



UNIVERSITE D'ANTANANARIVO
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE



THESE DE DOCTORAT EN SCIENCE DE LA VIE
OPTION : BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALE



PHYLOGEOGRAPHIE DU RICE YELLOW MOTTLE VIRUS A MADAGASCAR,
IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE LA RESISTANCE ELEVEE DE LA
VARIETE DE RIZ BEKAROSAKA



Présentée par : **RASOAFALIMANANA Mbolarinosy épouse RAKOTOMALALA**

Soutenue publiquement le : 14 novembre 2008 devant la Commission d'examen

Président de jury : Charlotte RAJERARISON, Professeur titulaire à l'Université d'Antananarivo

Directeur de Thèse : RAMAVOVOLOLONA, Professeur à l'Université d'Antananarivo

Rapporteur : Denis FARGETTE, Directeur de Recherche à l'IRD de Montpellier France

Examineur : Victor JEANNODA, Professeur titulaire à l'Université d'Antananarivo

Examineur : Abel ANDRIANTSIMAHAVANDY, Professeur titulaire à l'Université d'Antananarivo

DEDICACE

A Valérie, Larissa et Vanessa

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer mes remerciements et ma gratitude à l'endroit des personnes et instituts qui ont permis directement ou indirectement la réalisation des travaux de cette thèse et la rédaction de ce manuscrit :

- Pr Charlotte Rajeriarison d'avoir bien voulu présider le jury de cette thèse ;
- Dr Ramavovololona d'avoir accepté de diriger ces travaux et pour son dévouement, ses conseils valeureux et sa patience ;
- Dr Denis Fargette de m'avoir accueillie au sein de son équipe pendant la formation BFC et avec ses collaborateurs Dr Eugénie Hébrard, Agnès Pinel et Jamel Aribi d'avoir encadré les travaux de recherche et permis la valorisation des résultats obtenus dans cette thèse. Je remercie toute l'équipe pour leur assistance et leur amitié qui ont rendu mes séjours à Montpellier très agréables ;
- Pr Victor Jeannoda et Pr Abel Andriantsimahavandy d'avoir voulu être membres du comité de cette thèse, de leur accord, leur critique constructif et leur générosité ;
- L'IRD, en particulier le DSF pour m'avoir alloué une bourse de formation continue permettant de conduire les parties de la thèse utilisant les outils de Biologie moléculaire à Montpellier ; l'UMR RPB dirigé par Dr Michel Nicole et son staff pour l'accueil au laboratoire, l'assistance et l'atmosphère sympathique ; l'UMR GDP, en particulier Dr Alain Ghesquière et Dr Laurence Albar d'avoir collaboré dans les travaux sur la génétique de la résistance de la variété Bekarosaka ; la représentation de l'IRD à Madagascar successivement dirigée par M. François Jarrige et M. Christian Feller avec Mme Gabrielle d'avoir facilité les départs pour la France et les communications ;
- Le FOFIFA, d'avoir initié et promu la formation académique de ses chercheurs, de son appui et son encouragement surtout à l'endroit du Directeur Général Dr Lala Aimé Razafinjara, du Directeur Scientifique Dr Yvonne Rabenantoandro et du Chef de Centre Régional de Recherche du Nord-ouest Mr Armand Zenaivo et des collègues, des étudiants de l'UFP et du technicien Ernest Rakotondramanana pour l'assistance technique ;
- Le PSDR qui a inséré dans son financement un volet formation permettant la réalisation de la prospection des isolats du Rice yellow mottle et leur diagnostic à Madagascar ;
- Le SIST qui m'a formé dans la rédaction scientifique et qui a pris en charge l'édition anglaise de l'article de la thèse ;
- Le Pr John Tresh d'avoir édité l'article de la thèse ;

- Les amis que je me suis faits à Montpellier pour leur soutien et leur solidarité : Anne-Claire, Anne-Sophie, Maryse, Frédérique, Monique et Marc (France), Domoina, Rose, Tantely, Tandro ;
- Les co-stagiaires au laboratoire de RPB Montpellier : Sorho (Côte d’Ivoire), Oumar et Drissa (Burkina Faso), Elijha (Kenya), Ganesh (Inde), Edgardo (Costa Rica), Léandro et Ericka (Brésil), Andrea (Portugal), Majd (Syrie), Randry,
- Les co-thésards malgaches qui ont témoigné de l’amitié et de l’entraide à Montpellier : Mmes Jacqueline Rakotoarisoa, Charlotte Razafindrakoto, MM. Dodelys Andriatsimialona, Simon Razafimandimby, Richard Randriamanantsoa et Roger Randrianarivelo;
- La famille Hoafy, Gilbert qui m’a donné les semences de la variété de riz *Bekarosaka* à Ambanja et Clarisse qui m’a accueillie à Mulhouse France ;
- Et les miens qui ont souffert de mes absences fréquentes.

Au-dessus de tout le monde, je remercie Dieu qui a tout disposé !

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Importance de la maladie	2
Symptômes.....	3
Transmission de la maladie.....	4
Gamme d’hôtes.....	7
Lutte contre la maladie à Madagascar	7
Objectifs de la thèse	8
CHAPITRE I : DIVERSITE, PHYLOGENIE, ET PHYLOGEOGRAPHIE DU RYMV A MADAGASCAR	10
1.1 INTRODUCTION.....	10
1.1.1 Structure du virus.....	10
1.1.2 Organisation génomique	10
1.1.3 Caractéristiques physico-chimiques	12
1.1.4 Evolution des virus	12
1.1.4.1 Forces induisant l’évolution des virus de plantes à ARN.....	13
1.1.4.2 La mutation.....	13
1.1.4.3 La recombinaison.....	13
1.1.4.4 La quasi-espèce virale.....	13
1.1.4.5 La sélection	14
1.1.4.6 La dérive génétique.....	14
1.1.5 Variabilité et diversité du RYMV en Afrique	15
1.1.5.1 Diversité sérologique.....	15
1.1.5.2 Diversité moléculaire.....	15
1.1.6 ARN satellite.....	16
1.1.7 Phylogénie et phylogéographie.....	16
1.1.7.1 Phylogénie	16
1.1.7.2 Phylogéographie.....	17
1.1.7.3 Phylogénie et Phylogéographie du RYMV	17
1.1.8 Biogéographie de Madagascar	19
1.1.8.1 Les bioclimats	20
1.1.8.2 Bioclimat et phytogéographie	20

1.1.8.3 Bioclimat et biogéographie des variétés de riz.....	21
1.1.8.4 Bioclimat et biogéographie des insectes vecteurs	22
1.2 MATERIELS ET METHODES.....	23
1.2.1 Prospection des isolats de RYMV à Madagascar.....	23
1.2.1.1 Zones de prospection et leurs biogéographies.....	23
1.2.1.2 Mode de prélèvement.....	25
1.2.2 Matériels biologiques.....	26
1.2.3 Détection du RYMV dans les échantillons collectés par DAS-ELISA.....	27
1.2.4 Typage des isolats par TAS-ELSA.....	28
1.2.5 Extraction de l'ARN viral.....	30
1.2.6 Caractérisation du gène de la protéine de capsid.....	30
1.2.6.1 RT-PCR du gène de la protéine de capsid.....	30
1.2.6.2 Séquençage du gène de la protéine de capsid.....	32
1.2.6.3 Analyse des séquences.....	32
1.2.7 Phylogéographie de RYMV à Madagascar.....	32
1.2.8 Caractérisation du génome entier.....	32
1.2.8.1 RT-PCR des ORFs du génome entier.....	32
1.2.8.2 Séquençage et analyse des séquences du génome entier.....	34
1.2.9 RT-PCR de l'ARN satellite.....	34
1.2.10 Analyse de la population de RYMV à Madagascar par « pairwise restriction sites différences ».....	34
1.3 RESULTATS.....	35
1.3.1 Distribution et écologie du RYMV à Madagascar.....	35
1.3.1.1 Relation entre la température sur la distribution du RYMV	36
1.3.1.2 Non influence des plantes hôtes sur la distribution du RYMV	37
1.3.2 Diversité sérologique du RYMV à Madagascar.....	40
1.3.3 Homogénéité moléculaire des isolats malgaches.....	40
1.3.4 Structuration spatiale des isolats de la côte est de Madagascar.....	44
1.3.5 Population de RYMV à Madagascar en soudaine expansion.....	45
1.3.6 Absence d'ARN satellite.....	45
1.3.7 Relation phylogénétique des isolats malgaches avec les isolats africains.....	46
1.4 DISCUSSION.....	49
1.5 CONCLUSION.....	51

CHAPITRE II: CRIBLAGE DU GERMOPLASME MALGACHE AU RYMV, IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE LA RESISTANCE ELEVEE DELA VARIETE BEKAROSAKA.....	52
2.1 INTRODUCTION	52
2.1.1 Résistance de plantes aux virus.....	52
2.1.2 Résistance au RYMV.....	53
2.1.2.1 Déterminisme génétique.....	53
2.1.2.2 Spécificité de ces résistances.....	54
2.1.2.3 Stabilité d'une résistance.....	54
2.1.3 Lutte contre le RYMV.....	55
2.2 MATERIELS ET METHODES.....	55
2.2.1 Matériels biologiques.....	55
2.2.2 Criblage de variétés de riz pour la résistance au RYMV.....	57
2.2.3 Typage des résistances des variétés présélectionnées.....	59
2.2.4 Caractérisation du phénotype de la résistance élevée de Bekarosaka.....	60
2.2.4.1 Test de la spécificité.....	60
2.2.4.2 Test de la stabilité.....	60
2.2.5 Identification de la sous-espèce de la variété Bekarosaka.....	61
2.2.5.1 Détermination par la morphologie.....	61
2.2.5.2 Détermination par le test phénol.....	61
2.2.5.3 Détermination par les marqueurs microsatellites.....	62
2.2.6 Analyse des bases génétiques de la résistance de la variété Bekarosaka.....	63
2.2.7 Séquençage de la zone conservée du gène de résistance au RYMV	63
2.3 RESULTATS.....	64
2.3.1 Identification de variétés résistantes à Madagascar.....	64
2.3.1.1 Résistance évaluée d'après l'expression de symptôme à l'infection virale.....	64
2.3.1.2 Résistance évaluée d'après la teneur en virus.....	66
2.3.2 Résistance élevée de la variété Bekarosaka.....	68
2.3.3 Phénotype de la résistance élevée de Bekarosaka.....	69
2.3.3.1 Spécificité de la résistance de Bekarosaka.....	71
2.3.3.2 Stabilité de la résistance de Bekarosaka.....	74
2.3.4 Appartenance de la variété Bekarosaka à la sous-espèce indica.....	76
2.3.5 Génotype de la résistance de la variété Bekarosaka.....	81
2.3.5.1 Déterminisme génétique de la résistance de la variété Bekarosaka.....	82

2.3.5.2 Mutation de la zone conservée du gène conférant la résistance au RYMV retrouvée chez la variété Bekarosaka	83
2.4 DISCUSSION.....	84
2.5 CONCLUSION.....	88
CHAPITRE III : MECANISME DE CONTOURNEMENT DE LA RESISTANCE ELEEVEE DE RIZ AU RYMV PAR LES ISOLATS MALAGACHES.....	89
3.1 INTRODUCTION.....	89
3.1.1 Contournement d'une résistance.....	89
3.1.2 Contournement de la résistance de la variété Bekarosaka.....	90
3.2 MATERIELS ET METHODES.....	91
3.2.1 Matériels biologiques.....	91
3.2.2 Test de la durabilité de la résistance de la variété Bekarosaka avec deux isolats avirulents KJV1 (Mg25) et MRV17 (Mg16).....	91
3.2.2.1 Semis et inoculations.....	91
3.2.2.2 Prélèvement et broyage.....	93
3.2.2.3 Détection du RYMV dans les plantes par DAS-ELISA.....	93
3.2.3 Analyse des bases moléculaires du contournement par Mg16.....	93
3.2.3.1 Amplification de la VPg.....	93
3.2.3.2 Cinétique de la mutation/pathogénie.....	94
3.3 RESULTATS.....	94
3.3.1 Contournement de la résistance de la variété Bekarosaka par l'isolat Mg16.....	94
3.3.2 Bases moléculaires du contournement de la résistance de la variété Bekarosaka par Mg16.....	95
3.3.2.1 Trois domaines de mutation de Mg16.....	95
3.3.2.2 Cinétique d'apparition de virulence sur le codon 48.....	97
3.3.2.3 Cinétique d'apparition de virulence sur le codon 42.....	104
3.3.2.4 Cinétique d'apparition de virulence sur le codon 52.....	106
3.4 DISCUSSION.....	106
3.5 CONCLUSION.....	109

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	110
1. CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE RYMV A MADAGASCAR.....	111
1.1 Homogénéité moléculaire des isolats malgaches à Madagascar due à un goulot d'étranglement.....	111
1.2 Hypothèse sur l'origine des isolats malgaches de RYMV.....	112
1.3 11Phylogéographie de RYMV à Madagas.....	112
2. CONNAISSANCES ACQUISES SUR LA RESISTANCE DES VARIETES MALGACHES AU RYMV.....	113
2.1 Divers types de résistances des variétés malgaches au RYMV.....	113
2.2 Emergence d'un isolat contournant la résistance élevée de la variété Bekarosaka.....	115
2.3 Bases moléculaires du mécanisme de contournement	116
3. PERSPECTIVES.....	116
3.1 Suivi de la variabilité du RYMV à Madagascar.....	116
3.2 Test des isolats mutants dérivés de Mg16 sur les variétés résistantes Gigante et Tog 5681.....	117
3.3 Etude des valeurs sélectives des mutants par des transmissions sur variété résistante et sensible.....	117
3.4 Validation fonctionnelle des mutations rencontrées dans cette étude par la mutagenèse dirigée.....	117
CONCLUSION GENERALE.....	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121

LISTE DES ABREVIATIONS

Aa:	acide aminé
ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
BMV:	brome mosaic virus
Bp :	paire de bases (base pair)
CIRAD:	Coopération internationale de recherche agronomique pour le développement
CMD:	cassava mosaic disease
CMV:	cucumber mosaic virus
CP:	coat protein
DAS-ELISA:	double sandwich enzyme linked immunosorbent assay
DpDd:	DNA polymerase DNA dependant
DSF:	Département de soutien et formation
FAO:	food a organization
IBPGR:	International breeding program and germplasm resource
IRD:	Institut de recherche pour le développement
IRRI:	International rice research institute
IITA:	International institute for tropical agriculture
Jai:	jour après inoculation
Kb:	kilobase
MAb:	monoclonal antibody
MAEP:	Ministère de l'agriculture, de l'élevage et de la pêche
ML :	maximum likelihood
MP :	movement protein
MP :	maximum parsimony
MSV :	maize striped virus
NJ :	neighbour joining
Nt :	nucléotide
ORF :	open reading frame
PAUP :	phylogenetic analysis using parcimony
PCR :	polymerase chain reaction
PSDR :	projet de soutien pour le développement rural
PTGS:	post transcriptional gene silencing

QTL:	quantitative trait loci
RpRd :	RNA polymerase RNA dependant
RM:	rice microsatellite
RSNV :	rice striped necrosis virus
RT :	reverse transcription
RYMV :	rice yellow mottle virus
SAR:	systemic acquired resistance
SBMV:	southern bean mosaic virus
Ser:	sérotype
SNP:	single nucléotide polymorphism
TMV:	tobacco mosaic virus
VPg:	viral protein genome linked
ZYMV:	zucchini yellow mosaic virus

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Distribution de la panachure jaune du riz dans le continent africain.....	2
Figure 2. Symptômes de la panachure jaune du riz.....	5
Figure 3. Les principaux insectes vecteurs du Rice yellow mottle virus de la famille des Chrysomelidae à Madagascar.....	6
Figure 4. Reconstruction tri-dimensionnelle de la capsidie du <i>Rice yellow mottle virus</i>	11
Figure 5. Organisation génomique du Rice yellow mottle virus	12
Figure 6. Distribution géographique des six clades formés par les isolats africains définis par l'analyse des séquences du génome entier (Fargette et al, 2004).....	19
Figure 7. Les bioclimats de Madagascar (Koechlin, 1974)	21
Figure 8. Diagramme représentatif de la liaison antigène-anticorps en DAS et TAS ELISA.....	29
Figure 9. Evolution de la distribution du « <i>Rice yellow mottle virus</i> » entre 1994 et 2004.....	38
Figure 10. Influence de la température sur la distribution du « <i>Rice yellow mottle virus</i> » à Madagascar.....	39
Figure 11. Arbre phylogénétique basé sur les séquences nucléotidiques du gène de la protéine de capsidie de 25 isolats de RYMV.....	42
Figure 12. Régressions linéaires des distances géographiques (Km) et des distances génétiques (% divergence nucléotidique) des isolats représentatifs des régions infectées par RYMV à Madagascar.....	44
Figure 13. Modèle d'expansion soudaine s'accordant au "pairwise restriction sites différences" de la population de 25 isolats basé sur les séquences du gène de la protéine de capsidie.....	45
Figure 14. Absence d'ARN satellite montré par la non amplification par SNP.....	46
Figure 15. Amplification des ORFs du génome entier de l'isolat Mg16.....	47
Figure 16. Arbre phylogénétique construit à partir des séquences du génome entier de 20 isolats africains montrant la formation du groupe (cluster) des isolats malgaches, sa position et sa relation phylogénique avec les groupes des autres pays africains.....	48
Figure 17. Distribution de fréquence des 503 variétés basée sur la notation des symptômes (S) de 1 à 9.....	64
Figure 18. Distribution de fréquence des variétés de type <i>sativa</i> et des différents groupes de lignées introduites pour la résistance au RYMV.....	65
Figure 19. Distribution de fréquence des variétés traditionnelles et des lignées venant de l'IRRI.....	67

Figure 20. Distribution de la réponse des variétés d'après la teneur en virus évaluée par les absorbances à 405 nm des extraits de feuilles prélevées à 30, 45 et 60 jours après inoculation.....	68
Figure 21. Réponse des variétés Bekarosaka, Gigante (rymv 1-2), Tog5681 (Rymv 1-3) et IR64 (Rymv 1-1) aux isolats BF1, BFa5, CI4* évaluée par ELISA à 15 et 30 jours après inoculation (jai).....	72
Figure 22. Réponse des variétés Bekarosaka, Gigante (rymv 1-2), Tog5681 (Rymv 1-3) et IR64 (Rymv 1-1) aux isolats BF1, BFa5, CI4* évaluée par symptomatologie à 30 jours après inoculation (jai).....	73
Figure 23. Teneur en virus à 15 et 30 jai de la variété Bekarosaka inoculée par dix isolats venant des différentes régions rizicoles de Madagascar (a) et de huit isolats représentant les 6 souches africaines (b).....	75
Figure 24. Réaction au phénol des graines de Bekarosaka avec ceux des témoins IR64 (indica) et Nipponbare (japonica).....	79
Figure 25. Migration des ADNs de 7 plantes de Bekarosaka numérotées B1 à B7 avec les marqueurs microsatellites (RM : rice microsatellite) RM1, RM5, RM11, RM18, RM19 et RM167 lue avec le séquenceur LICOR DNA analyzer.....	80
Figure 26. Cartographie génétique du gène de résistance identifié dans la population IR64 x Bekarosaka (A) par rapport aux marqueurs RM252 et RM273 et comparaison avec les populations IR64 x Gigante (B) et IR64 x Tog5681 (C) (Albar et al, 2003).....	83
Figure 27. Séquences d'acides aminés d'une partie du domaine conservé du gène de résistance au RYMV chez Bekarosaka en comparaison avec les variétés résistantes Gigante (rymv 1-2), Tog5681 (rymv 1-3), Tog5672 (rymv 1-4) et les variétés sensibles IR64 et Tog5673 (rymv 1-1).....	84
Figure 28. Expérimentation en cellule de culture de la durabilité de la résistance de la variété Bekarosaka. Un total 150 plantes (3 bacs de 50 plantes disposées en lignes de 10 plantes) ont été inoculées par l'isolat Mg16 (A). Les symptômes sont clairs 30 jours après inoculation et différents niveaux de symptômes sont distingués (B). Les plantes ont été testées par ELISA, et une vingtaine ont été sélectionnées pour séquencer la VPg.....	92
Figure 29. Amplification du VPg des isolats mutants dérivés de Mg16 avec les témoins CI4Beka2 et le marqueur de poids Ladder	96

Figure 30. Electrophorégramme des séquences de la VPg des isolats Mg16-7 ayant du virus et de symptôme et Mg16-9 ayant du virus uniquement. Aucun changement n'est observé au codon 48 ni ailleurs.....	99
Figure 31. Electrophorégramme montrant la mutation des isolats Mg16-59 et Mg16-131 à la position 1728-1730 consistant au changement du codon AGA de l'isolat avirulent Mg16 en GGA.....	100
Figure 32. Electrophorégramme montrant le mélange G/A en position 1728 de l'isolat mutant Mg16-146 comparé à l'isolat Mg16 et l'isolat double mutant	101
Figure 33. Electrophorégramme illustrant la mutation de l'isolat Mg16-141 sur la position 1728 en comparaison avec l'isolat avirulent Mg16.....	102
Figure 34. Electrophorégramme illustrant la mutation à la position 1708-1710 de l'isolat Mg16-87 comparé à l'isolat avirulent Mg16.....	105
Figure 35. Electrophorégramme de la mutation à la position 1738-1740 de l'isolat Mg16-23 illustrant les mutations des isolats Mg16-12, Mg16-89, Mg16-121 et Mg16-148 où le codon CAC a muté en TAC.....	107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Spectre de reconnaissance des anticorps monoclonaux utilisés.....	29
Tableau 2. Absorbance et profil sérologique des isolats malgaches avec un antiserum polyclonal antiRYMV-Mg et 5 anticorps monoclonaux (MAbs) discriminants contre le « <i>Rice yellow mottle virus</i> » et comparés avec les sérotypes africains.....	41
Tableau 3. Distances génétiques deux à deux des isolats malgaches calculés par le logiciel CLUSTAL W.....	42
Tableau 4. Matériels du germoplasme du FOFIFA inclus dans le criblage à Madagascar.....	58
Tableau 5. Évaluation de la résistance des variétés sélectionnées à Madagascar par symptomatologie et par la teneur en virus ¹	71
Tableau 6. Détermination morphologique de la sous-espèce de la variété Bekarosaka.....	78
Tableau 7. Phénotype de résistance dans la population F2 IR64 x Bekarosaka et coségrégation avec le génotype aux marqueurs microsatellites RM252 et RM273.....	82
Tableau 8. Pathogénie de deux isolats avirulents Mg16 et Mg25 sur la résistance de Bekarosaka.....	95
Tableau 9. Les différentes mutations de l'isolat Mg16 sur 17 plantes de la variété Bekarosaka sélectionnées dans une population de 150 plantes un mois après inoculation.....	97
Tableau 10. Cinétique des mutations en position 1728-1730.....	103
Tableau 11. Différence des mutations des isolats témoins sur les variétés à résistance élevée Bekarosaka et Gigante à la position 1728-1730.....	104
Tableau 12. Cinétique des mutations à la position 1708-1710.....	105
Tableau 13. Cinétique des mutations sur la position 1738-1740.....	107

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Liste des isolats prospectés et des études faites correspondantes.....	118
Annexe 2. Les différentes amorces utilisées	121
Annexe 3. Liste de variétés du germoplasme entrées dans les criblages.....	122

GLOSSAIRE

ADN : acide désoxyribonucléique, chaîne de désoxyribonucléotides constitués de sucre (désoxyriboses) + acide phosphorique + base purique (adénine A et guanine G) ou base pyrimidique (thymine T et cytosine C). Le squelette de l'ADN est formé par les sucres unis par des phosphates ; chaque sucre est relié à une base A, T, C ou G. La succession des bases constitue la séquence.

Anticorps : substance défensive engendrée par l'organisme à la suite de l'introduction d'un antigène et concourant au mécanisme de l'immunité.

Agressivité : composante du pouvoir pathogène d'un virus qui exprime l'intensité des symptômes sur une plante donnée (cultivar ou variété).

ARN : acide ribonucléique, chaîne de ribonucléotides constitués de sucre (ribose) + acide phosphorique + base purique (adénine A et guanine G) ou pyrimidique (uracile U et cytosine C). Le squelette de l'ARN est formé par les sucres unis par des phosphates ; chaque sucre est relié à une base A, U, C ou G. La succession des bases constitue la séquence.

Avirulent : une souche ou un isolat est avirulent si elle est incapable d'infecter une variété possédant une résistance à ce virus.

Capside : ensemble des protéines (sous-unités capsidiales) entourant et protégeant l'acide nucléique dans le virion.

Cluster : ensemble de gènes/isolats apparentés, regroupés sur un chromosome/un arbre phylogénétique

Génome : ensemble de gènes

Génotype : ensemble de messages génétiques dans une cellule ou individu.

Isométrique : forme qui est proche d'une sphère

Kilobase (kb) : unité de mesure d'un acide nucléique monocaténaire, qui correspond à 1000 bases.

Monophylétique : dérivé d'un ancêtre commun ou d'une population initiale.

ORF (open reading frame) : cadre ouvert de lecture dans un ARN messager, qui code pour un polypeptide.

Pathotype : ensemble des souches ayant les mêmes propriétés de virulence.

Phénotype : expression du message génétique d'un individu dans sa morphologie, physiologie et comportement.

Positif : un ARN est positif s'il est messager, lu par les ribosomes.

Phylogénie : relation évolutive entre un ancêtre et tous ses descendants connus.

Phylogéographie : étude de la distribution géographique d'êtres vivants ayant des relations phylogénétiques

Phylum : lignée d'êtres vivants ayant une même origine.

Sérologie : étude des sérums, de leurs propriétés et de leurs applications

Silencing : désigne de façon restrictive dans cet ouvrage le « post-transcriptional gene silencing », dégradation post-transcriptionnelle spécifique d'un ARN dans le cytoplasme.

Subgénomique : un ARN subgénomique est une copie partielle d'un ARN génomique ; il a la même extrémité 3' que l'ARN génomique. Les ARN subgénomiques sont synthétisés au cours de la réplication, ils sont nécessaires pour la traduction d'une partie des protéines virales.

Virion : particule virale complète et infectieuse.

Virulence : la capacité d'une souche à infecter une variété possédant une résistance à ce virus.

VPg (viral protein genome linked) : protéine attachée par une liaison covalente à l'extrémité 5' de certains ARN viraux.

PUBLICATION ET COMMUNICATION

Les trois chapitres de la thèse ont sorti des résultats qui ont été soumis à la communauté scientifique sous-forme de 4 articles, une note de recherche et un poster

Une partie des résultats du **Chapitre I** a contribué dans l'article :

D. Fargette., A. Pinel., **M. Rakotomalala.**, E. Sangu., O. Traore., D. Sereme., F. Sorho., S. Issaka., E. Hébrard., Y. Séré., Z. Kanyeka, and G. Konaté. 2008. Rice yellow virus, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *Journal of Virology*, Vol. 82 N° 7, p 3584-3589.

Découlant du **Chapitre II**, un article dont l'impétrant est le premier auteur a été soumis à *European Journal of Plant Pathology* le 2 novembre 2007 et a été accepté le 24 janvier 2008 est déjà publié en ligne (Springer) au mois de mai 2008. Une note de recherche a été publiée à l'IRRI en 2006 dès la découverte et confirmation de la résistance élevée de la variété Bekarosaka en parallèle avec la soumission de la séquence de l'ADN de la variété. Un poster a été présenté à Aussois, France en février 2007 lors de la 11^e Rencontre des Biologistes.

M. Rakotomalala., A. Pinel-Galzi., L. Albar., A. Ghesquière., Y. Rabenantoandro., P. Ramavovololona and D. Fargette. 2008 Resistance to *Rice yellow mottle virus* in the rice germplasm in Madagascar. *European Journal of Plant Pathology*. Springer . DOI 10 1007/s 10658-008-9282-5

L. Albar., **M. Rakotomalala.**, D. Fargette., A. Ghesquière. 2006. Molecular characterization of resistance to Rice yellow mottle virus in Bekarosaka, an indica variety from Madagascar. *International Rice Research Note*

M. Rakotomalala., A. Pinel-Galzi., Y. Rabenantoandro., P. Ramavovololona and D. Fargette. 2007. Identification d'une variété à résistance élevée au *Rice yellow mottle virus* au sein d'un germplasm de riz sensible à Madagascar. Poster présenté aux 11^e Rencontres de Virologie Végétale, Aussois du 28 janvier au 1^{er} février 2007, p94.

Les résultats du contournement de la résistance de la variété Bekarosaka par l'isolat malgache Mg16 du **Chapitre III** ont contribué à un article de groupe :

Pinel-Galzi, A., **M. Rakotomalala.**, E. Sangu., F. Sorho., Z. Kanyeka., O. Traore., D. Séré., N. Poulicard., Y. Rabenantoandro., Y. Séré., G. Konaté., A. Ghesquière., E. Hébrard, and D. Fargette. 2007. Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species. *PLoS Pathology* 3: e180.

INTRODUCTION GENERALE

Le riz est une Monocotylédone du genre *Oryza* de la famille des Poaceae. Au sein de ce genre, on distingue vingt-trois espèces. Deux seulement sont cultivées : *Oryza sativa*, originaire d'Asie et maintenant présent sur les cinq continents en raison de ses qualités agronomiques. Il comprend aujourd'hui près de 140.000 variétés. L'espèce *Oryza glaberrima*, originaire de l'Afrique de l'Ouest, est restée confinée sur le continent africain. Les autres espèces sont restées sauvages (Jeanguyot et Ahmadi, 2002). L'espèce *O. sativa* comprend deux sous-espèces *indica* et *japonica* qui sont cultivées aujourd'hui partout dans le monde. Elle a été introduite à Madagascar vers le XIV^e siècle lors de l'immigration des Malais et des Indonésiens dans cette île. L'espèce *O. glaberrima* possède des caractères de rusticité recherchée. Il consiste aussi en un réservoir de gènes de résistance à diverses maladies. A ce titre, il est utilisé par les généticiens pour améliorer la résistance des riz *sativa* aux maladies.

Le riz a une importance économique et nutritionnelle majeure. C'est la deuxième céréale mondiale après le blé avec une production annuelle de 400 millions de tonnes dont 95% produits par les pays du Sud. Il représente la nourriture de base de 17 pays de l'Asie et du Pacifique, de 9 pays d'Amérique, et de 8 pays de l'Afrique dont Madagascar. Le riz couvre 20% des besoins énergétiques mondiaux (FAO, 2004).

Madagascar est l'un des plus anciens producteurs de riz après les pays asiatiques. Il figure aussi parmi les plus gros consommateurs mondiaux avec une consommation individuelle de 138 kg/an. La production s'élève à 3.420.000T en 2005 pour ses 18 millions d'habitants (MAP, 2006). La révolution verte adoptée par le MAP (Madagascar Action plan) vise à doubler cette production en 2008 pour atteindre l'autosuffisance alimentaire de cette denrée de base et à le tripler en 2012 pour avoir un excédent à exporter. Ce plan d'action passe par l'amélioration de la productivité avec la mise en œuvre de techniques adéquates, par l'extension des rizières et par la fourniture de semences améliorées et d'engrais. Pour accroître la productivité, il faut aussi lever les contraintes phytosanitaires qui compromettent les récoltes.

Depuis son apparition en 1989, la panachure jaune causée par le virus de la panachure jaune du riz (Rice yellow mottle virus ; acronyme RYMV) est devenue la plus importante maladie du riz à Madagascar (Rechkaus et Randrianangaly, 1990). Avant cette date, la pyriculariose tenait cette place. Deux autres maladies virales de riz ont été

mentionnées, *le Rice stripe necrosis virus* (RSNV) et une souche de *Maize stripe virus* (MSV), mais leur importance est négligeable tant en prévalence qu'en dégâts. La panachure jaune du riz est endémique en Afrique et n'a jamais été observé en dehors de ce continent.

Importance de la maladie

L'importance de la maladie est manifeste, tant en raison de son envergure géographique que des pertes de rendement qu'elle provoque.

La panachure jaune du riz a été identifiée pour la première fois au Kenya en 1966 (Bakker, 1974) (Figure 1). Puis, elle fut successivement observée au Liberia, Nigeria, Sierra Léone et Tanzanie en 1976 (Raymundo et Buddenhagen, 1976; Rossel *et al.*, 1982) ; en Côte d'Ivoire en 1977 (Fauquet et Thouvenel, 1977) ; en 1980, au Ghana et en Guinée (Raymundo et Konteh, 1980), au Niger, Burkina Faso, Mali et Malawi (John *et al.*, 1984), au Rwanda (Awoderu *et al.*, 1987), à Madagascar en 1989, plus récemment en Gambie (Séré et al, 2008), Guinée Bissau, Sénégal, Mauritanie (Awoderu, 1991, Séré et al, 2008) et Zanzibar (Ali et Abubakar, 1995) et tout récemment au Cameroun et Tchad (Traoré *et al.*, 2001) et en Ouganda (Pinel-Galzi, 2006).

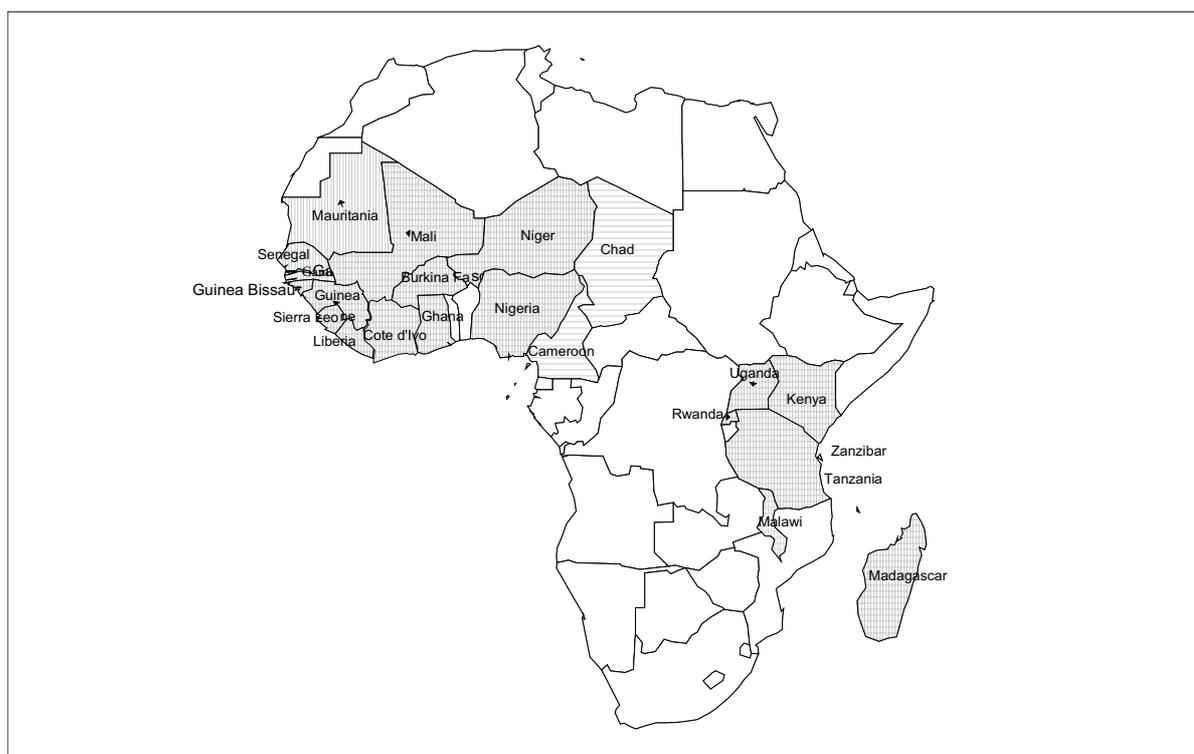


Figure 1. Distribution de la panachure jaune du riz dans le continent africain

Des suspicions de symptôme de maladie virale ont été rapportées par des experts de l'IRRI durant des prospections de rizières à Madagascar depuis 1985 (Mew, 1985 ; Fausto, 1988; Cabauatan, 1991). Mais, ils ont constaté que la maladie majeure était la pyriculariose. D'autres maladies - fongiques, bactériennes, ou des dégâts dus aux nématodes- étaient observés mais étaient considérés comme d'importance mineure. Sporadiquement, des symptômes de jaunissements foliaires et de rabougrissements de la plante ont été remarqués au centre semencier Anosy Fianarantsoa, zone limitrophe sud des Hauts-plateaux).

La présence de la panachure jaune à Madagascar a été confirmée en 1989 à l'aide des tests sérologiques des échantillons de feuilles prélevés dans les rizières de Lac Alaotra (Reckhaus et Randrianangaly, 1990). Cependant, des symptômes de panachure avaient été observés par les paysans plus de 20 ans auparavant dans la région du nord-ouest et au Lac Alaotra.

Les premières épidémies avérées de panachure se sont produites à l'époque où Madagascar cherchait à atteindre l'autosuffisance alimentaire en riz. La riziculture avait alors été intensifiée en 1984 en introduisant à partir de l'IRRI et en sélectionnant dans chaque région rizicole des variétés de riz à haut rendement en fonction des spécificités de chaque région. Ces variétés hautement productives se sont avérées toutes sensibles. Les épidémies se sont produites après le passage du mémorable cyclone Kamisy en 1984 avec des vents violents et beaucoup d'humidité. Ces conditions sont favorables à la pullulation qui a favorisé une forte pullulation des poux du riz (hispines) vecteurs du virus et permettent la dispersion et l'intensification de la maladie. Les deux greniers à riz de Madagascar, autour du Lac Alaotra d'une superficie de 70.000 Ha et dans la région du nord-ouest avec le périmètre irrigué de Marovoay d'une superficie de 20.000 Ha et le système *Asara* (pluvial de bas-fonds) des régions Boeny, Melaky et Sofia, ont été attaqués. En 1997, les épidémies de cette maladie s'étendaient jusqu'au sud-ouest, le nord-est et le sud-est mais n'atteignaient pas les Hauts-plateaux (Raharijaona, 1997).

Les épidémies se produisaient de façon imprévisible d'une région à l'autre, causant des pertes de rendement de 90% et conduisant parfois même à l'anéantissement de la production (Reckhaus et Andriamasintseheno, 1997). Aussi, le RYMV est-il devenu un fléau national.

