACE1*. For *Pi11*, parents and 52 DH progeny from the cross ZYQ8 x JX17 (Zhu et al. 1993), were inoculated with *ACE1* virulent/avirulent isogenic strains PH14/PH14-D31C12. ZYQ8 was susceptible to the virulent strain PH14 (Table 1), but JX 17 and half of the 52 DH lines were resistant to PH14, demonstrating that JX17 carries another resistance gene that recognizes an avirulence factor from the PH14 strain that differs from *ACE1*. Among the 23 DH lines from this cross that were susceptible to PH14, and that showed a clear phenotype for *Pi11*, 5 DH lines had recombinant phenotypes with regards to the resistance conferred by *Pi11* and by the *R* gene corresponding to *ACE1*. Two DH lines were susceptible to the *ACE1* avirulent strain PH14-D31C12, while carrying a *Pi11* resistant allele, and three were resistant to the *ACE1* avirulent strain PH14-D31C12, while carrying a *Pi11* susceptible allele. Therefore, these two *R* genes are different and separated by 22 ± 4 cM (Fig. 1).

The resistance gene *Pi29(t)* located on chromosome 8 was mapped using *M. grisea* isolate CL6 and 104 of the 105 DH progeny lines also used to map the resistance gene corresponding to *ACE1* (Sallaud et al. in press). Resistance of IR64 to CL6 is controlled by two dominant genes, *Pi29(t)* located on the chromosome 8 and *Pi24(t)* located on chromosome 1 (Sallaud et al. in press). Therefore, DH lines resistant to CL6, can carry either *Pi29(t)*, *Pi24(t)* or both *R* genes. Among the 20 DH lines that were susceptible to CL6, four were susceptible to the virulent isolate PH14 and resistant to *ACE1* avirulent isogenic strain PH14-D31C12. The existence of recombinant lines demonstrates that *Pi29(t)* differs from the resistance gene corresponding to *ACE1*. The distance between the two genes was evaluated to be 20 cM (Fig. 1). This result fits with the work of Sallaud et al. (in press), who mapped *Pi29(t)* close to the RFLP marker RZ617. In this study, RZ617 was located at 28 cM from the *R* gene corresponding to *ACE1*.

On the basis of the differential reactions of resistant cultivars to *M. grisea* isogenic strains differing only by their *ACE1* allele and of the genetic characterization and mapping of the *R* gene corresponding to *ACE1*, we conclude that we have identified a new resistance gene we named *Pi33*, according to the international rules in use for blast resistance genes (Kinoshita, 1998).

To determine whether *Pi33* is a recessive or dominant gene, 207 F₂ individuals from the IR64 x Azucena cross were inoculated with the *ACE1* avirulent isogenic strain PH14-D31C12. One hundred and sixty two plants showed resistance and 45 susceptibility to PH14-D31C12 ($\chi^2 = 1.17$, $P = 0.28$). All the 39 IR64 plants showed resistance symptoms while 26 of 28 (93%) Azucena plants showed

susceptibility. The two Azucena plants that did not show susceptibility symptoms were considered to have escaped inoculation. F₂ data were then corrected using the fact that 7 % of the susceptible Azucena plants did not show susceptible symptoms. The data obtained after correction were 159 resistant and 48 susceptible plants ($\chi^2 = 0.32$, $P = 0.57$). Thus, *Pi33* was considered to be dominant.

Fine mapping of *Pi33*

Eight-hundred fifty one IR64 x Azucena DH lines were characterized using the RM44 and RM72 SSR markers located on both sides of the *Pi33* locus. These two markers are at a distance of 10.6 ± 0.1 cM from one another. Additional molecular markers were mapped between RM72 and RM44 using 51 DH and 22 SSD lines that had a recombinant genotype for these two markers. The four RFLP markers G1010, R1813, C483 and S1633B (Kurata et al. 1994) were located between RM44 and RM72 (Fig. 2). *Pi33* was mapped between the two markers RM72 and C483 that are at a distance of 2.1 ± 0.2 cM from each other. Saji et al. (2001) showed that the Nipponbare YAC clones Y2643 and Y3140 (Umehara et al. 1995) hybridized with markers R1813 and C483, respectively. One of the four YAC end probes, Y2643L, was shown to be a monolocus probe polymorphic between IR64 and Azucena. Y2643L was mapped between *Pi33* and C483, at a distance of 0.5 ± 0.2 cM from C483 and 0.9 ± 0.2 cM from *Pi33* (Fig. 2). Thus, *Pi33* is located in a 1.6 ± 0.2 cM interval between RM72 and Y2643L (Fig. 2).

Discussion

Pi33*, a new rice blast resistance gene interacting with *M. grisea* avirulence gene *ACE1

In this study, we identified and mapped a new rice blast resistance gene, *Pi33*, on the short arm of chromosome 8. Differentiation of a new resistance gene from known *R* genes is difficult due to the uncharacterized avirulence genes in any given rice blast isolate used to identify the *R* gene and because rice cultivars often carry several resistance genes that provide overlapped resistance phenotypes. Pairs of isogenic *M. grisea* strains that only differ by their allele of the *ACE1* avirulence gene were used to distinguish unambiguously *Pi33* from other *R* genes. We cannot exclude that *ACE1* could be involved in the recognition of different resistance genes but, to date, such interactions were seldom reported (Dixon et al. 1998, van der Hoorn et al. 2001). In these few examples the resistance genes were found at the same locus and shared high sequence homology. To our knowledge, this is the first report of the use of a cloned fungal avirulence gene to predict the corresponding *R* gene.

We analyzed resistant cultivars for their differential reaction to *M. grisea* isogenic strains differing only by their *ACE1* allele, mapped the *Pi33* gene on the rice genetic map and performed allelism tests with known resistance genes mapping to the same chromosome. These experiments demonstrated that *Pi33* is different from all other known rice blast resistance genes.

Putative origin of *Pi33*

Pi33 was detected in several semi-dwarf *indica* rice cultivars such as Bala, DJ8-341, IR64, IR1529, IRAT7, Taichung Native 1 (TN1) and Zhai-Ye-Qing 8 (ZYQ8).

Two different hypotheses can be proposed for the wide distribution of *Pi33*. First, *Pi33* originates from a common ancestor of these cultivars, and second, *Pi33* is present in several traditional cultivars and has been independently selected from different sources.

In the first hypothesis, the only common parent of most of these cultivars (Bala, BW100, DJ8-341, IR64 and IRAT7) is TN1 (IRRI, 2002). This cultivar harbors *Pi33* and was derived from the cross between Tsai-Yuan-Chung (TYC) and Dee-Geo-Woo-Gen (DGWG). DGWG is the spontaneous mutant used for the introgression of the semi-dwarfism gene (*sd1*) into the green revolution *indica* cultivars (Monna et al. 2002). DGWG did not carry *Pi33* whereas TYC did. TN1 was used as a secondary source for semi-dwarfism in many crosses, and thus, is likely to have transmitted *Pi33* in semi-dwarf cultivars.

In the second hypothesis, *Pi33* was introgressed into the semi-dwarf *indica* cultivars from different sources. This hypothesis is supported by the fact that Carreon (a traditional *indica* cultivar) and ZYQ8 (an improved semi dwarf cultivar) carry *Pi33* but do not have TYC nor TN1 in their genealogy.

Whatever the origin of *Pi33*, this gene has been selected several times in different independent crosses. It has been selected for in DGWG x TYC progeny (TN1 cultivar) in Taiwan, TN1 x Ebandioulaye progeny (IRAT7 cultivar) in West Africa, and in the successive crosses that led to IR64 in The Philippines. These independent selection events in different breeding programs and geographic areas, may reflect some selective advantage of *Pi33*. We could only detect a few isolates virulent to *Pi33* in our worldwide collection of more than 2,000 isolates originating from 55 countries (data not shown). This broad spectrum resistance to blast is likely to have favored the selection of *Pi33* in different countries.

Mapping of *Pi33*

The location of the resistance gene was easily determined in two independent crosses. A small but significant number of DH lines (12 among 105) from the IR64 x Azucena cross showed a susceptible phenotype when inoculated with *ACE1* avirulent isogenic strains although they inherited the allele from the

resistant parent IR64 for all markers surrounding the *Pi33* locus. With or without these 12 lines *Pi33* mapped exactly at the same position on chromosome 8 in the IR64 x Azucena cross. This position was confirmed by the results of the Azucena x Bala cross where none of these "suppressed" lines was observed. Consequently, we considered that these lines harbored *Pi33*, but that one or several additional segregating gene(s) could suppress the expression of this *R* gene. If one independent gene suppresses the expression of *Pi33*, a 1:1 S:R segregation is expected in the lines carrying IR64 allele for the markers surrounding *Pi33*. Only 12 lines over 54 showed this suppressed phenotype. This result indicated that either more than one gene is involved in this suppressing process, either the suppressor gene is linked to *Pi33*. When testing this second hypothesis, the suppressor gene was located at the same locus as *Pi33*. At this stage, based on the results obtained, it is not possible to choose between these two hypotheses. Moreover, other hypotheses could be proposed but cannot be tested without additional crosses.

Positional cloning of *Pi33*

Although rice blast is a model pathosystem, the molecular mechanisms underlying the interaction between avirulence and resistance genes remains poorly understood. Therefore, the characterization of new resistance genes together with the fungal signals they recognize is of importance to understand how plants resist microbial pathogens. This importance is strengthened by the fact that *ACE1* does not share the typical characteristics of *AVR* genes from other fungi. The fine genetic map of *Pi33* described in this study will be very useful in constructing a physical map of this locus and in isolating this resistance gene. Positioning of *Pi33* will also help distinguish it from other *R* genes that could be mapped on chromosome 8. Allelism tests are often difficult to perform. Fine mapping is an alternative way to try to compare *R* genes and may be sufficient to identify a new gene in some cases.

Acknowledgements. We would like to thank Claudia Kaye, Nourollah Ahmadi and Michel Peterschmitt for critical review of the manuscript. YAC clones were obtained from the Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF) DNA bank.

References

- Böhnert HU, Fudal I, Dioh W, Tharreau D, Notteghem JL, Lebrun MH (2001) A fungal polyketide synthase is controlling recognition of avirulent *Magnaporthe grisea* by resistant rice. In: 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 10-14th July, 2001. Madison, Wisconsin, USA. p 122 (Abstract): <http://www.plantpath.wisc.edu/mpmi/>
- Bryan GT, Wu KS, Farrall L, Jia Y, Hershey HP, McAdams SA, Faulk KN, Donaldson GK, Tarchini R, Valent B (2000) A single amino acid difference distinguishes resistant and susceptible alleles of the rice blast gene *Pi-ta*. *Plant Cell* 12:2033-2045
- 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 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.). *Theor Appl Genet* 94:553-567
- Dangl JL, Jones JDG (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826-833
- Devic M, Albert S, Delseny M, Roscoe TJ (1997) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol Biochem* 35:331-339
- Dioh W, Tharreau D, Notteghem JL, Orbach M, Lebrun MH (2000) Mapping of avirulence genes in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*, with RFLP and RAPD markers. *Mol Plant Microbe Interact* 13:217-27
- Dixon MS, Hatzixanthis K, Jones DA, Harrison K, Jones JD (1998) The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* 10:1915-1925
- Ezuka A (1979) Breeding for and genetics of blast resistance in Japan. In: Proceedings of the rice blast workshop. IRRI, Los Baños, The Philippines, pp 27-48
- Filloux D, Brasseleur G, Leborgne L, Madelon E, Berger A, Garsmeur O, Grivet L, Glaszmann JC, Mathieu T, Lorieux M, Guesquière A (2000) An extended population of IR64 x Azucena RILs from EGRAM European Program. In: 4th International Rice Genetics Symposium, p 279 (Abstract)
- Guideroni E, Galinato E, Louistro J, Vergara G (1992) Anther culture of tropical japonica x indica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica* 62:219-224
- Hoisington D, Khairallah M, González-de-León D (1994) Laboratory protocols: CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Second edition, CIMMYT, Mexico City, Mexico
- Huang N, Parco A, Mew T, Magpantay G, McCouch S, Guideroni E, Xu J, Subudi P, Angeles ER, Khush G (1997) RFLP mapping of isosymes, RAPD and QTLs for grain shape, brown planthopper resistance in a doubled haploid rice population. *Mol Breed* 3:105-113
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q (2001) Resistance gene complexes: Evolution and utilisation. *Annu Rev Phytopathol* 39:312-331
- Imbe T, Matsumoto S (1985) Inheritance of resistance of rice varieties to the blast fungus strains virulent to the variety "Reiho". *Japan J Breed* 35:332-339 [in Japanese with English summary]

- Inukai T, Nelson RJ, Zeigler RS, Sarkarung S, Mackill DJ, Bonman, JM, Takamure I, Kinoshita T (1994) Allelism of blast resistance genes in near isogenic lines of rice. *Phytopathology* 84:1278-1283
- IRRI (2002) International Rice Information System. <http://www.iris.irri.org/>
- Jia Y, McAdams SA, Bryan GT, Hershey HP, Valent B (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J* 19:4004-4014
- Kinoshita T (1998) Report of the committee of gene symbolization, nomenclature and linkage groups. *Rice Genet Newsl* 14:57-59
- Kiyosawa S (1971) Genetical approach to the biochemical nature of plant disease resistance. *Japan Agric Res Quart* 6:72-80
- Kiyosawa S (1984) Establishment of differential varieties for pathogenicity test of rice blast fungus. *Rice Genet Newsl* 1:95-97
- Kiyosawa S, Mackill DS, Bonman JM, Tanak Y, Ling ZZ (1986) An attempt of classification of world's rice varieties based on reaction pattern to blast fungus strains. *Bull Natl InstAgrobiol Resources* 2:13-39
- Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, Harushima Y, Sue N, Wu J, Antonio BA, Shomura A, Shimizu T, Lin SY, et al. (1994) A 300 kilobases interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nat Genet* 8:365-372
- Mackill DJ, Bonman JM (1992) Inheritance of blast resistance in near-isogenic lines of rice. *Phytopathology* 82:746-749
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1988) Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76:815-829
- Monna L, Kitazawa N, Yoshino R, Suzuki J, Masuda H, Maehara Y, Tanji M, Sato M, Nasu S, Minobe Y (2002) Positional cloning of rice semi-dwarfing gene, *sd-1*: rice "green revolution gene" encodes a mutant enzyme involved in gibberellin synthesis. *DNA Res* 9:11-17
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321-4325
- Price AH, Steele KA, Moore BJ, Barraclough PB, Clarck LJ (2000) A combined RFLP and AFLP linkage map of upland rice (*Oryza sativa*, L.) used to identify QTLs for root-penetration ability. *Theor Appl Genet* 100:49-56
- Price AH, Thomos AD (1997) Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.). II: mapping quantitative trait loci using molecular markers. *Theor Appl Genet* 95:143-152
- Sallaud C, Lorieux M, Roumen E, Tharreau D, Berruyer R, Svestasrani P, Garsmeur O, Guesquiere A, Notteghem JL (2002) Identification of five new blast resistance genes in the highly blast resistant variety IR64 using a QTL mapping strategy. *Theor Appl Genet* (in press)
- Saji S, Umehara Y, Antonio BA, Yamane H, Tanoue H, Baba T, Aoki H, Ishige N, Wu J, Koike K, Matsumoto T, Sasaki T (2001) A physical map with yeast artificial chromosome (YAC) clones covering 63% of the 12 rice chromosomes. *Genome* 44:32-37
- Silué D, Tharreau D, Notteghem JL (1992) Identification of *Magnaporthe grisea* avirulence genes to seven rice cultivars. *Phytopathology* 82:1462-1467
- Takahashi Y (1965) Genetics of resistance to the rice blast disease. In: *The Rice Blast Disease*. Proceedings of a symposium at International Rice Research

- Institute, Los Baños, The Philippines. The Johns Hopkins press, Baltimore, Maryland, pp 303-329
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauch N, Lipovich L, Cho YC, Ishii T, McCouch SR (2000) Mapping and genome organisation of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 100:697-712
- Temnykh S, DeClerck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S. (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res* 11:1441-1452
- Umehara Y, Inagaki A, Tanoue H, Yasukoshi Y, Nagamura Y, Saji S, Otsuki Y, Fujimura T, Kurata N, Minobe Y (1995) Construction and characterization of a rice YAC library for physical mapping. *Mol Breed* 1:79-89
- Van der Hoorn RA, Kruijt M, Roth R, Brandwagt BF, Joosten MH, De Wit PJ (2001) Intragenic recombination generated two distinct *Cf* genes that mediate AVR9 recognition in the natural population of *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10493-10498.
- Wang GL, Mackill DJ, Bonman JM, McCouch SR, Champoux MC, Nelson RJ (1994) RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. *Genetics* 136:1421-1434
- Wang ZX, Yano M, Yamanouchi U, Iwamoto M, Monna L, Hayasaka H, Sasaki T (1999) The *Pi-b* gene for blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Plant J* 19:55-64
- Wu KS, Tanksley SD (1993) Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet* 241:225-235
- Yu ZH, Mackill DJ, Bonman JM, Tanksley (1991a) Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. *Theor Appl Genet* 81:471-476
- Yu ZH, Mackill DJ, Bonman JM, Tanksley (1991b) RFLP tagging of blast resistance genes in rice. In: *Rice Genetics II*. IRRI, Manila, The Philippines. pp 451-458
- Zhu LH, Chen Y, Xu YB, Xu JC, Cai HW, Ling ZZ (1993) Construction of a molecular map of rice and gene mapping using double haploid population of a cross between *indica* and *japonica* varieties. *Rice Genet Newsl* 10:132-135

Fig. 1: Mapping of the resistance gene corresponding to the *ACE1 Magnaporthe grisea* avirulence gene in the IR64 x Azucena and ZYQ8 x JX17 crosses.

- ¹ mapped during this study
- ² mapped during the EGRAM project (Filloux et al. 2000). For a complete map and details, see Sallaud et al. (in press)
- ³ mapped by Sallaud et al. (in press)
- ⁴ mapped by Zhu et al. (1993)
- ⁵ distance calculated in this study

Fig. 2: Fine mapping of *Pi33(t)* using a population of recombinant lines from the IR64 x Azucena cross.

All markers were mapped in this study.

- ¹ RFLP markers from Kurata et al. (1994)
- ² YAC end marker elaborated in this study using YAC clones from Umehara et al. (1995)
- ³ SSR markers from Temnykh et al. (2000)

IR64 x Azucena

ZYQ8 x JX17

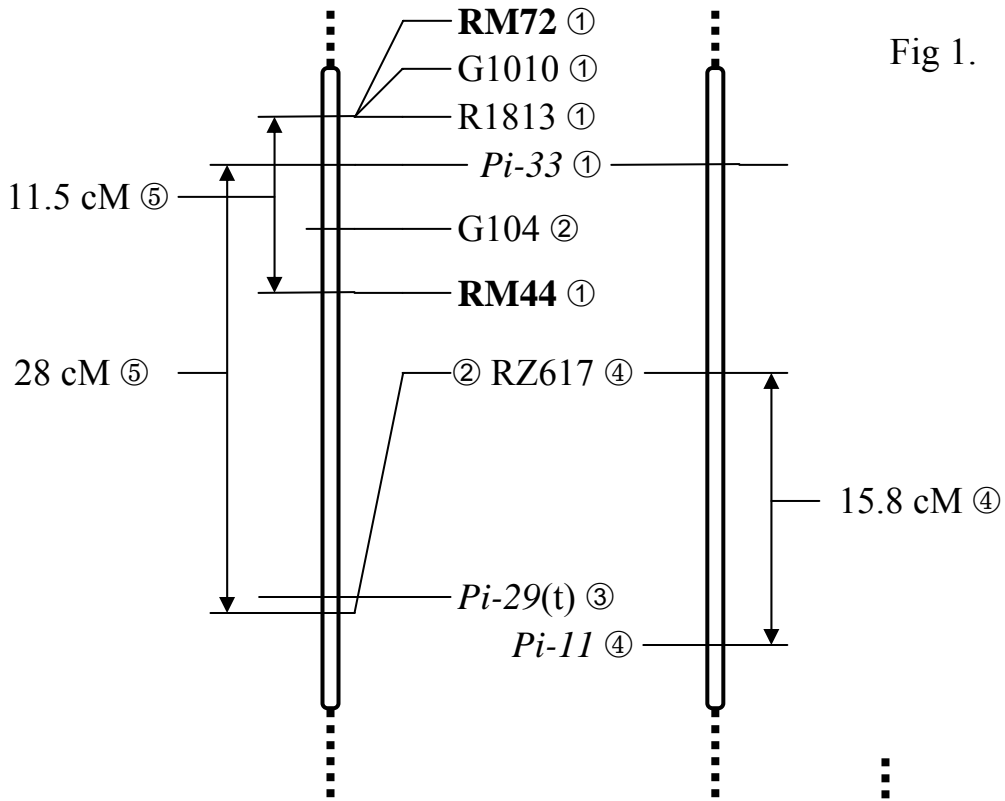


Fig 1.