Symptômes

Les symptômes caractéristiques de la panachure se manifestent par des jaunissements de feuilles et des rabougrissements de plante qui apparaissent 2 à 3 semaines après inoculation selon les variétés. Sur la variété de riz kenyane Sindano sur laquelle la panachure a été observée pour la première fois, les feuilles sont jaunes. Sur la variété Basmati 217, les

feuilles sont vert-jaunes pâles. Sur IR8, la première variété de riz à haut rendement réalisée aux Philippines par l'IRRI en 1966, les feuilles sont oranges. Les jeunes feuilles présentent des panachures, les plantes infectées produisent peu de talles, surtout lorsque l'infection survient à un stade précoce de développement. Quand les plantes survivent, ses panicules portent des graines vides (Bakker, 1970).

En Côte d'Ivoire, la maladie se manifeste sur les jeunes plantes de certaines variétés par des panachures vertes suivies d'un rabougrissement, et sur des plantes âgées par un jaunissement à la base des feuilles accompagné d'un brunissement des extrémités (Fauquet et Thouvenel, 1978).

A Madagascar, les caractéristiques sus-citées ont été identifiées (Figure 2). La maladie a été dénommée par les paysans comme « riz rouge et court » ou « riz- fleurs » en raison du rabougrissement des plants, de la couleur orange des feuilles et de la stérilité des panicules conduisant à un état végétatif permanent du riz (Reckhaus et Andriamasintseho, 1997).

En serre, le début de symptôme consiste en des points ou traits blancs. A ce stade, le symptôme reste localisé (Figure 2.1). En cas de sensibilité, ces traits évoluent en panachure (Figure 2.2). Les symptômes deviennent systémiques et se généralisent sur toutes les feuilles avec une coloration qui vire à l'orange (Figure 2.3). Le noircissement des graines (Figure 2.4) et le rabougrissement des plantes (Figure 2.5) surviennent au stade ultime de la maladie. Une rizière cultivée avec une variété sensible est parfois totalement abandonnée (Figure 2.6).

Transmission du RYMV

Comme tous les virus appartenant au genre des sobemovirus, le RYMV est transmis par des insectes appartenant à la famille des Chrysomélidae et aux sous-familles des Halticinae et Hispinae (Bakker, 1974). Les espèces de la sous-famille des Halticinae, *Chaectocnema abyssinica*, *C. kenyensis*, *C. pallidipes*, *C. pulla*, ont été recensés en Afrique continentale. De la sous-famille des Hispinae, ont été rapportés les espèces *Dactylispa bayoni*, *Di cladispa paucispina*, *D. viridicyanea* et *Trichispa sericea* (Bakker, 1974). Deux insectes de la famille de Tettigonidae de genre *Gonocephalus longipennis* et de la famille de Coccinellidae du genre *Chnootriba similis* ont été trouvés transmetteurs (Abo et al, 1997).

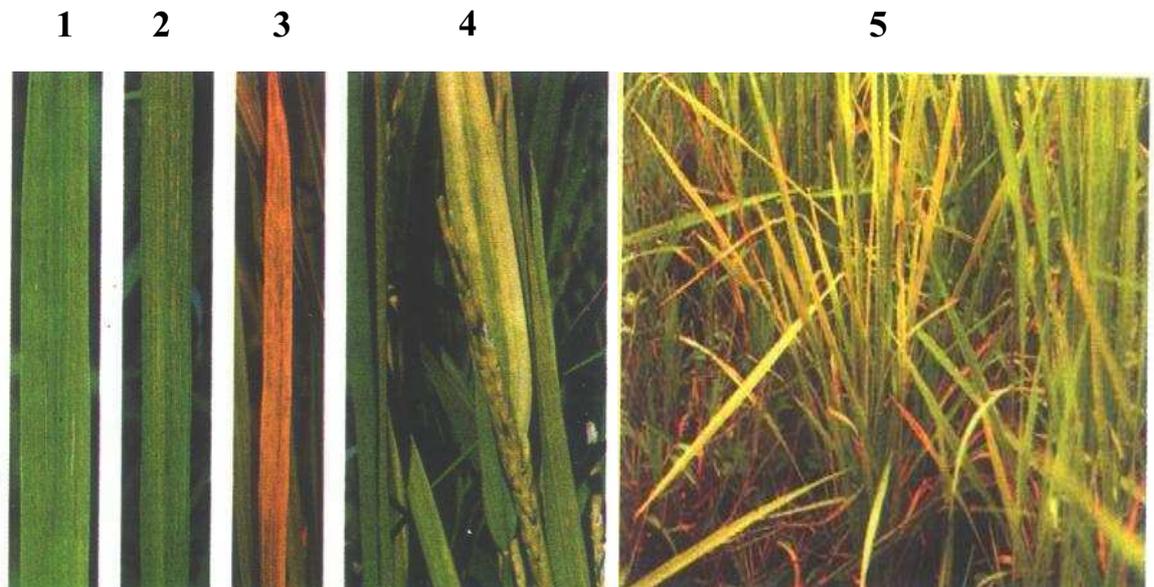


Figure 2. Symptômes de la panachure jaune du riz

- 1- Début d'apparition de la panachure en point ou trait localisé.
- 2- Les points et les traits s'allongent puis fusionnement en panachure caractéristique de la maladie.
- 3- Généralisation sur toute la feuille de la panachure qui devient jaune orange évoluant en nécrose (symptôme systémique).
- 4- Attaque au stade de reproduction : feuille paniculaire à panachure avancée ; les graines de la panicule sont noires et vides, anéantissant ainsi la production.
- 5- Rabougrissement d'une plante infectée.
- 6- Rizière infectée par RYMV après pullulation de *Dicladispa gestroi* dans la région d'Ambato-Boeny dans la région de Nord-Ouest de Madagascar, en saison « asara » ou saison des pluies.

A Madagascar, l'halicinae *Chaetocnema pulla* et l'hispiniae *Trichispa sericea* sont vecteurs du RYMV. L'hispiniae *Dicladispa gestroi* est un autre vecteur endémique à Madagascar (Figure 3). Les deux hispines appelés communément « poux de riz » par les Malgaches sont les principaux vecteurs de RYMV du fait de leur pullulation dans le pays en saison de pluie. Une corrélation significative existe entre l'infestation de *D. gestroi* et l'incidence de RYMV au Nord-ouest de Madagascar (Reckhaus et Andriamasintseho, 1997). Enfin, plus récemment, une sauterelle du genre *Oxya sp.* a été soupçonnée être vecteur du RYMV (Randriamanantsoa, 1994).

Expérimentalement, le RYMV est aisément transmis par voie mécanique. Naturellement, plusieurs facteurs abiotiques sont impliqués dans la transmission du RYMV (Abo et al, 2000). Ainsi, la transmission du RYMV par contact en cas de vents forts a été démontrée. Enfin, divers animaux herbivores tels que les ânes, les vaches et les rats de champs transmettent la panachure (Sarra et Peters, 2003; Sarra *et al.*, 2004). Mais le rôle respectif des différents modes de transmission dans la propagation n'est pas encore élucidé. Il est vraisemblable que l'importance de chacun d'entre eux varie selon les régions, voire selon les années.

Il a été montré que le RYMV n'était transmis ni par les semences (Konate *et al.*, 2001) ni par les nématodes (Abo *et al.*, 2000).

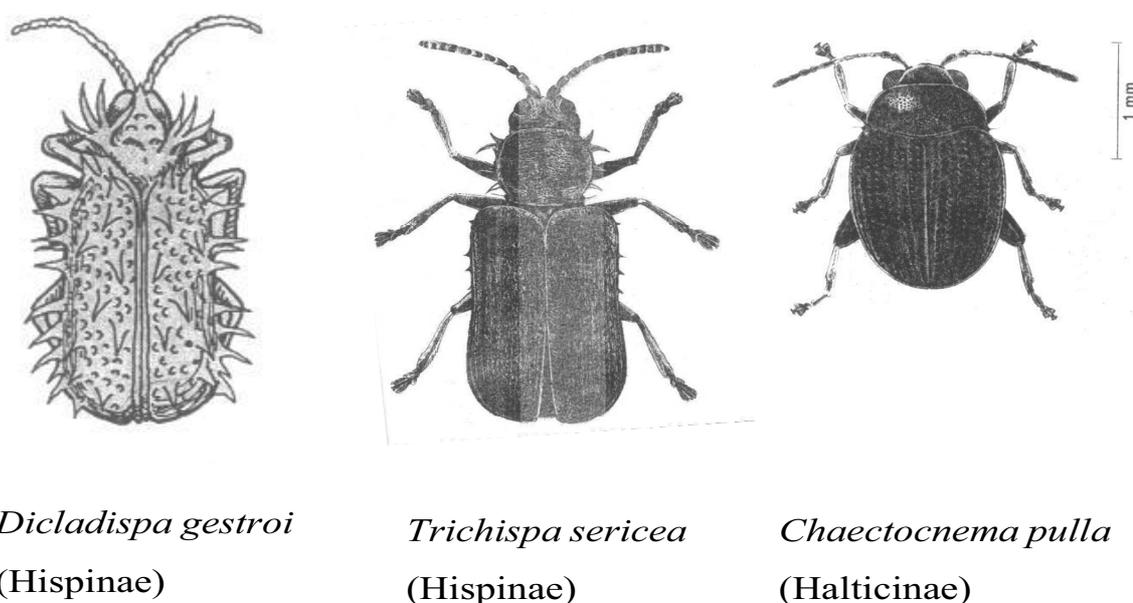


Figure 3. Les principaux insectes vecteurs du Rice yellow mottle virus de la famille des *Chrysomelidae* à Madagascar

Gamme d'hôtes

Le RYMV possède une gamme d'hôtes restreinte. Quelques tribus de la famille des graminées sont des hôtes systémiques du virus de la panachure. Il s'agit de :

- Eragrostidae : *Dinebra retroflexa* (Vahl) Panz., *Diplachne caudata* K. Schum., *Eragrostis aethiopica* Chiov., *E. ciliaris* (L.) R. Br., *E. namaquensis* Nees var. *namaquensis*,

- Oryzae : *Oryza australensis* Domin., *O. barthii* A. Chev., *O. brachiantha* A. Chev. et Roehr., *O. glaberrima* Steud., *O. longistaminata*, *O. nivara* Sharma et Shastry, *O. punctata* Steud., *O. ridleii* Hook f., *O. rufipogon* Griff., *O. spontanea* et *Oryza* sp., (Reckhaus et Andriamasintseho, 1997).

- Phalaridae *Phléum arenarium* L, les graminées *Eleusine indica*, *Eragrostis tenuifolia* (Bakker, 1974; Okioma *et al.*, 1983; Abo *et al.*, 2000).

Lutte contre la maladie à Madagascar

A Madagascar, les travaux de lutte contre la panachure jaune du riz sont alors devenus une priorité. Les organismes de recherche et de développement ont consacré leurs efforts à la mise en place d'une stratégie de lutte intégrée où la résistance variétale joue un rôle central pour résoudre le problème. Deux formes de résistance naturelle ont été déjà identifiées. Une résistance élevée présente chez une variété africaine Gigante de type indica et quelques variétés de l'espèce *O. glaberrima* a été caractérisée. Une résistance partielle est fréquente chez de nombreuses de la sous-espèce *O. japonica* Azucena et IRAT 177. La rareté des résistances élevées et la diversité du germplasm de riz à Madagascar ont encouragé la mise en place d'un programme de sélection variétale par le FOFIFA.

Toutefois, la connaissance de la diversité du virus, de sa variabilité et de son évolution est une condition requise pour le développement d'une résistance stable et durable. Il s'agit notamment de déterminer (i) le spectre et le niveau de résistance des variétés vis-à-vis des souches de RYMV représentatives de la diversité du virus à Madagascar, (ii) de déterminer s'il existe des souches ou des isolats capables spontanément de contourner ces résistances, (iii) si les souches avirulentes sont capables de devenir virulentes après confrontation avec les variétés résistantes. Peu d'informations sont disponibles sur la diversité et l'évolution du virus à Madagascar, raison pour laquelle ce travail a été entrepris.

Cette thèse intitulée « Phylogéographie du rice yellow mottle virus à Madagascar, Identification et Caractérisation de la résistance élevée de la variété de riz Bekarosaka » a été réalisée dans le cadre du volet formation du PSDR financé par la Banque Mondiale pour la

collecte des isolats du virus et les criblages par ELISA à Madagascar. Une bourse de formation continue allouée par le DSF IRD a permis de réaliser les travaux de biologie moléculaire au sein du laboratoire « Résistance des Plantes » à Montpellier France. Cette thèse s'inscrit dans le cadre général de la lutte contre la panachure jaune de riz en valorisant la richesse en ressources phylogénétiques et en biodiversité de Madagascar. Elle est basée sur une étude approfondie de la diversité, de l'évolution et de la phylogéographie du pathogène.

Objectifs de la thèse

Aussi, cette thèse s'est-elle fixée pour objectif l'étude de trois volets complémentaires : (i) la phylogéographie du RYMV, (ii) la résistance des variétés de riz malgaches au virus, les interactions du virus avec les variétés résistantes et (iii) le contournement de la résistance. Dans le premier volet, l'accent a été mis sur la phylogéographie du RYMV à Madagascar avec l'analyse de la diversité virale selon les régions. Il en a été déduit l'origine et les voies de propagation du virus dans l'île. Le deuxième volet se rapporte au criblage des ressources génétiques rizicoles malgaches avec la recherche de résistances au RYMV. Ces résistances sont caractérisées par inoculation d'isolats malgaches représentatifs de la diversité virale. Dans un troisième volet, la fréquence et le mode de contournement de la résistance à la panachure a été étudiée. L'ensemble de ces résultats est utilisé pour définir les conditions d'un contrôle durable de la panachure jaune du riz.

La thèse est divisée en quatre chapitres. Chacun d'entre eux est découpé en Introduction suivie des parties « Matériels et Méthodes », « Résultats », « Discussion » et « Conclusion ».

Le premier chapitre de la thèse présente l'étude de la diversité du RYMV à Madagascar. Il relate la prospection du RYMV dans les principales régions infectées, le suivi de l'évolution de la maladie et ses épidémies ainsi que la collecte des isolats. Les isolats collectés sont diagnostiqués et typés sérologiquement. Les sérotypes trouvés font l'objet d'une caractérisation moléculaire qui permettent de reconstruire la phylogénie du virus et d'émettre des hypothèses sur la dispersion géographique du virus. Ces études sont regroupées sous le terme phylogéographie.

Le second chapitre relate les étapes de sélection de variétés résistantes au RYMV : (i) criblage des variétés par symptomatologie et par test sérologique ELISA à Madagascar ; (ii) caractérisation des résistances de variétés vis-à-vis d'isolats locaux et d'isolats africains continentaux de référence ; (iii) caractérisation du phénotype et du déterminisme génétique de la résistance élevée de la variété malgache *Bekarosaka* découverte au cours de cette étude. Le troisième chapitre traite du contournement de la variété à résistance élevée *Bekarosaka* par certains isolats et les bases moléculaires qui le régissent. Le quatrième chapitre reprend les principaux résultats dans une discussion générale à l'issue de laquelle des perspectives de lutte intégrée durable contre la panachure jaune du riz seront émises. Une conclusion générale proposera des éléments de décision sur la valorisation des résultats obtenus et les suggestions pour l'amélioration du contrôle du RYMV.

CHAPITRE I : DIVERSITE, PHYLOGENIE, ET PHYLOGEOGRAPHIE DU RYMV A MADAGASCAR

1.1 INTRODUCTION

L'étude de la diversité du virus de la panachure jaune du riz est une condition requise au développement d'une méthode de lutte efficace contre la maladie. Elle repose sur les propriétés de la structure du virion. La méthode utilisée couramment est la sérologie qui est basée sur la propriété de l'enveloppe protéique du virion. Elle est renforcée par la méthode moléculaire « polymerase chain reaction (PCR) » qui utilise les propriétés de l'acide nucléique virale qui est pour le cas du RYMV, l'ARN. L'exploitation de ces propriétés est rendue possible par la bonne compréhension de la structure de la protéine de la capsid virale et du génome par des études faites par plusieurs chercheurs précédemment.

1.1.1 Structure du *Rice yellow mottle virus*

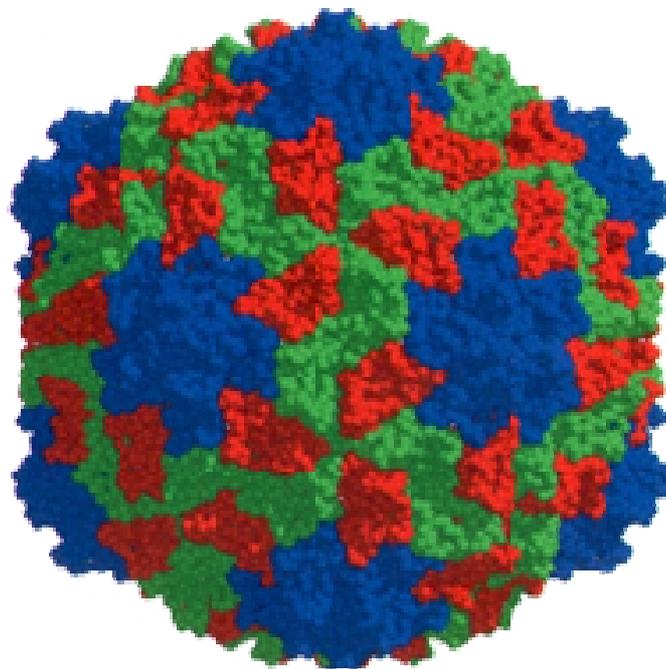
Le *Rice yellow mottle virus*, l'agent pathogène de la panachure jaune du riz appartient au genre des sobemovirus dont le membre type est le Southern bean mosaic virus (SBMV). Le génome du RYMV est formé par un seul brin d'ARN de sens positif avec une masse moléculaire de $1,4 \times 10^6$ Da (Yassi et al, 1994). Le RYMV ne possède pas de queue polyadénylée à son extrémité 3' et son extrémité 5' est liée par une liaison covalente à une protéine virale (viral protein genome linked ou VPg), comme les autres sobemovirus (Hull and Fargette, 2005).

Les particules du RYMV sont constituées par 80% d'ARN et de 20% de protéine et possèdent une forme isométrique de 25 nm de diamètre (Bakker, 1974). Une étude plus approfondie a confirmé leurs formes icosaédriques. La structure des virions du RYMV a été déterminée par cristallographie. Elles sont constituées par 180 sous unités de protéine de capsid assemblées suivant une conformation T=3 (Figure 4) (Qu *et al.*, 2000).

1.1.2 Organisation génomique

Le génome est constitué d'une molécule d'ARN simple brin de 4450 nucléotides et organisé en quatre cadres de lecture (ou open reading frames ou ORF). L'ORF1 commençant par le nucléotide (nt) 80 et se terminant au nucléotide 553 nt code pour une protéine P1 ayant 157 acides aminés (aa) et une masse moléculaire de 17,8 kDa impliquée dans le mouvement du virus

et dans la suppression du « gene silencing » (mécanisme de défense des plantes). L'ORF2a (609 à 2426 nt) et l'ORF2b (2093 à 3607 nt) codent pour une polyprotéine qui sera maturée en d'autres protéines : la protéase, la VPg, et la polymérase. L'ORF2b est traduite en fusion à partir de la polyprotéine P2a par un mécanisme ribosomal de changement de cadre de lecture ou « frameshifting ». L'ORF4 (3447 à 4166 nt) est chevauchant avec la partie 3' de l'ORF2 sur 160 nt. Il code pour la protéine de la capsid (CP) composée de 239 aa de masse moléculaire 26 kDa via un ARN subgénomique. Trois régions non codantes se situent sur la partie 5' terminal, entre l'ORF1 et l'ORF2 et sur la partie 3' terminal (Yassi et al, 1994 ; Makinen et al, 1995 ; Kouassi *et al.*, 2005) (Figure 5).



- | | |
|---|-------------------------|
|  | Monomères en position A |
|  | Monomères en position B |
|  | Monomères en position C |

Figure 4. Reconstruction tri-dimensionnelle de la capsid du *Rice yellow mottle virus*.

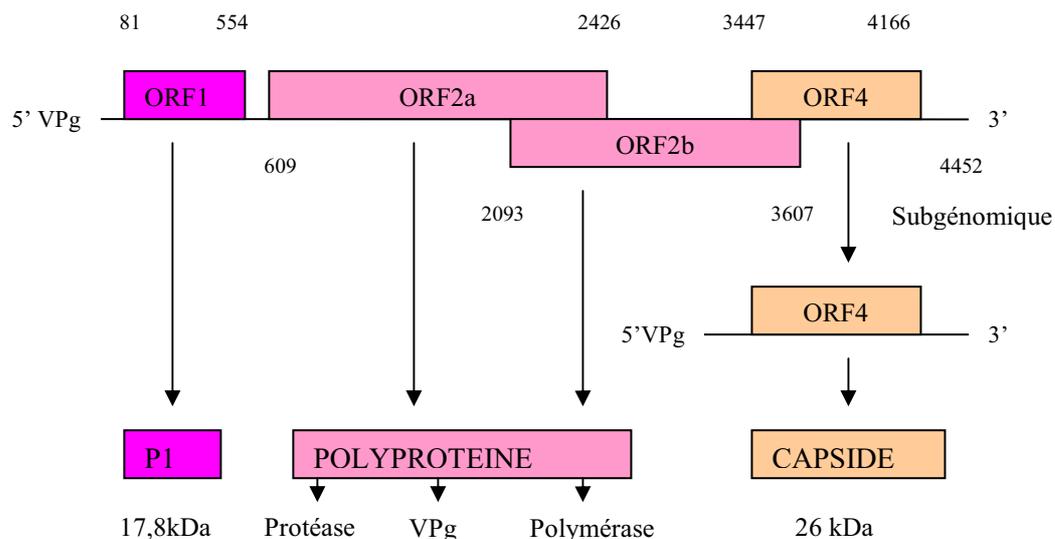


Figure 5. Organisation génomique du *Rice yellow mottle virus*.

1.1.3 Caractéristiques physico-chimiques

Le RYMV est très stable, en raison de la présence du cation Ca^{2+} . Notamment, son pouvoir pathogène persiste 155 jours chez les feuilles infectées 15 jours après inoculation, jusqu'à une température de 65°C et reste infectées après une dilution de 10^{-10} . Il n'est pas affecté par les traitements avec des solvants organiques tels que chloroforme, butanol et tétrachlorure de carbone (Bakker, 1974; Qu *et al.*, 2000).

1.1.4 Evolution des virus

Les virus de plantes à ARN ont différentes stratégies dans leur expression génomique: fragmentation du génome, formation d'ARN subgénomique, suppression d'un codon de terminaison amenant une translecture, traduction d'une polyprotéine, changement de cadres de lecture. Ces stratégies permettent une rapidité exceptionnelle de multiplication

Les virus de plantes à ARN n'ont pas -contrairement aux virus de plantes à ADN- des fonctions de contrôle et de réparation d'erreurs de synthèse durant les répliquations. Ces erreurs sont à l'origine de leur haute variabilité (Roossinck, 1997).

1.1.4.1 Forces induisant l'évolution des virus de plantes à ARN

On considère souvent cinq mécanismes dans l'évolution des virus de plantes: la mutation, la recombinaison, la dérive génétique, la migration et la sélection (Garcia-Arenal et al, 2001).

1.1.4.2 La mutation

La mutation est un processus au cours duquel un nucléotide qui était absent dans le brin d'ARN parent est incorporé dans le brin fils au cours des réplifications (Garcia-Arenal, 2001). La substitution, la délétion ou l'insertion surviennent à la suite d'erreurs non corrigées de l'ARN polymérase ARN dépendante (RpRd) au cours des cycles de réplification du virus. On estime le taux d'erreur des RpRd à environ 10^{-4} pour une base, c'est-à-dire une erreur pour un génome de 10 Kb pour les virus lytiques animaux à ARN et un peu plus faible chez *Tobacco mosaic virus* de l'ordre de $2,34 \times 10^{-5}$ (Garcia-Arenal, 2003). Chez les virus à ADN qui utilisent les ADN polymérase ADN dépendante dotée d'une fonction de contrôle de lecture et d'une fonction de réparation des erreurs de synthèse, on considère que le taux d'erreurs est de l'ordre de 10^{-9} (Roossink, 1997). Ce faible taux d'erreurs est dû à la fidélité de l'appariement des bases avant la polymérisation et à la reconnaissance des « mismatch » tandis que les ARN ne s'apparient pas et ne possèdent pas de correction post-transcriptionnelle des erreurs.

1.1.4.3 La recombinaison

La recombinaison est le processus pendant lequel des segments d'informations génétiques s'échangent entre deux brins d'ADN ou d'ARN au cours des réplifications. Ce mécanisme est fréquent chez les virus de plantes. Il peut être à l'origine d'isolats, de souches, voire d'espèces aux propriétés biologiques nouvelles (Worobey, 1999). La première recombinaison a été citée pour les virus à ARN chez les poliovirus dans la famille des Picornaviridae.

1.1.4.4 La quasi-espèce virale

En raison de la grande variabilité des virus à ARN, la formulation mathématique des populations virales avec un taux d'erreurs lors de la réplification a conduit à la notion de quasi-espèce virale (Eigen, 1993, 1996). Un virus de plante est décrit souvent comme une séquence de nucléotides dérivée d'un ADNc clone du virus. Or, un isolat n'est pas constitué d'une seule séquence mais d'un ensemble de séquences mutantes: elles sont représentées

mathématiquement par un nuage de points autour d'une séquence consensus (Rossinck, 1997). La séquence consensus est obtenue par le séquençage direct de l'ARN viral. Le nuage gravite autour d'un pic du variant le plus adapté. La sélection agit surtout sur les extrémités du nuage de points.

1.1.4.5 La sélection

La sélection module la variabilité naturelle en ajustant la relation hôte-virus. La sélection naturelle aboutit à la « survie du plus apte » dans la quasi-espèce virale générée par les mutations et des recombinaisons. La vitesse d'évolution peut être différente selon le virus, la souche virale et le gène considéré en raison de différentes pressions de sélection qui s'exercent. La relation hôte-virus chez les virus peut être stable en dépit de l'importante variabilité des virus à ARN. La quasi-espèce est aussi stabilisée par la sélection. Au sein du nuage de mutants, les plus adaptés sont les plus fréquents et donneront une descendance de plus en plus adaptée.

De ce fait, la sélection est un processus directionnel dans une population virale où la fréquence des variants les plus adaptés augmente (sélection positive) tandis que celle des variants les moins adaptés diminue (sélection négative), ce qui aboutit à une diminution de la diversité (Garcia-Arenal, 2001).

1.1.4.6 La dérive génétique

La dérive génétique aboutit, comme la sélection à une réduction de la diversité. Elle est due à une perte de variants au cours des processus d'échantillonnage au sein des populations. La dérive génétique est importante dans les populations virales de plantes, notamment au cours du mouvement des particules virales au sein de l'hôte, lors des transmissions du virus par vecteurs d'une plante à l'autre ou d'une aire géographique à l'autre. On parle souvent de goulot d'étranglement lors de la transmission de plante à plante ou effet fondateur lors de l'établissement de nouvelles populations dans une zone géographique nouvelle. La dérive génétique se traduit par une nouvelle population contenant un sous-ensemble, le plus souvent aléatoire, de la population mère. Le taux de réduction de la diversité initiale traduit l'intensité de la dérive génétique. Il en résulte une faible diversité au sein de la population mais une diversité accrue entre les différentes populations. Des exemples ont été cités avec le cas des variants de TMV sensibles à la température et provoquant des lésions nécrotiques au cours des passages sur différents hôtes (Aldahoud., 1989). La faible diversité du Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) en Martinique comparativement à la diversité mondiale est une manifestation d'un effet fondateur (Desbiez, 1996).

1.1.5 Variabilité et diversité du RYMV en Afrique

1.1.5.1 Diversité sérologique

La diversité sérologique d'une collection d'isolats de RYMV prélevés dans plusieurs pays africains a été étudiée à l'aide d'une série d'anticorps monoclonaux discriminants. Cinq sérotypes (Ser) ont été ainsi définis. Ces sérotypes ont une distribution géographique propre. Ainsi, les sérotypes Ser2 et Ser3 sont présents en Afrique de l'ouest exclusivement, le sérotype Ser1 se retrouve à la fois en Afrique de l'ouest et centrale. Les sérotypes Ser4 et Ser5 sont présents exclusivement en Afrique de l'est. Quelques isolats malgaches venant de la région du nord-ouest, de Ranohira et de la collection d'Ambatobe en 1990 ont été étudiés avant cette étude. Ils appartiennent au sérotype Ser4 (N'-Guessan *et al.*, 2001).

1.1.5.2 Diversité moléculaire

L'ORF1 et l'ORF4 sont les parties les plus variables du génome du RYMV, alors que l'ORF2 est la partie la plus conservée. L'ORF4 code pour la protéine de capsid du virus. Il est transcrit à des concentrations élevées via un ARN subgénomique. Les phylogénies reconstruites l'ORF4 sont très largement compatibles avec celles reconstruites à partir du génome entier c'est-à-dire leurs arbres ont la même forme. L'ensemble de ces raisons (forte concentration de l'ARN subgénomique porteur de l'ORF4, variabilité élevée et congruence phylogénétique) fait de l'ORF4 la portion du génome la plus appropriée pour l'étude de la diversité du RYMV. L'étude de la variabilité moléculaire basée sur le séquençage de l'ORF4 a révélé une diversité élevée. Six souches ont été définies. Elles recoupent largement les sérotypes établis à l'aide d'anticorps monoclonaux. Leur répartition géographique est caractéristique : les souches S2 et S3 (correspondant à Ser2 et Ser3, respectivement) se trouvent en Afrique de l'ouest exclusivement. La souche S1 (correspondant à Ser1) se subdivise en deux lignées, l'une présente en Afrique de l'ouest, l'autre en Afrique ouest/centrale (couvre le long d'un axe nord-sud Togo, Bénin, Niger). Les souches S4 (correspondant à Ser4) et S5 et S6 (correspondant à Ser5) sont présentes en Afrique de l'Est exclusivement (Pinel *et al.*, 2000 ; Abubakar *et al.*, 2003 ; Fargette *et al.*, 2004 ; Traoré *et al.*, 2005 ; Fargette *et al.*, 2006). Les divergences de séquence de l'ORF4 atteignent 16% en nucléotides et 12% en acides aminés. La variabilité des souches d'Afrique de l'est est plus de deux fois plus élevée que celle des souches d'Afrique de l'ouest.

1.1.6 ARN satellite

Un virus de plantes est quelques fois parasité par un satellite pathogène qui peut être soit un virus très petit soit un ARN (Astier et al, 2001). Ces satellites présentent des formes linéaires ou circulaires. Ils dépendent du virus dit assistant pour leur réplication mais ils ne sont pas nécessaires au virus assistant pour son cycle. Toutefois, les symptômes provoqués par le virus assistant sur la plante hôte sont accentués en présence des satellites. Le RYMV possède le plus petit satellite circulaire connu avec 220 nucléotides. Il est classé parmi les ARN satellites circulaires sans fonction messagère, comme d'autres virus du genre des sobemovirus (Hull et Fargette, 2005).

Près de 75% des isolats collectés des champs sur du riz cultivé ou sur des graminées sauvages dans les régions représentatives de la distribution géographique du virus possèdent un ARN satellite. La prévalence peut atteindre 100% en Afrique centrale et en Afrique de l'ouest. Elle est plus faible en Afrique de l'est. Deux formes très voisines du satellite ont été mises en évidence. L'étude de deux isolats malgaches a révélé la présence d'une des deux formes du satellite. L'ARN satellite ne jouait pas de rôle ni dans la phylogénie ni dans la pathogénie du RYMV (Pinel *et al.*, 2003).

1.1.7 Phylogénie et Phylogéographie

1.1.7.1 Phylogénie

La phylogénie est l'étude des relations historiques et évolutives entre organismes ou microorganismes d'un taxon donné. Elle révèle les parentés entre genres, espèces, sous-espèces, souches ou variants. Elle aboutit à la reconstruction d'un arbre phylogénétique au sein duquel les apparentements du taxon sont visualisés. L'arbre phylogénétique est basé sur l'analyse soit de caractères morphologiques, soit de caractères moléculaires. La phylogénie moléculaire se base sur la comparaison des séquences d'ADN ou d'ARN d'un gène, d'une région, d'un fragment ou du génome entier, comme dans le cas où la taille du génome est limitée. Il y a plusieurs méthodes de reconstruction phylogénétique (Darlu et Tassy, 1993) :

La méthode cladistique consiste à étudier les branchements phylogéniques, en mettant en évidence les séries de transformations des caractères de l'état plésiomorphe ou primitif à l'état apomorphe ou dérivé. L'arbre appelé alors cladogramme est un diagramme représentant les relations hiérarchiques entre les groupements de taxa ou de séquences et il est construit par la méthode de la parcimonie (MP : « maximum parcimony »). Le principe de la

parcimonie est de choisir l'arbre au plus court chemin, c'est à dire minimisant les transformations ou les substitutions de l'ancêtre aux descendants, donc l'arbre le plus parcimonieux.

La méthode probabiliste consiste par contre à choisir l'arbre et les longueurs de branches les plus probables obéissant à un modèle d'évolution défini au préalable. Ceci conduit aux méthodes d'estimation dites du maximum de vraisemblance (ML : maximum likelihood) qui cherche l'arbre qui maximalise les probabilités à observer les caractères ou les données. Une variante de cette méthode est la méthode bayésienne qui au lieu de choisir l'arbre qui maximalise la probabilité, opte pour l'arbre qui a la plus haute probabilité.

La méthode phénétique se base sur la ressemblance globale des unités évolutives comparées deux à deux pour inférer les parentés. Le phylogramme est souvent construit par la méthode des distances qui convertit les ressemblances, par exemple les alignements de séquences nucléotidiques en des matrices de distances qui sont utilisées pour calculer l'ordre des branchements et les longueurs de branches. La robustesse des nœuds peut être évaluée par une méthode statistique appelée le bootstrapping.

1.1.7.2 Phylogéographie

La phylogéographie s'intéresse aux processus qui gouvernent la distribution géographique des lignées généalogiques surtout au niveau intraspécifique. Plusieurs études montrent qu'il existe une structuration spatiale de la diversité des virus de plante (Bousalem, 2000; Garcia-Arenal, 2001).

1.1.7.3 Phylogénie et Phylogéographie du RYMV

Plusieurs analyses phylogénétiques ont été réalisées sur le RYMV à une échelle continentale. Abubakar et al (2003) ont élaboré un arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ORF4 de 40 isolats représentatifs des différents pays infectés par le RYMV et reconstruit avec la méthode des distances. L'arbre a montré que les isolats d'Afrique Centrale et ceux d'Afrique de l'ouest forment un groupe phylogénétique avec deux clades, le premier formé par les isolats d'Afrique de l'ouest forestière et le deuxième clade formé à la fois par les isolats d'Afrique de l'ouest et d'Afrique centrale savaniques.

Les isolats d'Afrique centrale et ceux d'Afrique de l'ouest forment un groupe monophylétique constitué par deux clades. Le clade des isolats d'Afrique centrale et le clade

d'Afrique de l'ouest ont subi de successives différenciations vers l'extrême ouest. Une incongruence a été observée entre les arbres phylogénétiques obtenus avec les séquences du génome entier et celles de l'ORF4 qui a montré un groupe paraphylétique formé par les isolats de l'Afrique centrale et ceux d'Afrique de l'ouest. Cette incongruence - bien que très circonscrite dans le cas du RYMV- souligne les limites des reconstructions basées sur une portion du génome. Dans le cas du RYMV, nous appliquons une méthode en deux temps. Le séquençage partiel d'un nombre d'isolats représentatifs est réalisé ; il permet d'assigner chaque isolat à une souche de référence (auparavant entièrement séquencée). A défaut, il est alors séquencé entièrement et est inclus dans le corpus de souches de référence. Les relations entre les souches, notamment au niveau des noeuds les plus internes (les plus sujets aux distorsions) sont étudiées à partir des séquences du génome entier des souches de référence.

Cette approche a été suivie avec 173 isolats partiellement séquencés et 16 souches de référence entièrement séquencées (Fargette et al. 2004 ; Traoré et al. 2005). Les trois principales méthodes d'analyse (maximum de vraisemblance, maximum parcimonie et distance) ont été appliquées. La topologie des arbres est semblable quelles que soient les méthodes de reconstruction utilisées. La principale caractéristique de ces arbres phylogénétiques est l'emboîtement successif des nœuds selon un axe est-ouest au travers de l'Afrique. Les branchements les plus basaux sont observés à l'est de Tanzanie. Des branchements successifs ont montré les isolats des autres régions de Tanzanie et de Madagascar. Les résultats suggèrent que le centre d'origine du RYMV est en Afrique de l'est, et que la dispersion du virus a suivi une direction est -ouest (Figure 6) (Fargette *et al.*, 2004).

La phylogéographie du RYMV dans le continent africain incluant 11 pays a montré que les distances génétiques entre isolats basés sur l'ORF4 et les distances géographiques sont corrélées positivement. Les distances géographiques de 4000 et 8000 Km sont associées à des distances génétiques de 7 et 14% respectivement. En Afrique de l'est, due aux différentes barrières physiques (lac, montagne, mer), la divergence s'est faite dans des conditions isolées. Les isolats de Madagascar et ceux de la région du Lac Victoria forment des groupes sœurs ayant un ancêtre commun (Abubakar *et al.*, 2003).

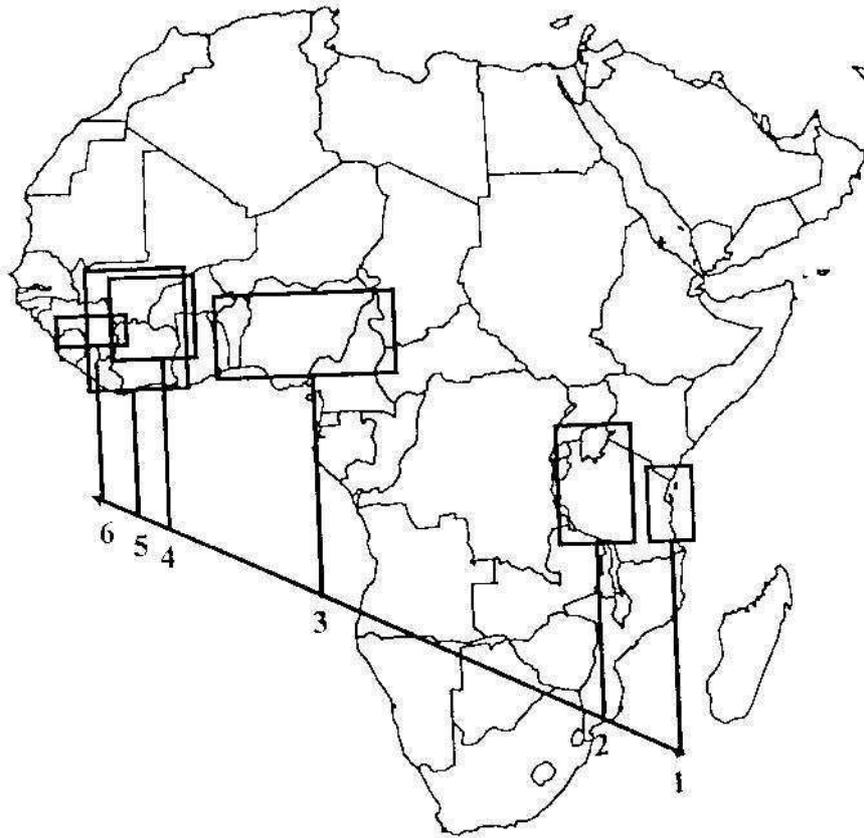


Figure 6. Distribution géographique des six clades formés par les isolats africains définis par l'analyse des séquences du génome entier (Fargette et al, 2004)

1.1.8 Biogéographie de Madagascar

La phylogéographie d'une espèce est étroitement liée à la biogéographie de son environnement. Aussi, la prise en compte de la situation géographique de Madagascar- qui régit la distribution de sa faune, flore et microorganismes- est-elle indispensable.

Madagascar est la quatrième plus grande île mondiale après le Groenland, la Nouvelle Guinée et Bornéo. Elle est située entre le 12° et le 25° degré de latitude de l'hémisphère sud et sa superficie est de 592.000 km². C'est une île continentale dérivée de la dislocation de l'ancien continent Gondwana survenue il y a environ 125 millions d'années avant J-C (Brown, 1998). L'île est distante du continent africain d'environ 400 km. Madagascar abrite une diversité biologique exceptionnelle, avec 80% de la diversité de la planète.

1.1.8.1 Les bioclimats

Le principal facteur de la biodiversité à Madagascar est l'existence de plusieurs bioclimats qui sont générés par le relief et les vents. Le relief qui reflète les événements tectoniques (volcanisation, métamorphisation et sédimentation) est accidenté et présente trois massifs centraux : le massif de Tsaratanana (2876 m altitude) au nord, le massif de l'Ankaratra (2643 m altitude) au centre et le massif de l'Andringitra (2608 m altitude) au sud. On observe un cloisonnement de Madagascar le long de l'axe nord-sud qui isole la partie orientale de la partie occidentale du pays, avec une dissymétrie marquée d'est en ouest. A l'est, on a une falaise escarpée à pente très abrupte. A l'ouest, la pente est plus régulière. Trois sortes de vents interviennent dans la pluviométrie de Madagascar :

- l'alizé, en provenance de l'océan indien, est orienté d'est en ouest. Il régit la saison pluvieuse. La majeure partie des pluies est déversée à l'est du pays tout au long de l'année. Très peu d'humidité franchit la côte occidentale.

- le foehn est un vent tourbillonnaire très sec, issu de l'alizé qui souffle sur le versant occidental

- la mousson est un vent équatorial qui régit les pluies estivales dont jouit la côte occidentale pendant une période allant de novembre à mars.

Il existe deux gradients pluviométriques, l'un de direction est-ouest dû à la dissymétrie du relief et l'autre de direction nord-sud avec une diminution progressive de la pluie du nord au sud. La répartition de la température à Madagascar est régie aussi par l'alizé et la mousson. Koechlin (1974) a présenté les bioclimats en fonction de la température et la pluviométrie (Figure 7).

1.1.8.2 Bioclimat et phytogéographie

Le cloisonnement physique de l'île dû au relief et les bioclimats conditionnent des végétations contrastées marquées par une forte endémicité. On distingue (Humbert, 1995) :

- le Domaine de l'Est et le Domaine de Sambirano constitués de forêt dense humide sempervirente

- le Domaine du Centre et de l'Est de haute altitude caractérisés par des formations forestières d'altitude

- les Bois de pentes occidentales qui font la transition entre le Domaine du Centre et le Domaine de l'Ouest et sont formés de forêts sclérophylles de moyenne altitude

- le Domaine de l'Ouest constitué de forêts denses et sèches

- le Domaine du Sud-ouest caractérisé par des formations xérophiles du sud-ouest ou « bush »

Les phénomènes d'érosion, la dégradation de la végétation et l'introduction de genres et espèces nouveaux ont transformé ces aires phytogéographiques originelles.

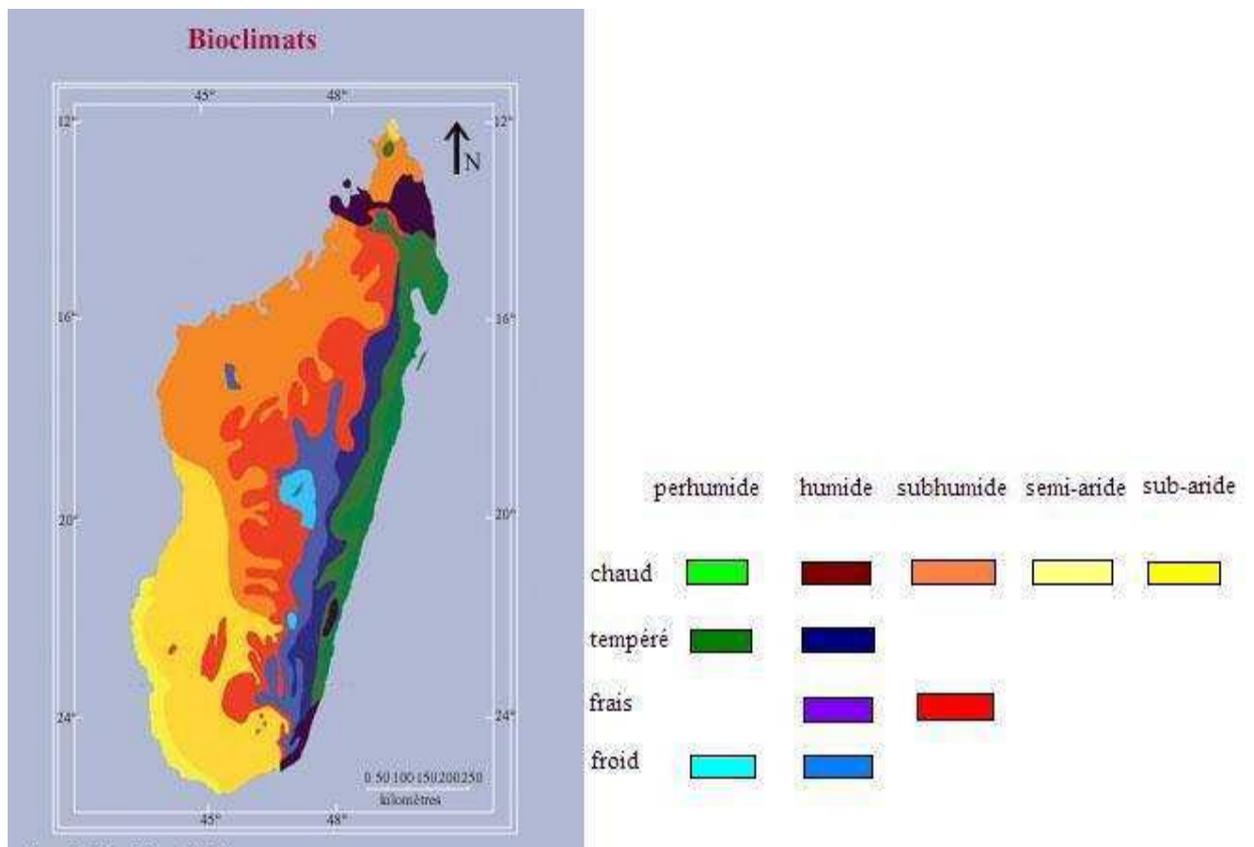


Figure 7. Les bioclimats de Madagascar (Koechlin, 1974)

1.1.8.3 Bioclimat et biogéographie des variétés de riz

Les variétés traditionnelles de riz introduites par les immigrants asiatiques constituant le premier peuple malgache ont été cultivées dans des domaines variés répartis en fonction du bioclimat qui détermine leur aptitude culturale. Les variétés de riz sont alors distinguées selon leur tolérance ou sensibilité au froid ainsi que selon leur adaptation aux différentes conditions édaphiques. Ainsi, sept grandes familles vernaculaires sont répertoriées selon leurs zones de culture (Rabary, 1989) :

- famille des Vary Lava : zone des Hauts- plateaux ;
- famille des Kiriminy : zone du Nord-ouest ;

- famille des Rojo : zone des Hauts-plateaux ;
- famille des Latsika : zone de très haute altitude ;
- famille des Tsipala : zone de Marovoay et de l'ouest ;
- famille des Makalioka : zone de la région du Lac Alaotra ;
- famille des Botramaintso : zone de la côte est.

La particularité des variétés malgaches tient à l'existence d'un groupe atypique intermédiaire morphologiquement des types *indica* et *japonica* présents par ailleurs sur l'île. Les deux sous-espèces *indica* et *japonica* sont distinctes, chacune d'entre elles étant caractéristique d'un type de riziculture. Les variétés de type *indica* se rencontrent dans les régions de Mahajanga (nord-ouest), du Lac Alaotra (moyen-est), des hauts plateaux, Antsirabe et Fianarantsoa où elles sont cultivées exclusivement en rizières inondées. Les variétés de type *japonica* se retrouvent principalement dans le sud-est en riziculture pluviale, en *tavy* (culture sur brûlis), sur *tanety* (en pente), à hautes altitudes (aux environs de 1800 m) toujours en riziculture pluviale (Kochko, 1988). Le groupe intermédiaire est originaire des hauts plateaux et se cultive en riziculture aquatique (Ahmadi, 1988).

1.1.8.4 Bioclimat et biogéographie des insectes vecteurs

Les principaux insectes vecteurs de RYMV à Madagascar de la sous-famille des *Hispinæ* ont une distribution géographique distincte. *Dicladispa gestroi*, le pou épineux, pullule dans les zones de basse à moyenne altitude tandis que le pou inerme *Trichispa sericea* se trouve confiné dans les hauts plateaux. Une cohabitation des deux insectes est observée dans les zones intermédiaires (Reckhaus et Andriamasintseheno, 1997).

Le RYMV présente une grande diversité sérologique et moléculaire en Afrique. La répartition géographique de la diversité a été mise en évidence. Cinq échantillons venant de Madagascar (étiquetés Mg1 à Mg5) ont été collectés entre 1989 et 1991 et ont été caractérisés partiellement avant cette étude. Ces isolats appartenaient au sérotype Ser 4 et à la souche S4. Cependant, l'échantillonnage restreint, l'absence d'information sur leur origine géographique, des possibles contaminations limitaient la portée de ces résultats. En tout état de cause, il restait nécessaire de mener une étude approfondie du RYMV dans ce grand pays rizicole qu'est Madagascar. Cette étude avait pour objectif d'évaluer la diversité virale dans les principales régions rizicoles du pays. Les informations sur la diversité moléculaire du RYMV ont été aussi utilisées pour déterminer les relations phylogénétiques entre les isolats. Ces informations moléculaires ont été confrontées aux données épidémiologiques afin d'en déduire l'origine probable du virus à Madagascar et de retracer les chemins vraisemblables de dispersion.

1.2 MATERIELS ET METHODES

Les matériels nécessaires à l'étude de la diversité sérologique et moléculaire consistent en isolats ou virus extrait plantes infectées qui ont été prospectées dans différentes régions de Madagascar. Ces isolats ont subi des tests sérologiques pour diagnostiquer, typer RYMV. Ensuite, les variants repérés ont subi des extractions d'ARN et de test moléculaire basé sur l'ORF4.

1.2.1 Prospection des isolats de RYMV à Madagascar

Des phytopathologistes nationaux et expatriés ont fait régulièrement des inspections phytosanitaires à Madagascar : le RYMV n'a pas été observé de 1970 à 1978 (Notteghem, communication personnelle). Après son premier rapport sur l'apparition de RYMV dans l'île, Rechkaus (1994) a fait une prospection à Madagascar et a établi une cartographie des régions infectées et non infectées. Les régions infectées par le RYMV ont été classées selon l'incidence de la maladie.

Au cours de nos propres prospections, les principales régions géographiques et épidémiques du pays qui recouvrent l'essentiel de la diversité climatique et écologique de Madagascar ont été visitées. Cependant, les régions enclavées, particulièrement difficiles d'accès, possédant une biogéographie particulière et soupçonnées d'être infectées par la panachure n'ont pas été atteintes. A l'issue de ce travail, la cartographie du RYMV en 2004 a été comparée avec celle établie par Rechkaus en 1994, c'est-à-dire dix ans auparavant. Parallèlement, la distribution géographique du virus a été comparée à la répartition de la température et des plantes hôtes afin d'isoler les facteurs associés.

1.2.1.1 Zones de prospection et leurs biogéographies

Régions du Nord et du Nord-ouest

Des échantillons présentant des symptômes de panachure ont été collectés des villages et stockés et/ou régénérés dans la collection de Marovoay. Cette région de basse altitude (zéro à 113 m) possède un climat sub-humide chaud selon les subdivisions biogéographiques de Koechlin (1974) avec une pluviométrie moyenne varie de 1100 à 1600 mm et une température varie de 22° à 31°C. Deux saisons de culture de riz sont pratiquées : la saison *asara* pluvieuse et chaude et la saison *jeby* sèche et fraîche. Le vecteur *D. gestroi* pullule dans cette région seulement pendant la saison *asara*. Il sévit alors à la fois comme ravageur de riz et comme vecteur de RYMV. Il hiberne ensuite dans la forêt humide pendant la saison fraîche et sèche

(Randriamanantsoa, 1994). C'est le domaine des variétés de riz *Tsipala*, *Kiriminy* et *Boina* et des lignées IRRI introduites en 1985 qui avaient été sélectionnées et déployées pour leur performance agronomique. Toutes ces variétés sont sensibles à la panachure jaune.

Région du Nord-est

Les échantillons du Nord-est ont été collectés pendant deux saisons de culture. Le climat humide tout au long de l'année permet la culture du riz sans interruption. Cependant, deux saisons principales peuvent être distinguées selon la température : saison chaude et saison fraîche. La pluviométrie varie de 1400 à 2300 mm et la température de 22 à 27°C. *D. gestroi* est présent tout au long de l'année dans les rizières où l'humidité est élevée. La variété traditionnelle *Mamoriaka* est la plus cultivée et est aussi sensible au RYMV. De ce fait, l'inoculum du virus est toujours présent.

Région du Moyen-est

La région du Moyen-est a une altitude d'environ 1155 m. Elle a un climat subhumide tempéré avec une température variant de 16 à 27°C. Il s'agit d'une zone intermédiaire entre les régions de basse et de haute altitude. Le riz est cultivé seulement pendant la saison pluvieuse. C'est le domaine de la variété *Makalioka* à laquelle se sont ajoutées plus tard la variété chinoise *Tche Kouai* vulgarisée et quelques lignées provenant de l'IRRI. Toutes ces variétés sont sensibles. Les deux vecteurs du RYMV *D. gestroi* et *T. sericea* cohabitent dans cette région et sévissent aussi comme ravageurs des cultures (Randriamanantsoa, 1994).

Région du Sud-ouest

La région du Sud-ouest de 7 à 577 m d'altitude a un climat semi-aride avec une pluviométrie de 500 mm, voire nulle pendant les années de sécheresse mais de 900 mm pendant les années de cyclones. La température varie entre 20 et 30°C. Il y a un gradient d'aridité croissant vers le sud où le bioclimat devient sub-aride. La culture du riz y est sporadique et discontinue. C'est le domaine de la variété traditionnelle et susceptible *Tsipala* à laquelle s'est rajouté par la suite le cultivar IR8 et d'autres lignées IRRI introduites en 1985. Toutes ces variétés sont sensibles à la panachure jaune. Le vecteur *D. gestroi* seulement y est présent.

Région du Sud-est

La région du Sud-est est au niveau de la mer et consiste en une plaine étroite le long du bord de la mer et d'une forêt sur le flanc de montagne à l'intérieur. Le bioclimat est perhumide chaud avec une pluviométrie de 2830 mm et une température varie de 21 à 27°C. La culture du riz est pratiquée pendant toute l'année. C'est le domaine des variétés de riz traditionnelles nommées *Botramaitso* et *Vatomandry*. Le *D. gestroi* est à la fois ravageur du riz et un vecteur du RYMV.

Région des Hauts-plateaux

Les prospections ont été faites selon l'axe Maevatanana-Antananarivo-Fianarantsoa et le long de l'axe Antananarivo-Ambatondrazaka. Quelques échantillons soupçonnés d'être virosés ont été collectés et ont été inclus dans les tests de diagnostic du RYMV. La région des Hauts-plateaux est caractérisée par une succession de montagnes et de vallées au-dessus de 1250 m d'altitude et par une température basse. La subdivision bioclimatique varie de subhumide frais à humide froid. La température varie de 11°C à 24°C. La pluviométrie peut atteindre 1360 mm. C'est le domaine du riz traditionnel de type Rojo qui est sensible au RYMV. Seule, l'hispine *T. sericea* y sévit comme ravageur, mais ne joue pas de rôle de vecteur en raison de l'absence de réservoirs de RYMV.

1.2.1.2 Mode de prélèvement et d'isolation

Les régions du Nord, Nord-est et Nord-ouest ont été prospectées en 2003 tandis que celles du Moyen-est, Sud-est, Sud-ouest et les Hauts plateaux en 2004. Ceux du Nord-ouest comprennent aussi des échantillons collectés avant ces dates et qui ont été conservés dans la station de Tsararano

Les échantillons ont été collectés sur des feuilles présentant des symptômes prononcés de panachure. Parfois, des feuilles soupçonnées d'être virosées ont été collectées pour être testées par ELISA. Après avoir diagnostiqué la présence du RYMV, les feuilles ont été coupées en petits morceaux et mises en sachet scellé et étiqueté. Les échantillons ont été déposés dans une glacière jusqu'à l'arrivée au laboratoire où ils ont été transférés dans un congélateur (-20°C) en attendant le transport vers Montpellier.

1.2.1.2 Mode d'isolation

En préalable aux tests, afin d'obtenir les concentrations virales nécessaires, les échantillons prélevés dans les champs ont été régénérés après inoculation d'une lignée sensible, le plus souvent la variété IR64, une lignée d'élite de l'IRRI. Chaque échantillon de feuille infectée et diagnostiquée venant d'un lieu déterminé représente un isolat de RYMV. Les isolats sont ensuite conservés pour long terme dans une chambre froide.

1.2.2 Matériels biologiques

▪ Isolats, origine et dénomination

- 26 échantillons du Nord et Nord-ouest (MRV1 à MRV26)
- 23 échantillons du Nord-est (SBV1 à SBV23)
- 9 échantillons du Moyen-est (CALA1 à CALA9)
- 11 échantillons du Sud-est (KJV1 à KJV3, MNJ1 à MNJ9)
- 7 échantillons du Sud-ouest (SO1 à SO7)

Par souci d'homogénéité de nomenclature avec les inventaires antérieurs, ces 77 échantillons collectés seront renommés avec le préfixe Mg (pour Madagascar) suivi d'un numéro d'ordre (cf liste en Annexe).

▪ Antisera utilisés

Plusieurs antisera polyclonaux ont été utilisés. L'un, déposé au John Innes Centre, UK a été préparé contre un isolat d'Afrique de l'ouest d'une souche de savane. Deux antisera ont été fabriqués dans le laboratoire de l'IRD de Montpellier, France. L'un d'entre eux avait été obtenu contre un isolat de Côte d'Ivoire (Fauquet et Thouvenel, 1977). Le second qui est le plus utilisé avait été préparé à partir d'un isolat de Madagascar prélevé avant le début de cette thèse, au commencement des épidémies de panachure dans le pays (N'Guessan et al., 2000).

Des anticorps monoclonaux (MAb) ont été préparés à partir de ce même isolat malgache toujours dans le laboratoire de l'IRD de Montpellier, France. Certains anticorps monoclonaux ont un spectre de détection différent selon les isolats, ce qui a permis de distinguer différents sérotypes (N'Guessan et al., 2000). Cinq MAb ont été utilisés dans ce travail :

MAb A : ne reconnaît pas Ser2

MAb D : ne reconnaît pas Ser1

MAb E : ne reconnaît pas Ser5

MAb G : ne reconnaît pas Ser3

MAb M : reconnaît tous les sérotypes

1.2.3 Détection du RYMV dans les échantillons collectés par DAS-ELISA

Le DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est une méthode immuno-enzymatique qui permet de détecter le virus et d'évaluer la charge virale des échantillons. Le test repose sur les principes des réactions antigène-anticorps et précisément sur la reconnaissance par les anticorps de la protéine de capsidie qui enveloppe l'acide nucléique des virus. Une protéine ou une polysaccharide injectée dans le corps d'un mammifère (lapin, cheval, souris, etc...) ou d'un oiseau (dinde, poule, etc...) est reconnue comme un antigène et provoque une réaction immunitaire chez ces hôtes se traduisant par la production d'anticorps, des glycoprotéines qui circuleront dans le sérum sanguin (Matthews, 1991). Ces anticorps ont la propriété de reconnaître et de se lier spécifiquement avec l'antigène qui les a induits. Cette reconnaissance et cette spécificité sont conférées par la présence des déterminants antigéniques appelés aussi épitopes localisés généralement en surface de la protéine virale (Van Regenmortel, 1993). Un antisérum polyclonal regroupe des anticorps dirigés contre différents épitopes. Il est le plus souvent utilisé comme test de diagnostic à large spectre. Le test ELISA comprend une phase solide où l'antigène est fixé sur une surface plastique (une plaque en plastique de 96 puits en général) et sa présence est détectée par un anticorps couplé à un enzyme. Le DAS-ELISA est une variante de ce test adapté par Clark et Adams aux virus de plantes (Clark et Adams, 1977). En DAS-ELISA, l'anticorps est préalablement adsorbé sur la plaque. Puis l'antigène est rajouté. L'anticorps couplé à la phosphatase alcaline est ensuite rajouté. Sa présence est reconnue avec l'ajout du substrat (dans ce travail, le p-nitrophénylphosphate ou pNPP) qui donnera une réaction colorimétrique dont l'intensité sera évaluée par spectrophotométrie. Le nom double-sandwich illustre que l'antigène est reconnu à la fois par l'anticorps et par l'anticorps couplé (Figure 8A).

Le test DAS-ELISA comprend cinq étapes :

1. Adsorption de la plaque ELISA avec de l'anticorps polyclonal purifié (IgG) à 1mg/ml dans un tampon carbonaté pH 9,6. Ce mélange est déposé à raison de 100 µl/puits sur les 60 puits du milieu de la plaque (les puits en bordure ne sont pas utilisés pour diminuer l'hétérogénéité des réactions).
2. Blocage des sites non occupés avec des protéines de lait écrémé dilué dissout à 3% dans du tampon phosphaté salin-tween (PBST) déposées dans toute la plaque à raison de 200 µl/puits.
3. Dépôt de l'antigène viral extrait de feuilles broyées dans du PBST au 1/10 (poids/volume).
4. Dépôt de l'anticorps conjugué à la phosphatase alcaline à la même dilution et à la même quantité que l'anticorps non-conjugué.
5. Révélation par du substrat pNPP dilué à 1 mg/ml dans du tampon diéthanolamine à pH 9,8.

Chacune des quatre premières étapes est suivie d'une incubation, soit à 37°C pendant 2 h, soit à 4° C pendant une nuit, puis d'un rinçage rapide et de trois rinçages espacés de 3 min avec du tampon PBST, sauf pour l'étape de blocage qui est réalisée à 37°C pendant 1 h et suivie d'un seul rinçage de 3 min. La dernière étape est incubée à la température ambiante mais protégée de la lumière qui détériore le substrat. La lecture est faite 1 h et 4 h après au spectrophotomètre Multiscan à 405 nm. Un échantillon est considéré positif si sa densité optique (DO) est à la fois supérieure à 0,1 et à deux fois celle du témoin sain. Quand les échantillons n'ont pas une charge virale suffisante, ils sont régénérés par multiplication sur la variété sensible IR64 (cf. ci-dessus). Les échantillons sont alors récoltés lorsque les symptômes foliaires sont marqués, puis retétés à nouveau directement ou après stockage à - 80°C.

1.2.4 Typage des isolats par TAS-ELISA

Le test TAS-ELISA (triple antibody sandwich-ELISA, parfois appelé aussi double sandwich indirect) est une autre variante du test ELISA. Il comprend une étape supplémentaire où un anticorps monoclonal (spécifique d'un seul épitope) est utilisé. Le test TAS-ELISA permet ainsi de typer les isolats d'après leur réaction avec une série d'anticorps monoclonaux (MAbs) discriminants. Les MAbs sont produits par un hybridome de souris. Le triple sandwich consiste en un anticorps polyclonal, un MAb et un anticorps anti-souris conjugué à la phosphatase alcaline qui reconnaît et se lie au Mab (Figure 8B).

Les MAbs sont dénommés A, D, E, G et M dans ce test. Ce sont des surnageants de culture bruts obtenus après culture des hybridomes. Ils ont des spectres de reconnaissance distincts avec les sérotypes connus (Ser 1 à Ser 5).

Soixante-quatre échantillons à la fois représentatifs des régions infectées et ayant une DO élevée en DAS-ELISA ont été sélectionnés pour être testés en TAS-ELISA. Des isolats de chacun des cinq sérotypes connus (Ser 1 à Ser5) ainsi qu'un extrait de plante saine sont utilisés comme témoins. Par rapport au DAS-ELISA, le test TAS-ELISA comprend une étape supplémentaire. Les étapes 1, 2, et 3 se sont déroulées comme en DAS-ELISA mais l'étape 4 consiste en un dépôt des Mabs suivie d'une étape 5 : le dépôt de l'anti-souris conjugué. Dans la 6^e étape, l'anticorps anti-souris conjugué a été révélé comme en DAS-ELISA. Le dépôt des MAbs a été réalisé aux dilutions suivantes :

MAbs A, M, E, G : 1/10

MAb D: pur

La lecture a été faite comme en DAS-ELISA. Pour simplifier l'interprétation des résultats, les DO sont codées (Tableau 1).

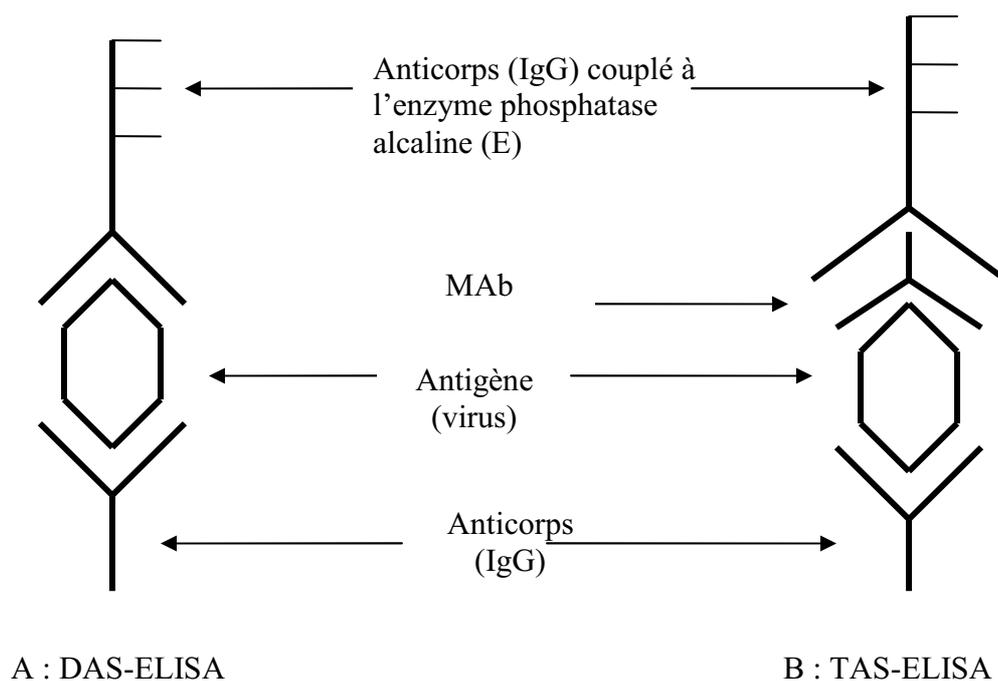


Figure 8. Diagramme représentatif de la liaison antigène-anticorps en double sandwich (DAS) et triple sandwich (TAS) du test ELISA

Tableau 1. Spectre de reconnaissance des anticorps monoclonaux utilisés

Sérotype	Anticorps monoclonaux (MAbs)				
	A	D	E	G	M
Ser 1	4	0	4	4	4
Ser 2	0	4	4	4	4
Ser 3	4	4	4	0	4
Ser 4	4	4	4	4	4
Ser 5	4	4	0	4	4

Codes des absorbances (en gras) : **0** $\leq 0,30$; $0,31 \leq 1 \leq 0,60$; $0,61 \leq 2 \leq 1,20$; $1,21 \leq 3 \leq 1,80$; $1,81 \leq 4$.

1.2.5 Extraction de l'ARN viral

Vingt cinq isolats couvrant le spectre de réactions sérologiques obtenu avec les 5 MABs ont été sélectionnés pour le typage moléculaire afin d'augmenter la chance d'obtenir une variabilité. Il s'agissait majoritairement d'isolats de sérotype Ser 4 mais aussi de plusieurs isolats aux réactions atypiques. De telles réactions atypiques se produisent parfois en ELISA. La 'rénovation' des échantillons par multiplication sur plante sensible permet de lever la plupart des ambiguïtés. Dans les autres cas, seul le typage moléculaire permet de s'assurer de la présence de nouveaux variants.

L'ARN total est extrait des échantillons venant directement de champs avec le kit Rneasy de Quiagen pour toutes les études moléculaires suivantes. L'extraction s'est faite à l'aide du kit Rneasy de Quiagen à partir de 0,1g de poudre de feuille obtenue après broyage dans de l'azote liquide. Le broyat a été dissocié par un tampon de lyse contenant du β -mercaptoéthanol et par une incubation au bain-marie à 56°C pendant 3 mn et a ensuite subi une centrifugation à 14.000 rpm (round per min) dans de l'éthanol, puis une autre série de centrifugations à 10.000 rpm et de 3 lavages avec du tampon de lavage. L'ARN a été obtenu en deux éluions de 30 μ l dans de l' H_2O , puis a été conservé à -20°C pour tous les travaux d'amplification par RT-PCR.

1.2.6 Caractérisation du gène de la protéine de capsid

1.2.6.1 RT-PCR du gène de la protéine de capsid

Le RYMV étant un virus à ARN, on doit faire une reverse transcription (RT) avant l'amplification par la « polymerase chain reaction » (PCR). Le principe de la RT-PCR repose sur l'exploitation des connaissances sur les propriétés physico-chimiques de l'ADN. L'ADN se dénature, s'hybride, s'allonge et se rénature à des températures spécifiques déjà connues. Au cours de l'hybridation, un autre brin se forme à l'aide de l'enzyme polymérase qui synthétise la chaîne nucléotidique à partir des bases ajoutées dans le milieu en copiant le brin initial. Cette polymérisation doit être initiée par un couple de petites séquences appelées amorces, flanquées sur les extrémités 3' et 5' du brin de départ. L'appareil PCR est conçu pour amplifier l'ADN à partir de l'ADNc au cours de cycles de températures de dénaturation-hybridation-élongation.

La RT permet d'avoir l'ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc sera ensuite amplifié pour avoir l'ADN qui sera séquencé. Le quatrième cadre de lecture (ORF4) - qui code pour l'enveloppe protéique - a été amplifié par RT-PCR soit avec le couple d'amorces (A1, B1)

(Brugidou et al, 1995) soit avec le couple d'amorces (A2, B2) (Pinel et al., 2000). Quelques isolats pouvaient être amplifiés par l'amorce sens A1(nt 4428-4450) mais la plupart ne pouvaient pas l'être et devaient être amplifiés par l'amorce sens A2(nt 4300-4321) qui est plus spécifique des isolats malgaches, les deux associées avec l'amorce antisens B1(nt 3442-3457). Les isolats SBV2 et SBV6 se sont avérés récalcitrants à l'amplification avec les amorces (A1, B1) et (A2, B1). On a réalisé alors une RT-PCR ciblant la zone 2136-3577 (ORF2) avec les amorces correspondantes. Les séquences des amorces utilisées dans ce travail sont présentées en Annexe 2.

La RT consiste en une dénaturation de 7,5 µl d'ARN total pendant 10 min à 65°C dans l'appareil PCR. L'ARN dénaturé a ensuite été mélangé pour un volume final de 20 µl, avec 2 µl de DTT (Invitrogen) 100 mM, 0,5 µl de Rnase inhibitor (Invitrogen) 20 U/µl, 4 µl de tampon RT 5X, 4 µl de dNTPs 2,5 mM, 1 µl d'amorce antisens concernée 100 µM et 1 µl de transcriptase inverse M-MLV-RT (Invitrogen) 200 U/µl. Le mélange a ensuite été incubé pendant 60 min à 37°C dans l'appareil PCR. On a obtenu alors l'ADN complémentaire (ADNc) qui a été conservé à -20°C ou amplifié directement par PCR.

La PCR consiste en l'amplification de l'ADNc (2,5 µl) en présence de 5 µl de tampon PCR 10X, 4 µl de dNTPs 2,5 mM, 3 µl d'amorce sens et 1 µl d'amorce anti-sens, tous les deux à 100 pmole/µl et de 1 µl de polymérase (dynazyme ou Taq polymérase) 25 U/µl, le tout ajusté au volume de 50 µl avec de l'eau distillée stérile. Le mélange a subi le programme suivant :

Dénaturation :	5 mn à 94°C
30 cycles de :	dénaturation 1 mn à 94°C
	hybridation 1 mn à 55°C
	élongation 1 mn à 72°C
élongation finale :	10 mn à 72°C
puis arrêt de réaction :	15°C

L'amplification a été vérifiée sur un gel d'agarose 1% dans du TAE 0,5X sur lequel on a déposé 10 µl d'ADN mélangé avec 2 µl de bleu de charge. Dix microlitres de marqueur de poids moléculaire d'ADN ladder (1 Kb de Invitrogen) ont été déposés pour vérifier la taille du produit. Après une migration de 30 mn à 100V, les bandes ont été visualisées sous les rayons UV, la taille attendue étant de 1008 pb.

Les ADNs sous forme de produits PCR ont été séquencés directement lorsqu'ils se sont avérés 'propres'. En présence de bandes parasites, on a procédé à l'extraction préalable d'ADN à partir de la bande du gel avec le kit QIAquick gel extraction de Qiagen.

L'ADN obtenu a été soit conservé à 4°C, soit envoyé pour séquençage directement ou après purification selon sa qualité.

1.2.6.2 Séquençage du gène de la protéine de capsid

Le séquençage a été mené avec le kit Taq terminator et analysé sur un séquenceur Applied Biosystems 373 A.

1.2.6.3 Analyse des séquences

Les séquences ont été assemblées puis corrigées à l'aide du logiciel Seqman (DNASTAR). Elles ont ensuite été alignées par Clustal W. Un arbre phylogénétique a été reconstruit à partir de ces séquences, enraciné avec l'isolat tanzanien Tz5 par la méthode des distances à l'aide du programme PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony).

1.2.7 Phylogéographie de RYMV à Madagascar

Nous rechercherons s'il existe une structuration spatiale de la diversité du RYMV à Madagascar. Aussi, nous testerons s'il existe une relation significative entre la distance génétique et la distance géographique des isolats pris deux à deux. Les matrices de distances génétiques entre les isolats ont été calculées par le logiciel Megalign (DNASTAR) à partir des séquences du gène de la protéine de capsid. Elles correspondent aux taux de divergence (%) calculés par comparaison deux à deux des séquences à partir de l'arbre phylogénétique reconstruit après l'alignement multiple (cf Annexe 3). Les distances géographiques entre les lieux de prospection des isolats ont été calculées à partir d'une carte physique de Madagascar à une échelle de 1/1.640.000. Les distances génétiques ont été portées sur un graphe en fonction des distances géographiques.

1.2.8 Caractérisation du génome entier

1.2.8.1 RT-PCR des ORFs du génome entier

L'isolat Mg16 (provenant de l'échantillon MRV17) de la région du Nord-ouest, a été sélectionné pour le séquençage du génome entier parce que c'était le plus basal sur l'arbre

phylogénétique basé sur le gène de la protéine de capsid (ORF4). Quatre RT-PCR ont été réalisés pour amplifier les 4 fragments du génome comme décrit par Fargette et al (2004). Les couples d'amorces utilisées sont A_S-A_{AS}, B_S-B_{AS}, C_S-C_{AS} et A1-B1 dont les séquences sont détaillées (cf Annexe 2). Ces quatre couples d'amorce permettent de couvrir l'ensemble du génome. Nous avons mené des RT-PCR avec les trois premiers couples d'amorces et utilisé la séquence de l'ORF4 séquencée antérieurement (cf paragraphe 2.4 et 2.5). Les RT A_S-A_{AS}, B_S-B_{AS} et C_S-C_{AS} ont un protocole commun consistant à dénaturer 7,5 µl d'ARN total additionné de 3,5 µl d'eau et de 1 µl d'amorce antisens correspondant à 100 µM puis à incuber le mélange à 90°C pendant 10 mn puis à 4°C. La reverse transcription proprement dite a consisté à ajouter le tampon RT 5X avec le DTT 0,1M, les DNTPs 10µM et l'enzyme Superscript II 200 U/µl pour un volume final de 20 µl. Le programme du Superscript de la réverse transcription a été comme suit :

10 mn à la température ambiante
 50 mn à 42°C
 5 mn à 50°C
 5 mn à 90°C
 arrêt de la réaction et stockage à 15°C

Les RT B_S-B_{AS} et C_S-C_{AS} qui correspondent à des fragments plus longs ont une étape supplémentaire qui est la destruction de l'ARN après l'étape de réverse transcriptase. Pour cela, 1 µl de RNase H à 2 U/µl a été ajouté dans les tubes RT et les mélanges ont été incubés pendant 30 mn à 37°C.

Le pool PCR a été à peu près identique à celui utilisé pour amplifier ORF4 sauf la concentration de l'amorce sens qui est triple de celle de l'amorce antisens. Par contre, les programmes des trois PCR sont spécifiques à chacun.