Fig 2.

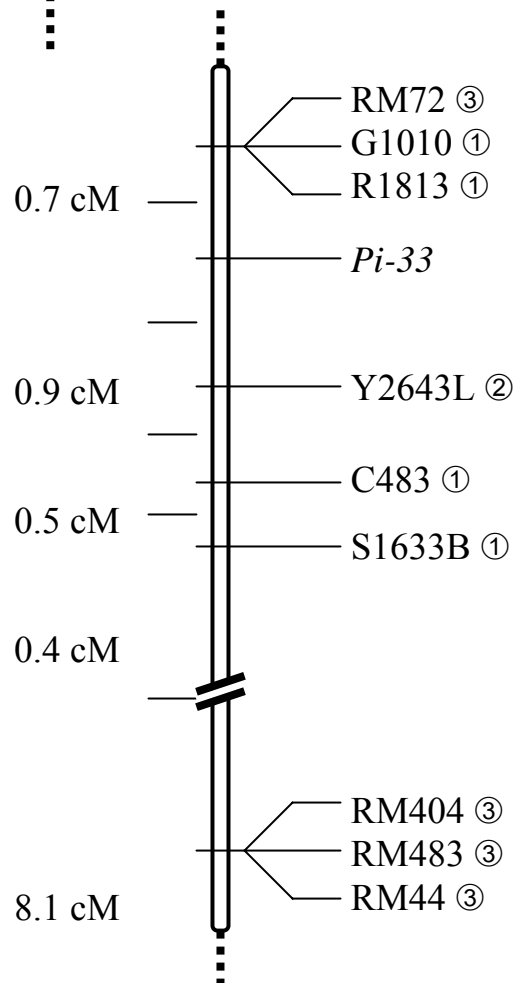


Table 1 Presence or absence of a specific resistance gene recognizing the *ACE1* avirulence gene in several rice lines and cultivars

Rice lines and cultivars	Subspecies	IRGC number	R genes harbored	Reaction to inoculation with						Specific resistance to <i>ACE-1</i>		
				Guy11	PH14	PH14-D31C12	PH19	PH19-D31C12	2/0/3		2/0/3-D31C12	
<i>Pi25</i> to												
Parents of crosses used for mapping	IR64	<i>indica</i>	66970	<i>Pi32</i>	1 ^a	6	3	5	<i>I</i>	1	1	Yes
	Azucena	<i>japonica</i>	328	-	6	6	6	6	6	6	6	No
	Bala	<i>indica</i>	12884	-	2	6	2	6	<i>3</i>	5	2	Yes
	ZYQ8	<i>indica</i>	-	<i>Pi11</i>	1	6	3	5	<i>I</i>	3	2	Yes
	JX17	<i>japonica</i>	-	-	-	2	2	-	-	6	6	No
Nipponbare ^b	<i>japonica</i>	-	-	-	5	5	5	-	-	5	5	No
Kassalath ^b	<i>indica</i>	-	-	-	4	-	-	-	-	6	6	No
Maratelli ^c	<i>japonica</i>	3091	-	-	6	6	6	6	6	6	6	No
IRAT7 ^d	<i>indica</i>	-	-	-	2	4	<i>I</i>	3	1	5	2	Yes
DJ8-341 ^d	<i>indica</i>	-	-	-	2	-	-	1	1	5	<i>I</i>	Yes
BW100	-	50657	-	-	2	-	-	6	3	5	2	Yes
Carreon	<i>indica</i>	5993	-	-	2	-	-	2	1	4	2	Yes
IR1529	<i>indica</i>	-	-	-	2	6	2	6	3	5	2	Yes
IR8	<i>indica</i>	66395	-	-	4	6	5	-	-	4	4	No
DGWG	<i>indica</i>	123	-	-	-	6	6	-	-	5	5	No
TN1	<i>indica</i>	105	-	-	-	6	3	-	-	6	3	Yes
Tetep	<i>indica</i>	11115	-	-	6	1	1	3	1	6	5	No
TYC	<i>indica</i>	-	-	-	-	6	3	-	-	6	2	Yes
LAC23	<i>japonica</i>	14957	-	-	-	6	5	3	3	6	5	No
CO39	<i>indica</i>	51231	-	-	5	-	-	6	5	5	5	No
CO39 isogenic lines	C101LAC	-	-	<i>Pi1</i>	2	2	2	6	3	5	2	Yes
	C104LAC	-	-	<i>Pi1</i>	5	-	-	6	5	5	5	No
	C103TTP	-	-	<i>Pi1</i>	5	-	-	6	5	5	5	No
	C101A51	-	-	<i>Pi2</i>	5	-	-	3	3	6	6	No
	C102A51	-	-	<i>Pi2</i>	5	-	-	-	-	5	6	No
	C104PKT	-	-	<i>Pi3</i>	4	-	-	-	-	6	6	No
	C101PKT	-	-	<i>Pita</i>	4	-	-	-	-	6	6	No
	C101TTP-3	-	-	<i>Pita</i>	5	-	-	-	-	6	6	No
(Mackill and Bonman 1992)	C105TTP-1	-	-	<i>Pita</i>	5	-	-	-	-	5	5	No
	C105TTP-2 (L-9)	-	-	<i>Pita</i>	5	-	-	-	-	6	6	No
	C105TTP-2 (L23)	-	-	<i>Pita</i>	5	-	-	-	-	5	6	No
	C105TTP-4 (L23)	-	-	<i>Pita</i> + <i>Pi4^b</i>	3	-	-	-	-	3	3	-
	Fukunishiki	<i>japonica</i>	40257	<i>Piz</i> + <i>Pish</i>	5	-	-	-	-	4	4	No
Japanese differential cultivars	K1	<i>japonica</i>	40254	<i>Pita</i>	3	-	-	-	-	3	3	-
	K59	<i>japonica</i>	40261	<i>Pit</i>	6	-	-	-	-	4	3	No
	K60	<i>japonica</i>	36112	<i>Pik^p</i>	6	-	-	-	-	5	5	No
	Kanto51	<i>japonica</i>	484	<i>Pik</i>	6	-	-	-	-	5	6	No
	Pi-n ^o 4	<i>japonica</i>	6733	<i>Pita²</i>	6	-	-	-	-	5	4	No
(Kiyosawa 1984, Kiyosawa et al. 1986)	Shin 2	<i>japonica</i>	7661	<i>Pik^s</i> + <i>Pish</i>	6	-	-	-	-	5	5	No
	Toride 1	<i>japonica</i>	40260	<i>Piz^t</i>	6	-	-	-	-	5	5	No
	Tsuyuake	<i>japonica</i>	40262	<i>Pik^m</i>	6	-	-	-	-	5	5	No
	Zenith	<i>japonica</i>	-	<i>Piz</i> <i>Pia</i>	6	-	-	-	-	5	4	No
	Norin 22	<i>japonica</i>	10905	<i>Pish</i>	4	-	-	-	-	4	4	No
(Ezuka 1979)	Reiho	<i>japonica</i>	40025	<i>Pia</i> <i>Pita²</i>	6	-	-	-	-	5	6	No
	St1	<i>japonica</i>	30329	<i>Pif</i>	5	-	-	-	-	5	5	No

Annexes

^a Disease score. Scoring was performed according to a standard reference scale (Silué et al. 1992). Cultivars with scores 1 to 3 and 4 to 6 were considered to be resistant and susceptible respectively

^b Parent of cross used by Kurata et al. (1994)

^c Susceptible control

^d Resistant cultivars used for the identification and mapping of *ACE1* (Böhnert et al. 2001, Diouh et al. 2000)

Annexe 16 : Alignement des séquences *indica* sur la séquence de Nipponbare du RGP

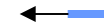
Légende:

- Non répété
- un peu répété
- Répété
- >99% homologie
- 96-98% homologie
- 90-95% homologie
- 86- 90% homologie

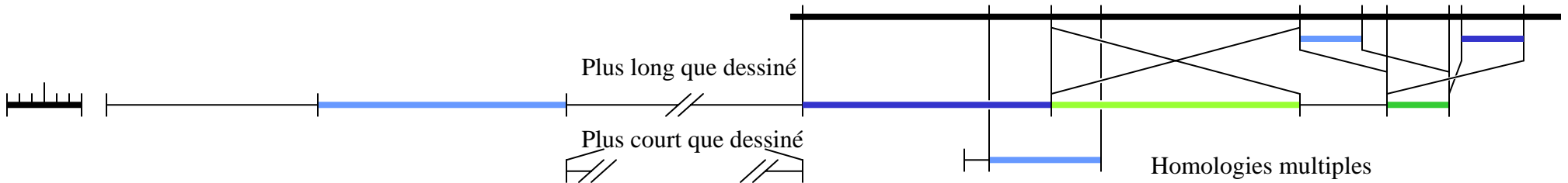
BAC end OSJNBa ou OSJNBb (Nipponbare), *japonica*
57H10r

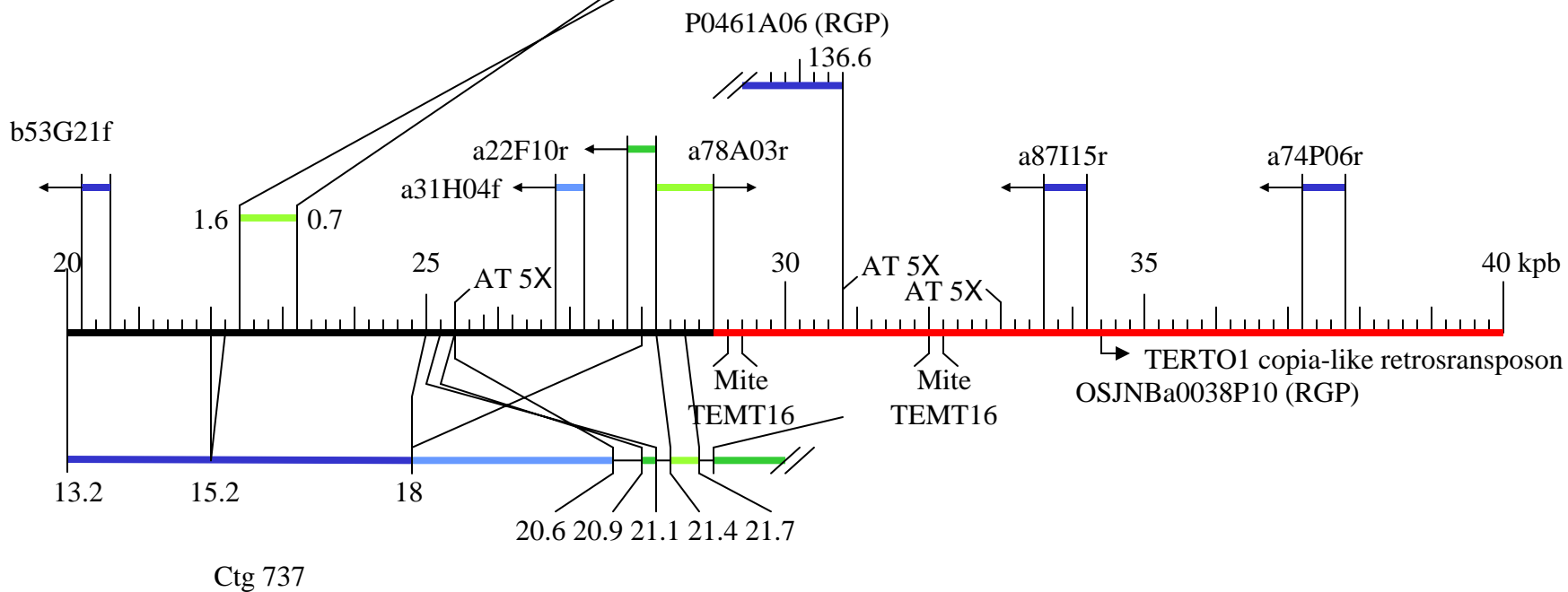
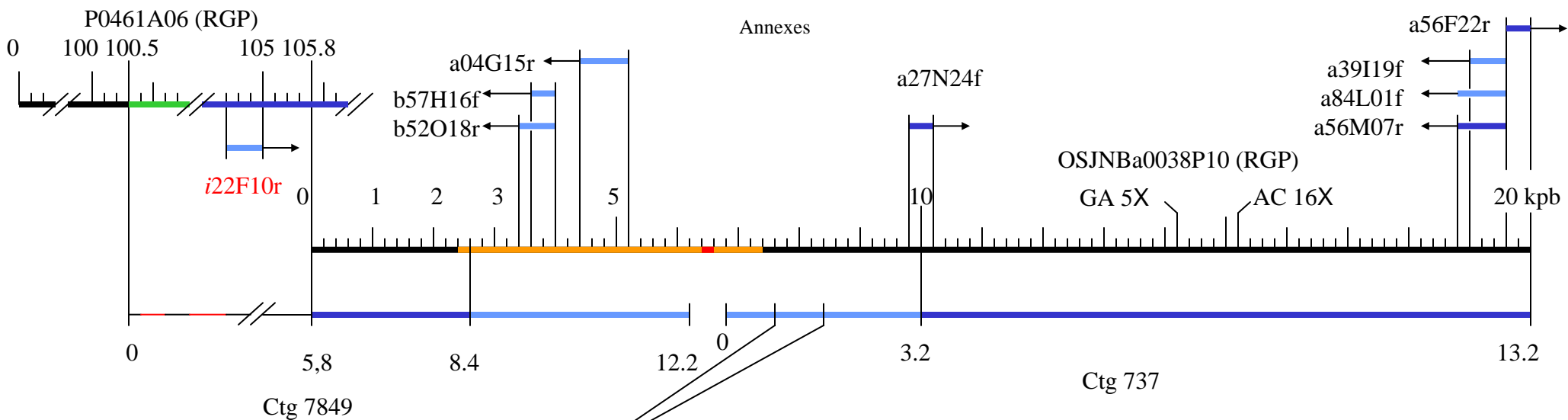


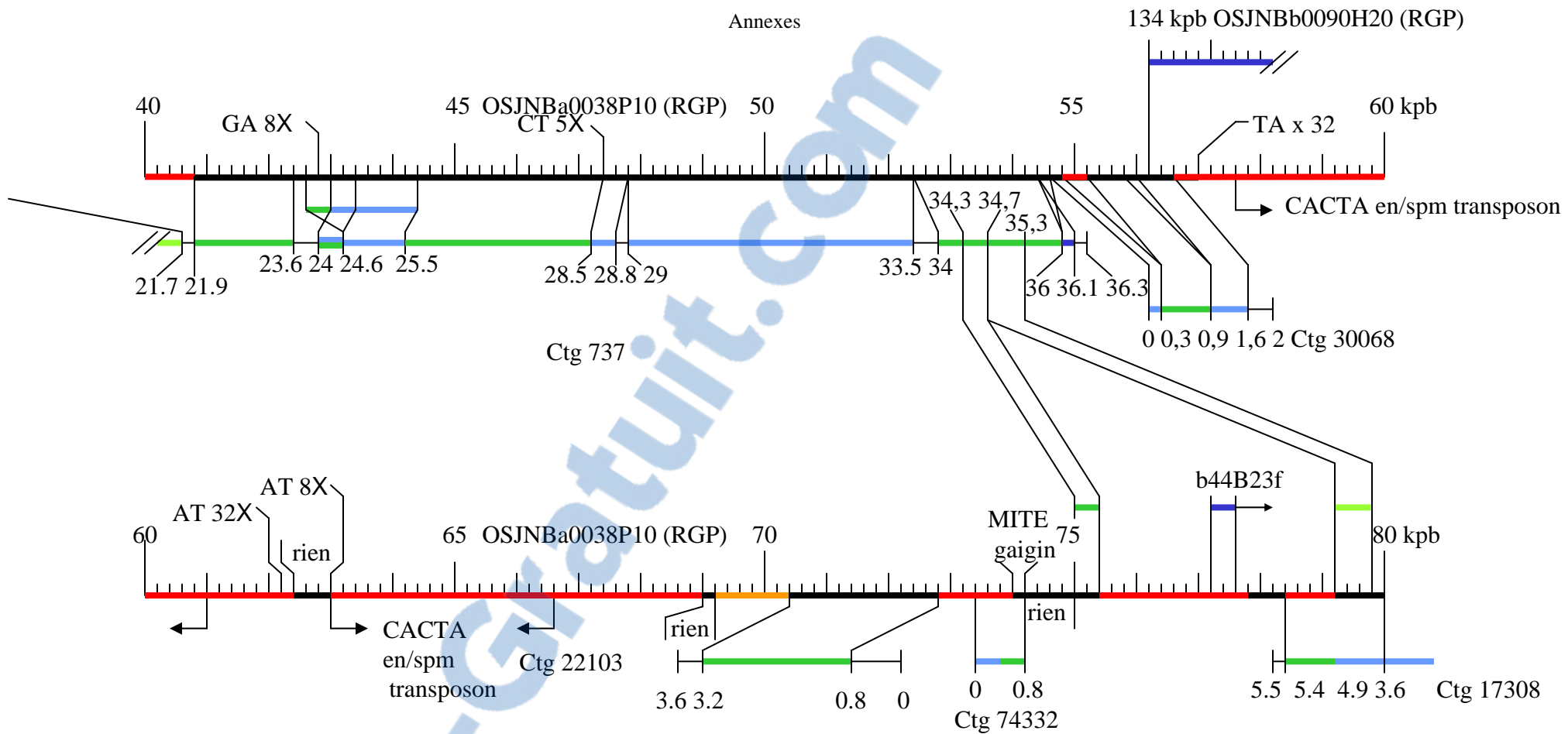
BAC end OSIIBb (93-11), *indica*
i04L15f