A _S -A _{AS}	B _S -B _{AS}	C _S -C _{AS}
3 mn à 94°C	3 mn à 94°C	3 mn à 94°C
<u>30 cycles :</u>		
30 sec à 94°C	30 sec à 94°C	30 sec à 94°C
20 sec à 55°C	30 sec à 58°C	30 sec à 55°C
1 mn à 72°C	1 mn10sec à 72°C	1 mn20sec à 72°C
<u>élongation finale :</u>		
10 mn à 72°C	10 mn à 72°C	10 mn à 72°C
<u>arrêt :</u> 15°C	15°C	15°C

1.2.8.2 Séquençage et analyse des séquences du génome entier

Le séquençage du génome entier a été fait en utilisant non seulement les amorces des RT-PCR, mais aussi des amorces internes. Les séquences nucléotidiques de l'isolat Mg16 (MRV17) ont été corrigées par Seqman et assemblées avec les isolats malgaches Mg1 et Mg2 et 17 isolats africains séquencés avant cette étude par Megalign utilisant l'algorithme CLUSTAL W. Les relations phylogénétiques ont été analysées par le programme PAUP écrit par Swofford (1993) avec la méthode des distances et le modèle d'évaluation Kimura-2-1985. La robustesse des nœuds a été estimée par bootstrap. Le pourcentage de soutien à chaque nœud obtenu après 1000 échantillonnages est indiqué.

1.2.9 RT-PCR de l'ARN satellite

Dix-sept isolats ont subi l'amplification d'ARN satellite suivant le protocole décrit par Pinel et al (2003). Après dénaturation de 7,5 µl d'ARN total pendant 10 mn à 65°C, la transcription reverse a été réalisée dans du tampon RT contenant 5 µM d'amorce antisens (nt 197-217), 10 U/µl de l'enzyme M-MLV-RT, 5 mM DTT (Invitrogen), 0,5 U/µl RNase inhibitor, 0,5 mM dNTPs. Une PCR a été poursuivie avec l'ADNc dans du tampon contenant 0,6µM d'amorce sens (nt 9-28), 0,2 µM d'amorce antisens, 25 U/µl de polymérase Dynazyme, 2 mM de dNTPs et le tout ajusté au volume final de 50 µl. Le mélange a subi le programme PCR suivant :

Dénaturation :	5 mn à 94°C
30 cycles :	Dénaturation 1 mn à 94°C
	Hybridation 1 mn à 65°C
	Elongation 1 mn à 72°C
Elongation finale :	10 mn à 72°C
Stockage à 15°C	

L'amplification a été vérifiée par migration sur agarose 2% et visualisée sous rayon UV. Le produit attendu est de 220 bp.

1.2.10 Etude de la diversité du RYMV à Madagascar par analyse de la distribution des distances génétiques des couples d'isolats (pairwise distances)

Basée sur les séquences nucléotidiques de l'ORF4 de 25 isolats, l'analyse de la distribution des distances génétiques des isolats pris deux à deux "pairwise nucleotide

différence" calculée d'après le pourcentage de divergence nucléotidique de leurs ORFs a été entreprise. Cette analyse permet de tester des scénarios d'expansion de la population virale à Madagascar (expansion soudaine, exponentielle, alternance d'expansions et de retractions, ...). Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel DnaSP.

1.3 RESULTATS

1.3.1 Distribution et écologie du RYMV à Madagascar

Le RYMV est toujours présent dans les régions du nord, du nord-ouest et de Morondava de Madagascar comme cela a été observé dix ans auparavant (Reckhaus, 1994) avec une incidence allant de 60 à 80% (Figure 9). Aucune des régions reconnues comme infectées auparavant n'est redevenue indemne ni diminuer en incidence. Conformément à leur observation, le RYMV est absent des Hauts-plateaux (provinces d'Antananarivo et de Fianarantsoa) circonscrit par Maevatanana au nord, Miandrivazo à l'ouest, Kianjavato au sud-est et Ambatondrazaka à l'est. Des échantillons soupçonnés comme infectés ont été collectés sur l'axe Maevatanana-Antananarivo, à Antsirabe et à Ranomafana mais ils se sont tous avérés négatifs par les tests ELISA. Ces résultats confirment que le RYMV n'a pas envahi l'ensemble des régions rizicoles de Madagascar et il est présent dans les zones côtières uniquement. Aucune extension géographique ni augmentation d'incidence n'ont été remarquées dans le Moyen Est du pays où l'incidence du RYMV est restée stationnaire aux environs de 20%.

En revanche, une extension spatiale et une augmentation de degré d'incidence du RYMV ont été observées dans d'autres régions. Ainsi, dans le Sud-Ouest du pays, le RYMV s'est propagé de Morondava déjà infectée en 1994, à la plaine rizicole de Samangoky (Morombe) en 2004 pour atteindre une incidence de 60 à 80%. De même, dans le Sud-Est du pays, la maladie s'est étendue de Mananjary à Farafangana et est même soupçonnée s'être dispersée, dans les étroites plaines rizicoles longeant les côtes de l'extrême sud de Madagascar qui présentent toutes les conditions favorables à la dissémination de la maladie (présence de *D. gestroi*, continuité de la riziculture avec les régions infectées prospectées). Une augmentation du degré d'incidence a été aussi observée dans la région du nord est du pays. En 1994, la région de Sambava était faiblement infectée alors qu'en 2004 elle est devenue un foyer de RYMV avec une incidence similaire aux régions nord-ouest et sud-ouest infectées. D'autres régions, telles que la zone ouest entre la région de Marovoay et de Morondava, la zone entre la région du nord-est et du Lac Alaotra, sont soupçonnées d'être infectées mais ces régions sont peu explorées à cause de leur enclavement. Des infections sporadiques peuvent apparaître partiellement comme à Ranohira

Toliara. Un échantillon de feuille s'est avéré infecté avant l'étude. Mais ces infections ne persistent pas à cause de la discontinuité des rizières dans ce milieu semi-désertique. En effet, la transmission du virus d'une saison à l'autre ou d'un champ à l'autre n'est pas possible faute de réservoir de virus.

1.3.1.1 Relation entre la température et la distribution du RYMV

Il existe un lien marqué entre les faibles températures et les limites d'extension du RYMV. La comparaison de la carte de distribution des températures moyennes enregistrées sur 30 années (<http://www.weatherbase.com/weather/weather.php>) à Madagascar et la carte de distribution du RYMV montre que (Figure 10) :

- les régions non infectées correspondent aux zones de température $< 20^{\circ}\text{C}$
- les régions à faibles attaques (incidence = 20%) correspondent aux zones de températures comprises entre 20 et 25°C
- les régions très infectées (incidence $\geq 60\%$) correspondent aux zones de température $\geq 25^{\circ}\text{C}$

Ces observations suggèrent qu'un seuil de 20°C est critique pour l'extension spatiale de la maladie. Ce seuil correspond soit à une altitude de 1250 m sur les Hauts-plateaux soit à une période allant de juin à septembre sur les côtes. Au-dessus de 20°C , la maladie était présente et sa fréquence peut atteindre jusqu'à 80%. A cette température, la fréquence du RYMV est faible. En dessous de cette température, la maladie était absente. Sur les hauts plateaux, provinces d'Antananarivo et de Fianarantsoa où le RYMV est totalement absent, la température annuelle moyenne varie de 12 à 19°C et la moyenne mensuelle a fluctué entre 15°C et 21°C toute l'année. Les régions de moyenne altitude, comme Ambatondrazaka et Miandrivazo, étaient près du seuil de 20°C . Dans les régions côtières où la double culture est pratiquée, comme le cas de Marovoay et de Sambava, l'incidence de la maladie est faible en contre-saison (10% et 40%, respectivement) alors que la température descend à 20°C voire en-dessous. Toutefois, la durée des faibles températures rentre aussi en ligne de compte. Une comparaison avec les régions africaines infectées par le RYMV comme la Tanzanie, l'Ouganda et le Kenya le suggère. Dans ces pays, les températures moyennes annuelles varient de 20°C à 24°C et les températures nocturnes de 15°C , équivalentes à celles de Hauts-plateaux malgaches. Cependant, ces températures sont plus courtes et varient quotidiennement (<http://www.weatherbase.com/weather/weather.php>). En outre, la faible température nocturne qui ne dure que 12 h est compensée le lendemain par une température élevée de 12 h. Pour le cas de la plaine de Marovoay où une faible température règne pendant toute la saison de culture, soit six mois environ, le RYMV n'est présent que sporadiquement.

1.3.1.2 Non influence des plantes hôtes sur la distribution du RYMV

Le confinement du RYMV aux régions côtières et sa limite d'extension aux Hauts- plateaux de Madagascar semblent ne pas être dus à la culture de variétés de sensibilité ou de résistance différentes d'une région à l'autre. En effet, les variétés les plus cultivées des régions côtières infectées et des Hauts- plateaux indemnes ont été testées avec le RYMV. La plupart d'entre elles étaient sensibles, peu ont montré une résistance partielle ou une tolérance. La seule variété qui ait exprimé une résistance élevée provient de la région épidémique dans le nord de Madagascar (voir travail sur la résistance). D'autres hôtes sensibles à la panachure jaune du riz tels que le riz sauvage *O. longistaminata* et quelques genres des graminées tels que *Eragrostis*, *Echinochloa crus-galli*, *Eulésine indica*, et *Panicum maximum* (Reckhaus and Masajo, 1996), poussent dans toutes les régions de Madagascar. Ils auraient pu servir de réservoir d'inoculum et auraient permis le passage du RYMV dans les Hauts-plateaux. Ces constats renforcent la non influence de l'hôte sur la transmission du RYMV dans les régions indemnes.

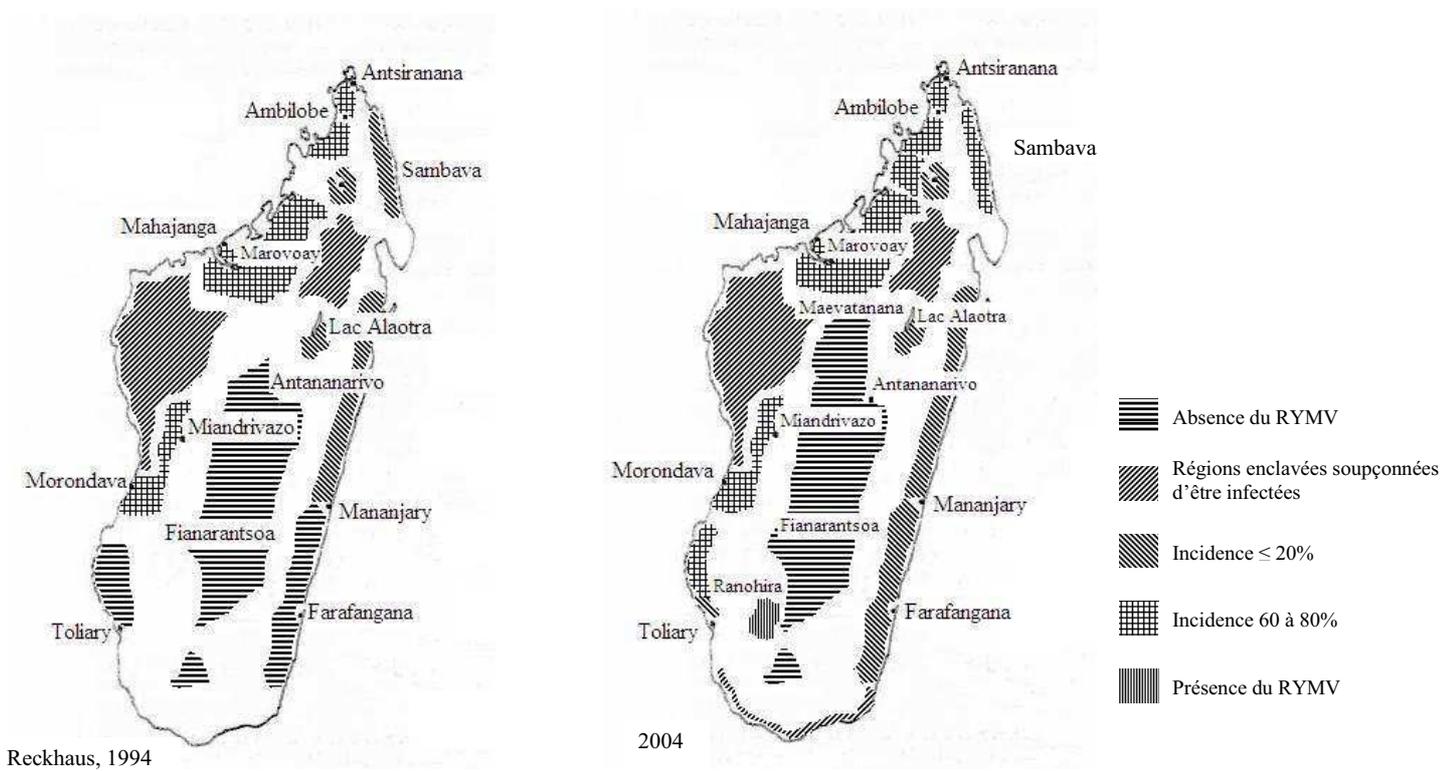


Figure 9. Evolution de la distribution du « *Rice yellow mottle virus* » entre 1994 et 2004

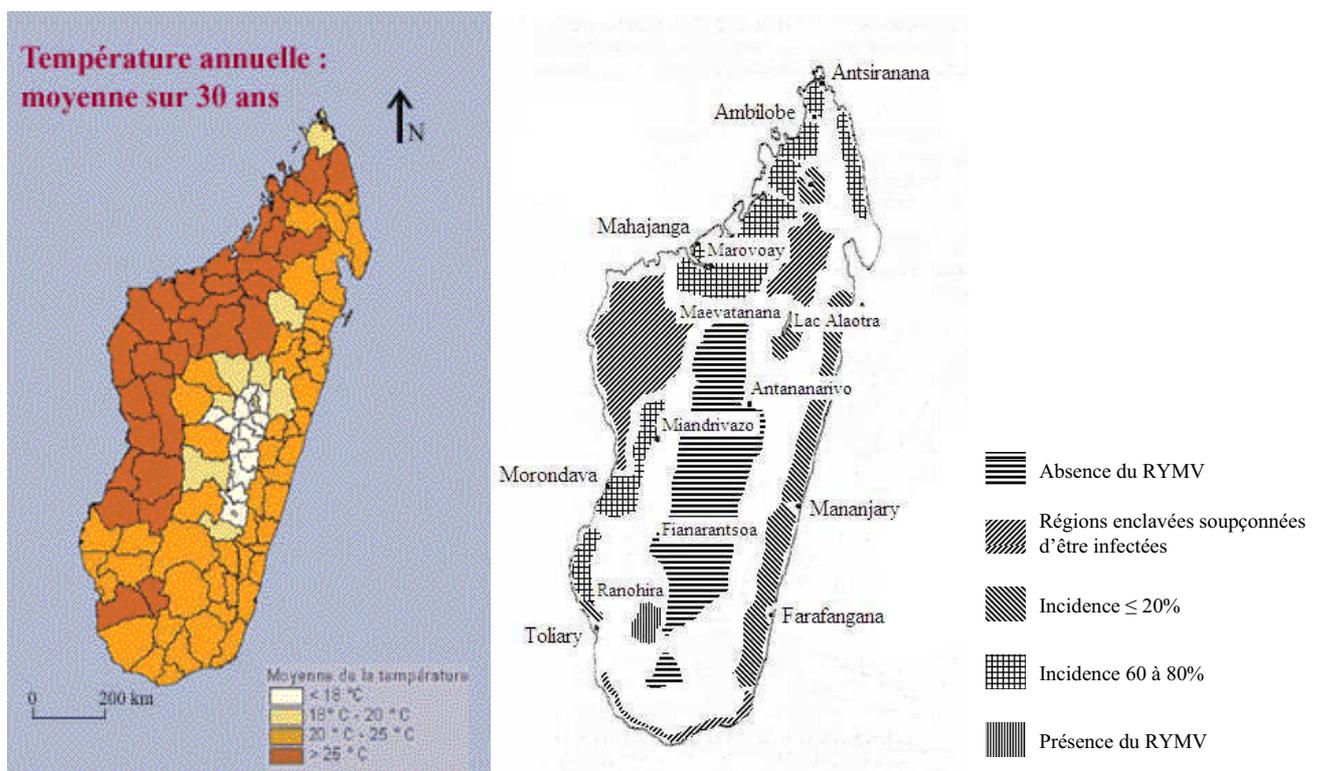


Figure 10. Influence de la température sur la distribution du « Rice yellow mottle virus » à Madagascar

1.3.2 Diversité sérologique du RYMV à Madagascar

Soixante-quatre isolats provenant des différentes régions agro-écologiques infectées par la panachure avec une charge virale élevée estimée en DAS-ELISA ont été sélectionnés pour un typage sérologique avec les anticorps monoclonaux discriminants.

En dépit de l'exceptionnelle diversité géographique, climatique et biologique de Madagascar (cf Introduction), les profils sérologiques de la grande majorité des isolats sont proches. Ils ont un profil sérologique Ser4 c'est-à-dire qu'ils sont reconnus par les 5 Mabs (Tableau 2). Cependant, quelques variantes ont été observées au cours de cette étude. Par exemple, les réactions avec les MAb D et MAb E rapprochent les profils sérologiques des isolats Mg12 et Mg14 des sérotypes Ser1 et Ser5, respectivement. Aussi, ces isolats ont été inclus pour le typage moléculaire pour la présence d'éventuels variants.

1.3.3 Homogénéité moléculaire des isolats malgaches

Les isolats malgaches, même les variants sérologiques, sont étroitement apparentés (Tableau 3). Des isolats distants de 50 à 1000 km ont des identités moléculaires de 97,5 à 100%.

La proximité moléculaire des isolats malgaches est apparente aussi avec l'arbre phylogénétique reconstruit à partir des séquences de protéine de la capsid (Figure 11). La distance génétique avec l'isolat Tanzanien utilisé comme groupe externe est élevée.

La topologie de l'arbre présente des particularités qui donnent des indications sur l'orientation vraisemblable de l'épidémie. Les branchements successifs des nœuds les plus internes aux nœuds les plus externes suggèrent une dispersion de l'ouest vers le nord-est, puis le moyen-est, et enfin le sud-est du pays. La différenciation tardive des isolats du sud-est est particulièrement claire. Quelques exceptions, tels que les isolats Mg10, Mg11 et Mg29, suggérant des événements récents de dispersion.

Cependant, la plupart des supports de branche (bootstrap) de l'arbre ne sont pas significatifs, ce qui a amené à considérer la distribution de ces groupes phylogénétiques par rapport à leur origine géographique et voir s'il y a une relation entre les distances génétiques et les distances géographiques.

Tableau 2. Absorbance et profil sérologique des isolats malgaches avec un antiserum polyclonal antiRYMV-Mg et 5 anticorps monoclonaux (MAbs) discriminants contre le «*Rice yellow mottle virus*» et comparés avec les sérotypes africains

Isolat	Identifiant	Origine	DO _{405nm} polyclonal	MAbs				
				A	D	E	G	M
<u>Sélectionnés:</u>								
MRV8	Mg10	NW	3,8	4	4	4	4	4
MRV20	Mg11	NW	4,0	4	4	4	4	4
MRV21	Mg12	NW	4,2	4	0	4	4	4
SBV11	Mg13	NE	4,1	4	4	4	4	4
SBV14	Mg14	NE	3,8	4	4	0	4	4
SBV17	Mg15	NE	3,9	4	4	4	4	4
MRV17	Mg16	NW	3,3	4	4	4	4	4
SBV19	Mg17	NE	5,3	4	4	4	4	4
SBV23	Mg18	NE	4,6	4	4	4	4	4
SO2	Mg19	SO	1,2	4	0	0	0	4
SO7	Mg20	SO	1,1	4	3	3	4	4
CALA2	Mg21	ME	1,2	4	4	3	4	4
CALA9	Mg22	ME	1,2	3	0	1	0	0
MNJ4	Mg23	SE	0,8	4	4	3	3	4
MNJ7	Mg24	SE	1,0	4	2	2	2	4
KJV1	Mg25	SE	1,0	4	2	0	0	4
KJV2	Mg26	SE	0,9	4	4	2	4	4
SO3	Mg27	SO	1,1	4	4	2	4	4
SO4	Mg28	SO	1,1	4	4	3	4	4
SO6	Mg29	SO	1,1	4	1	0	1	4
CALA3	Mg30	ME	1,1	4	4	3	4	4
CALA5	Mg31	ME	1,0	4	4	3	4	4
MNJ1	Mg32	SE	0,9	4	4	2	2	4
MNJ3	Mg33	SE	0,8	4	2	2	2	4
MNJ6	Mg34	SE	0,8	4	2	2	2	2
<u>Testés:</u>								
MRV2		NO	1,2	4	4	4	4	4
MRV3		NO	4,0	4	4	4	4	4
MRV7		NO	4,4	4	2	3	3	4
MRV9		NO	3,9	4	4	4	4	4
MRV10		NO	4,7	4	4	4	4	4
MRV11		NO	4,2	4	4	4	4	4
MRV12		NO	4,0	4	4	4	4	4
MRV14		NO	3,9	4	4	4	4	4
MRV15		NO	4,3	4	4	4	4	4
MRV16		NO	4,2	4	4	4	4	4
MRV18		NO	4,2	4	3	4	3	4
MRV19		NO	2,6	3	3	4	2	4
MRV23		NO	4,0	4	4	4	4	4
MRV25		NO	3,9	4	4	4	4	4
MRV26		NO	3,9	4	4	4	4	4
SO1		SO	1,2	4	0	0	0	4
SO5		SO	0,7	4	0	1	0	4
SO8		SO	0,6	4	1	0	0	4
SBV1		NE	4,3	4	3	3	3	4
SBV2		NE	4,6	4	2	2	2	4
SBV4		NE	4,3	4	4	3	3	4
SBV5		NE	3,9	4	4	4	4	4
SBV7		NE	5,9	4	4	4	4	4
SBV8		NE	3,9	4	4	4	4	4
SBV13		NE	3,8	4	2	4	2	4
SBV15		NE	3,3	4	4	4	4	4
SBV18		NE	4,1	4	4	4	4	4
SBV20		NE	1,1	4	4	4	4	4
SBV21		NE	1,0	4	4	4	4	4
SBV22		NE	1,0	3	4	4	4	4
CALA1		ME	1,1	4	4	4	4	4
CALA4		ME	1,1	4	4	4	4	4
CALA6		ME	1,0	4	4	4	4	4
CALA7		ME	1,0	4	4	4	4	4
CALA8		ME	1,0	4	4	2	4	4
KJV3		SE	0,9	4	4	3	4	4
MNJ5		SE	0,8	4	3	2	3	4
MNJ8		SE	1,1	4	2	1	2	4
MNJ9		SE	1,1	4	4	4	4	4
<u>Sérotypes témoins:</u>								
CI1 (Ser1)		Côte d'Ivoire		4	0	4	4	4
CI63 (Ser2)		Côte d'Ivoire		0	4	4	4	4
SL11 (Ser3)		Sierra Leone		3	4	4	0	4
Mg1 (Ser4)		Madagascar		4	4	4	4	4
Tz3 (Ser5)		Tanzanie		4	4	0	4	4

ode des absorbances à 405nm: 0 ≤ 0,30 ; 0,31 ≤ 1 ≤ 0,60 ; 0,61 ≤ 2 ≤ 1,20 ; 1,21 ≤ 3 ≤ 1,80 ; 1,81 ≤ 4 ; A, D, E, G, M : MAbs utilisés pour le typage

Tableau 3. Distances génétiques deux à deux des isolats malgaches calculés par le logiciel CLUSTAL W

Isolat	KJV2	KJV1	MNJ4	MNJ7	MRV20	MRV21	MRV8	SBV11	SBV14	SBV17	SO2	SO7	CALA2	CALA9	SBV23	SBV19	MRV17	SO6	MNJ6	MNJ1	CALA5	MG2	MG1	MG3	
KJV2	***	99.9	98.6	98.9	98.3	97.9	98.2	98.5	98.6	98.5	97.8	97.9	98.5	98.3	97.6	98.5	97.6	98.3	98.9	98.8	98.6	97.5	98.8	98.5	KJV2
KJV1	0.1	***	98.8	99.0	98.5	98.1	98.3	98.6	98.8	98.6	97.9	98.1	98.6	98.5	97.8	98.6	97.8	98.5	99.0	98.9	98.8	97.6	98.9	98.6	KJV1
MNJ4	1.4	1.3	***	99.2	98.6	98.2	98.2	98.8	98.9	98.8	98.3	98.2	98.8	98.6	97.9	98.8	98.5	98.6	98.6	99.9	98.9	97.8	99.0	98.8	MNJ4
MNJ7	1.1	1.0	0.8	***	98.9	98.5	98.8	99.3	99.2	99.3	98.6	98.5	99.0	98.9	98.5	99.0	98.2	98.9	99.2	99.3	99.2	98.3	99.3	99.0	MNJ7
MRV20	1.7	1.6	1.4	1.1	***	98.8	98.5	99.0	99.4	99.0	98.6	98.8	98.8	98.3	98.2	99.0	98.5	98.9	98.5	98.8	98.9	97.8	98.8	98.8	MRV20
MRV21	2.1	2.0	1.8	1.6	1.3	***	98.3	98.9	99.3	98.9	98.8	98.6	98.6	97.9	98.3	98.6	98.6	98.2	98.1	98.3	98.8	97.8	98.3	98.6	MRV21
MRV8	1.8	1.7	1.8	1.3	1.5	1.7	***	98.6	99.0	98.6	98.5	98.3	98.6	97.9	97.8	98.3	98.1	97.9	97.9	98.3	98.5	97.6	98.3	98.6	MRV8
SBV11	1.6	1.4	1.3	0.7	1.0	1.1	1.4	***	99.6	100.0	98.8	98.9	99.2	98.5	98.9	99.2	98.6	98.8	98.9	98.9	98.8	98.5	98.9	99.2	SBV11
SBV14	1.4	1.3	1.1	0.8	0.6	0.7	1.0	0.4	***	99.6	99.2	99.3	99.3	98.6	98.8	99.3	99.0	98.9	98.8	99.0	99.2	98.3	99.0	99.3	SBV14
SBV17	1.6	1.4	1.3	0.7	1.0	1.1	1.4	0.0	0.4	***	98.8	98.9	99.2	98.5	98.9	99.2	98.6	98.8	98.9	98.9	98.8	98.5	98.9	99.2	SBV17
SO2	2.3	2.1	1.7	1.4	1.4	1.3	1.5	1.3	0.8	1.3	***	98.5	98.5	97.8	97.9	98.5	98.8	98.1	97.9	98.5	98.3	97.5	98.2	98.5	SO2
SO7	2.1	2.0	1.8	1.5	1.3	1.4	1.7	1.1	0.7	1.1	1.5	***	98.6	98.5	98.1	98.6	98.5	98.2	98.1	98.3	98.5	97.6	98.6	98.6	SO7
CALA2	1.6	1.4	1.3	1.0	1.3	1.4	1.4	0.8	0.7	0.8	1.5	1.4	***	98.5	98.3	99.0	98.3	98.5	98.5	98.9	98.8	98.1	98.9	99.2	CALA2
CALA9	1.7	1.6	1.4	1.1	1.7	2.1	2.1	1.6	1.4	1.6	2.3	1.5	1.6	***	97.9	98.5	97.6	98.6	98.3	98.8	99.2	97.5	99.6	98.5	CALA9
SBV23	2.4	2.3	2.1	1.6	1.8	1.7	2.3	1.1	1.3	1.1	2.1	2.0	1.7	2.1	***	98.3	97.8	98.2	98.1	98.1	98.2	97.8	98.3	98.3	SBV23
SBV19	1.4	1.3	1.1	0.8	0.8	1.3	1.6	0.7	0.6	0.7	1.4	1.3	0.8	1.4	1.6	***	98.3	98.8	98.6	98.9	98.8	97.9	98.9	98.9	SBV19
MRV17	2.4	2.3	1.6	1.8	1.6	1.4	2.0	1.4	1.0	1.4	1.3	1.5	1.7	2.4	2.3	1.6	***	97.9	97.8	98.3	98.5	97.4	98.1	98.3	MRV17
SO6	1.7	1.6	1.4	1.1	1.1	1.8	2.1	1.3	1.1	1.3	2.0	1.8	1.6	1.4	1.8	1.1	2.1	***	98.5	98.8	98.9	97.5	99.0	98.5	SO6
MNJ6	1.1	1.0	1.4	0.8	1.5	2.0	2.1	1.1	1.3	1.1	2.1	2.0	1.5	1.7	2.0	1.3	2.3	1.5	***	98.8	98.6	97.8	98.8	98.5	MNJ6
MNJ1	1.3	1.1	0.1	0.7	1.3	1.7	1.7	1.1	1.0	1.1	1.5	1.7	1.1	1.3	2.0	1.0	1.7	1.3	1.3	***	99.0	97.9	99.2	98.9	MNJ1
CALA5	1.4	1.3	1.1	0.8	1.1	1.3	1.5	1.3	0.8	1.3	1.7	1.5	1.3	0.8	1.8	1.1	1.6	1.1	1.4	1.0	***	97.8	99.6	98.8	CALA5
MG2	2.6	2.4	2.3	1.7	2.3	2.3	2.4	1.5	1.7	1.5	2.6	2.4	1.8	2.6	2.3	2.0	2.7	2.6	2.3	2.1	2.3	***	97.9	98.2	MG2
MG1	1.3	1.1	1.0	0.7	1.3	1.7	1.7	1.1	1.0	1.1	1.8	1.4	1.1	0.4	1.7	1.0	2.0	1.0	1.3	0.8	0.4	2.1	***	98.9	MG1
MG3	1.6	1.4	1.3	1.0	1.3	1.4	1.4	0.8	0.7	0.8	1.5	1.4	0.8	1.6	1.7	1.0	1.7	1.6	1.5	1.1	1.3	1.8	1.1	***	MG3

% de similarité dans le triangle supérieur
 % de divergence dans le triangle inférieur

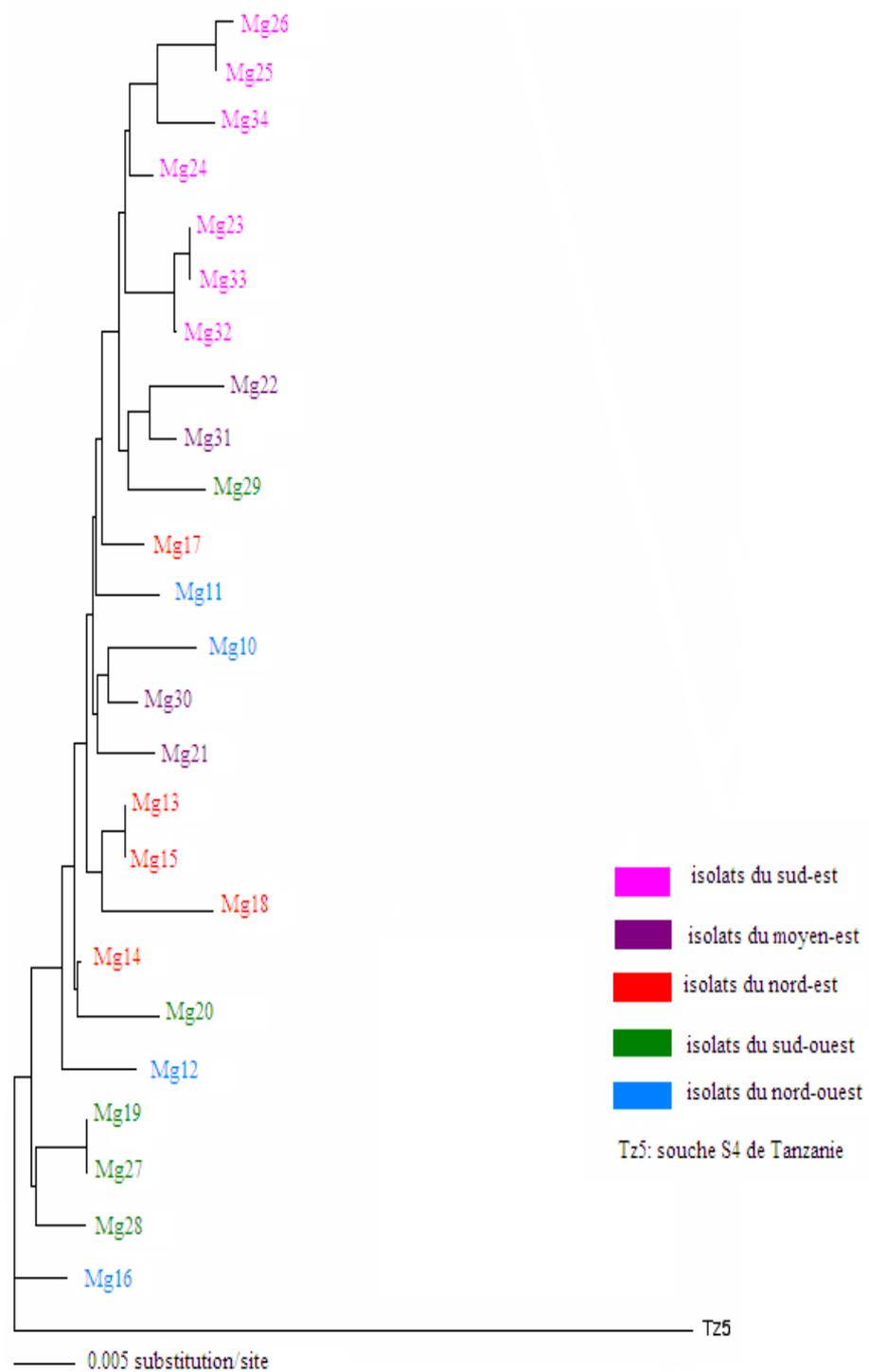


Figure 11. Arbre phylogénétique basé sur les séquences nucléotidiques du gène de la protéine de capsid de 25 isolats de RYMV venant de différentes régions infectées de Madagascar, par la méthode des distances, montrant une relation moléculaire très proche.

1.3.4 Structuration spatiale des isolats de la côte est de Madagascar

On distingue trois groupes d'isolats à base spatiale : le groupe d'isolats du Nord-est, le groupe du Moyen-est et celui du Sud-est. Les plus grandes distances génétiques ont été trouvées entre les isolats du Nord-est et ceux du Sud-est, donc entre les isolats les plus éloignés.

En considérant tous les isolats, la corrélation linéaire est significative avec une pente peu marquée et un coefficient de corrélation $r = 0,2$ ($P < 0,005$) (Figure 12a). En ne considérant que les isolats de la côte Est, le coefficient de corrélation $r = 0,4$ ($P < 0,034$) est plus fort et la pente plus forte (Figure 12b). Les distances génétiques ont été corrélées significativement aux distances géographiques.

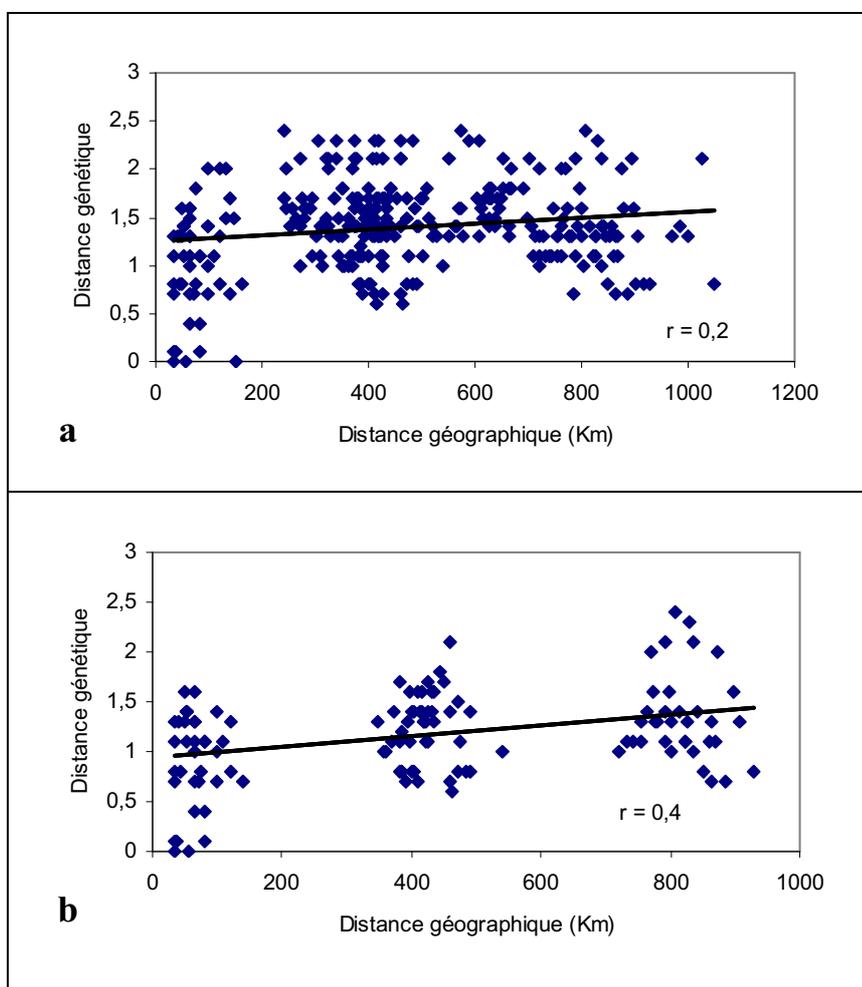


Figure 12. Régressions linéaires des distances géographiques (en km) et des distances génétiques (% de divergence en nucléotides) des isolats représentatifs des régions infectées par le « *Rice yellow mottle virus* » à Madagascar (a) et des isolats de la côte Est (b).

1.3.5 Population de RYMV à Madagascar en soudaine expansion

L'analyse par les pourcentages de différences génétiques (Pairwise genetic distances) basée sur les nucléotides du gène de la protéine de capsid de la population de 25 isolats de RYMV affiche une courbe de distribution unimodale qui s'accorde avec un modèle d'expansion soudaine de population (Figure 13). Les « épaulements » de la distribution des fréquences observées reflètent vraisemblablement la structuration spatiale de la diversité.

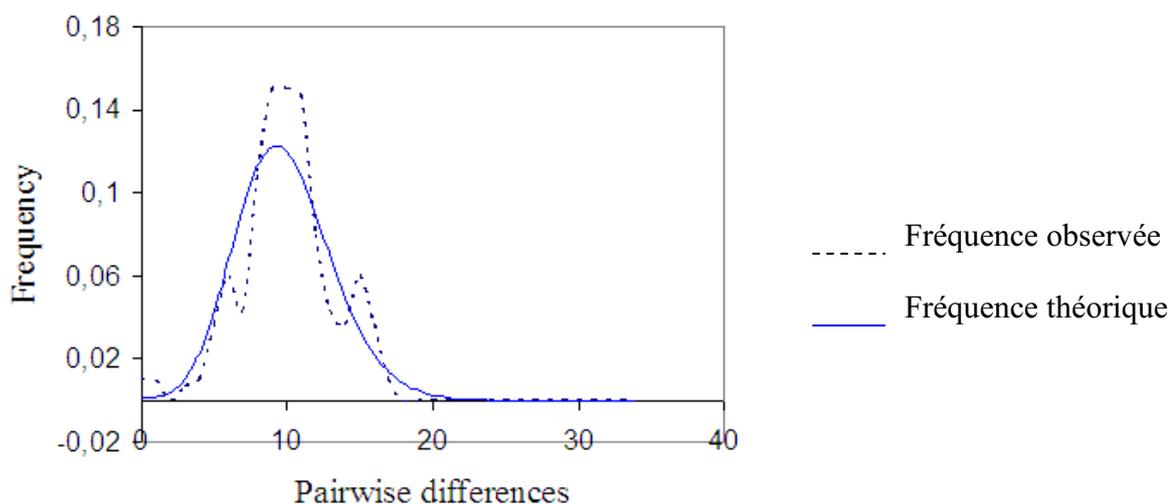


Figure 13. Modèle d'expansion soudaine s'accordant à la population de 25 isolats représentatifs des isolats malgaches par la méthode « pairwise genetic distances » basée sur les séquences du gène de la protéine de capsid.

1.3.6 Absence d'ARN satellite

Aucune amplification n'a été obtenue lors de la RT - PCR de l'ARN satellite sur les 17 isolats malgaches choisis comme représentatifs des régions prospectées alors que les témoins utilisés ont bien montré la bande de 220 bp attendue (Figure 14). Les isolats malgaches de RYMV ne comportent donc pas d'ARN satellite.

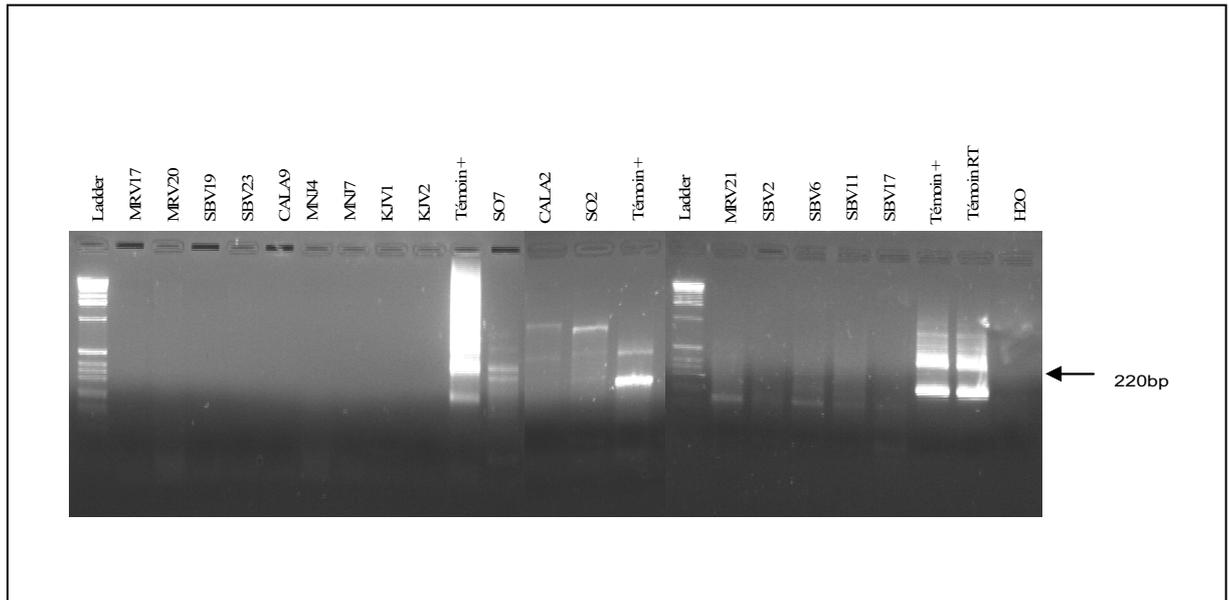


Figure 14. Absence d'amplification d'ARN satellite de 17 isolats de « *Rice yellow mottle virus* », représentatifs des régions rizicoles malgaches. La bande de 220bp attendue n'apparaissait que chez les témoins positifs (+) africains.

1.3.7 Relations phylogéniques des isolats malgaches avec les isolats africains

Les RT-PCR des quatre ORFs du génome entier de l'isolat Mg16 ont donné les produits de 1Kb pour l'ORF1, 1,5 Kb pour l'ORF2a, 1 Kb pour l'ORF2b et 1,5 Kb pour l'ORF4, conformément aux témoins (Figure 15). Ces fragments ont été séquencés pour déterminer la séquence entière de l'isolat Mg16. L'arbre phylogénique de souches de RYMV a été reconstruit à partir des séquences entières de 20 isolats, dont trois isolats malgaches.

Une étude préalable avec l'espèce apparentée Cocksfoot mottle virus avait montré que les isolats de Tanzanie étaient les plus apparentés. L'un d'entre eux, l'isolat Tz127 a alors été choisi comme « outgroup interne ».

Les trois isolats malgaches forment un groupe monophylétique, entre les isolats d'Afrique de l'est (Tanzanie), d'Afrique centrale et de l'ouest.

La distance génétique élevée de la souche malgache avec les autres souches d'Afrique de l'Est indique que la contamination de Madagascar ne provient pas de Tanzanie.

L'analyse phylogénique basée sur le génome entier de Mg1, Mg2 et Mg16 avec le corpus des isolats représentatifs des pays africains infectés par RYMV et des souches, a montré que les isolats de Tanzanie sont les plus basaux sur le phylogramme (Figure 16). Ceci signifie que la diversification des isolats de Tanzanie est la plus ancienne dans l'histoire évolutive du RYMV. Ensuite, un ancêtre commun s'est différencié pour engendrer les isolats malgaches, ceux de l'Afrique centrale et ceux de l'Afrique de l'ouest qui divergent à partir d'un même nœud sur l'arbre. Les isolats malgaches forment un groupe monophylétique c'est-à-dire qu'ils sont dérivés d'un même ancêtre et appartiennent à la souche S4. Leur ancêtre commun avait subi plusieurs substitutions à partir de l'ancêtre africain démontrées par la longue branche qui reflète aussi la diversification d'une souche intermédiaire qui est différente de celle du Lac Malawi et celle du Lac Victoria. Cette diversification est plus récente que celle des isolats de l'Afrique centrale et de l'ouest.

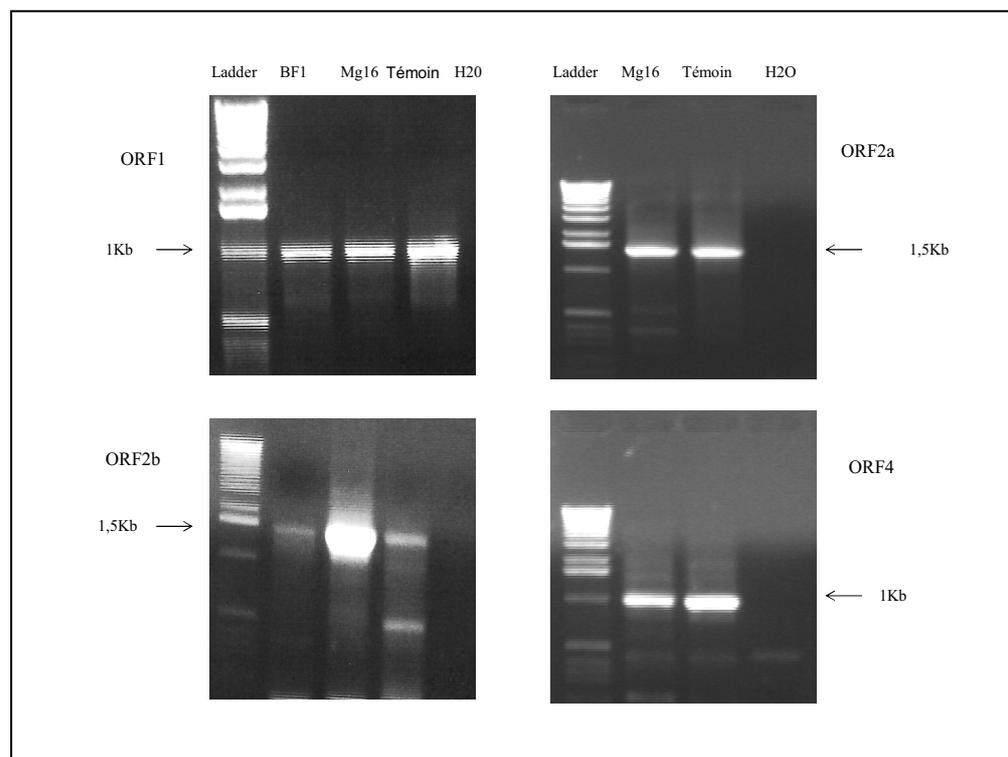
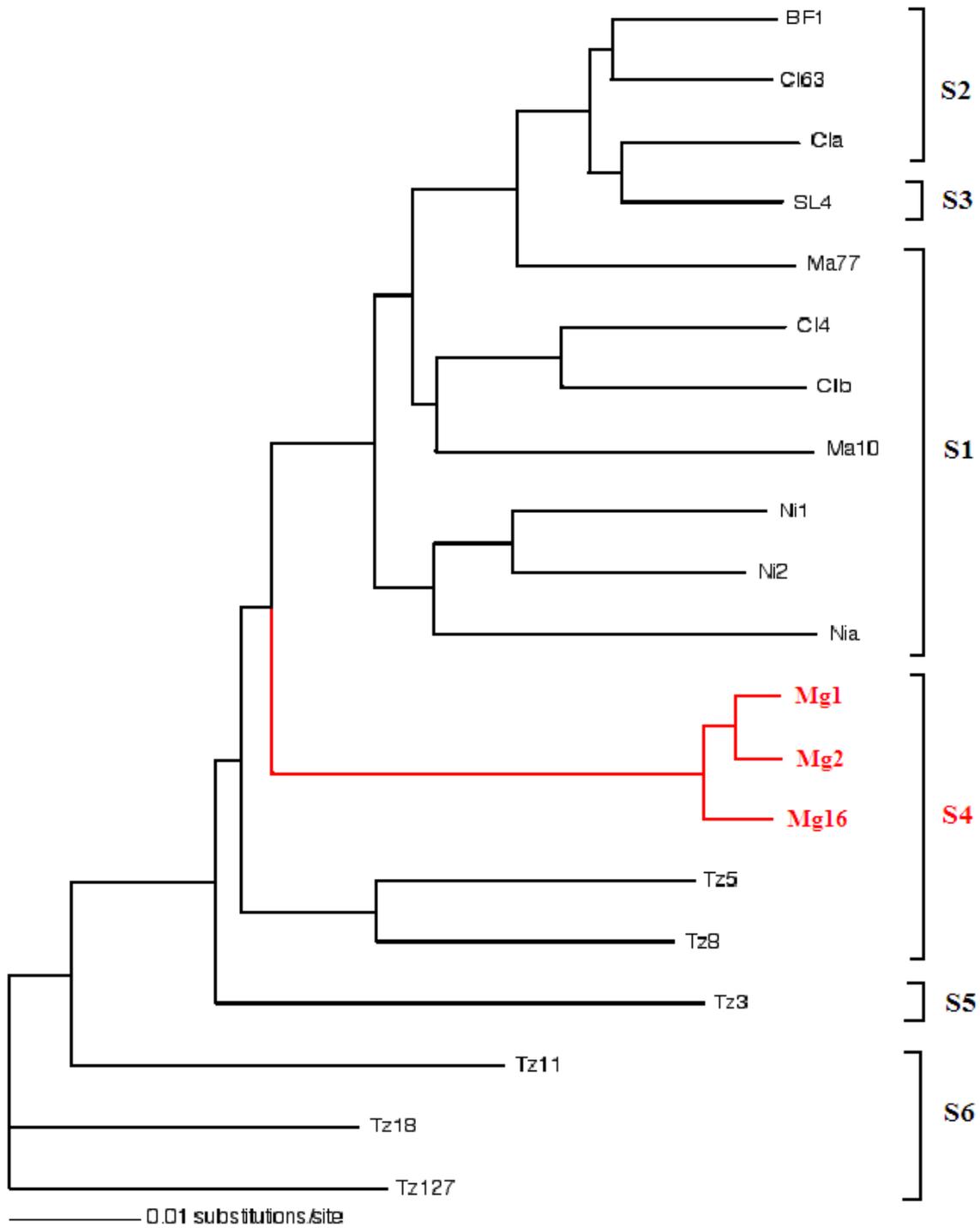


Figure 15. Amplification des ORFs couvrant le génome entier de l'isolat Mg16.



Mg : isolats de Madagascar
Tz : isolats de la Tanzanie
Ni : isolats du Nigeria
Ma : isolats du Mali

CI : isolats de la Côte d'Ivoire
SL : isolats du Sierra Léone
BF : isolats du Burkina Faso

Figure 16. Arbre phylogénétique construit à partir des séquences du génome entier de 20 isolats africains montrant la formation du groupe (cluster) des isolats malgaches, sa position et sa relation phylogénique avec les groupes des autres pays africains.

1.4 DISCUSSION

Les isolats malgaches du RYMV montrent un profil sérologique de type Ser4 correspondant à la souche S4. Une relation phylogénétique proche a été observée entre eux basée sur les séquences du gène de la protéine de capsid qui est un outil approprié pour un typage d'intraclade. Cette proche parenté d'isolats est démontrée par la faible divergence génétique des nucléotides de 2,4 % alors qu'elle est de 10,6 % en Tanzanie (Abubakar et al, 2003). La diversité élevée du RYMV dans l'île de Pemba coïncide avec sa proximité avec Tanzanie qui est distante de 30 km, pouvant résulter à plusieurs contaminations de RYMV. L'infection de Madagascar, distant de plus de 400 km de la côte africaine, avec une diversité plus faible, résulterait d'un nombre beaucoup plus limité de contamination. Alternativement, la situation de Madagascar pourrait résulter de plusieurs infections de la même souche. Quoiqu'il en soit, l'origine possible du RYMV à Madagascar est encore recherchée. La topologie de l'arbre phylogénétique suggère que le RYMV s'est diversifié initialement sur la Côte Ouest de Madagascar. La faible diversité nucléotidique du RYMV à Madagascar suggère une infection récente. L'inoculum source résulterait d'un goulot d'étranglement. Au cours de la transmission par vecteur, l'essentiel de la diversité n'a pas été transmis. Ce phénomène se produit typiquement lors de la dissémination d'un virus dans une île. C'est le cas du virus de la courgette *Zucchini yellow mosaic potyvirus* lorsqu'il a été introduit dans l'île de la Martinique (Desbiez C., 1996).

L'analyse des distances génétiques de couples d'isolats à partir des séquences de la protéine de capsid de la population d'isolats de RYMV malgaches a été menée. Une courbe de distribution qui s'ajuste à un modèle d'une population en expansion soudaine a été obtenue. Tel phénomène est fréquent après un goulot d'étranglement (Aboim, 2005). Les épidémies de la panachure à Madagascar consisteraient donc en des expansions soudaines d'une région à l'autre suite à des transmissions d'une petite population de RYMV par les insectes vecteurs.

Les isolats malgaches de cette étude ne portent pas d'ARN satellite. Les deux isolats malgaches étudiés auparavant ont au contraire été associés à un satellite (Pinel et al, 2003). Les satellites viraux avaient été mis en évidence dans des isolats multipliés plusieurs fois. Très facilement transmissibles, la présence de ces satellites provient probablement de contaminations. La phylogéographie a montré une corrélation entre les distances géographiques et les distances génétiques parmi les isolats de la côte Est. Cette corrélation n'est pas aussi flagrante que celle trouvée en Afrique de l'est (Abubakar et al, 2001) dû aux distances génétiques faibles mais elle a été significative. La population initiale de RYMV a été introduite dans la côte ouest de Madagascar dans un paysage rizicole particulièrement

favorable à la propagation : forte densité de rizières, double culture du riz, absence de barrière géographique et écologique. Le RYMV a pu alors se propager rapidement. La structuration spatiale suggère une progression de la population vers le nord, puis vers l'est. Du nord-est, elle a poursuivi sa propagation vers le sud-est du pays.

La direction de propagation est compatible avec la structure du relief de Madagascar où les côtes de l'est et de l'ouest du pays sont séparées par une chaîne de montagne qui au travers de l'île du nord au sud, joue un rôle de barrière entre les deux côtes. Quand le RYMV est arrivé sur la côte ouest, il s'est naturellement propagé vers le nord du pays avant d'envahir la côte est. La culture du riz est continue et la présence de Coléoptères vecteurs ont permis cette propagation. Au contraire, le RYMV ne pourrait pas se propager directement vers le sud du pays en raison de la rareté et de la discontinuité des rizières dans cette partie de l'île, sub-aride et souvent désertique, qui consiste en une barrière agro-écologique. Par ailleurs, les coléoptères vecteurs recensés à Madagascar ont une répartition géographique et temporelle. Alors que le *Dicladispa gestroi* domine pendant la saison pluvieuse et chaude dans les régions côtières, le *Trichispa sericea* est restreint aux hauts plateaux. Tous les deux entrent en « hibernation » pendant la contre-saison (Reckhaus and Andriamasintseheno, 1997; Delucchi, 2002). La transmission à longue distance par vecteurs ne peut se faire que pendant la saison de pluie, consistant alors en une barrière biologique.

Outre l'obstacle physique de représentation, la faible température qui règne dans les hauts plateaux peut empêcher la propagation du virus. Dans les sites où le RYMV était totalement absent, la température moyenne annuelle était inférieure à 20°C. La même situation apparaît dans les régions côtières en contre saison pendant laquelle la température est à ce seuil voire en dessous. L'incidence de la maladie chute alors plus de la moitié de celle en saison normale. Ce n'est donc pas tant l'altitude qui est le facteur limitant que les faibles températures qui lui sont associées. La durée de la période froide est importante aussi pour être un facteur limitant de la propagation. En Tanzanie, au Kenya et en Ouganda où le minimum de la température moyenne mensuelle était de 15°C et le maximum est de 29°C, des températures équivalentes à celles des Hauts plateaux malgaches, l'incidence de la maladie est élevée. Dans ces pays, la durée de la saison à faible température est limitée. D'autre part, les faibles températures nocturnes sont compensées par des températures diurnes élevées. L'effet de la température basse et sa durée sur la survie et la multiplication de RYMV a besoin d'être étudié expérimentalement. De même, il doit être considéré dans la prévention de l'envahissement du RYMV dans les régions tempérées et froides qui peuvent subir un réchauffement climatique et seraient infectées alors par le virus.

L'origine des isolats malgaches a été déduite de l'arbre phylogénétique construit à partir des séquences de leur génome entier avec celles des isolats des autres pays africains. Les isolats malgaches se différencient des isolats africains en un groupe monophylétique. Pourtant, ils partagent un ancêtre commun avec eux.

Les isolats malgaches sont clairement apparentés aux isolats d'Afrique de l'est. Cependant, ils constituent un groupe monophylétique distinct des autres isolats d'Afrique de l'est. Ce groupe est compact et distant des autres souches Est-africaines.

L'ensemble de ces résultats suggère une infection récente à partir d'une souche africaine non encore identifiée à ce jour. Il ne s'agit probablement pas d'un isolat de Tanzanie où la diversité a été particulièrement étudiée. Plus probablement, il s'agit d'un isolat du Mozambique, plus proche de Madagascar. Des vents violents balayant parfois le pays, peuvent apporter des insectes vecteurs virulifères

1.5 CONCLUSION

L'étude a permis de mettre en évidence la faible diversité moléculaire des isolats malgaches de RYMV appartenant tous à la souche S4 et au sérotype Ser4. Cette situation reflète un phénomène de goulot d'étranglement qui s'explique par la situation insulaire de Madagascar. Elle indique aussi une contamination récente pouvant être unique ou multiple à partir d'une souche homogène en provenance d'un pays proche. Le virus a probablement été introduit à Madagascar sur la côte occidentale du pays. Le virus ne porte pas d'ARN satellite, à la différence de la plupart des autres pays africains. Arrivée à Madagascar, la population de RYMV a subi une expansion soudaine. Cette absence d'ARN satellite traduit probablement aussi le goulot d'étranglement. Sa dispersion s'est fait probablement de la direction ouest - nord est - sud est à cause des barrières physique, climatique, biologique et agro-écologique.

CHAPITRE II: CRIBLAGE DU GERMOPLASME MALGACHE AU RYMV ET IDENTIFICATION DE LA RESISTANCE ELEVEE DE LA VARIETE *BEKAROSAKA*

2.1 INTRODUCTION

La lutte contre les phytopathogènes tels que nématodes, bactéries et champignons peut se faire directement avec des nématicides, des antibiotiques et des fongicides, respectivement. L'intégration d'autres lutttes biologique, variétale renforce l'efficacité de la lutte directe, réduit l'emploi des pesticides et limite l'apparition de souches résistantes. Dans le cas des virus phytopathogènes, la lutte directe n'est pas possible. Par contre, dû à leur petit nombre de gènes, les études sur ces virus sont très avancées. La plupart de leurs génomes sont déjà cartographiés et leurs cycles de développement bien compris. Grâce à ces informations, des résistances aux virus ont été obtenues par des transformations des plantes hôtes par insertion d'un fragment de génome altérant les étapes du cycle viral indispensables à la survie et à la multiplication du virus (réplication, mouvement, encapsidation, etc...) et sont déjà utilisées dans les pays du nord. Ces méthodes sont coûteuses et l'utilisation des organismes génétiquement modifiés (OGM) ne suscite pas l'unanimité. Les pays du sud comme Madagascar sont encore hésitants à l'adoption de cette méthode ou des produits déjà obtenus dans les pays pratiquant pour diverses raisons : coût élevé de la transformation et inexistence de dispositif de contrôle des plantes transgéniques déjà élaborées. La préférence va à l'utilisation des résistances naturelles rendue possible par la bonne connaissance d'un germoplasme disponible. Cette méthode est parfois renforcée par la lutte contre les vecteurs du virus pour limiter la transmission du virus d'un hôte infecté à un hôte sain, l'élimination des hôtes intermédiaires pour freiner la production et le maintien de l'inoculum, le choix des techniques culturales appropriées. Ces mesures sont nécessaires non seulement pour renforcer la résistance de l'hôte mais aussi pour éviter une forte pression de sélection sur le virus qui engendrera l'apparition de souches virulentes.

2.1.1 Résistance de plantes aux virus

Chez les virus de plantes, on distingue plusieurs types de résistance: immunité et résistance extrême, résistance à l'accumulation virale, résistance aux mouvements de virus, résistance aux vecteurs (Lecoq et al, 2004). D'autres types de résistance ont été étudiés aussi, la

résistance acquise systémique (SAR) et le « virus induced gene silencing » ou extinction de gène induite par le virus et qui amène la plante à produire un inhibiteur à l'expression génomique du virus. Une autre forme de résistance est de réduire la sévérité des symptômes et par conséquent les pertes en rendement sans pourtant modifier la sensibilité de la plante et qui est appelée tolérance (Schafer, 1971).

Ces types de résistance sont gouvernés par des gènes de certains cultivars. Les premiers déterminés et étudiés sont les gènes de résistance N et N' des cultivars de tabac *Nicotiana glutinosa* et *N. sylvestris* respectivement, à *Tobacco mosaic virus* (TMV). Ce sont des gènes dominants qui provoquent une réaction d'hypersensibilité de la plante vis-à-vis du virus. Des lésions nécrotiques se forment sur la feuille autour du virus introduit et empêchent le virus d'envahir. Chez la pomme de terre, le gène Rx confère une résistance extrême aux souches de virus *Potato virus X* (PVX) et se manifeste par l'absence de lésion sur les feuilles après inoculation du virus (Lecoq et al, 2001).

2.1.2 Résistance au RYMV

Trois types de résistance au RYMV sont connus. Deux formes de résistance naturelle, une partielle et une élevée, et une forme de résistance obtenue par transformation génétique.

2.1.2.1 Déterminisme génétique de ces résistances

La résistance partielle polygénique est contrôlée par un « quantitative trait locus » (QTL) porté par les chromosomes 1 et 12 et qui agit en épistasie avec un QTL porté par le chromosome 7. Elle se manifeste par un retard de la multiplication du virus, une atténuation du symptôme et une faible perte de rendement en champ (Ghesquière *et al.*, 1997; Pressoir *et al.*, 1998; Ahmadi *et al.*, 2001). Cette résistance a été trouvée chez *Oryza sativa japonica* cultivar Azucena originaire de Philippines et chez une variété pluviale IRAT177 créée par le Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) (Ioannidou et al. 2000).

La résistance élevée est présente chez quelques variétés d'*Oryza glaberrima* et chez une seule variété d'*Oryza sativa*. Elle est contrôlée par un même gène monogénique récessif. Elle se manifeste par l'absence de symptôme et par une charge virale indétectable par le test ELISA.

Ceci dérive du blocage du mouvement intercellulaire du virus (Ndjiondjop *et al.*, 2001). La résistance élevée des deux sous-espèces d'*Oryza* est conférée par un même gène majeur récessif *Rymv-1* ou « Resistance to yellow mottle virus-1 » dont le locus est localisé sur le chromosome 4 et qui aussi code pour le facteur d'initiation de la traduction isoforme eIF(iso)4G (Albar *et al.*, 2006). Plusieurs allèles du gène ont été identifiées : *Rymv1-2* chez la sous-espèce *sativa* Gigante, *Rymv1-3* et *Rymv1-4* chez les sous-espèces *glaberrima* Tog5681 et Tog 5672, respectivement. Ces allèles sont caractérisés par une substitution d'acide aminé ou une courte délétion d'acide aminé au niveau du domaine conservé du gène par rapport à l'allèle *Rymv1-1* des variétés susceptibles.

La résistance obtenue par des transformations génétiques dont le transgène dérive de la « RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) » du RYMV, agit par un mécanisme de « post transcriptional gene silencing (PTGS)», aboutissant à la destruction des transcrits chez les plantes transgéniques portant le transgène (Pinto, 2000). Cette résistance est plutôt partielle.

2.1.2.2 Spécificité de ces résistances

Les résistances au RYMV des cultivars Azucena, Gigante et Tog5681 sont spécifiques car certains isolats obtenus après des passages en série ont pu provoquer des symptômes sur ces variétés. L'isolat virulent sur Azucena est avirulent sur Gigante et Tog 5681. L'isolat virulent sur Gigante est avirulent sur Tog 5681 tandis que l'isolat virulent sur Tog 5681 est difficilement virulent sur Gigante conférant le terme d'allèle spécifique puisque cette résistance est due à un même gène (Fargette *et al.*, 2002a).

2.1.2.3 Stabilité d'une résistance

Une résistance est stable si elle persiste sur un grand nombre de souches ou d'isolats. Les résistances non spécifiques où tous les isolats présents sont avirulents, sont stables mais elles possèdent différents niveaux de stabilité qui dépendent de l'émergence de nouveaux variants faisant suite au déploiement des variétés résistantes dans les rizières (Lecoq 2004).

2.1.3 Lutte contre le RYMV

Pour contrôler la panachure jaune du riz à Madagascar, une stratégie de lutte intégrée a été adoptée. Elle est fondée sur l'usage de variétés résistantes parce que les produits chimiques pour contrôler les insectes vecteurs ne sont ni disponibles ni accessibles aux paysans et de surcroît sont dangereux pour l'environnement. Les travaux de criblage pour la résistance au RYMV ont commencé à Madagascar en 1991. Un germoplasme riche d'approximativement 4000 variétés qui est composé de variétés traditionnelles, introduites et de lignées issues de travaux d'hybridation a été testé. Le criblage comprend une première étape qui repère par symptomatologie les variétés très sensibles. Ils sont alors éliminés. Un nombre plus réduit est testé par DAS-ELISA. Une deuxième étape consiste en un typage des résistances des variétés sélectionnées vis-à-vis des isolats de RYMV connus. Une étude plus approfondie sera menée sur la variété traditionnelle *Bekarosaka* pour voir si sa résistance élevée serait équivalente à celle de la variété connue Gigante.

Le chapitre montre :

- les étapes des travaux de sélection à partir du germoplasme faits à Madagascar avec un isolat malgache jusqu'à la sélection de variétés apportées à Montpellier pour une étude approfondie. Les variétés et lignées introduites repérées résistantes dans cette étude seront citées.
- la caractérisation de la résistance de variétés sélectionnées à Montpellier contre des isolats africains et en comparaison à des variétés résistantes étudiées à l'IRD précédemment.
- la caractérisation du phénotype et du génotype de la résistance élevée de la variété *Bekarosaka*

2.2 MATERIELS ET METHODES

2.2.1 Matériels biologiques

Variétés criblées : Un ensemble de cinq cents trois (503) variétés du germoplasme malgache a été soumis à des travaux de criblage. Il comprenait les principales variétés traditionnelles et améliorées localement, ainsi que des introductions sélectionnées pour la résistance au RYMV (Tableau 2). Les variétés traditionnelles sont celles cultivées dans les

régions de *Marovoay* dans le nord-ouest, au *Lac Alaotra* dans le moyen est, à *Tanandava* dans le sud-ouest et sur les hauts plateaux. Il y avait aussi quelques populations de riz indexées par les paysans comme résistants pendant une sélection participative menée au cours des tests multilocaux.

Les variétés améliorées sont les lignées ON (observational nursery) et T (*Tsararano*) obtenues à partir des croisements faits dans la station de Tsararano Marovoay du FOFIFA (Rechkaus and Masajo, 1996; Rakotomalala, 2000). Les ON dérivent des croisements entre les variétés pluviales brésiliennes (Ciwini, Moroberekan,) et les variétés sensibles de type *indica* et ayant les types de grain de riz de luxe ou de demi-luxe appréciés dans la région du nord-ouest (AliCombo, Boina 1329 et Tsipala). Leur sélection se basait sur la présence d'une résistance au RYMV semblable à celle des parents pluviaux, combiné au type de plant et de grain similaires aux parents riz de luxe et de demi-luxe. Les lignées T sont issues d'un seul croisement réussi avec le riz sauvage *Oryza longistaminata*. Il s'agissait d'une variété traditionnelle sensible nommée *Miandry bararata* venant des Hauts Plateaux qui montre à la fois une photopériodisme, un faible rendement et une mauvaise qualité de graine. Les plantes de la génération F1 (*O. longistaminata*/*Miandry bararata*) ont subi des croisements doubles, à trois voies et en retour (backcross) avec le riz *sativa* pour éliminer les caractères sauvages hérités de *O. longistaminata* (rhizomes, stérilité, grain barbu), tout en gardant la résistance au RYMV. De variétés autres que *Miandry bararata* ont été utilisées comme parent récurrent ; ce sont de variétés sélectionnées auparavant et déjà vulgarisées pour leur bonne qualité de grain et le haut rendement. La sélection des lignées T se basait sur la résistance au RYMV, le type de plant de riz *sativa* et les bons caractères agronomiques. Les introductions comprennent celles qui ont été introduites avant l'apparition de la maladie et qui ont été sélectionnées pour des caractères agronomiques ou la résistance à d'autres stress (sécheresse, inondation, salinité) et celles introduites d'autres instituts de recherche en 1998, spécialement pour la résistance au RYMV venant. Ces dernières comprenaient les lignées Tox (Tropical oryza cross) et Tog (Tropical *Oryza glaberrima*) de l'IITA (Ibadan, Nigeria), les variétés pluviales de EMBRAPA (Goiana, Brésil) et de CIRAD (France), les lignées IR de l'IRRI (Philippines) et les OG (*Oryza glaberrima*) conservés à l'ADRAO (Cotonou, Bénin) introduites par le biais d'une collaboration avec INGER-IRRI.

Variétés témoins :

Boina 1329 : variété traditionnelle, témoin sensible utilisé à Madagascar

IR64 : témoin sensible utilisé à l'IRD Montpellier

Gigante : variété d'*O. sativa* de type *indica* de l'Afrique de l'Ouest à résistance élevée

Azucena : variété d'*O. sativa* de type *japonica* à résistance partielle

Tog 5675-1 : variété d'*O. glaberrima*, utilisé comme témoin résistant à Madagascar

Tog 5681 : variété d'*O. glaberrima* à résistance élevée, utilisé à Montpellier

Isolats inoculés :

Isolats représentatifs des régions géographiques de Madagascar :

MRV : collection de *Marovoay* incluant ceux de la région *Boeny*, de la Sofia et de la région de DIANA ;

SO : de la région du sud-ouest, axe *Miandrivazo-Morondava-Morombe*

SBV : du nord-est, de la collection de *Sambava* incluant ceux de toute la région de SAVA ;

CALA : du moyen-est, de la collection du Complexe Agricole du *Lac Alaotra* et collectés aux alentours du Lac

KJV : de *Kianjavato*

MNJ : de l'axe *Mananjary-Manakara-Farafangana*, collection de *Mananjary*

SBV17 (Mg15) : originaire du nord-est de Madagascar, isolé et caractérisé dans le chapitre 1

BF1 : isolat du Burkina Faso

BFa5 : isolat du Burkina Faso

CI4* : obtenu après passage en série de l'isolat CI4, isolat de Côte d'Ivoire, sur le cultivar *Gigante* hautement résistante au RYMV.

2.2.2 Criblage de variétés de riz pour la résistance au RYMV à Madagascar

Des sélections basées sur les symptômes apparus sur des plantes de ces 503 variétés de riz inoculées avec un mélange d'isolats de RYMV malgache collectés à la station de *Tsararano Marovoay* du FOFIFA au Nord-ouest de Madagascar ont été entreprises pendant trois saisons.

Tableau 4. Matériels du germoplasme du FOFIFA inclus dans le criblage à Madagascar

Matériels ¹	Nombre	Origine
Variétés traditionnelles	48	Prospection à Madagascar
Sélections cultivées dans différentes régions écogéographiques	76	Traditionnelles et introduites
Lignées IRRI	96	Introduction par le projet IRRI-Madagascar
Lignées Tox	48	Introduction de l'IITA
Lignées Tog	7	Introduction de l'ADRAO par INGER-IRRI
OG (<i>Oryza glaberrima</i>)	144	Introduction de l'ADRAO par INGER-IRRI
Riz pluvial	10	Introduction de EMBRAPA et de CIRAD
Lignées ON	2	Création de la station <i>Tsararano</i>
Lignées T	72	Création de la station <i>Tsararano</i>
Total	503	

¹Liste en annexe

Les plantules de 15 jours ont été repiquées sur deux lignes de 1 m avec un espacement de 20 x 20 cm faisant 10 plantes par variété. Pour référence, le témoin sensible *Boina* 1329 a été repiqué toutes les 10 variétés. L'inoculation a été faite 15 jours après repiquage avec un inoculum mixte préparé avec des broyats de feuilles infectées par différents isolats de RYMV suivant la méthode de John (1990). L'évaluation des symptômes basée sur les notations de 1 à 9 (IRRI SES, 3e édition) a été réalisée 30 jours après inoculation (jai). Une courbe de distribution de fréquence des notations de symptômes des variétés a été tracée. La sélection a ciblé les variétés qui ont eu une notation inférieure ou égale à la médiane.

La sélection a été reprise par le test ELISA sur un nombre déjà réduit de variétés issues du premier crible par symptôme. La présence ou la multiplication du virus au sein de chaque variété peut être dosée par la densité optique lue au spectrophotomètre. En plus de la présence du virus, elle indique aussi la quantité de la charge virale qui reflète la capacité de multiplication ou non du virus au sein de plante. De ce fait, le test ELISA permet de catégoriser le niveau de résistance d'une variété. Plusieurs niveaux peuvent être ainsi définis.

Deux cents trente-trois variétés ayant une notation inférieure à 7 ont été testées. Les plantes ont été cultivées et l'inoculation a été faite comme précédemment. Les variétés Tog 5675-1 et IR 64 ont été utilisées respectivement, comme témoin résistant et sensible. Les prélèvements d'échantillons pour les tests ELISA ont été faits à 30, 45 et 60 jai. ELISA a été exécuté comme décrit dans le chapitre 1 sur le diagnostic des isolats. Les absorbances lues à 405 nm (A_{405nm}) ont été portées sur un graphique et la sélection a été portée sur les variétés ayant une DO inférieure à 0.2, valeur considérée comme positive.

2.2.3 Typage des résistances des variétés présélectionnées

Les semences de 12 variétés de bas-fonds sélectionnées à Madagascar pour leur bonne résistance au RYMV ou pour leur résistance modérée combinée avec une bonne performance agronomique ont été retenues. Elles ont été apportées à l'IRD de Montpellier pour une caractérisation plus approfondie de la résistance au RYMV.

Les 12 variétés ont été testées en trois lots à cause de l'espace limité dans la serre de confinement de type S2, mais la conduite de l'expérience a été uniforme. Un dispositif expérimental de bloc randomisé à quatre répétitions a été adopté ayant comme traitements pour chaque lot :

- 2 isolats agressifs : BF1 de Burkina Faso et SBV17 (Mg15) de Madagascar
- 4 variétés présélectionnées malgaches
- 3 variétés témoins : Gigante comme témoin de résistance élevée, Azucena comme témoin de résistance partielle et IR 64 comme témoin sensible

L'unité expérimentale a été un pot contenant dix plantes par variété. L'évaluation de symptôme et l'échantillonnage ont été faits à 15 et à 30 jai. Les feuilles infectées systémiques ont été prélevées. Leurs extraits ont été testés par DAS-ELISA comme décrit dans le chapitre I et les valeurs de l'absorbance ont été analysées par le logiciel Statistix for Windows. Une analyse générale de

variance (ANOVA) des absorbances (A_{405nm}) a été entreprise avec les deux isolats et les sept variétés par lot. Une ANOVA par isolat a suivi quand la différence entre isolats a été trouvée significative. Les DO moyennes par variété ont été comparées par LSD ($t_{0,05}$).

En 2004, une variété traditionnelle récemment prospectée partiellement résistante *Maintimboty*, a été testée avec les isolats BF1, CI4* et BFa5 en comparaison à la variété Tox 3233 identifiée ayant une résistance partielle en 2003 et avec la variété hautement résistante Gigante à l'IRD Montpellier.

2.2.4 Caractérisation du phénotype de la résistance élevée de Bekarosaka

2.2.4.1 Test de la spécificité

La variété *Bekarosaka* identifiée comme ayant une résistance élevée a été comparée avec les variétés Gigante et Tog 5681 qui ont une résistance élevée étudiée auparavant par l'IRD. Elles ont été inoculées avec les isolats virulents BFa5 et CI4Gig8. Quatre lots de pots avec dix graines de chaque variété ont été semés. Les isolats BF1, BFa5 et CI4Gig8 ont été inoculés comme décrit ci-dessus à 15 jours après semis, et le quatrième lot a servi comme témoin non inoculé. L'évaluation visuelle de symptôme et le prélèvement ont été faits à 15 et 30 jai. Un test ELISA a été exécuté sur des extraits de feuilles dilués au 1/100. Les absorbances (A_{405nm}) de chaque variété avec chaque isolat ont été portées sur graphique et les cinétiques de réaction des variétés ont été suivies à 15 et 30 jai.