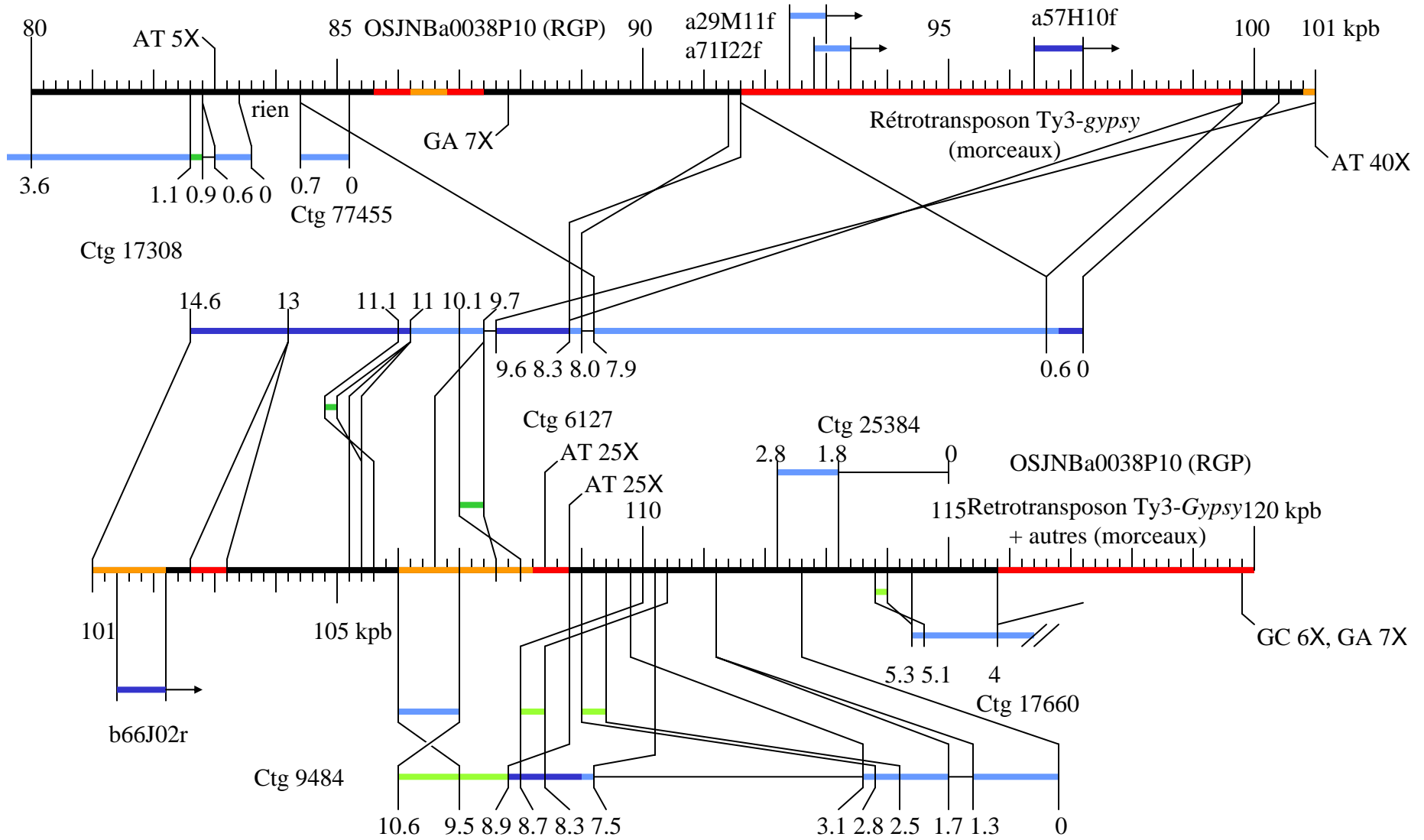
Japonica , Indica sans homologie , Indica avec homologie , rupture d 'echelle, homologie de meme sens, homologie en sens inverse, répétitions en tandem



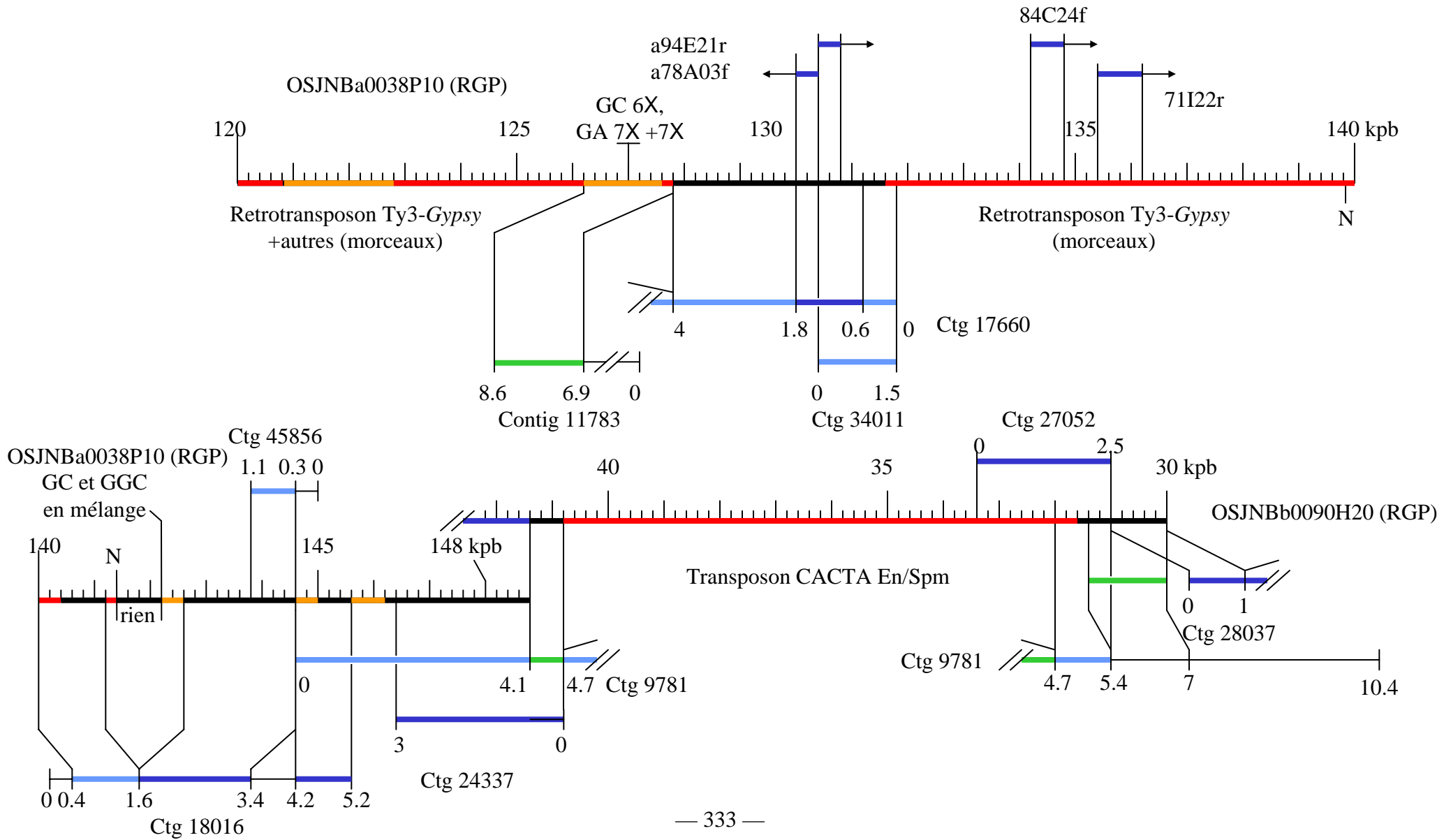


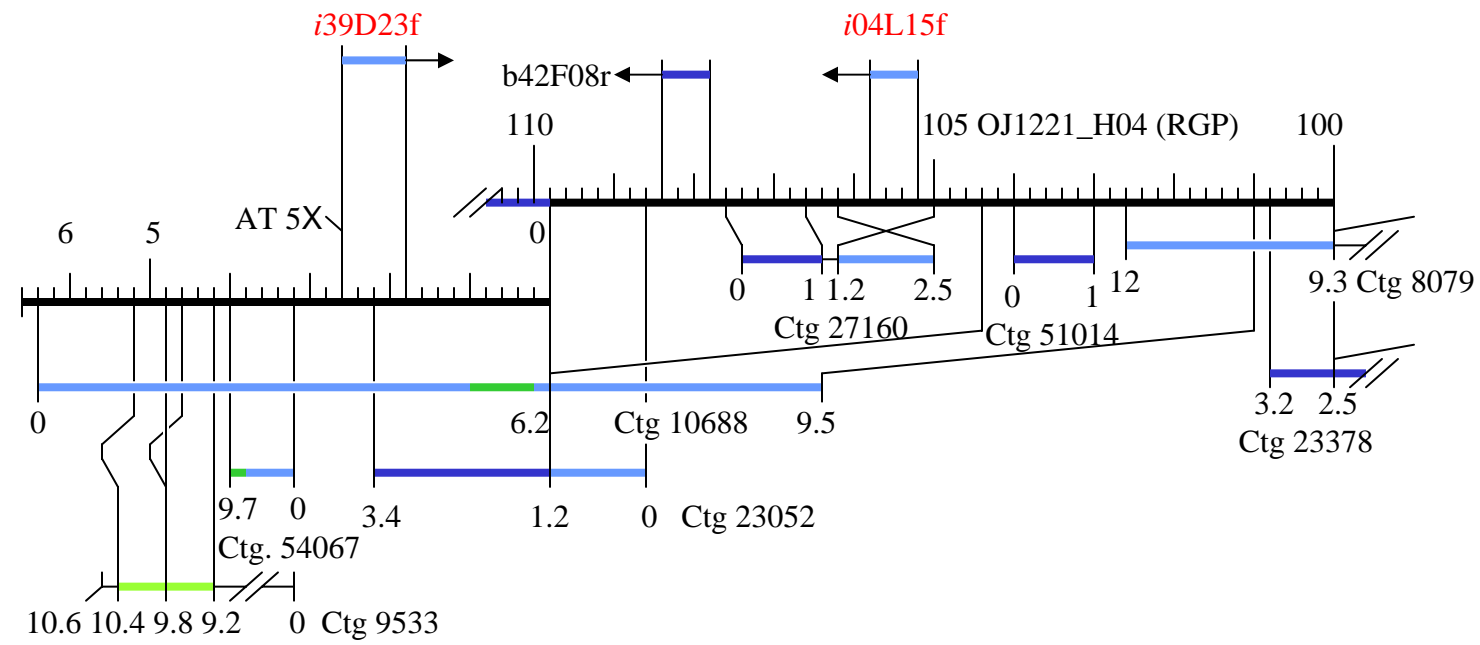
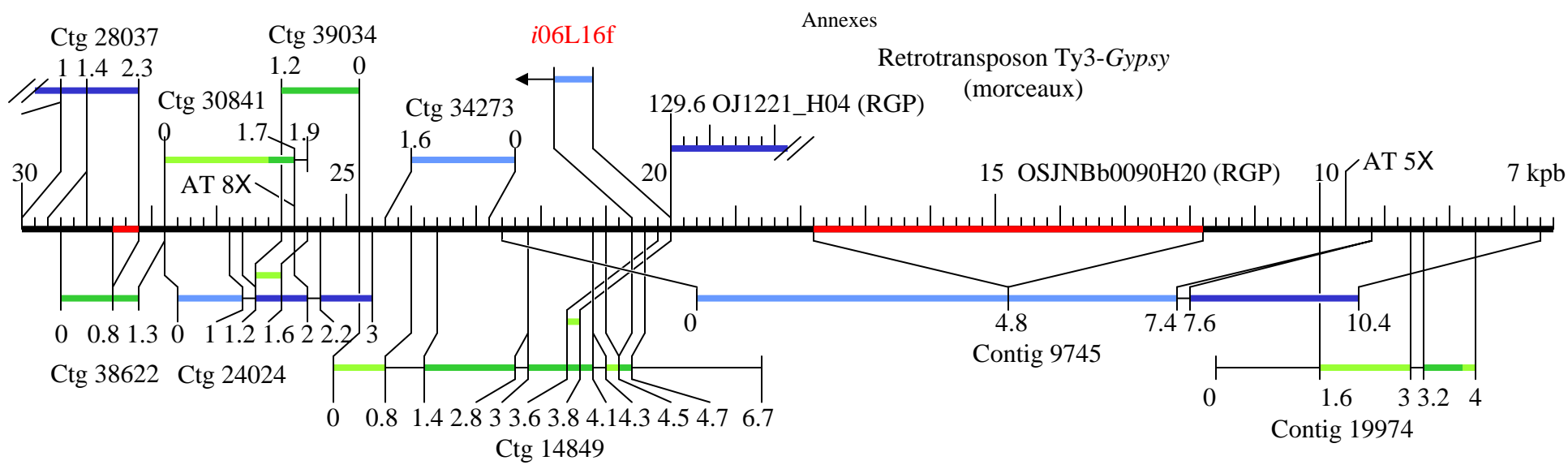