2.2.4.2 Test de la stabilité

Dix isolats de RYMV provenant de différentes régions rizicoles infectées de Madagascar et 8 isolats représentant les 6 souches de RYMV identifiés sur le continent africain par l'IRD ont été inoculés à *Bekarosaka*. Les isolats malgaches étaient BekaC, MRV8 (Mg10), SBV11 (Mg13), SBV23 (Mg18), CALA2 (Mg21), KJV1 (Mg25), MNJ4 (Mg23), MNJ7 (Mg24), et SO2 (Mg19) et SO7 (Mg20). Les isolats représentant les souches africaines étaient Ma1 (S1), CI4, CI13 et Ma6 (S2), SL4 (S3), Ke1 (S4), Tz3 (S5) et Tz11 (S6). L'isolat CI4*, trouvé virulent sur *Bekarosaka* dans le test antérieur, a été utilisé comme témoin positif, et un pot de plantes saines de *Bekarosaka* comme témoin sain. L'évaluation visuelle de symptômes et le prélèvement d'échantillons pour un test ELISA ont été faits à 15 et 30 jai.

2.2.5 Identification de la sous-espèce de la variété Bekarosaka

La variété *Bekarosaka* étant issue d'une population locale, la détermination de sa sous-espèce a été jugée une condition requise avant l'étude de son génotype parce qu'elle permet de choisir les sous-espèces résistantes de comparaison.

Trois méthodes ont été utilisées pour déterminer la sous-espèce de la variété *Bekarosaka* : la détermination basée sur la morphologie, le test phénol et les marqueurs microsatellites qui permettent de différencier les espèces *glaberrima* et *indica* ainsi que les sous-espèces *indica* et *japonica*.

2.2.5.1 Détermination par la morphologie

L'IRRI a mis en évidence des caractères morphologiques différenciant les sous-espèces *indica*, *japonica* et *javanica*. Des plantules de 15 jours de la variété *Bekarosaka* ont été repiquées en collection testée sur 5 lignes de 5 m dans la serre de la station *Tsararano Marovoay*, avec la variété Gigante comme témoin *indica* et la variété Azucena comme témoin *japonica*. Les observations des caractères du port de la plante, des tiges, des feuilles, des panicules, des graines, de la phénologie ont été faites et comparées utilisant la clef de détermination élaborée par l'IRRI (1995).

2.2.5.2 Détermination par le test phénol

Les graines des variétés de riz de la sous-espèce *indica* contiennent un composant qui s'oxyde avec le phénol et qui provoque une coloration noire après quelques heures d'imbibition alors que la couleur de celles des variétés de riz de la sous-espèce *japonica* reste inchangée. De ce fait, ce test permet de distinguer les variétés de la sous-espèce *indica* de celles de la sous-espèce groupe *japonica*.

Six graines des variétés *Bekarosaka*, IR64 (*indica*) et Nipponbare (*japonica*) ont été utilisées. Le phénol (aquaphénol) a été dilué à 1,5% sous la hotte (90µl aquaphénol + 5910µl H₂O = 6ml).

Les 6ml ont été distribués dans 3 tubes et les graines ont été trempées dans chaque tube étiqueté pendant 7 h. Après cette durée, les changements de couleur des graines ont été observés.

2.2.5.3 Détermination par les marqueurs moléculaires microsatellites

Les marqueurs microsatellites sont des séquences de di à tetra-nucléotides répétés en tandem qui permettent de détecter une diversité allélique (McCouch, 1997). Ils ont été utilisés pour différencier les variétés des sous-espèces *indica* et *japonica*. Les marqueurs RM1, RM5, RM11, RM18, RM19, RM167 possédant un taux élevé de différenciation *indica/japonica* dans les travaux antérieurs (Patry-Bres, 2000) ont été choisis.

Extraction d'ADN de la variété *Bekarosaka* : Des morceaux de feuilles de 2 cm ont été prélevées sur sept plantes de la variété *Bekarosaka* et ont été mis dans un tube de 2 ml puis au congélateur avant l'extraction d'ADN. On a adopté la méthode simple et rapide d'Edwards et al (1991) d'extraction à billes. Une bille a été mise dans chaque tube et les tubes ont été incubés dans de l'azote liquide quelques secondes, puis mis dans un portoir qui a été déposé dans un broyeur pendant 15 secondes. Quatre cents microlitres de tampon pour extraction (200 mM Tris HCl pH 7,5 ; 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été agités à la main et centrifugés à 13000 rpm pendant 1 mn puis 300 µl de surnageant ont été collectés et transférés dans un tube de 2 ml dans lequel 300 µl d'isopropanol ont été ajoutés. Le mélange a été recentrifugé à 13000 rpm pendant 5 mn et le surnageant a été éliminé. Le culot a été séché en l'essuyant avec un tissu en papier puis au vacuum rotatif et à la fin, il a été dissous avec 100 µl de TE 0,5. L'ADN est conservé au réfrigérateur pour tous les travaux qui ont suivi.

PCR : Sept échantillons de *Bekarosaka* ont été testés avec 7 variétés *indica*, 7 variétés *japonica* et 4 *glaberrima*. Leur ADN a été déposés sur une plaque PCR à raison de 4 µl par puits. Un mélange composé de dNTP, Taq polymérase, Tampon, MgCl₂, amorce (RM) sens lié au M13, amorce antisens, M13 marqué, H₂O a été ajouté à chaque puits.

Programme: 94°C 3 mn
94°C 30s
55°C 30s
72°C 45s
72°C 6 mn
10°C 10 mn

← 29 cycles

Migration sur gel : Les échantillons ont été déposés sur du gel d'acrylamide + TBE + ammonium persulfate + Temed + Urée (dénaturante au cours de la migration) dans le « DNA analyzer » LI-COR. Les RM sens liés au M13 marqué peuvent être visualisés au fluorochrome à 700 nm.

2.2.6 Analyse des bases génétiques de la résistance de la variété *Bekarosaka*

Des croisements ont été réalisés dans la serre de l'IRD Montpellier entre *Bekarosaka* x Gigante et entre *Bekarosaka* x IR 64. Les générations F1 et F2 ont été obtenues. Quarante-sept plantes de la population F2 (IR64 x *Bekarosaka*) ont été inoculées avec l'isolat BF1. Les symptômes ont été observés et les pourcentages des ségréants F2 sensibles et résistants ont été dénombrés. Les marqueurs microsatellites RM 252 et RM 273, encadrant le gène majeur de résistance des variétés Gigante et Tog 5681, ont été testés sur les 47 plantes F2 évaluées. Ces deux marqueurs ont été amplifiés et révélés (Albar et al, 2003) puis cartographiés à l'aide du logiciel Mapmaker (Lander et al, 1987). Par ailleurs, trois hybrides F1 issus du croisement Gigante x *Bekarosaka* et une trentaine de plantes F2 issues de l'autofécondation ont été analysés.

2.2.7 Séquençage de la région conservée du gène de résistance au RYMV de la variété *Bekarosaka*

L'ADN génomique d'une des sept plantes de *Bekarosaka* extrait dans le paragraphe 2.2.5.3 a été utilisé pour l'amplification de la région conservée du gène de résistance déjà identifié chez la variété Gigante. Les variétés Gigante, Tog5672 et Tog5681 ont été utilisées comme témoins résistants, et IR64 et Tog5673 comme témoins sensibles. Une PCR avec le couple d'amorces F12-R6 (Annexe 2) flanquées sur le 7^e exon du gène qui est la région la plus conservée a été conduite. Le programme de l'enzyme dynazyme a été appliqué.

Le séquençage a été fait avec le kit « Taq Terminator sequencing » et analysé par le séquenceur « Applied Biosystem 373 A ».

2.3 RESULTATS

2.3.1 Identification de variétés résistantes au RYMV à Madagascar

2.3.1.1 Résistance évaluée d'après l'expression des symptômes à l'infection virale

La distribution des réponses de la population de 503 variétés basée sur leur symptôme noté de 1 à 9 a montré une moyenne et une médiane égales à 5,94 et de 7, respectivement (Kolmogorov-Smirnov statistique = 0,18, $P < 0,0036$) (Figure 17). Les résultats indiquent une prédominance de variétés sensibles (S=7 et S=9) qui représentent 56,6% de la population totale. Seulement 6,6% de la population totale se sont avérées hautement résistantes (S=1). Un total de 218 variétés ont eu des scores intermédiaires pour S=3 (12,1%) et S=5 (25,2%), suggérant une résistance partielle.

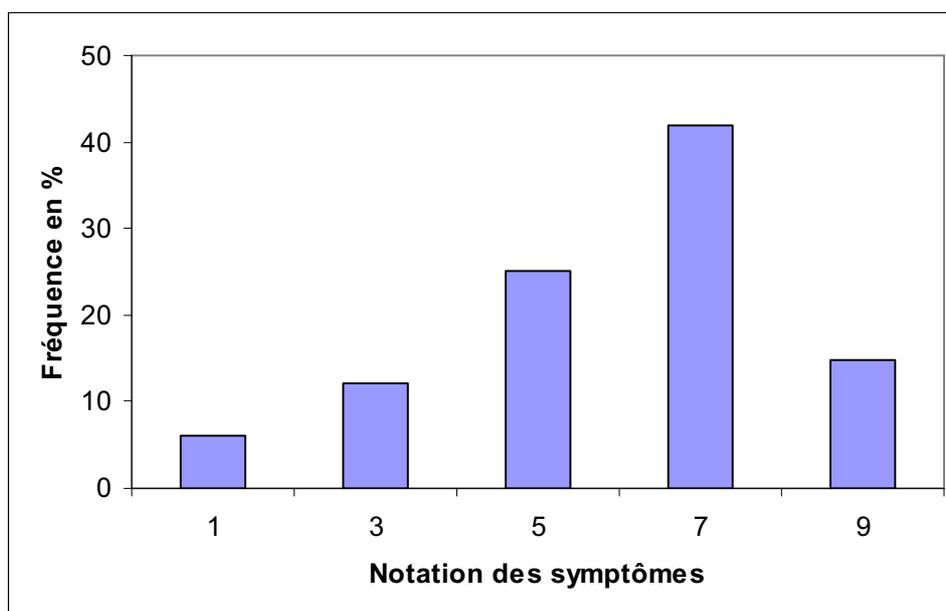


Figure 17. Distribution de fréquence des 503 variétés basée sur la notation des symptômes (S) de 1 à 9 (Kolmogorov-Smirnov statistique = 0,19, $P < 0,0036$ moyenne = 5,94, médiane = 7).

Quand les fréquences des différentes catégories (sous-espèces et origines) de la population ont été comparées, plusieurs contrastes sont apparus : - Une forte proportion de cultivars sans symptôme (S = 1) a été observée parmi les introductions récentes, due à la collection de

variétés pluviales du Brésil et quelques accessions de l'espèce africaine *O. glaberrima*. Les cultivars de la sous-espèce *indica* sont sensibles (S = 7) à très sensibles (S = 9) (Figure 18). Dans l'espèce *O. glaberrima*, les variétés Tog 6589, Tog 6629, OG 437-15, OG 392-6, OG 438-6, OG 440-11, OG 1257, OG 375-10, OG 449-20, OG 449-20, OG 449-31, OG 440-11 ont été repérés comme résistantes. Cependant, l'espèce *O. glaberrima* comprend une majorité d'accessions sensibles (S = 7 et S = 9). Les variétés pluviales Morobérékan, Lac 23, Faro 2, Faro 41, Faro 43, IRAT 104, IRAT 156, IRAT 161, IITA 235, IITA 305 et seule une lignée *sativa* IR 75083-73-10 *sativa* à haut rendement se sont avérées asymptotiques. Les lignées Tox de l'IITA ont montré une proportion maximale dans la classe modérément résistante.

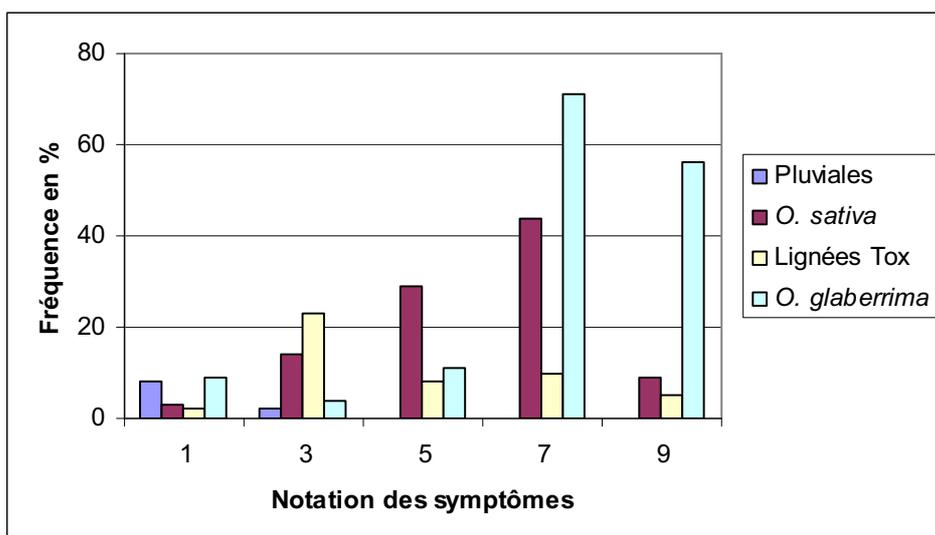


Figure 18. Distribution de fréquence des variétés de type *sativa* et des différents groupes de lignées introduites pour la résistance au RYMV

- Au sein de l'espèce *sativa*, les variétés traditionnelles sont moins sensibles que les lignées venant de l'IRRI (Figure 19). Une variété traditionnelle nommée *Bekarosaka*, quelques lignées Tox et des lignées ON et T n'ont pas présenté de symptôme. Les notations de symptôme

et les DO des 503 variétés sont tabulés en annexe. Les variétés dont les notations sont supérieures ou égales à 7 ont été éliminées pour le second crible par ELISA.

2.3.1.2 Résistance évaluée d'après la teneur en virus

Il n'y a pas de relation stricte entre l'expression de symptôme et la teneur en virus. L'espèce *O. glaberrima* a montré une faible proportion d'accessions ayant une teneur élevée en virus par rapport à l'espèce *O. sativa* (toutes origines confondues) et une distribution très différente de l'expression de symptôme (Figure 20). Parmi les 503 variétés criblées, dont 233 ont été retenues en raison de la faiblesse des symptômes, seule la variété traditionnelle *Bekarosaka* a combiné l'absence constante de symptôme et un niveau indétectable de virus. La teneur en virus des variétés *glaberrima* et des variétés pluviales sans symptôme cités auparavant s'est rangée autour de 0,4. Cette faible teneur en virus indique plutôt une résistance partielle. D'autres variétés *glaberrima* qui avaient une teneur en virus plus élevée et des symptômes peu marqués sont tolérants. Quelques lignées T et ON sélectionnées localement pour la résistance au RYMV avaient une teneur en virus très faible jusqu'à 60 jai. Ce sont les lignées T 70722, T 70723, T70721, T70751, T70752 et T70753, ON332 et ON333. Elles ont cependant montré des symptômes d'un niveau équivalent à ceux du témoin sensible *Boina* 1329. Leur réponse à l'infection mérite donc d'être confirmées dans un test plus affiné. Parmi les variétés qui ont eu une teneur en virus intermédiaire, la sélection a pris en compte le type de plant de riziculture pluviale de bas fonds (rainfed lowland) où la panachure jaune du riz sévit et de la performance agronomique. Deux lignées Tox (Tox 3233-31-6-2-1-1A et Tox 3219-51-1-3-2-2B), deux lignées ON (ON 332, ON 333), *Mahadigny* et *Maintimbotsy* ont répondu à ces critères.

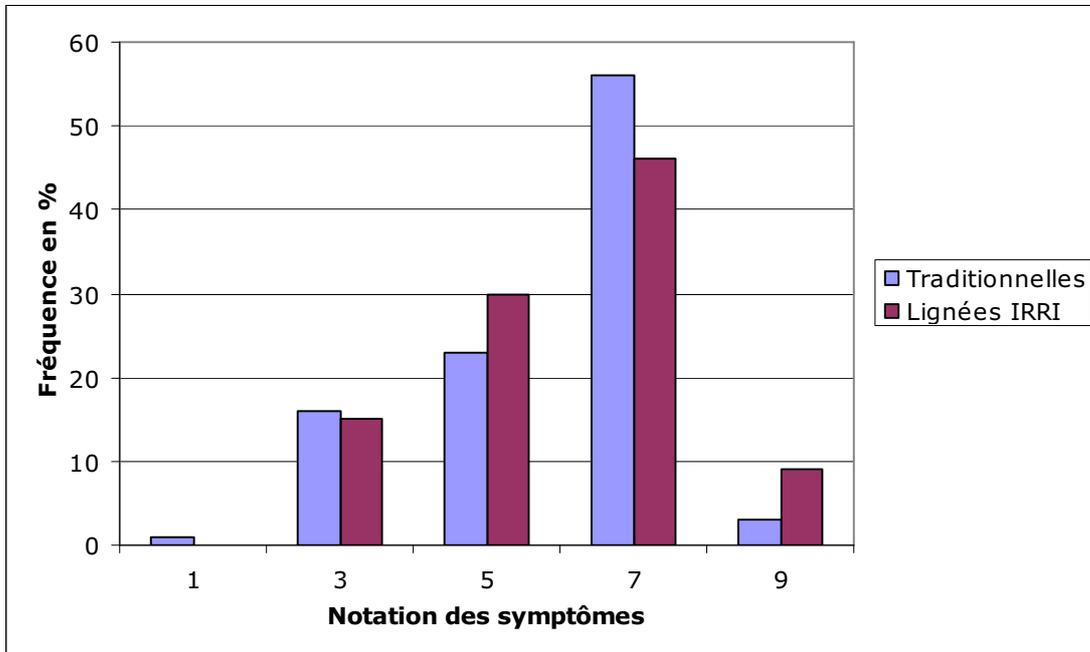


Figure 19. Distribution de fréquence des variétés traditionnelles et des lignées venant de l'IRRI.

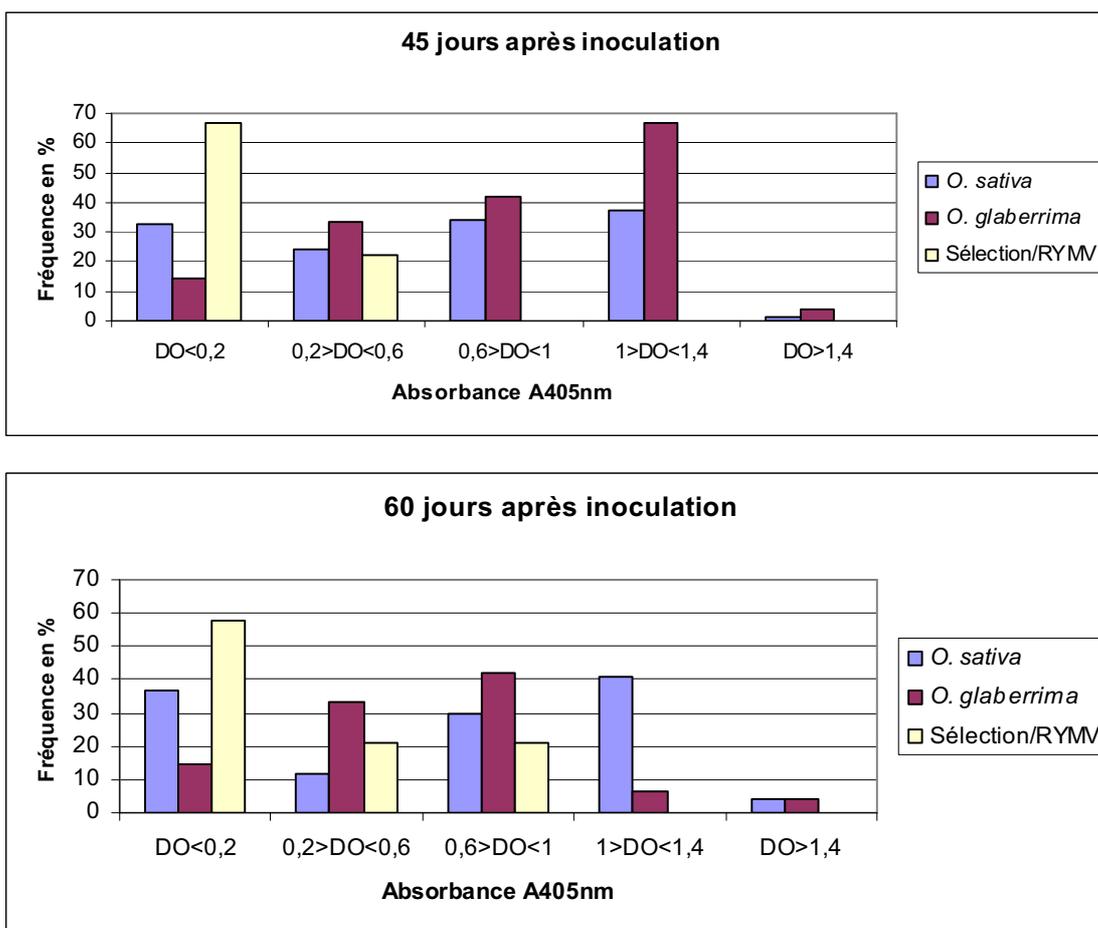


Figure 20. Distribution de la réponse des variétés d'après la teneur en virus évaluée par les absorbances à 405 nm des extraits de feuilles prélevées à 30, 45 et 60 jours après inoculation.

2.3.2 Résistance élevée de la variété *Bekarosaka*, résistance partielle des lignées Tox et tolérance des lignées ON et de la variété *Maintimboty*

La réponse à l'inoculation d'un isolat de Madagascar (SBV 17) et d'un isolat de Burkina Faso (BF1) a permis de caractériser plus finement le niveau de résistance des 13 sélections malgaches étudiées à Montpellier.

Dans le premier lot, la variété traditionnelle malgache *Bekarosaka* s'est distinguée par son score égal à 1 dénotant l'absence totale de symptôme et par sa teneur en virus en dessous du seuil de détection par ELISA ($A_{405nm} = 0,11$) avec les deux isolats SBV17 et BF1 sur 4 répétitions

(Tableau 3). Cette absorbance est significativement équivalente à celle de la variété Gigante de type *indica* à résistance élevée. Ce résultat implique que la variété *Bekarosaka* possède une résistance élevée au RYMV. Il confirme le résultat des sélections à Madagascar présenté précédemment. Les lignées Tox 3219-51-1-3-2-2B et Tox 3233-31-6-2-1-1A ont montré des symptômes de panachure et de jaunissement (score 3). Elles avaient une teneur en virus significativement équivalente à celle de la variété Azucena avec les isolats SBV17 et BF1. Ces lignées possèdent donc une résistance partielle au RYMV. La variété *Mahadigny* a montré moins de symptôme (score 5) que le témoin sensible IR64 (score 7), mais les deux variétés avaient une teneur en virus significativement équivalente. Cette variété de bas fonds à haut rendement subissait peu de perte en rendement lors des infections dans les rizières. La variété *Mahadigny* peut être qualifiée comme tolérante au RYMV.

Dans le deuxième lot, les lignées ON 332, ON 333, T 70722 et T 70723 ont montré des symptômes d'un niveau équivalent à celui du témoin Azucena partiellement résistant (score 3) avec les deux isolats. Vis-à-vis de l'isolat malgache SBV17, leurs teneurs en virus étaient équivalentes à celle de la variété Azucena. Vis-à-vis de l'isolat BF1, leur teneur en virus était aussi élevée que celle du témoin sensible IR64. Leur résistance partielle dépend de l'isolat. Leur réponse s'apparente plutôt à une tolérance au RYMV.

Dans le troisième lot, toutes les lignées de la série T exprimaient des symptômes et une teneur en virus semblable à ceux de l'IR64 avec les deux isolats SBV17 et BF1. T70721, T70751, T70752 et T70753 sont donc sensibles.

Dans le quatrième lot, la variété *Maintimboty* exprimait des symptômes d'un niveau équivalent à celui de Tox 3233-31-6-2-1-1A (score 3) mais avait une teneur en virus élevée. Cette variété traditionnelle repérée aussi par les paysans lors du programme de sélection participative exprime peu de symptôme dans leurs rizières à Madagascar. Elle peut donc être classée comme tolérante au RYMV.

2.3.3 Phénotype de la résistance élevée de la variété *Bekarosaka*

2.3.3.1 Spécificité de la résistance de la variété *Bekarosaka*

La variété *Bekarosaka* n'a montré aucun symptôme à 15 et 30 jai avec l'isolat BF1 dans ce test comme dans les tests antérieurs. La teneur en virus est restée semblable à celle de la plante saine (Figure 21). Par contre, avec les isolats BFa5 et CI4*, la teneur en virus était notable

à 15 jai et a continué à augmenter à 30 jai. De même, les symptômes ont été bien évidents (Figure 22). Une réaction semblable a été observée sur la variété Gigante avec ces trois isolats. La réaction de la variété Tog5681 qui n'exprimait pas de symptôme ni n'accumulait de virus que ce soit avec l'isolat BF1 ou l'isolat CI4* était différente de celle des variétés *Bekarosaka* et Gigante. Ces deux isolats sont alors virulents sur les variétés *Bekarosaka* et Gigante seulement et avirulents sur la variété Tog 5681. Seul, l'isolat BFa5 était virulent sur les trois variétés. Vis-à-vis de génotype de ces trois isolats, la résistance de la variété *Bekarosaka* est semblable à celle de la variété Gigante et différente de celle de la variété Tog 5681. Ces résultats suggèrent que les variétés *Bekarosaka* et Gigante ont le même génotype et partagent le même allèle de résistance.

Tableau 5. Évaluation de la résistance des variétés sélectionnées à Madagascar par symptomatologie et par la teneur en virus¹.

Variété	Isolat ²				
	SBV17			BF1	
	Notation de symptôme	A _{405nm}		Notation de symptôme	A _{405nm}
<u>Premier lot</u>					
1. Tox 3219	3	2,5 c		3	0,8 bc
2. Tox 3233	3	1,9 bc		3	0,8 bc
3. Mahadigny	5	4,5 d		5	0,8 bc
4. Bekarosaka	1	0,1 a		1	0,1 a
5. IR64	7	4,3 d		5	1 c
6. Azucena	3	2,1 c		3	0,6 b
7. Gigante	1	0,1 a		1	0,1 a
<u>Deuxième lot</u>					
1. ON 332	3	3 b c		3	1,3 c
2. ON 333	3	2,5 b		3	1,4 c
3. T 70722	3	3,4 c		3	1,3 c
4. T 70723	3	3,7 c		3	1,2 c
5. IR 64	7	3,8 c		7	1,3 c
6. Azucena	2	3,1 bc		3	0,7 b
7. Gigante	1	0,1 a		1	0 a
<u>Troisième lot</u>					
1. T 70721	3	4,3 c		5	1,4 bc
2. T 70751	5	3,9 c		7	1,8 cd
3. T 70752	5	4,4 c		7	1,6 bc
4. T 70753	5	3,4 bc		7	1,6 bc
5. IR 64	7	4,2 c		7	2,3 d
6. Azucena	3	1,8 b		5	1 b
7. Gigante	1	0,1 a		1	0,1 a
<u>Quatrième lot</u>					
1. Maintimboty	5	4,3 na		5	1,2 na
2. Tox 3233	3			3	
3. IR 64	7			7	

¹ donnée par l'absorbance (A_{405nm}) par enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Les tests ont été faits avec l'isolat malgache SBV17 et l'isolat africain BF1 et les variétés témoins Gigante (résistance élevée), Azucena (résistance partielle) et IR64 (sensible)

²Moyennes de DO sur 4 répétitions suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes par lot et par isolat

Premier lot SBV17 (F= 8,7, P<0,0001), BF1 (F=15,8, P<0,0000)

Deuxième lot SBV17 (F=19,4, P<0,0000), BF1 (F=37,0, P<0,0000)

Troisième lot SBV17 (F=8,6, P<0,0001), BF1 (F=7,9, P<0,0002)

Na: non analysé

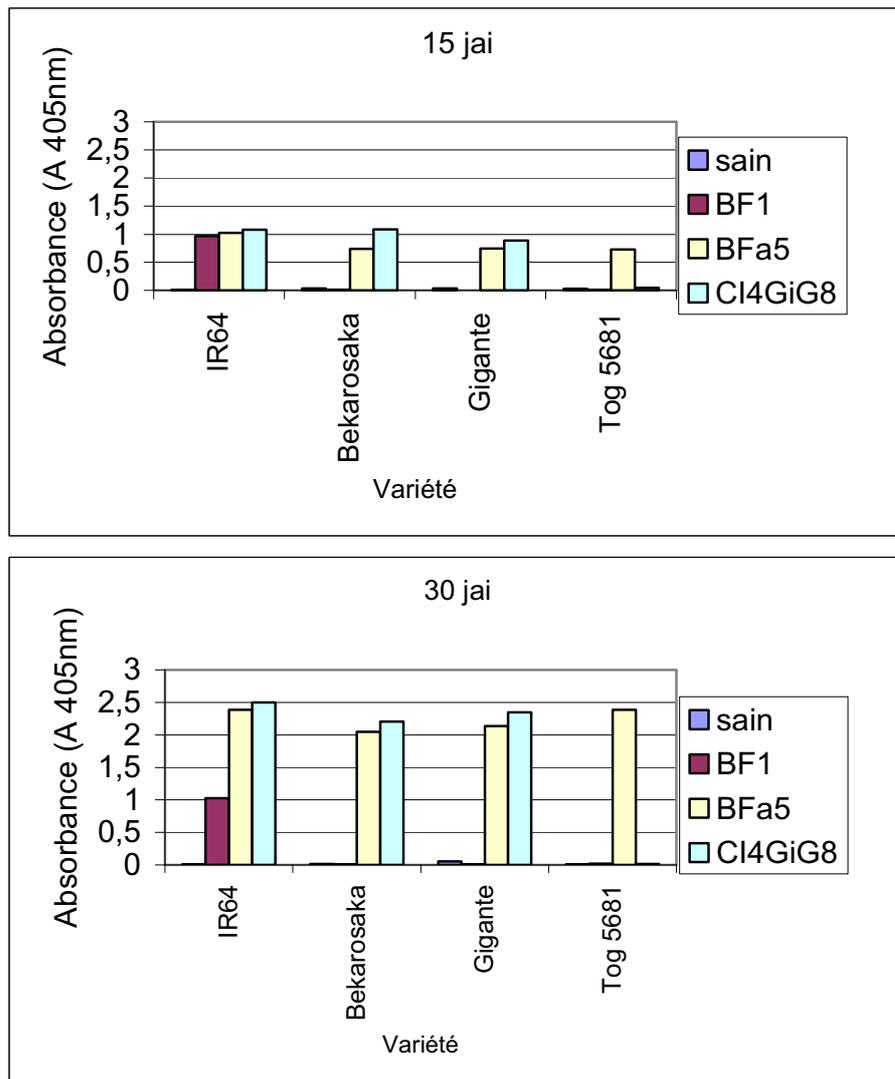


Figure 21. Réponse des variétés *Bekarosaka*, *Gigante* (rymv 1-2), *Tog5681* (Rymv 1-3) et *IR64* (Rymv 1-1) aux isolats BF1, BFa5, CI4* évaluée par ELISA à 15 et 30 jours après inoculation (jai).

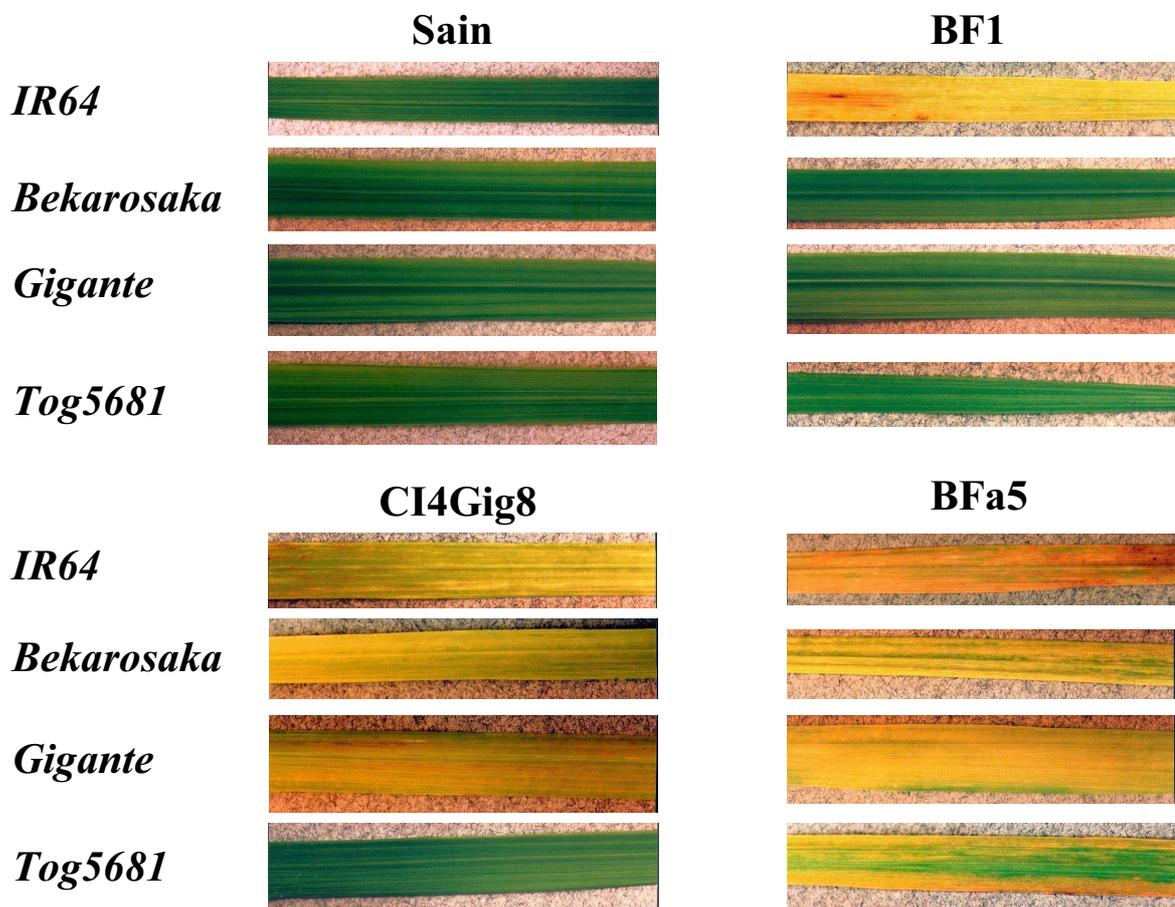
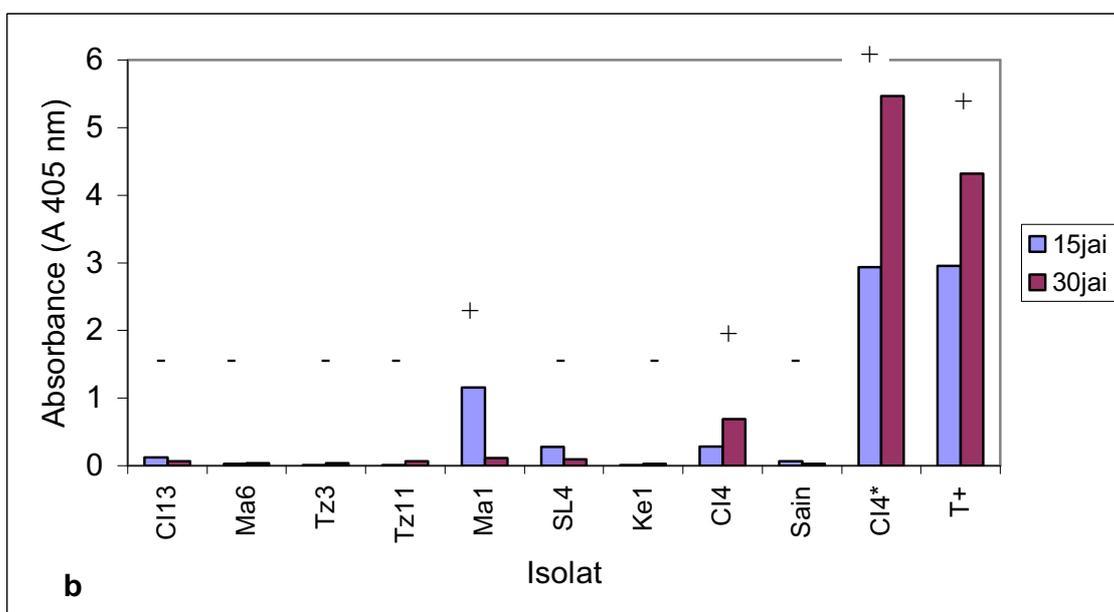
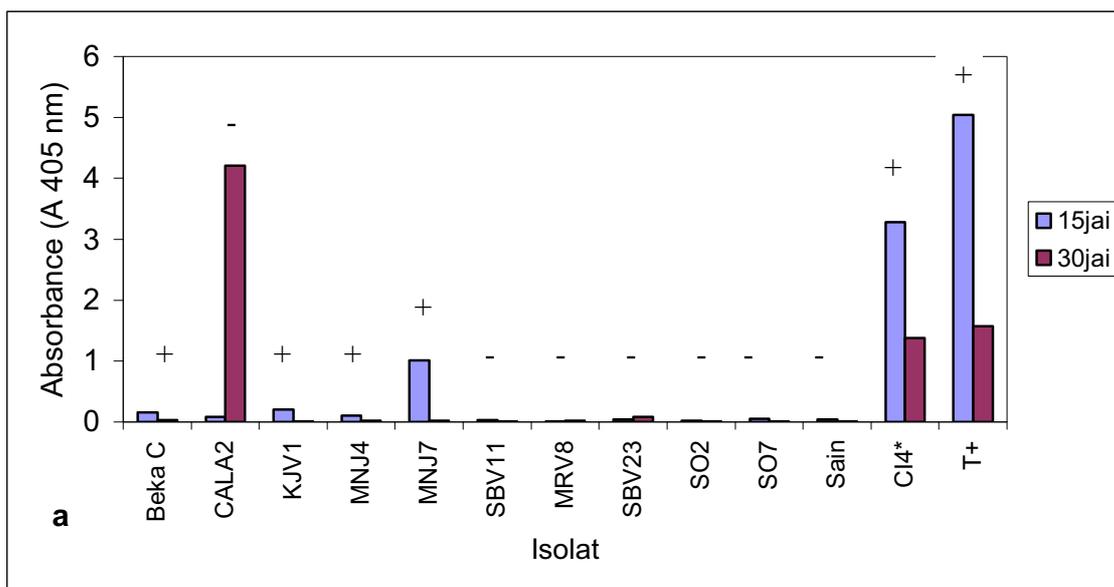


Figure 22. Réponse des variétés *Bekarosaka*, *Gigante* (rymv 1-2), *Tog5681* (Rymv 1-3) et *IR64* (Rymv 1-1) aux isolats BF1, BFa5, CI4* évaluée par symptomatologie à 30 jours après inoculation (jai).

2.3.3.2 Stabilité de la résistance de *Bekarosaka*

En général, la résistance de *Bekarosaka* au RYMV est stable au cours du temps vis-à-vis de la plupart des isolats : absence de symptôme, niveau de virus non détectable par ELISA (Figure 23). De réponses positives (symptôme, teneur en virus) ont été parfois détectées. Cependant, il s'agissait de réponses ponctuelles : symptôme localisés à une feuille, teneur en virus légèrement supérieure au seuil de signification. Dans aucun des cas, l'infection ne se généralisait et l'accumulation virale ne s'accroissait. Selon la réponse de la variété *Bekarosaka* à l'infection, quatre pathotypes peuvent être distingués :

- isolats ne provoquant pas de symptôme ni multiplication de virus (indétectable par ELISA): MRV8, SBV23, SO3, SO7, Ke1, Ma6, Tz3, Tz11.
- isolats induisant l'apparition de symptôme sans virus détectable par ELISA: SBV11, BekaC
- isolats ayant une teneur en virus positive mais sans symptôme: CALA2
- isolats montrant à la fois du symptôme et du virus (teneur en virus positive): KJV1, MNJ4, MNJ7, CI13, Ma1, SL4, CI4



+ : présence de symptôme
 - : absence de symptôme

Figure 23. Teneur en virus à 15 et 30 jai de la variété *Bekarosaka* inoculée par dix isolats venant des différentes régions rizicoles de Madagascar (a) et de huit isolats représentant les 6 souches africaines (b).

2.3.4 Appartenance de la variété *Bekarosaka* à la sous-espèce *indica*

Les caractères morphologiques tels que le port de la feuille paniculaire, la hauteur de la plante, le nombre élevé de talles, le format des graines rapprochent la variété *Bekarosaka* de la variété *indica* Gigante et la différencie de la variété *japonica* Azucena (Tableau 4). Ce résultat suggère donc que la variété *Bekarosaka* est de type *indica*. De plus, ces caractères différencient aussi la variété *Bekarosaka* de la variété Gigante. La variété *Bekarosaka* possède les traits caractéristiques suivants: un limbe très long, une glumelle avec des sillons dorés sur fond paille et un cycle long influencé par la photopériode.

Les graines de la variété *Bekarosaka* se sont oxydées comme celles de la variété IR64, indiqué par le noircissement des téguments et de l'aquaphénol (Figure 24). Par contre, les graines de la variété Nipponbare, témoin *japonica*, sont restées jaunes claires et l'aquaphénol limpide. Cette réaction positive au test phénol est une caractéristique des variétés *indica* suggérant aussi que la variété *Bekarosaka* est du type *indica*.

Les marqueurs microsatellites ont révélé différents allèles sur les 7 plantes de *Bekarosaka* (Figure 25).

RM1 (3 allèles) :

- allèle A formé par B5 et B7 divisé entre *indica* et *japonica*,
- allèle B formé par B1 et B6 divisé également entre *indica* et *japonica*,
- allèle C formé par B2, B3 et B4 exclusivement *indica*

Donc, RM1 plaide en faveur des *indica*

RM5 (2 allèles) :

- allèle A formé par B3
- allèle B formé par B1, B4, B5, B6 et B7 qui sont proches des *indica*

Donc RM5 plaide aussi en faveur des *indica*.

RM11 (3 allèles) :

- allèle A formé par B3
- allèle B formé par B1
- allèle C formé par B4, B5, B6, B7
- Les trois plaident en faveur des *indica*.

RM18 (3allèles) :

- allèle A formé par B3 (*indica*)
- allèle B formé par B1, B4, B6 (proche de Gigante)

- allèle C formé par B5 et B7 qui est partagé entre *indica* et *japonica*, Ce marqueur n'a donc pas été concluant.

RM19 (2 allèles) :

- allèle A formé par B3
- allèle B formé par B1, B2, B4, B5, B6, B7, les deux allèles plaidant pour *indica*.

RM167 n'a pas montré d'hétérogénéité comme les cinq autres, il n'y avait qu'un allèle indiquant la sous-espèce *indica*.

Cinq marqueurs microsatellites sur six ont plaidé en faveur de la sous-espèce *indica*, confirmant les résultats obtenus sur la morphologie et le test phénol.

Les trois résultats (morphologie, test phénol et marqueurs microsatellites) ont confirmé que la variété malgache *Bekarosaka* issue d'une population locale, appartient bien à la sous-espèce *indica*. Les caractéristiques morphologiques distinguent clairement la variété *Bekarosaka* de la variété Gigante.

Tableau 6: Détermination morphologique de la sous-espèce de la variété *Bekarosaka*

CARACTERISTIQUES	<i>Bekarosaka</i>	Gigante: Témoin Indica	Azucena: Témoin Japonica
Gaine foliaire	vert	vert	vert
Longueur du limbe	60 cm	35 cm	35 cm
Largeur du limbe	10 mm	11 mm	13 mm
Pubescence	Moyennement poilu	Moyennement poilu	Moyennement poilu
Couleur du limbe	Vert	Vert foncé	Vert pâle
Port de la plante	érigé	érigé	érigé
Port de la feuille paniculaire	érigé	érigé	horizontale
Couleur du stigmate	Blanc	Blanc	Blanc
Hauteur de la plante	115 cm	99 cm	70 cm
Nombre de talles	15	8	4
Résistance à la verse	résistante	sensible	moyennement résistante
Longueur de la panicule	16 cm	16 cm	14 cm
Ramification secondaire	légère	légère	Peu ramifié
Couleur de l'apex	Paille	Paille	Pourpre
Couleur de la glumelle	Sillons dorés sur fond paille	jaune clair	paille
Forme du grain	Demi-long	Long	Rond
Poids de 1000 grains	25 g	25 g	28 g
Translucidité	1/4 de la section opaque	petite tâche centrale	1/4 de la section opaque
Cycle végétatif moyen	135 j (photopériodique)	112 j	125 j

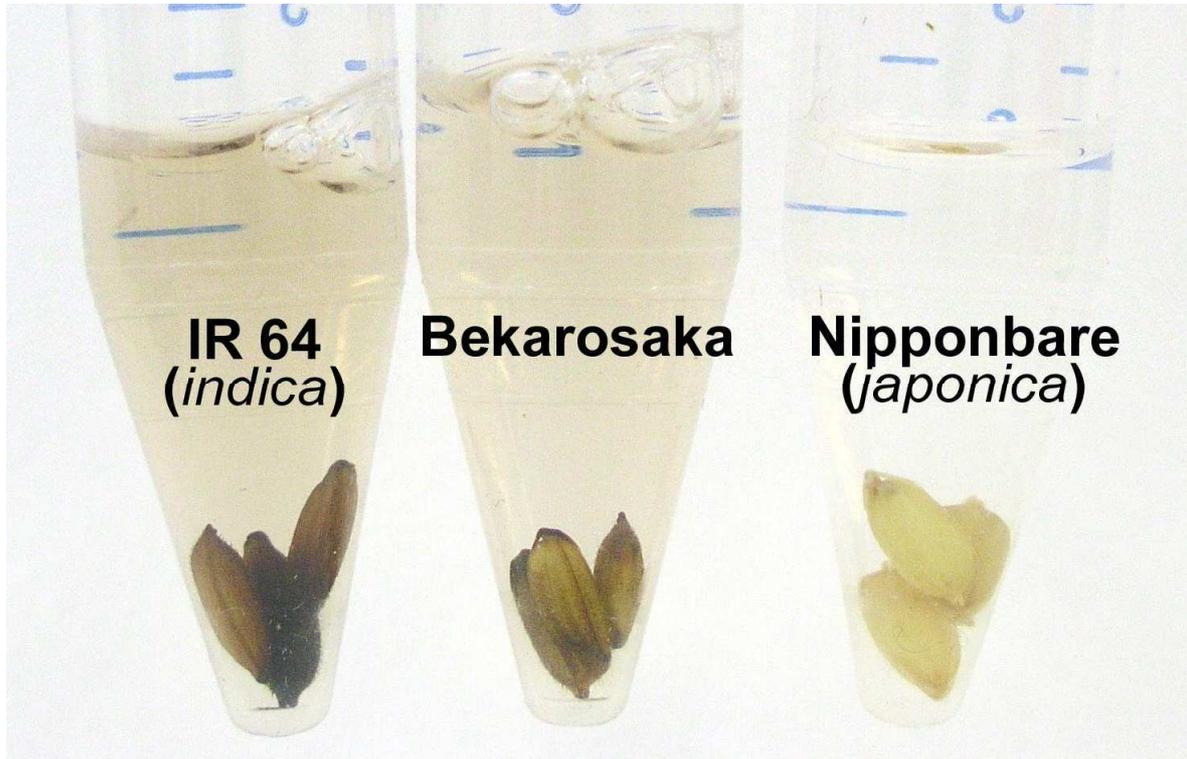
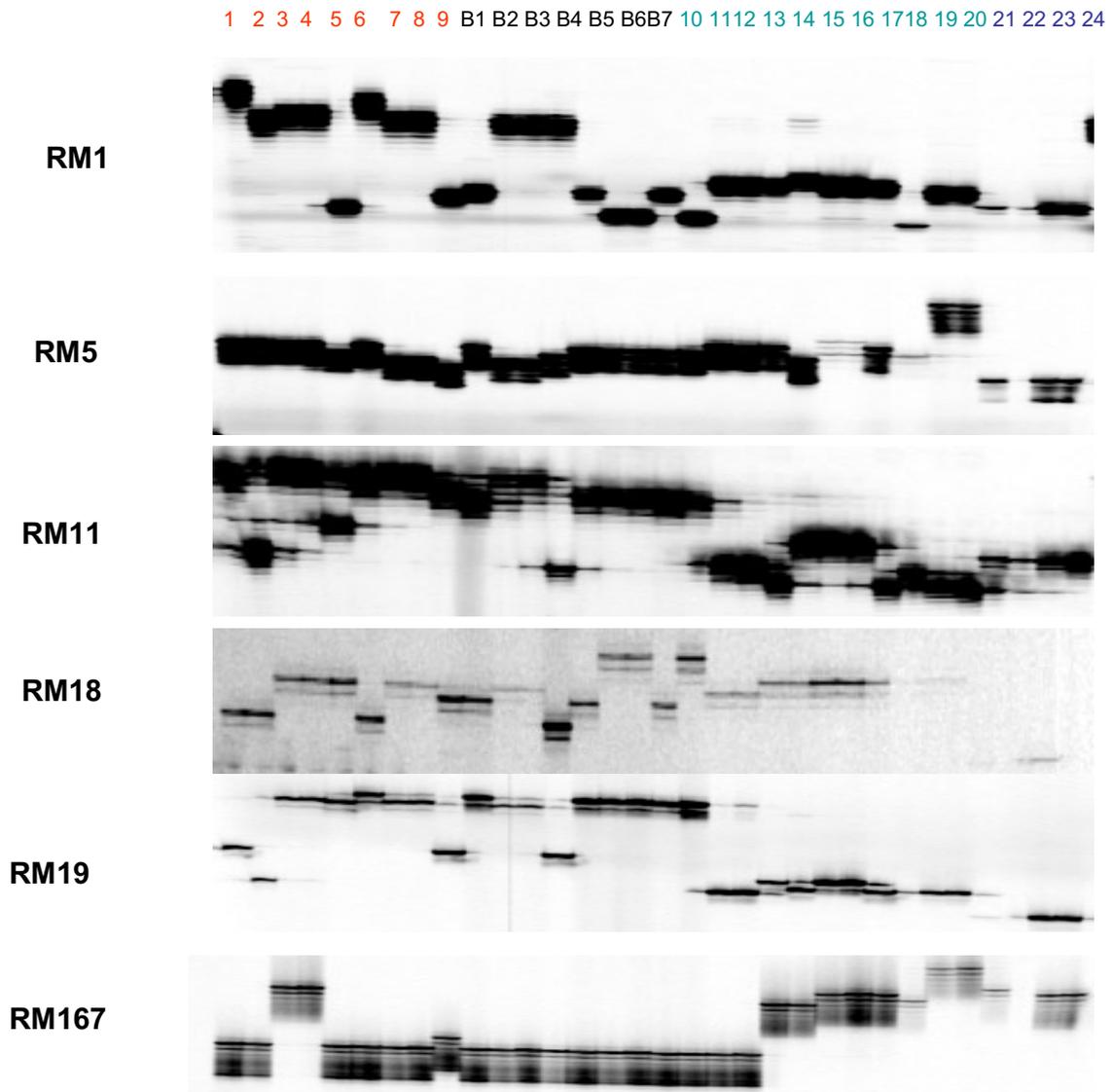


Figure 24. Réaction au phénol des graines de la variété *Bekarosaka* en comparaison avec ceux des témoins IR64 (*indica*) et Nipponbare (*japonica*).



Témoins indica (en rouge) : 1 : ASD, 2 : MTU, 3 et 4 : IR5, 5 : Carreon, 6 : Kaw Dawk Mali, 7 et 8 : IR64 et 9 : Gigante

Témoins japonica (en vert) : 17 et 18: Pate B, 19 : Canarg, 20 : Hawmon, 21 et 22 : Carolina, 23 : Morobérékan, 24 : Nipponbare, 25 et 26 : Azucena

Témoins glaberrima (en bleu) : 27 : Tog 5681, 28 : Tog 5674, 29 et 30 : Tog 5673

Figure 25. Migration des ADNs de 7 plantes de *Bekarosaka* numérotées B1 à B7 avec les marqueurs microsatellites (RM : rice microsatellite) RM1, RM5, RM11, RM18, RM19, RM167 lue avec le séquenceur Li-Cor DNA analyzer.

2.3.5 Génotype de la résistance de la variété *Bekarosaka*

2.3.5.1 Déterminisme génétique de la résistance de la variété *Bekarosaka*

L'observation des symptômes après inoculation mécanique de l'isolat BF1 a mis en évidence 9 plantes résistantes et 38 plantes sensibles sur le total de 47 plantes de la population F2 du croisement *Bekarosaka* x IR64 (Tableau 5). Cette ségrégation n'est pas significativement différente d'une ségrégation 1 : 3 ($\chi^2 = 0.86$, 1 ddl) et suggère que la résistance est contrôlée par un gène majeur récessif. Trois hybrides F1 du croisement Gigante x *Bekarosaka* et une trentaine de plantes F2 issues de l'autofécondation de ces hybrides se sont avérés résistantes au RYMV. Ce résultat indique que le même gène est impliqué dans la résistance des variétés Gigante et *Bekarosaka*.

Les marqueurs microsatellites RM252 et RM273 ont tous les deux montré du polymorphisme entre les variétés IR64 et *Bekarosaka*. Le marqueur RM252 coségrège parfaitement avec la résistance ; le marqueur RM273 montre deux recombinaisons par rapport au gène de résistance et 4 recombinaisons avec le marqueur RM 252 (Tableau 5). La cartographie génétique du gène de *Bekarosaka* par rapport aux marqueurs RM252 et RM273 indique une colocalisation avec le gène majeur des variétés Gigante et Tog 5681 (Figure 26).

Les résultats obtenus sur les populations IR64 x *Bekarosaka* et Gigante x *Bekarosaka* mettent en évidence que la résistance de la variété *Bekarosaka* au RYMV est contrôlée par le gène majeur récessif de résistance identifié dans les variétés Gigante et Tog 5681.

Tableau 7. Phénotype de résistance dans la population F2 IR64 x *Bekarosaka* et coségrégation avec le génotype aux marqueurs microsatellites RM252 et RM273

Plante	Phénotype	RM252	RM273
1	R	BB	BB
2	S	BI	BI
3	S	BI	II
4	S	BI	BI
5	S	II	II
6	S	BI	BI
7	S	BI	BI
8	S	BI	BB
9	S	BI	BI
10	S	II	II
11	S	BI	BI
12	S	II	II
13	S	II	II
14	S	BI	BI
15	S	BI	BI
16	S	II	II
17	S	BI	BI
18	S	BI	BI
19	S	II	II
20	S	II	II
21	R	BB	BB
22	S	BI	BI
23	S	BI	BI
24	S	II	BI
25	S	II	II
26	S	II	II
27	S	II	II
28	S	BI	BI
29	S	II	II
30	S	BI	BI
31	S	II	II
32	R	BB	BB
33	S	BI	BI
34	R	BB	BI
35	R	BB	BB
36	S	BI	BI
37	S	II	II
38	S	BI	BI
39	R	BB	BB
40	S	BI	BI
41	S	BI	BI
42	S	BI	BI
43	R	BB	BB
44	S	II	II
45	R	BB	BB
46	R	BB	BB
47	S	BI	BI

B : allèle de *Bekarosaka*, I : allèle de IR64, R: résistant, S: sensible

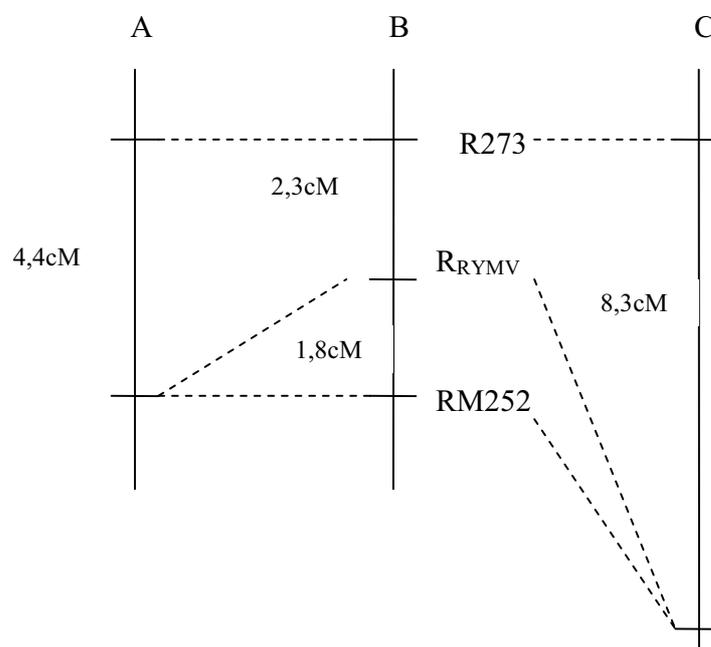


Figure 26. Cartographie génétique du gène de résistance identifié dans la population IR64 x *Bekarosaka* (A) par rapport aux marqueurs RM252 et RM273 et comparaison avec les populations IR64 x Gigante (B) et IR64 x Tog5681 (C) (Albar et al, 2003)

2.3.5.2 Mutation de la zone conservée du gène conférant la résistance de Gigante au RYMV retrouvée chez la variété *Bekarosaka*

Le séquençage et la comparaison des séquences d'acides aminés de la zone conservée du gène eIF(iso)4G a montré que la variété *Bekarosaka* possède la même mutation que la variété Gigante. Il s'agit de la substitution de la lysine (E) chez les variétés sensibles IR64 et la Tog5673 en acide glutamique (K) à la position 309 du gène (Figure 27). Les variétés *glaberrima* résistantes Tog5672 et Tog5681 ont montré une autre substitution à la position 321 ou une délétion à la position 322, respectivement. Ce résultat confirme celui sur la spécificité où la variété *Bekarosaka* et la variété Gigante réagissaient de la même façon vis-à-vis des isolats BF1, BFa5 et CI4* alors que la variété Tog5681 se distinguaient d'elles. Les variétés *Bekarosaka* et Gigante qui sont toutes les deux de type *indica*, partagent le même allèle qui est différent de celui des *glaberrima*.

		252	262	272	282	292	302
IR64	DVISLIFEKA	VFEPTFCPMY	AQLCSDLNEK	LPSFPSEEPG	GKEITFKRVL	LNNCQEAPEG	
Gigante
Bekarosaka
Tog5673
Tog5681
Tog5672

		312	322	332	342	352	359
IR64	AESLRAEIAK	LTGPDQEMER	RDKERIVKLR	TLGNIRLIGE	LLKQKMVPEK	IVHHIVQ	
GiganteK.....
BekarosakaK.....
Tog5673	D.....
Tog5681	D.....
Tog5672	D.....K.....

Figure 27. Séquences d'acides aminés d'une partie du domaine conservé du gène de résistance au RYMV chez *Bekarosaka* en comparaison avec les variétés résistantes Gigante (rymv 1-2), Tog5681 (rymv 1-3), Tog5672 (rymv 1-4) et les variétés sensibles IR64 et Tog5673 (rymv 1-1).

2.4 DISCUSSION

A Madagascar, la lutte variétale est la méthode la plus prometteuse pour contrôler une maladie de plante. La forte diversité génétique qui offre de bonnes chances de trouver une résistance, le respect de l'environnement allant de pair avec la cherté des produits chimiques qui réduisent la lutte chimique. Le germplasma malgache est constitué de plus de 4000 variétés. Près d'une centaine est cultivée dans les différentes zones rizicoles du pays aux conditions agroclimatiques spécifiques. Après l'apparition de la panachure jaune du riz en 1990, toutes les variétés ont été confrontées au RYMV. La résistance variétale au RYMV est recherchée dans le cadre du programme du FOFIFA et dans d'autres instituts partenaires étrangers. Un total de 503 accessions a montré des résultats consistants après trois tests de confirmation. Vu le grand nombre de variétés à étudier, le criblage a été conduit par étapes. La population totale a montré une distribution avec une fréquence élevée de notations ($S = 7$ et $S = 9$), signifiant que les variétés sensibles sont nombreuses. Les variétés sans symptôme ($S = 1$) sont rares et sont constituées de variétés *glaberrima*, de variétés pluviales, de lignées Tox, d'une seule variété traditionnelle indica *Bekarosaka* et de quelques sélections locales ON et T. Les variétés très

sensibles de score 9 sont en faible effectif. En effet, les variétés les plus sensibles ont été éliminées par l'infection ou écartées des programmes de sélection. La plupart des introductions, sélectionnées pour la résistance au RYMV, possèdent déjà un niveau de résistance. Une proportion importante de variétés a une notation de 3 et 5, signifiant la possibilité de sélectionner des variétés malgaches modérément résistantes et tolérantes. La sensibilité des lignées venant de l'IRRI par rapport aux variétés traditionnelles malgaches a été notée. Les lignées IR ont été introduites à Madagascar avant l'apparition de la panachure jaune du riz et ont été sélectionnées pour leur haute productivité et leur résistance ou tolérance à des stress abiotiques (toxicité, sécheresse ou inondation). Ce type de plant de riz à haut rendement a une réponse très positive à la fertilisation, caractéristique souvent propice à la sensibilité aux maladies en général. Deux cents trente-trois variétés choisies en raison de la faiblesse du symptôme exprimé avaient subi des tests de confirmation par ELISA. La teneur en virus, estimée par ELISA, n'avait pas de relation avec l'expression des symptômes. Notamment les 12 variétés *glaberrima* sans symptôme dans ce criblage avaient une teneur en virus positive. Leur résistance est partielle. Les autres variétés *glaberrima* de la population sont sensibles comme a été trouvée auparavant la Tog 5673 qui sert de témoin sensible (Albar et al, 2006). Nous n'avons pas retrouvé chez *O. glaberrima* les variétés hautement résistantes identifiées auparavant (Ndjondjop et al, 1999).

La plupart de variétés avaient une teneur en virus moyenne. Sur les 503 variétés criblées, seule la variété traditionnelle *Bekarosaka* présentait à la fois une teneur en virus indétectable par ELISA et une absence de symptôme. Cette résistance élevée chez l'espèce de riz *O. sativa* est exceptionnelle puisque jusqu'à présent la variété Gigante a été la seule trouvée après de longues années de sélection de différents organismes nationaux et internationaux. Les créations locales T 70722, T 70723, T70721, T70751, T70752 et T70753, ON 332 et ON 333 ont montré une faible teneur en virus. Ces lignées ont été sélectionnées en gardant le type de plant de variétés de bas-fonds et le type de grain apprécié au Nord-ouest et leur étude a été poursuivie à Montpellier (France) avec les variétés *Bekarosaka*, *Mahadigny* et *Maintimbotsy*. Comme les régions rizicoles infectées par RYMV à Madagascar sont principalement irriguées ou pluviales de bas-fonds, la sélection a plutôt été orientée vers la recherche de variétés propre à ce type de riziculture. L'espèce *O. sativa*, avec des variétés traditionnelles, locales ou récemment introduites pendant l'intensification de la production rizicole, a aussi été privilégiée. A l'issue de l'étude approfondie des 13 variétés à l'IRD Montpellier, la variété *Bekarosaka* a confirmé sa résistance élevée. La priorité a alors été donnée à cette variété prometteuse. La variété *Bekarosaka* a été prospectée dans la région d'*Ambanja* au nord de Madagascar qui est infectée par RYMV. Sa résistance a été

remarquée par les riziculteurs et est restée stable pendant deux années de criblage à Madagascar. Le phénotype de la résistance de la variété *Bekarosaka* est semblable à celui de la variété Gigante : absence de symptôme et pas de charge virale après inoculation de l'isolat avirulent BF1 et ayant des symptômes et une charge virale élevée avec les isolats virulents BFa5 et CI4*. La stabilité de sa résistance vis-à-vis de plusieurs isolats malgaches et africains a été démontrée. Des symptômes localisés ou des réactions positives ont parfois été observés. Mais ils sont restés très localisés. De tels phénomènes se sont apparus souvent pendant peu de jour après inoculation mais souvent ont disparu peu après et le virus n'a jamais été détecté par ELISA au moment du prélèvement. Ces isolats contournants potentiels ont donné un indice pour l'étude de la durabilité de la résistance où les inoculations en série peuvent induire le symptôme systémique. Des résistances partielles ont été trouvées chez les Tox 3219-51-1-3-2-2B et Tox 3233-31-6-2-1-1A qui ont montré du symptôme et de la concentration virale similaires à ceux de la variété Azucena. Ces lignées Tox dérivent des croisements entre *sativa* et *japonica* (riz pluvial). Elles pourraient avoir hérité de la résistance partielle des parents *japonica*. L'intérêt de ces variétés est que leur résistance est polygénique. Leur déploiement dans les champs pose peut-être moins de risque de contournement que celui d'une variété à résistance élevée. Plusieurs variétés sont tolérantes : teneur en virus élevée mais symptôme faible.

La variété à haut rendement de type « rainfed lowland » *Mahadigny* qui est issue de la lignée IR 21015-80-1-1-2, la variété traditionnelle récemment prospectée *Maintimboty* et les créations de la station *Tsararano* ON 332, ON 333, T 70722 et T70723. Un niveau de résistance plus élevé a été observé à Madagascar avec certains de ces variétés. Les différences de comportement peuvent traduire les conditions de test plus rigoureux à Montpellier.

Pour approfondir la compréhension de la résistance de la variété *Bekarosaka*, son étude a été faite en comparaison avec la variété Gigante à résistance élevée. La sous-espèce de *Bekarosaka* a été, en premier lieu, confirmée bien que des études auparavant aient énoncé que les variétés de riz aquatique malgache sont la plupart de la sous-espèce *indica*. Trois méthodes ont été utilisées : la détermination par la morphologie, le test phénol et les marqueurs microsatellites. Quelques caractères morphologiques permettaient de différencier une variété de la sous-espèce *indica* d'une *japonica* ou d'une *javanica* qui en ce moment est considéré comme un sous-groupe de *japonica*. *Bekarosaka* paraît appartenir morphologiquement à la sous-espèce *indica* comme la plupart de variétés traditionnelles malgaches cultivées dans les zones côtières de Madagascar (Ahmadi, 1988; Rabary, 1989). Cette méthode est souvent couplée avec le test phénol qui est aussi une vieille méthode mais est fiable pour différencier une espèce *indica* d'une espèce

japonica grâce à l'oxydation des téguments de la graine de riz de type *indica*. Des marqueurs microsatellites ont été mis au point pour étudier la diversité génétique de variétés de riz. Ils permettent notamment de différencier les variétés de type *indica* du *japonica* et de plus, peuvent informer sur les différents allèles existants. La variété *Bekarosaka* est différente de la variété Azucena (*japonica*) et est plus proche de la variété Gigante sur les caractères tels que, fort tallage, format de grain demi-long, et feuille paniculaire érigée contre faible tallage, format de grain rond et feuille paniculaire horizontale chez la variété Azucena. La variété *Bekarosaka* s'est distinguée de la variété Gigante par la hauteur de la plante (115 cm vs 99 cm), sur le cycle (135 j vs 112 j) et par la couleur de la glumelle (paille avec des sillons dorés) chez la variété *Bekarosaka* tandis que jaune clair chez la variété Gigante. Les graines de la variété *Bekarosaka* ont eu des réactions positives au test phénol indiquant l'appartenance à la sous-espèce *indica* qui a été confirmée par cinq marqueurs microsatellites sur six. Trois allèles ont été distingués mettant en évidence l'origine dans une population de *Bekarosaka*. Les trois méthodes ont permis de conclure que la variété *Bekarosaka* appartient bien à la sous-espèce *indica*. Le même phénotype vis-à-vis de la résistance au RYMV est présent dans les fonds génétiques différents des variétés *Bekarosaka* et Gigante. Cette similarité nous a conduit à étudier le déterminisme génétique de la résistance de la variété *Bekarosaka* sachant que le gène de résistance des variétés Gigante et de Tog 5681 est monogénique récessif. L'étude des populations F1 et F2 du croisement *Bekarosaka* x IR64 a montré que toutes les plantes F1 étaient sensibles. La population F2 a donné le ratio 1 : 3 caractéristique de la ségrégation de gène récessif. De plus, les plantes de la génération F1 du croisement *Bekarosaka* x *Gigante* étaient toutes résistantes. Ces deux croisements ont démontré que le gène de résistance de la variété *Bekarosaka* est bien monogénique récessif tout comme celui de la variété *Gigante*. Le gène de résistance des variétés Gigante et Tog 5681 est cartographié sur le chromosome 4 et les marqueurs flanqués sur ce gène (Albar et al, 2003) ont été amplifiés et révélés sur la population F2 *Bekarosaka* x IR64. La colocalisation du gène de résistance de *Bekarosaka* renforce l'implication du même gène majeur des variétés *Gigante* et Tog 5681. La séquence d'acides aminés de l'ADN génomique de la variété *Bekarosaka* aussi a présenté la même mutation à la position 309 de la zone conservée du gène de résistance eFiso4G qui confère la résistance de *Gigante* démontré par la substitution de l'acide aminé lysine en acide glutamique (Albar et al, 2006). Celle des variétés *glaberrima* était soit une autre substitution soit une délétion sur d'autres positions, renforçant la présomption que la résistance de *Bekarosaka* est différente de celle des *glaberrima* et suggérant que chez les *indica* la résistance est conférée par la même mutation. Ces résultats confirment que les variétés *Bekarosaka* et Gigante partagent le

même gène de résistance élevée *Rymv1* et le même allèle *Rymv1-2* (Fargette et al. 2002; Traoré et al, 2006). Ces deux variétés sont originaires de Madagascar et de l’Afrique, cette coïncidence pourrait être expliquée par un échange de gène entre variétés par une intromission naturelle suivie de sélection par les cultivateurs et de mouvement d’un continent à un sous continent.

2.5 CONCLUSION

Les deux types de résistance naturelle ont été identifiés parmi les variétés malgaches. La variété traditionnelle *Bekarosaka* issue d’une prospection dans la région du Nord-ouest possède une résistance élevée équivalente à celle de la variété *Gigante* qui a servi de comparaison. Les variétés introduites Tox 3219-51-1-3-2-2B et Tox 3233-31-6-2-1-1A ont montré une résistance partielle équivalente à celle de la variété témoin *Azucena*. La résistance élevée de *Bekarosaka* a la même spécificité que celle de *Gigante* par rapport aux isolats avirulents et virulents connus. Elle montre aussi une stabilité relative aux isolats représentatifs des régions rizicoles malgaches et par rapport aux isolats africains représentatifs des souches connues. Toutefois, certains isolats ont montré des symptômes localisés et de faibles teneurs en virus qui indiquent un potentiel de contournement de résistance et qui sera élucidé dans l’étude de la durabilité.

La variété *Bekarosaka* est la deuxième *indica* identifiée après la variété *Gigante* possédant une résistance élevée au RYMV. Cette résistance est contrôlée par le même gène récessif monogénique *Rymv1* trouvé chez la première variété *indica* *Gigante* et chez la variété *O. glaberrima* Tog 5681 mais l’allèle chez les *indica* est *Rymv1-2*. Elle consiste en une substitution de l’acide aminé lysine en acide glutamique à la position 309 du facteur de l’initiation de la traduction gène eIFiso4G codé par *Rymv1*.

Les *glaberrima* étudiés ont présenté pour la plupart de la sensibilité, mais des résistances partielles ont été détectées chez Tog 6589, Tog 6629, OG 437-15, OG 392-6, OG 438-6, OG 440-11, OG 1257, OG 375-10, OG 449-20, OG 449-20, OG 449-31, OG 440-11. Elles peuvent être considérées dans des travaux d’amélioration future.

CHAPITRE III : MECANISME DE CONTOURNEMENT DE LA RESISTANCE ELEVEE DE RIZ AU RYMV PAR LES ISOLATS MALGACHES

3.1 INTRODUCTION

L'utilisation de la résistance variétale est le mode de lutte le plus prometteur contre le RYMV. En effet, les traitements insecticides contre les insectes vecteurs ne sont pas envisageables en raison de leur coût élevé, des préjudices qu'ils causent à l'environnement et de leur efficacité incertaine. Les mesures prophylactiques (élimination des repousses, des riz sauvages infectées...) sont utiles pour limiter la pression d'inoculum. Cependant, elles ne sont pas suffisantes à elles seules pour empêcher le développement des épidémies. L'utilisation de résistance variétale, de résistance élevée notamment, offre des possibilités de contrôle efficace, économique et écologique de la panachure. Il faut cependant s'assurer que ces résistances, avant d'être multipliées puis diffusées aux agriculteurs, soient durables. En effet, le contournement de la résistance compromettrait les efforts de contrôle de la maladie.

3.1.1 Contournement de résistance

Les modalités de contournement des résistances aux virus de plante ont été répertoriées (Harrison, 2002). Des études antérieures ont montré que le contournement de certaines résistances au RYMV est possible. Ainsi, une résistance partielle est-elle surmontée après inoculations répétées d'isolats (Fargette et al, 2002). De même, les allèles 2 et 3 de la résistance élevée *Rymv1* sont-ils contournés par certaines souches de quelques régions en Afrique (Konaté et al, 1977 ; Traoré et al, 2006). Le mécanisme moléculaire du contournement de l'allèle de résistance élevée *Rymv1-2* par une souche d'Afrique de l'Ouest a été élucidé. Les séquences entières d'isolats avant et après contournement ont été comparées. Une mutation spécifique de la VPg du RYMV a été observée. Son rôle dans le contournement a été vérifié par mutagenèse dirigée d'un clone infectieux (Hébrard et al, 2006).

L'issue de la confrontation entre l'isolat inoculé et la lignée résistante est étroitement dépendante de la souche inoculée (N'Guessan et al, 2001). Les études antérieures ont porté sur des isolats de RYMV d'Afrique de l'Ouest et d'Afrique Centrale. Aucune information n'est disponible en revanche sur l'aptitude des souches d'Afrique de l'Est et de Madagascar à

contourner les résistances. Dans le chapitre I, la diversité du RYMV à Madagascar a été étudiée. Dans le chapitre II, la variété hautement résistante *Bekarosaka* a été mise en évidence et caractérisée. Elle porte l'allèle 2 de la résistance élevée *Rymv1*. Dans le chapitre III, nous évaluons l'aptitude des isolats malgaches à surmonter cette résistance.

3.1.2 Contournement de la résistance de la variété *Bekarosaka*

Les isolats de RYMV de Madagascar sont très proches moléculairement. Cette homogénéité moléculaire ne préjuge cependant pas de la diversité de leurs caractéristiques pathogéniques contrastées. Dans un essai préliminaire, l'isolat malgache (Mg1) n'avait pas infecté la variété hautement résistante *Bekarosaka* (absence de symptômes, taux de virus non détectable). Dans un essai ultérieur, l'isolat KJV1 (Mg25) avait été noté comme potentiellement virulent. En effet, il induisait des symptômes de panachure localisés et avait une DO légèrement supérieure au « bruit de fonds » dans les tests ELISA. Cependant, les symptômes ne se généralisaient pas et la concentration virale n'augmentait pas au cours du temps, contrairement à ce que l'on attendait d'un isolat réellement virulent. L'isolat KJV1 n'était pas transmissible non plus de *Bekarosaka* à *Bekarosaka*. En somme, l'isolat KJV1 n'avait pas développé de virulence vis-à-vis de la variété hautement résistante *Bekarosaka*.

Le comportement de l'isolat, dénommé MRV17 (Mg16), présentait des caractéristiques pathogéniques toutes autres après inoculation de la variété *Bekarosaka*. Les symptômes de panachure devenaient rapidement systémiques, la concentration virale atteignait des taux élevés, la croissance du riz était affectée, aboutissant parfois à la mort de la plante. La transmission de plante à plante atteignait presque un taux de 100%.

Nous avons donc étudié les propriétés moléculaires de l'isolat Mg16 avant et après contournement de la résistance élevée de *Bekarosaka* (allèle 2 du gène *Rymv1*). Nous avons recherché les acides aminés susceptibles d'expliquer l'aptitude du RYMV à contourner. Nous avons ensuite étudié les mutations qui conféraient le contournement.