Annexes

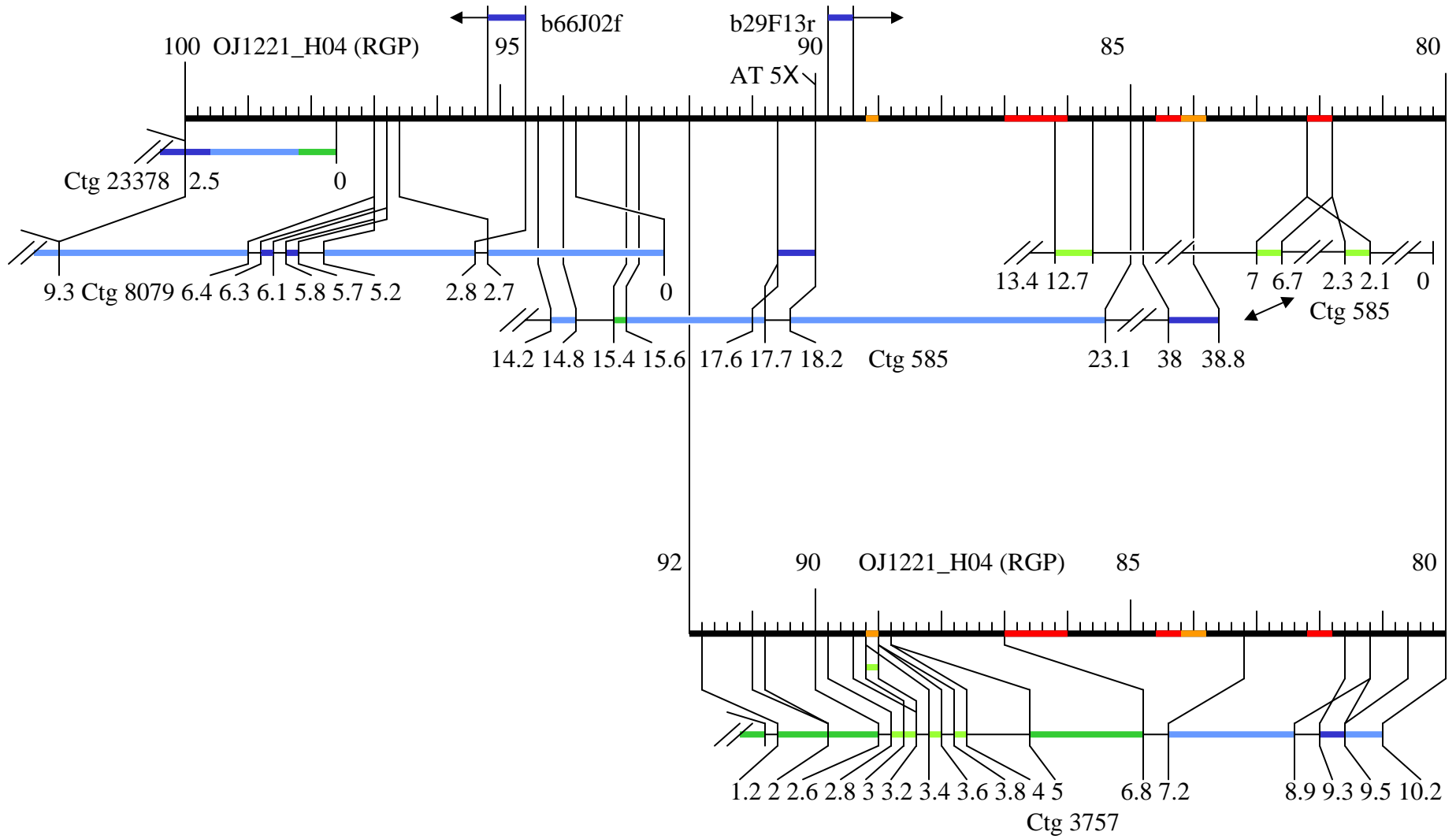


Annexes

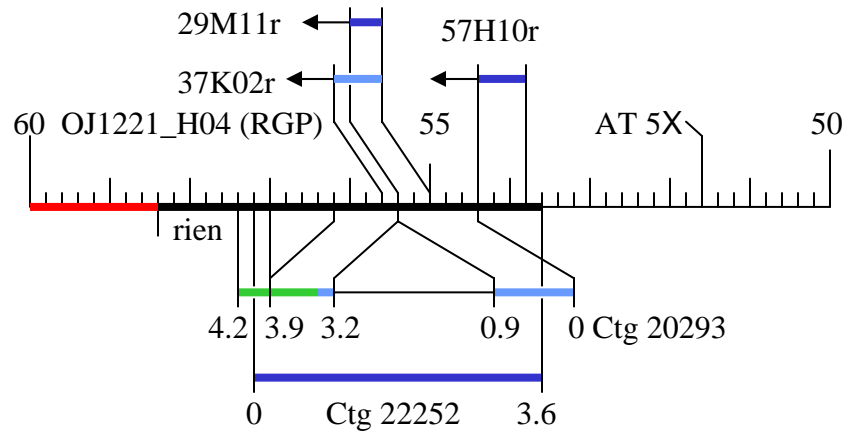
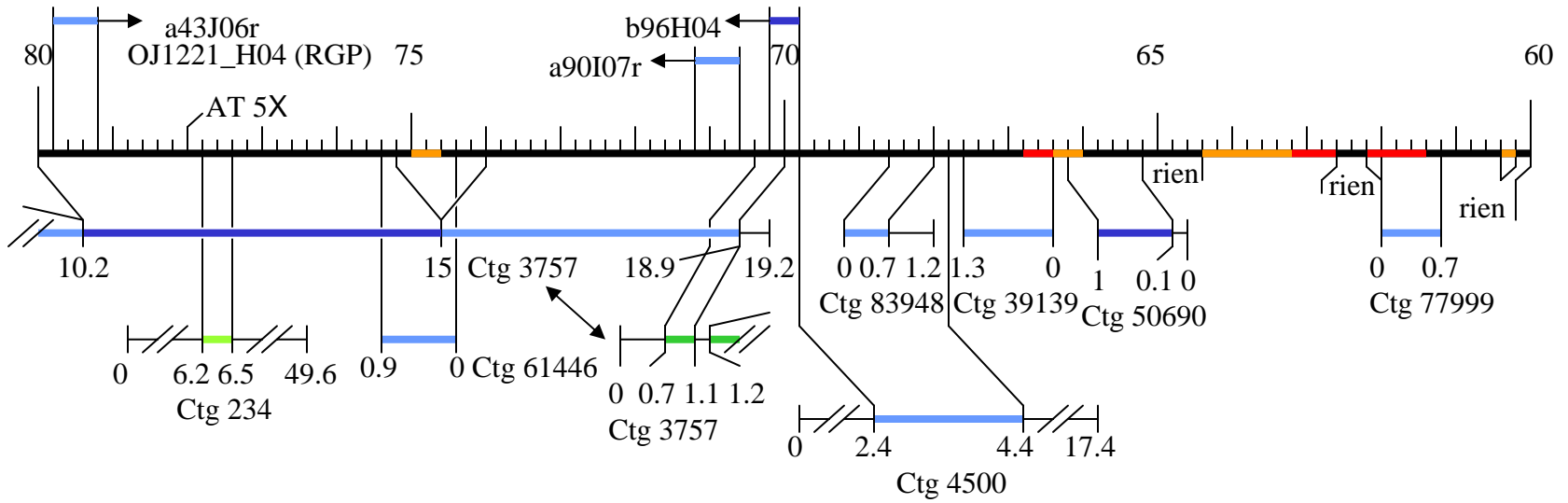




Annexes



Annexes



Annexes

Rqs : Début NBS
 1) 115 TVVRQKLEDEI AANRRFEALT EeiidTQF-- FSSNT---R EYTHSFINELD IVGRDEAKNK IVEIILSAAD Aya---FVSL PIVGLGGIGK TALAKLVYND MARIKKMPEKN LWACVSNVFD LKKLILDDIIQ SDTG-ESN-K QLSLQTLQNK
 2) 130 REVHEKLENEI AASKKDFGLT Dwtvgggcse EP--E---R ESYFSVYQPD IIGRDDARDE IVSKILRAAE Hhd---IPVL PLLGLGGIGK TELANMVYND QQIRERFSKM MWACVSNKFN LKNILQDIIIE SASG-ESC-K HNLHLQJNK
 3) 124 NIILERLDKI AQERDTIGLQ MICEMRRY-- DTSER---P QSSSLVDSSA VFGREDRREE MVRVLVSDNG HNSC-NLCVI PVVGMGGGLK TTLMQMVMYHD DRVREHFDLR IWIYVSESD ERKLTQETLE ASDYDQSV-A STNMNMLQET
 4) 128 MRIEGKIDRL IKDRHIVdpi mrf--NRE-- EIRER---P KTSSLDIDSS VYGREEDKEV IVNMLLTTNN SNHV-NLSIL PIVGMGGVKG TTTLQVLVND VRVKKHFQLR MWLVCVSENF EAKLTKETIE SVASGLSS-A TTNMNLQED
 5) 11 ----- MDRE-- EIKER---P KTSSLDIDSS VFGREEDKEN IVKMLLTPNN SNHA-NVSVL PIVGMGGGLK TTTLQVLVND PRVKEYFQLR VWPVCVSENF EMKLTKETIE SVASGFPSS-V TTNMNLQED
 6) 125 DDIATRLQEL VEAKNPFGLS VI---TYE- KPKE---R YEAFVLDESQ IFGRVDDKKN LLEKLLGDRD esqsgNFSIV PIVGMGGVKG TTTLARLLYDE KVKVDHFDLR AWVCVSEDFS VPNIISRVIYQ SVTG-EKK-E FEDLNLQEA
 7) 131 EKVTIRLERL ASQRNLIGLK EL---TAM- IPKQR---L PTTSLVDESE VFGRDDKDE IMRFLI-PEN GKDND-GITVV AIVGIGGVKG TTLSQLLYND QHVRYSYFGTK VVAHVSEEFDF VFKITKKVYE SVTS-RPC-E FTDLDLVQVK
 8) 119 KKIKNRDFEI VKGRSDYSI ansempvdyvp qhtkrktigeV PLYTIVDETT IFGRDQAKNQ IISELLI-ETD SQQK---IV SVIGLGGSGK TTTLAKLVYND GNIKKHFEVV LWVHVSEFEA VEKLVKELFK AIAG-DMS-D HPPLQHVSR
 9) 128 EDTIETLKDL QEQIGLLGLK EYFDSTK--- ET--R---R PSTSVDESD IFGRQSEIED LIDRLL-SEG ASGK-KLTVV PIVGMGGQKG TTTLAKAVYND ERVKNHFDLK AWVCVSEGFD aLRITKELLQ EIGkfdskdV HNNLNQLQVK

Rqs 1 fillVLDDvW e W g G S i vTTT d w F p l g iv K lPLA k lgs L W iw paLrL
 1) 254 LRGLQ--EN KYLLVDDII SDNVNDWEQL KNLSSGGRG SVVVVTRNM NVAHVVKLE PYYVPELSPD ECMQVIRYA FRD-EEKDIT LLEIGKCIV EKCHGVPLAA KTLGSLVFGK QDVKEWLRIK DANLWNIEQN KCDILPALKL
 2) 269 LRGLQ--NG NYFLVDDII TRDYNWREL RNLSSGGRG SVIIVTTREN VVAMVGTSD PYKVALPFPH ECMQIFTRVA FRQGEENKYP WLLIGESIV KKCAGVPLAI KSLGSLFTM RDETQWLVRK EDHLCKIVQG DRDIMPVLKL
 3) 266 LSRVLR--GK RYLLVDDVV NEDLDKWHYS RAALISGGFG SKIIVTSRNE NVGRIMGGIE PYKLQKLSDD DSWSVFKSHA FRDGDCAHP ELEAIMGEIV KKLKGLPLAS KALGSLFCK TDEEHWKVL QNDIWEPLAD KNNILPALRL
 4) 268 LSNKLE--GK RFLVLDVV NEDPDRWDRY RCALVAGAKG SKIMVTRNE NVGKLVGGLT PYYLQKLSYN DCWNLFRSYA FADGDSSAHP NLEMIGKEIV HKLKGLPLAA RALGSLCAK DNEDDWKNIL ESEIWEPLSD KNNILPALRL
 5) 129 LSKKLE--GK RFLVLDVV NEDPEKWDY RCALVSGSNG SRIVVTRNE NVGKLVGGLT PYYLQKLSYN DCWNLFRSYA FADGDSSAHP HLEIIGKEIV KKLKGLPLAA KAIGSLCTK DTEEDWKNIL RSEIWEPLSD KNNILPALRL
 6) 264 LKKELE--NQ LFLVLDVV SESYGVWEL VGFPLGSPG SRIIMTRKE QLRKLGSPH QDPLEGLSD DALSLFAQVA FGVPFNLSHR TLRPHGLDLPV KKDGLPLAL RTLGRLLRKT DTEEQWELL DSEIWEPLSD D-EIVPALRL
 7) 268 LKERLTgtGL PFLVLDVV NENFADWDL RQPFIAHAQG SQIRVTRSQ RVASIMCAVH VHNLPQSDG DCWNLFRSYA FGVPFNLSHR EIGDLAERIV HKCRGLPLAV KTLGVLRFPE GKVIWEWRLV SSRINWLPAD KSNLLPVLRV
 8) 262 ISDKLV--GK RFLVLDVV TEDRVWEQF MVHLKSGAP SSILLTRSR KVAEAVDSSY AYNLPFLSKE DSWKVFQQC- FGALKALDP EFLQTGKEIV EKCGGVPLAI KVIAGVLHG KGIIEWRSIC DSNLLDVqd EHRVFACLSL
 9) 268 LKESLE--GK KFLVLDVV NENYNWDL RNIFAQGDIG SKIIVTRTD SVALMMG-NE QIRMGNSTE ASWSLQRHA FEMMDPMGHP ELEEVGRQA AKCKGLPLAL KTLAGMLRSK SEVEEWKRL RSEIWEPLPHN Di--LPALML

req : Sy LK f cs p kdy f i WmA Gf | fin NBS
 1) 401 SYDALPPLHK ACFSCSVFP KDYVILRELL IMFWMALGLL HKTREGDEIE TIGGQYFNEI DQSRFLQD-- -HVYIYNGSI QS-CKMHDLV HNLAMFVCHK EHAIVNCESK -----D-LSE KVRHLVWDRK DFSTEIEFPK HLrKANKAR
 2) 417 SYNALPAALK PCLSYLSIFP KDFEYRYRCI IMFWMAHGLL NSNKLSEID -SLITPDGSM PH-CKLHDIV HDLGRVYldt dIAVNVNCGO ----Q-VSE TVRHLVWDLK DPTHQEFPR HliKARKAR
 3) 414 SYNHLPPHLK QCFAPCSVFP KDYMFRREKL VKIWLALGFI RQSRK-KRME DTGNAYFNEI LSRSPFQ-- -Y-----ENN YV---MHDAM HDLAKSISME DCDHLYDGR- ---RHD-NAI KTRHLSFPCK DAKCM-HFNP YGFRKLRTL
 4) 416 SYNHLPPHLK RCFAPCSVFP KDYVFEKIDIL VQIWMVAVGI QPQGR-RRME EIGNNYFDEL LSRSPFQ-- -H-----KDG YV---MHDAM HDLQSVSDI ECMRLDn1P- ---NMSTTER NARHLSFSCD NKSQT-TFEA FRGFNRARS
 5) 277 SYNHLPAALK RCFAPCSVFP KDYVFEKIDIL VQIWMALGFI QSPGR-RTIE ELGSSYFDEL LGRSPFQ-- -H-----KGG YV---MHDAM HDLQSVSDI ECLRLDDPP- ---NSSSTR SSRHLSFSCD NRSRT-SFED FLGPKKARTL
 6) 411 SYNDLSASLK LFLAYCSLFP KDYEFDKBEL ILLWMAEGFL HQPTTNKSQ RLGLEYFDEL LSRSPFQHP NN-----KSL FV---MHDLM NDLATPVAGE FFSRLDIEMK keFRMQ-ALE KHRHMSFVCE TFMGHKFKP LKGAKNLRTF
 7) 418 SYVYLPALHK RCFAYCSIFP KGHAFEKDKV VLLWMAEGFL QOTRSSKNLE ELGNEYFDEL ESRSLQK-- -T-----KTR YI---MHDFI NELAQFASGE FSSKFDGDC- ---KLQ-VSE RTRYLSYLRD NYAEPMEFEA LREVKPLRTF
 8) 409 SFVHLPDLHK PCFLHCSIFP RGVVINRHL ISQWIAHGFV PTNQA-RQAE DVGIGYFDEL LKVGFLQD-- -HVQIWStrg evtCKMHDLV HDLARQILRD Ef--VSEIE- ---TNK-QIK RCRLYSLTsc tglkdnkcg kvralygcgp
 9) 413 SYNDLPALHK RCFSCAIFP KDYVFRKEQV IHLWIANGLV Pvkdein-Q DLGNQVLEL RSRSLFEKVP NpskrnieEL FL---MHDLV NDLAQLASSK LCIRLEESQ- ---GSH-MLE QCRHLSYSIG FNGEFKLTLP LYKLEQLRTL

----- | début LRRs
 1) 540 ---TFASIDN NG--TMTKAF LDNPLSTFTL LRVLIPIVSDV FDEL-PSSIG NLKHLRYLDL QWNGKIKFLP NSLCKLVNLQ TLQLSRCDQL EKMPKDVHRL ISLRFCLTL KNKYLSEhdg fcs----- / /
 2) 555 ---TFISSCN HG--SLSKKF LEVLSKLL LRVLIISGVR IDEL-PDSIG NLKHLRYLDL TWNKTIKYP NSLCKLVNLQ TLDLYRSDQL IELPRDVNKL ISLRYLSLTS KQQLPLeagL rgw----- / /
 3) 546 TIHGYKSR- ----MSQL PHGLFMKLEY LRVLDHMQGG LKEL-PESIG NLKHLRYLDL SST-EIETPL ASLVKLVNLQ ILKLSDCNPL REVPGQITRL INLRHLLEAS- T----- / /
 4) 549 LLLNGYKSK- ----TSSI PSDLFLNLR Y LHVLDLNRQE ITEL-PESVG KLKMLRYLNL SGT-VVRKLD SSIKLYCLO TLKLRNCSH- -----NL VNLLSLEAR- / /
 5) 410 LLLNGYKSR- ----TSPI PSDLFLMLRY LHVLELNRRD ITEL-PDSIG NLKMLRYLNL SGT-GITVLP SSIKLYCLO TLKLRNCSH- -----I VNLRLWLEAR- / /
 6) 552 LALSvgakgS WKIFVLSNKL LNDILQELP LRVLSLNL ISKV-PEVVG SMKHLRYLNL SGT-LITHLP EYVCLVNLQ TLIVSGDYL VKLPKSFKL KNLQHPDMRD T----- / /
 7) 552 LPLSLNNSR SC--CLDQMV SKLLPLTLP LRVLSLSHYK IARLPPDFK NISHARFLDL SRT-LEKLP KSLCYMYNLQ TLLSYCSLL KELPTDISNL INLRVLDLIG T----- / /
 8) 548 ele----- PDKTMNKQCC VRTIILKYIT ADSL-PLFVS ADL-NCBALP BALSRVNLQ ALHLNCSRL AVVPESISNL KKLRTLELNG VssiksLpqs igdcdnLrrL yLeecgied / /
 9) 553 LPIRI----E FRLHNSKRV LHNILPTRL LRALSFSQYK IKELPNDLFT KLKLRFLDI SRT-WITKLP DSICGLVNL TLLSSCADL BELPLQMEKL INLRHLDVSN T----- / /

Annexes

Ctg 5542: 15857 *TLGSVLFQKQDVKEWLR IKDANLWNIEQNKCDILPALKLSYDALPPHLKACFSCLSVFPKDYVILRELLIMFWMALGLLHKTREGDEIETIGGQYFNELDQRSLFQDHYV-YNGSIQSC 16213
TLGSVLFQKQDVKEWLR IKDANLWNIEQNKCDILPALKLSYDALPPHLKACFSCLSVFPKDYVILRELLIMFWMALGLLHKTREGDEIETIGGQYFNELDQRSLFQDHYV YNGSIQSC
RGA : 361 KTLGSVLFQKQDVKEWLR IKDANLWNIEQNKCDILPALKLSYDALPPHLKACFSCLSVFPKDYVILRELLIMFWMALGLLHKTREGDEIETIGGQYFNELDQRSLFQDHYVIYNGSIQSC 480

Ctg 5542: 16214 KMHDLVHNLAMFVCHKEHAIVNCESKDLSEKVRHLVWDRKDFSTEIEFPKHLRKANKARTFASIDNNGTMTKAFLDNFLSTFTLLRVLIFSDVDFDEIPSSIGNLKHLRYLDLQWNGKIK 16573
KMHDLVHNLAMFVCHKEHAIVNCESKDLSEKVRHLVWDRKDFSTEIEFPKHLRKANKARTFASIDNNGTMTKAFLDNFLSTFTLLRVLIFSDVDFDE+PSSIGNLKHLRYLDLQWNGKIK
RGA : 481 KMHDLVHNLAMFVCHKEHAIVNCESKDLSEKVRHLVWDRKDFSTEIEFPKHLRKANKARTFASIDNNGTMTKAFLDNFLSTFTLLRVLIFSDVDFDELPSIGNLKHLRYLDLQWNGKIK 600

Ctg 5542: 16574 FLPNSLCKLVNLQTLQLSRCQLEKMPKDVHRLISLRFCLTLKKNKYLSEHDGFCSLTSLTFLFLNSCAELSSMTNGFGSLTSLRKLYIFNCPKLATLPSTMNQLSTLQTL SINNCHELD 16933
FLPNSLCKLVNLQTLQLSRCQLEKMPKDVHRLISLRFCLTLKKNKYLSEHDGFCSLTSLTFLFLNSCAELSS+TNGFGSLTSLRKLYIFNCPKLATLPSTMNQLSTLQTL SINNCHELD
RGA : 601 FLPNSLCKLVNLQTLQLSRCQLEKMPKDVHRLISLRFCLTLKKNKYLSEHDGFCSLTSLTFLFLNSCAELSSLTNGFGSLTSLRKLYIFNCPKLATLPSTMNQLSTLQTL SINNCHELD 720

Ctg 5542: 16934 LLEPSEAMGGLACL DVLQLVGLPKLVCFPGSFISAATSLQYFGIGNCGLMKLPDFIQSFTSLK KIVINGCPELSRRC AVKSGEDFHLISHVPQITIDKKT YRKITPSHPECSSVS 17281
LLEPSEAMGGLACL DVLQLVGLPKLVCFPGSFISAATSLQYFGIGNCGLMKLPDFIQSFTSLK KIVINGCPELSRRC AVKSGEDFHLISHVPQITIDKKT YRKITPSHPECSSVS
RGA : 721 LLEPSEAMGGLACL DVLQLVGLPKLVCFPGSFISAATSLQYFGIGNCGLMKLPDFIQSFTSLK KIVINGCPELSRRC AVKSGEDFHLISHVPQITIDKKT YRKITPSHPECSSVS 836

Rapport-Gratuit.com

Résumé :

La résistance des plantes aux agents pathogènes suit souvent la théorie gène – pour – gène, où un gène de résistance dominant permet à la plante de détecter les souches de l'agent pathogène portant le gène d'avirulence correspondant, ce qui aboutit à la résistance. En l'absence du gène de résistance ou du gène d'avirulence, la maladie se développe. Contrairement aux autres gènes d'avirulence, le gène *ACE1* de *Magnaporthe grisea* code pour une grosse protéine qui n'est pas sécrétée. En conséquence, il se peut que le gène de résistance correspondant révèle un mécanisme de résistance différent de ceux déjà connus. Au niveau appliqué, ce gène pourrait, combiné avec les gènes *Pi1* et *Pi2*, permettre d'obtenir une résistance durable à la pyriculariose, qui est la plus importante des maladies fongiques du riz.

Au cours de cette thèse, le gène de résistance correspondant à *ACE1* a été cartographié sur le bras court du chromosome 8 du riz en utilisant des couples de souches isogéniques. Des tests d'allélisme ont montré que ce gène de résistance était différent de ceux déjà connus sur ce chromosome. Il a été nommé *Pi33*. Nous avons montré que l'allèle résistant de *Pi33* est dominant, puis nous l'avons finement cartographié en utilisant une population de 889 lignées IR64 × Azucena et des marqueurs RFLP, AFLP et SSR. *Pi33* se trouve dans un espace de 1,6 cM entre les marqueurs R1813 et Y2643L.

Cette cartographie fine a permis de réaliser une cartographie physique par marche chromosomique sur une banque BAC ordonnée de la variété Nipponbare (sensible). Nous avons ensuite utilisé les sondes produites au cours de cette marche pour réaliser une carte physique de la zone dans une banque non ordonnée de la variété IR64 (résistante). L'étude comparée des séquences des variétés Nipponbare et 93-11 dans la zone a mis en évidence des ruptures de la micro-synténie, mais aucun homologue à des gènes de résistance connus n'a été identifié.

Enfin, les marqueurs générés au cours de ces travaux ont été utilisés pour étudier le polymorphisme autour de *Pi33* et son origine parmi les parents d'IR64. Il ressort de ces travaux que *Pi33* est probablement un gène ancien, antérieur à la domestication du riz. Chez le plupart des variétés améliorées actuelles, ce gène provient de TYC, une variété traditionnelle de Taiwan. Cependant, chez IR64, ce gène semble provenir d'une accession d'une espèce sauvage du riz : *Oryza nivara*.

Rice-*Magnaporthe grisea* interactions study. Characterization and cloning of the rice blast resistance gene *Pi33*.

Summary:

We identified the resistance gene corresponding to the avirulence gene *ACE1* using pairs of isogenic strains of *Magnaporthe grisea* differing only by their *ACE1* allele. This resistance gene was mapped on the short arm of rice chromosome 8 using progenies from the crosses IR64 (resistant) × Azucena (susceptible) and Azucena × Bala (resistant). We also detected this resistance gene in several rice varieties, including the differential isogenic line C101LAC. Allelism tests permitted us to distinguish this gene from two other resistance genes (*Pi11* and *Pi29(t)*) that are present on the short arm of the chromosome 8. Segregation analysis in F₂ populations was in agreement with the existence of a single dominant gene, designated as *Pi33*. Finally, *Pi33* was finely mapped between two molecular markers of the rice genetic map that are separated by a distance of 1.6 cM.

Using this fine map, we physically mapped *Pi33* using the ordered BAC library of the cultivar Nipponbare (susceptible). A two-step walk was necessary to achieve this map. We then used the markers found during this walk to physically map *Pi33* in the IR64 (resistant) unordered BAC library. No resistance gene homologues (RGA) were found in the available sequence data in the area of *Pi33*. Moreover, no RGA were revealed in IR64 BAC clones by PCR amplification.

A complementation test was performed in order to confirm the physical map and to demonstrate *Pi33* cloning. Kassalath susceptible cultivar was transformed using 5 BAC clones of the IR64 library that span the area of *Pi33*. One of these clones seemed to confer resistance to *ACE1* but this result needs confirmation.

Finally, the markers generated during this work were used to study the polymorphism around *Pi33* and the origin of this gene amongst the parents of the IR64 cultivar. *Pi33* is probably an ancestral gene that appeared before rice domestication. In most of the resistant modern cultivars, *Pi33* comes from the Taiwanese traditional cultivar TYC. Alternatively, in IR64, *Pi33* comes from an accession of the wild species *Oryza nivara*.

Ecole Doctorale : Biologie Intégrative.

Spécialité : Ressources Phytogénétiques et Interactions Biologiques.

Mots-clefs : riz, Pyriculariose, *Pi33*, *ACE1*, résistance, cartographie génétique, cartographie physique, clonage.

CIRAD-CA Montpellier, TA 73-09, 34398 Montpellier CEDEX 01, France.