3.2 MATERIELS ET METHODES

3.2.1 Matériels biologiques

- Isolats : Mg16 (MRV17) : isolé et caractérisé dans le chapitre 1
Mg25 (KJV1) : isolé et caractérisé dans le chapitre 1
- Témoins :
 - CI4 : avirulent
 - CI4* : virulent sur Gigante
 - CI44A : virulent sur Gigante après passage en série
 - CI4Beka2 virulent sur *Bekarosaka* après un deuxième passage
- Variété : Bekarosaka à résistance élevée, identifiée dans le chapitre 2
 - Gigante : témoin résistant
 - IR64 : témoin sensible

3.2.2 Test de la durabilité de la variété Bekarosaka

3.2.2.1 Semis et inoculations

Une méthode semblable a été adoptée avec les deux isolats, hormis le nombre de plantes inoculées. Deux cents (200) graines de *Bekarosaka* pour l'isolat KJV1 (Mg25) et 150 graines pour l'isolat MRV17 (Mg16) ont été semées dans des bacs à raison de 50 graines par bac (Figure 28). Les plantules de 15 jours ont été inoculées avec un inoculum à concentration de 0,1 mg/ml préparé à partir de feuilles infectées de chaque isolat. Les échantillons provenaient directement des rizières de Madagascar (KJV1 de *Kianjavato* et MRV17 de *Marovoay*) et avaient été conservées à -20°C à Montpellier pendant un an, à une concentration de 0,1 mg/ml dans du tampon phosphate 0,1M, pH 7,2.

Les isolats CI4*, CI4A et CI4Beka, virulents vis-à-vis de Gigante, ont été utilisés comme témoins positifs. L'isolat CI4, avirulent sur Gigante, a été utilisé comme contrôle négatif.

Chaque isolat a été inoculé à un pot de 5 plantes de *Bekarosaka* et de Gigante. La variété IR64 a été incluse comme témoin sensible. Elle a été inoculée avec chacun des isolats à raison de 10 plantes par isolat. La variété Gigante a servi de témoin résistant. Des témoins non inoculés ont été inclus consistant en un pot de 10 plantes de chacune des variétés *Bekarosaka*, Gigante et IR64.



Figure 28. Expérimentation en cellule de culture de la durabilité de la résistance de la variété *Bekarosaka*. Un total 150 plantes (3 bacs de 50 plantes disposées en lignes de 10 plantes) ont été inoculées par l'isolat Mg16 (A). Les symptômes sont clairs 30 jours après inoculation et différents niveaux de symptômes sont distingués (B). Les plantes ont été testées par ELISA et une vingtaine ont été sélectionnées pour séquencer la VPg.

3.2.2.2 Prélèvement et broyage

Les feuilles inoculées avec les isolats témoins ont été prélevées à 15 jai. Celles inoculées avec les isolats KJV1 et MRV17 ont été prélevées lorsqu'elles exprimaient des symptômes : 30 jai pour MRV17 et 50 jai pour KJV1. Pour les plantes asymptomatiques, les 2^e dernières feuilles ont été prélevées. Si des symptômes soit sous forme de point, de trait, de panachure ou de jaunissement apparaissent, les portions de feuilles correspondantes étaient prélevées aussi. Les feuilles ont été pesées et broyées avec du tampon PBST 1X au 1/10.

3.2.2.3 Détection du RYMV par DAS-ELISA

Les échantillons de feuilles prélevés ont été testés en ELISA (Cf. chapitre I) afin de déterminer la présence et la teneur en virus.

3.2.3 Analyse des bases moléculaires du contournement

3.2.3.1 Amplification de la « viral protein genome linked » (VPg)

Seize plantes inoculées avec l'isolat Mg 16 présentant des symptômes de panachure et avec une charge virale élevée, ainsi qu'une plante sans symptôme mais aussi avec charge virale forte ont été sélectionnées pour séquencer la VPg.

- Extraction d'ARN

Les ARNs de ces plantes ont été extraits avec le kit Rneasy suivant le protocole utilisé avec les autres isolats dans le chapitre 1.

- Détection par single nucleotide polymorphism (SNP)

RT-PCR avec les amorces F1 et R1: l'amorce sens F1 (1469 à 1483nt, 5'-CCCCGCTCTACCACAA-3') et l'amorce antisens R1 (2131 à 2117nt, 5'-AAAGATGACACCCGA-3') donnent un fragment de 663 bp correspondant à la VPg. Pour détecter la VPg dans les plantes à symptômes et ayant une charge virale positive, 5 à 10 µg d'ARN total ont été mélangés avec 7,5 µl d'eau et dénaturés par incubation pendant 10mn à 65°C. La synthèse du premier brin a été conduite avec 0,01µmol dNTP, 100 pmole de l'amorce antisens R1 et 200 U de stratascript reverse transcriptase dans son tampon, le tout soumis à une température de 42°C pendant 60 mn. L'ADNc (2,5 µl) a subi ensuite une polymérisation avec

0,02 U Dynazyme DNA polymerase et son tampon, 0,01 μ mole dNTP, 30 pmole d'amorce sens F1, 10 pmole d'amorce antisens R1. Le mélange a été soumis au programme suivant:

Dénaturation :	3 mn à 94°C	
Dénaturation :	30 s à 94°C	30 cycles
Hybridation :	30 s à 45°C	
Elongation :	1 mn à 72°C	
Elongation finale :	10 mn à 72°C	
Arrêt de la réaction :	4°C	

Les produits d'amplification (10 μ l) ont été séparés sur un gel d'agarose 1% dans un tampon TAE 0,5X contenant 0,5 μ g/ml de BET (ethidium bromide). Les bandes ont été observées aux rayons UV.

- Séquençage de la VPg

Les ADNs montrant une bande de taille 663 bp ont été séquencés avec le kit « Taq Terminator » et analysés avec le séquenceur « Applied Biosystems 373 A ». Les séquences ont été ensuite alignées avec le logiciel Megalign (algorithme Clustal W) et les électrophorégrammes traités avec le logiciel Seqman.

3.2.3.2 Cinétique de la mutation/pathogénie

L'amplification et le séquençage de la VPg de 6 isolats mutants ont été réalisés à nouveau 3 et 5 mois après inoculation afin de suivre le processus du contournement.

3.3 RESULTATS

3.3.1 Contournement de la résistance de la variété *Bekarosaka* par l'isolat Mg16

L'isolat KJV1 (Mg25) n'a pas pu contourner la résistance de la variété *Bekarosaka* en dépit de la faible multiplication à bas bruit observée lors du test de stabilité. Aucune des 200 plantes testées n'a montré de symptômes systémiques ou une forte valeur ELISA, et ce jusqu'à 50 jai (Tableau 8).

Par contre, une forte valeur en ELISA a été obtenue dès 30 jai chez 119 des 150 plantes de la variété *Bekarosaka* inoculées par l'isolat Mg16. Parmi les 119 plantes où le RYMV était détecté, les symptômes s'échelonnaient de quelques points à des symptômes systémiques avec la répartition suivante : 14 plantes ont montré avec des points ou des traits (score 3), 46 plantes avec des symptômes de panachure (score 5), 7 plantes avec un jaunissement généralisé (score 7) et une plante avec une nécrose (score 9). La résistance de la variété *Bekarosaka* a donc été largement contournée par l'isolat Mg16. Le nombre de plantes inoculées n'explique pas les différences de comportement entre les isolats Mg25 et Mg16 puisque 200 plantes ont été inoculées avec Mg25 et 150 avec Mg16. Ce sont les caractéristiques moléculaires de Mg16 qui expliquent son aptitude au contournement.

Tableau 8. Pathogénie de deux isolats avirulents Mg16 et Mg25 sur la résistance de *Bekarosaka*

Isolat	Nombre de plantes	Apparition de symptômes ¹ /prélèvement de feuilles ²	Plantes positives en ELISA	Evaluation de symptômes et de présence de virus					
				0	1	3	5	7	9
KJV1 (Mg25)	200	50 JAI ²	0	200	0	0	0	0	0
MRV17 (Mg16)	150	30JAI ¹	119 (79,3%)	31	50	14	46	7	1

0 : virus – symptôme -, 1 : virus + symptôme -, 3 : virus + symptôme + (trait), 5 : virus + symptôme + (panachure), 7 : virus + symptôme + (jaunissement), 9 : virus + symptôme + (Nécrose)

3.3.2 Bases moléculaires du contournement de la résistance de *Bekarosaka*

3.3.2.1 Trois domaines de mutations de l'isolat Mg16

L'amplification de la VPg de 16 variants de l'isolat Mg16 issus de feuilles présentant des symptômes et contenant du virus (DO positive), ainsi que d'un isolat prélevé d'une feuille sans symptôme mais avec du virus, a révélé la bande attendue de 663 bp, de taille identique à celle du témoin positif CI4Beka2 (Figure 29). Les produits d'amplification ont été

séquencés. La séquence de la VPg des isolats devenus virulents a été comparée à celle de l'isolat avirulent inoculé.

La comparaison a mis en évidence trois codons mutés un mois après inoculation (Tableau 9) dont :

- un codon majoritaire en position 1728-1730 (codon 48), chez 8 isolats sur 17 (47%), ainsi que chez les isolats témoins CI4*, CI44A. Il a été trouvé également chez les isolats virulents CI4gig66A, CI4Beka2 et CI4gig4ABeka dans des tests antérieurs.
- deux codons minoritaires en position 1708-1710 (codon 42) chez 4 isolats sur 17 (23,5%) et en position 1738-1740 (codon 52) chez 4 isolats sur 17 (23,5%).

Deux isolats virulents sur 17 n'ont montré aucune mutation dans la VPg : ce sont les isolats Mg16-7 avec virus et avec symptôme, et Mg16-9 avec virus mais sans symptôme. La relation entre la virulence et la mutation n'est donc pas toujours synchrone. Une cinétique d'apparition des mutations chez les 17 isolats devenus virulents a été alors entreprise afin de comprendre le mécanisme de la pathogénie de l'isolat Mg16.

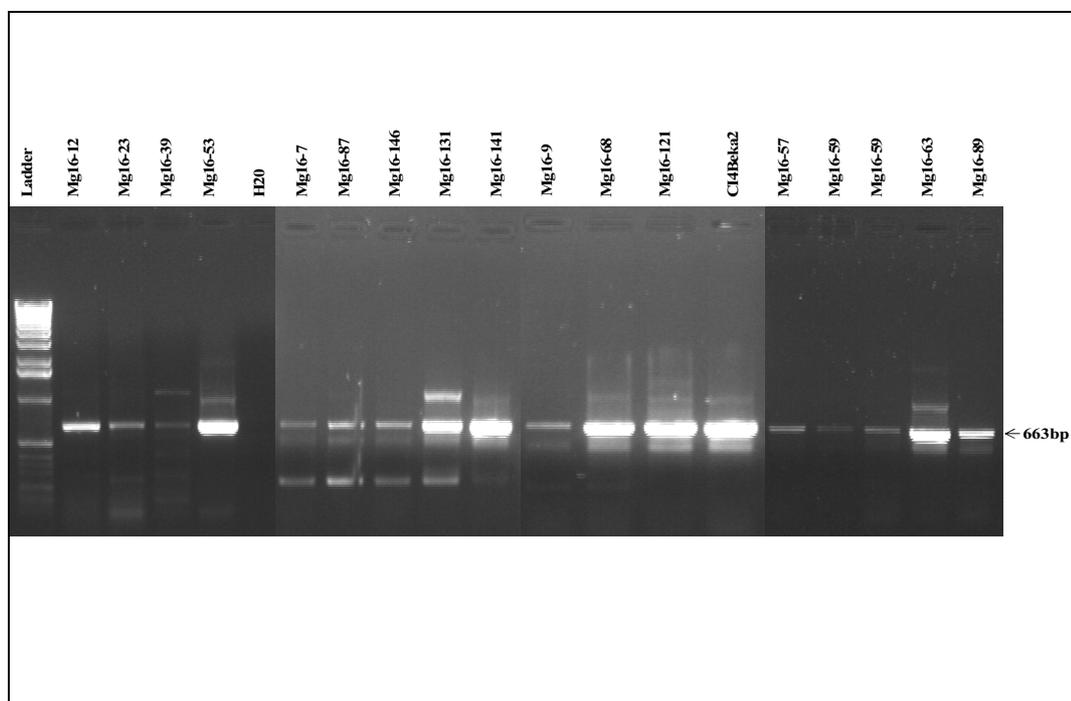


Figure 29. Amplification de la VPg chez les isolats virulents dérivés de l'isolat Mg16 avec le témoin CI4Beka2 et le marqueur de poids Ladder.

Tableau 9. Les différentes mutations de l'isolat Mg16 sur 17 plantes de la variété *Bekarosaka* sélectionnées dans une population de 150 plantes un mois après inoculation

Isolat	Symptôme et virus/ELISA	Position 1708-1710		Position 1728-1730		Position 1738-1740	
		Nucléotide	Acide aminé	nucléotide	Acide aminé	nucléotide	Acide aminé
Mg16 (avirulent)	Sans symptôme ni virus	AAC	asn	AGA	arg	CAC	his
Mutants émergents							
Mg16-7	Symptôme + virus	AAC	asn	AGA	arg	CAC	his
Mg16-9	Virus seul	AAC	asn	AGA	arg	CAC	his
Mg16-12	Symptôme + virus	AAC	asn	AGA	arg	CAC/TAC	his/tyr
Mg16-23	Symptôme + virus	ACC	thr	AGA	arg	TAC	tyr
Mg16-39	Symptôme + virus	AAC	asn	AGA	arg	CAC	his
Mg16-53	Symptôme + virus	AAC	asn	AGA	arg	CAC	his
Mg16-57	Symptôme + virus	AAC/TAC	asn/tyr	AGA	arg	CAC	his
Mg16-59	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA	gly	CAC	his
Mg16-63	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA	gly	CAC	his
Mg16-68	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA/GAA	gly/glu	CAC	his
Mg16-87	Symptôme + virus	ATC	ile	AGA	arg	CAC	his
Mg16-89	Symptôme + virus	AAC	asn	AGA	arg	TAC	tyr
Mg16-121	Symptôme + virus	AAC	asn	AGA	arg	TAC	tyr
Mg16-131	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA	gly	CAC	his
Mg16-141	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA/GAA	gly/glu	CAC	his
Mg16-146	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA/GAA	gly/glu	CAC	his
Mg16-148	Symptôme + virus	AAC/TAC	asp/tyr	AGA	arg	CAC/TAC	his/tyr
Témoins sur Bekarosaka							
CI4	Sans symptôme ni virus	AAC	asn	AGA	arg	CAC	his
CI4Beka2	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA/GAA	gly/glu	CAC	his
CI4gig4A/Bekarosaka	Symptôme + virus	AAC	asn	GAA	glu	CAC	his
Témoins sur variétés connues							
CI4	Sans symptôme ni virus	AAC	asn	AGA	arg	CAC	his
CI4*	Symptôme + virus	AAC	asn	ATA	ile	CAC	his
CI4gig4A/Gigante	Symptôme + virus	AAC	asn	GGA	gly	CAC	his
CI4gig66A/IR64	Symptôme + virus	AAC	asn	GTA	val	CAC	his

3.3.2.2 Cinétique d'apparition des mutations de virulence sur le codon 48

- Un mois après inoculation

Différents scénarios ont été observés à 1 mois après inoculation au codon 48 (nt 1728-1730) :

1) L'isolat Mg16-7 présentant du virus et du symptôme et l'isolat Mg16-9 présentant du virus uniquement sont restés identiques à l'isolat sauvage Mg16 c'est-à-dire ils ont gardé le codon AGA à cette position bien que leur phénotype soit différent (Tableau 9, Figure 30). Ce résultat confirme que la fixation de la mutation de virulence n'est pas nécessairement synchronisée de l'apparition de symptômes et de l'accumulation virale. Dans ces deux cas, la compétition entre les formes avirulentes et virulentes n'aboutit pas à l'élimination immédiate de la forme avirulente (cf. Discussion).

2) La mutation au codon AGA (aa : arginine) de l'isolat avirulent Mg16 en GGA (aa : glycine) chez les mutants virulents Mg16-59, Mg16-131 est illustrée en Figure 31 et résumée dans le Tableau 9.

3) L'analyse des électrophorégrammes révèle des mélanges de mutations : on observe ainsi le mélange AGA et GGA chez le variant Mg16-146. Ce résultat suggère que le passage d'arginine AGA en acide glutamique GAA se fait par l'intermédiaire de la glycine GGA. La présence du même mélange a été observée chez le témoin CI4Beka2 obtenu après un second passage de CI4 sur la variété *Bekarosaka*. Dans ce mélange, l'acide glutamique (GAA) est majoritaire et la glycine (GGA) minoritaire (Figure 32).

Le deuxième mélange a été observé chez les mutants Mg16-68 et Mg16-141, mélange qui concerne l'étape GGA/GAA (glycine/acide glutamique) (Tableau 9). L'électrophorégramme de l'isolat Mg16-141 illustre les deux cas (Figure 33). Ce résultat conforte l'existence d'une étape intermédiaire de mutation, la glycine, entre l'arginine de l'isolat avirulent à l'acide glutamique de l'isolat virulent.

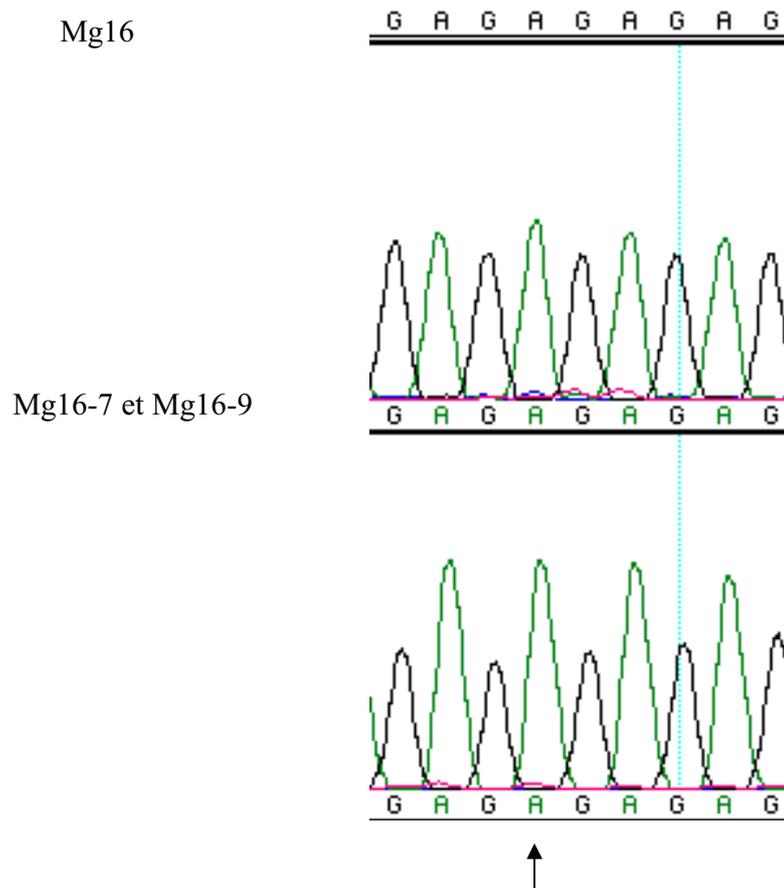


Figure 30. Electrophorégramme des séquences de la VPg des isolats Mg16-7 ayant du virus et de symptôme et Mg16-9 ayant du virus uniquement. Aucun changement n'est observé au codon 48 ni ailleurs dans la VPg.

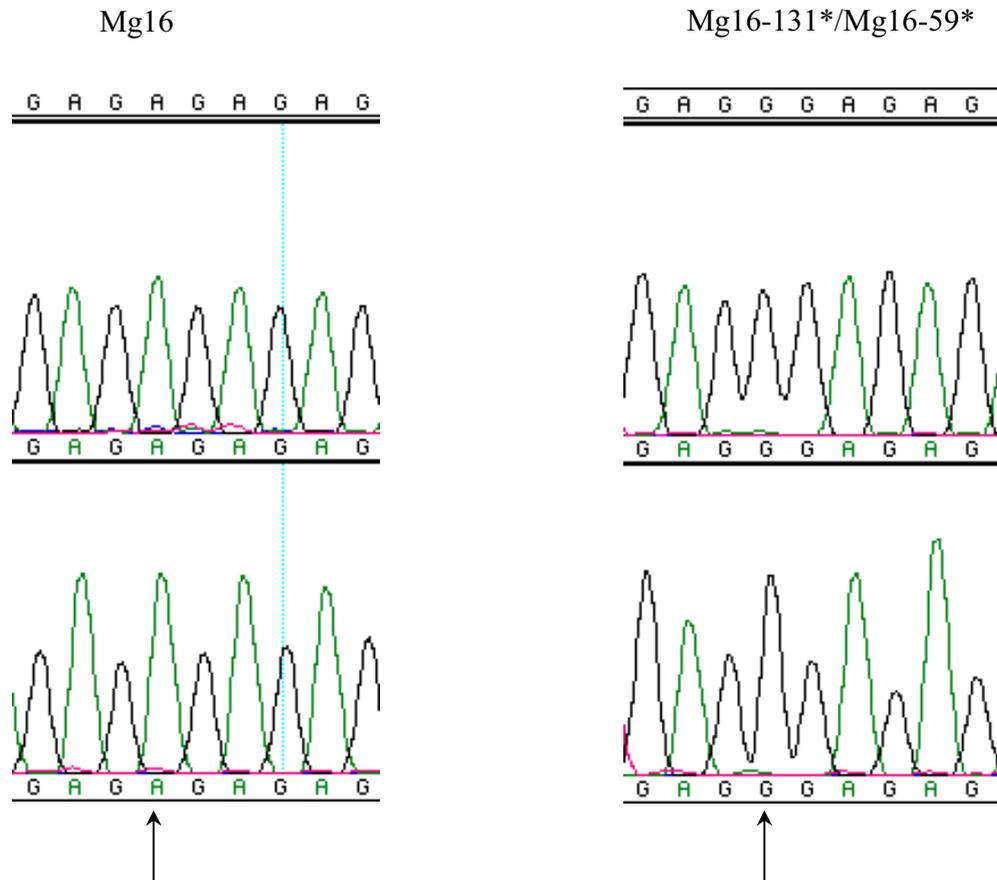


Figure 31. Electrophorégramme montrant la mutation des isolats Mg16-59 et Mg16-131 à la position 1728-1730 consistant au changement du codon AGA de l'isolat avirulent Mg16 en GGA

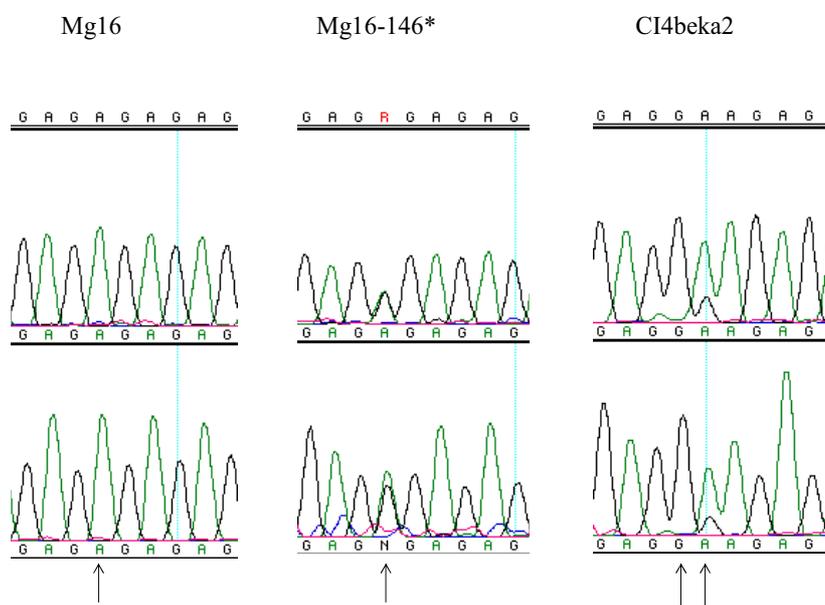


Figure 32. Electrophorégramme montrant le mélange G/A en position 1728 du mutant Mg16-146 comparé à l'isolat avirulent Mg16 et l'isolat double mutant CI4Beka2.

- Evolution au cours du temps

Le suivi des 17 isolats du tableau 9 à 3 et à 5 mois après inoculation par de nouveaux séquençages de la VPg a montré que 9 isolats sur 17 ont une mutation à la position 1728-1730 (Tableau 10). Cinq variants se sont révélés dès un mois après inoculation dont trois avec le codon GGA (Mg16-59, Mg16-63, Mg16-131) et deux avec un mélange GGA/GAA (Mg16-68 et Mg16-146). Chez les quatre autres qui n'ont pas muté à un mois après inoculation, Mg16-7 a muté directement en GAA à 3 mois après inoculation confirmant que l'acquisition de l'état virulent est bien liée à une mutation de la VPg, mais cette dernière peut survenir après les symptômes de RYMV, alors même que le virus est détectable. La même constatation a été faite avec les isolats Mg16-9 et Mg16-53 qui n'ont acquis les mutations de virulence que 5 mois après inoculation ; dans ce cas le codon GAA a été observé, mais pas l'étape intermédiaire GGA. L'isolat Mg16-9 a aussi la particularité de se multiplier sur la variété résistante *Békarosaka* sans provoquer de symptômes. Le

variant virulent Mg16-12 présente une particularité unique : il possède le codon ACA (aa : thréonine) en mélange avec le codon AGA (aa : arginine). Ce variant possède aussi une mutation sur une position en aval (1738-1740). Hormis ce variant, tous les isolats ont évolué en GAA. L'acide glutamique (GAA) est donc l'évolution majoritaire et ultime des changements qui se produisent sur le codon 48 après infection de la variété résistante *Bekarosaka*. Ce motif a été observé aussi chez les témoins CI44ABeka et CI4Beka2 respectivement seul ou en mélange avec le motif GGA.

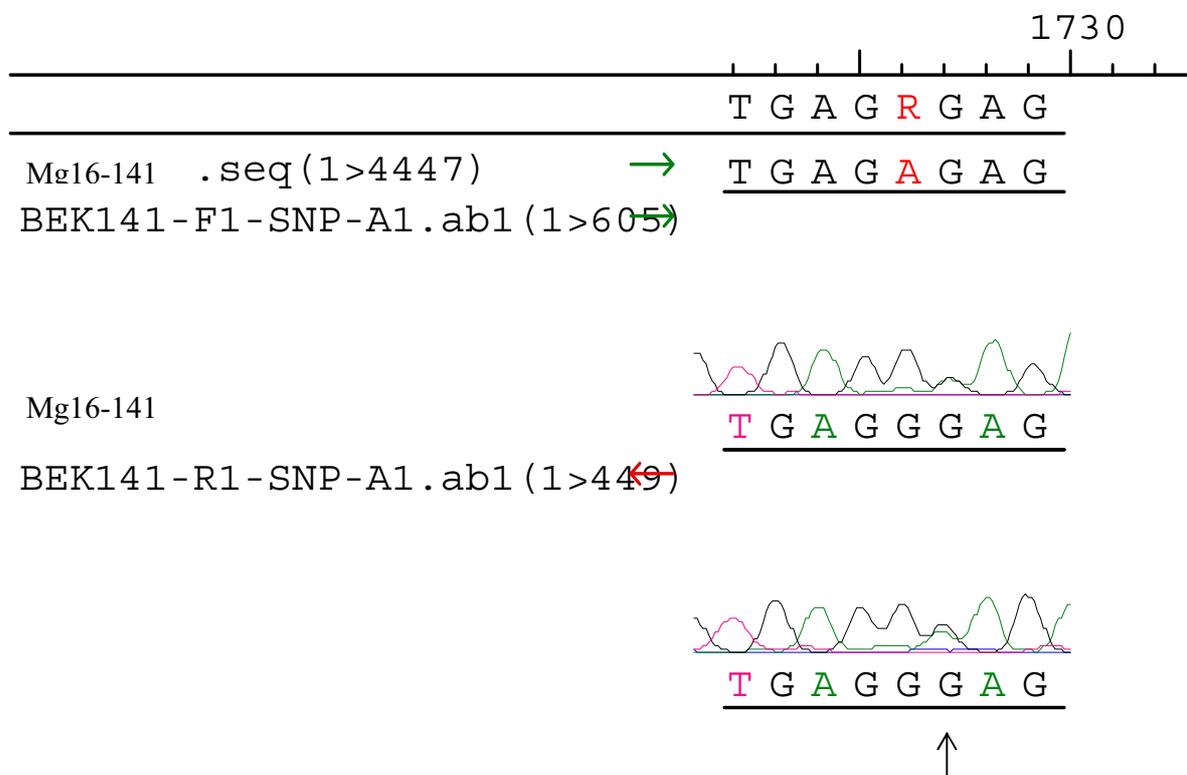


Figure 33. Electrophorégramme illustrant la mutation de l'isolat Mg16-141 sur la position 1728 en comparaison avec l'isolat avirulent Mg16. Il y a un mélange G/A équimolaire (indiqué par la flèche) suggérant une évolution de GGA vers GAA.

Tableau 10. Cinétique des mutations en position 1728-1730

Isolat	1 mois après inoculation	3 mois après inoculation	5 mois après inoculation
Mg16-7	AGA (arg)	GAA (glu)	GAA (glu)
Mg16-9	AGA (arg)	AGA (arg)	GAA (glu)
Mg16-12	AGA (arg)	AGA (arg)	ACA/AGA(thr/arg)
Mg16-53	AGA (arg)	AGA (arg)	GAA (glu)
Mg16-59	GGA (gly)	GAA (glu)	GAA (glu)
Mg16-63	GGA (gly)	GGA (gly)	GAA (glu)
Mg16-68	GGA/GAA (gly/glu)	GAA (glu)	GAA (glu)
Mg16-131	GGA (gly)	GAA (glu)	GAA (glu)
Mg16-146	AGA/GGA (arg/gly)	GAA (glu)	GAA (glu)
Témoins			
Mg16	AGA (arg)		
CI4	AGA (arg)		
CI4Beka2	GGA/GAA (gly/glu)		
CI44ABeka	GAA (glu)		

En rouge : mutation

En bleu: variant ayant une autre mutation ailleurs

- Différence de pathogénie de Mg16 vis-à-vis des variétés *Bekarosaka* et *Gigante*

Les témoins utilisés ont été ceux qui ont contourné la variété résistante *Gigante* initialement étudié et qui a été utilisée comme référence dans l'étude du contournement de la variété *Bekarosaka*, en raison du déterminisme identique de leur résistance. Dans cette expérience, ces isolats n'ont pas toujours montré les mêmes mutations de virulence vis-à-vis de ces deux variétés bien que leurs formes sauvages possèdent le même motif AGA sur la position 1728-1730. Le motif GGA (glycine) qui est commun aux deux variétés s'avère être une forme intermédiaire chez la variété *Bekarosaka*. Le motif GAA (acide glutamique) est original à la variété *Bekarosaka* et n'a pas été trouvé chez la variété *Gigante*. Les motifs ATA (isoleucine) et GTA (valine) sont caractéristiques de la variété *Gigante* et n'ont pas été trouvés chez aucun des 17 isolats testés, ni chez les isolats témoins testés sur la variété *Bekarosaka* (Tableau 11).

Quels que soient les isolats et les variétés, les mutations de virulence correspondent à un changement de classe d'acides aminés.

Tableau 11. Différence des mutations des isolats témoins sur les variétés à résistance élevée *Bekarosaka* et Gigante à la position 1728-1730

Isolat	Bekarosaka		Gigante	
	pathogénie	mutation	pathogénie	mutation
CI4	Avirulent	Pas de mutation	Avirulent	Pas de mutation
CI4*	Virulent	Non testé	Virulent	ATA (ile)
CI4Beka2	Virulent	GGA/GAA (gly/glu)	Non testé	Non testé
CI44A	Virulent	GAA (glu)	Virulent	GGA (gly)
CI4gig66A/IR64	Non testé	Non testé	virulent	GTA (val)

En rouge : les mutations communes à *Bekarosaka* et Gigante

En bleu : mutations spécifiques à *Bekarosaka*

En vert : mutations spécifiques à Gigante

3.3.2.3 Cinétique d'apparition de la virulence sur le codon 42

Concernant cette position située six codons en amont de la position 1728-1730, quatre des 17 variants virulents présentaient une mutation sur le codon 42 (nt 1708-1710). Le codon avirulent est AAC (aa : asparagine) (Figure 34, Tableau 12). Le variant Mg16-23 a évolué de codon AAC à ACC à 1 mois après inoculation puis a évolué en GCC (alanine) à 5 mois après inoculation. Deux variants virulents Mg16-57 et Mg16-148 présentaient un mélange avirulent/virulent AAC/TAC (asparagine/tyrosine) à 3 mois après inoculation qui a évolué en TAC à 5 mois après inoculation. Le variant Mg16-87 qui a muté en ATC (isoleucine) dès 1 mois après inoculation a subi une réversion en AAC du départ, à 5 mois après inoculation. Ces mutations sont spécifiques à la variété *Bekarosaka* et n'ont jamais été retrouvées avec les isolats virulents sur la variété Gigante auparavant. Les mutations associées au contournement de résistance correspondent aussi à un changement de classe d'acide aminé : de la classe acide (asparagine) en hydrophobe (isoleucine).

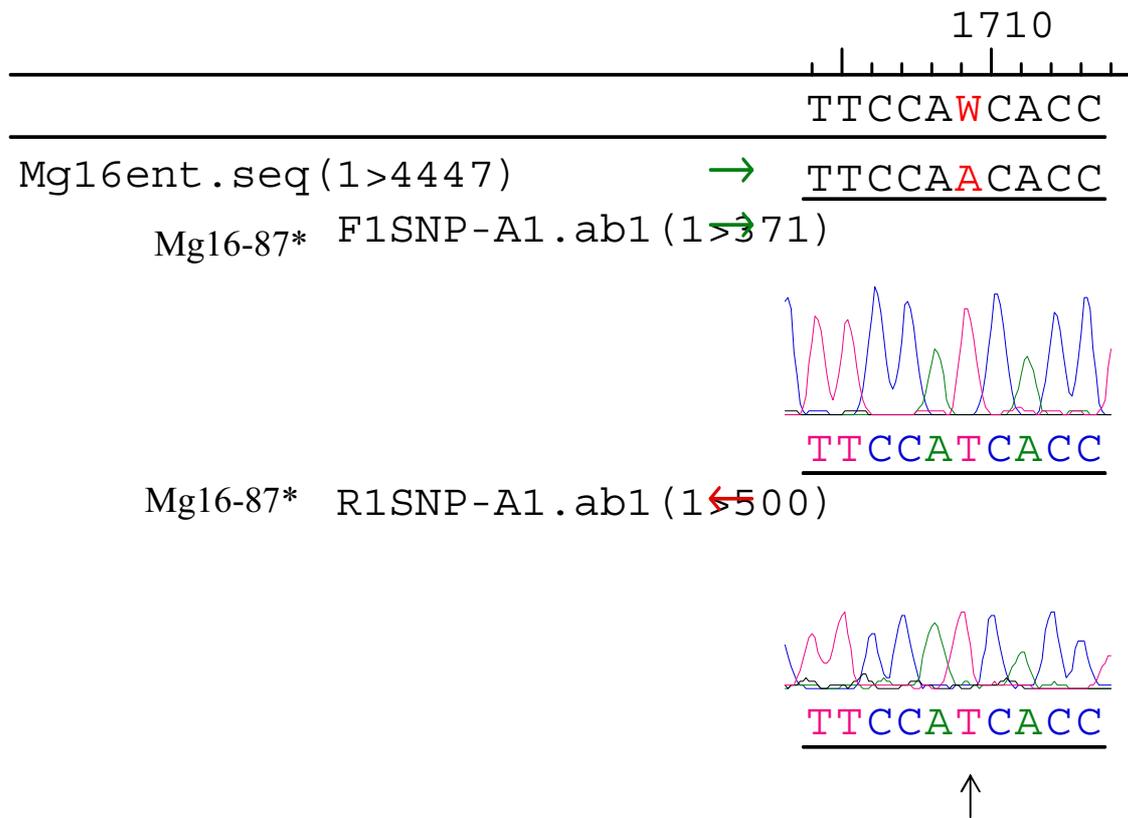


Figure 34. Electrophorégramme illustrant la mutation à la position 1708-1710 de l'isolat Mg16-87 comparé à l'isolat avirulent Mg16

Tableau 12. Cinétique des mutations à la position 1708-1710

Isolat	1 mois après inoculation	3 mois après inoculation	5 mois après inoculation
Mg16-23	ACC (thr)	ACC (thr)	GCC (ala)
Mg16-57	AAC/TAC (asn/tyr)	AAC/TAC (asn/tyr)	Non testé
Mg16-87	ATC (ile)	Non testé	AAC (asn)
Mg16-148	AAC/TAC (asn/tyr)	AAC/TAC (asn/tyr)	TAC (tyr)
Témoin Mg16	AAC (asn)		

en rouge : mutation

en vert : réversion

3.3.2.4 Cinétique d'apparition de virulence sur le codon 52

Six variants Mg16-12, Mg16-23, Mg16-39, Mg16-89, Mg16-121 et Mg16-148 ont montré une mutation au codon 52, c'est à dire 4 codons en 'aval' du codon majoritaire 48. Dans chacun des 6 cas, il s'agissait de la substitution d'une histidine (CAC) de l'isolat avirulent Mg16 en tyrosine (TAC). Ce changement est illustré par le cas de l'isolat Mg16-23 (Figure 35). Il s'agit de la transformation d'un acide aminé basique (histidine) en acide aminé hydrophobe (tyrosine). Trois variants ont muté dès un mois après inoculation (Mg16-23, Mg16-89, Mg16-121) et sont alors restés stables jusqu'à 3 mois (Tableau 13). Deux isolats ont présenté un mélange avirulent/virulent CAC/TAC (histidine/tyrosine), Mg16-12 apparu à un mois après inoculation et Mg16-39 à 3 mois après inoculation. Quatre variants ont gardé la mutation C1738T (mutation C en T à la position 1738) jusqu'à 5 mois mais deux variants (Mg16-89 et Mg16-148) ont repris le codon initial CAC. Ce phénomène de réversion se retrouve et n'a pas été retrouvé dans les mutations à la position 1728-1730. L'isolat Mg16-148 possède à la fois la mutation 1708-1710 et la mutation instable 1738-1740.

3.5 DISCUSSION

La réponse de la variété résistante *Bekarosaka* à l'inoculation des isolats malgaches Mg16 et Mg25 est diamétralement opposée. L'isolat Mg25 est incapable de contourner la résistance élevée de *Bekarosaka*, alors que l'isolat Mg16 contourne la résistance avec un taux élevé. Les deux isolats proviennent de deux régions géographiques différentes. L'isolat Mg16 est originaire du nord-ouest de Madagascar, alors que l'isolat Mg25 provient du sud-est du pays. La position phylogénétique des deux isolats est différente aussi. L'isolat Mg16 appartient aux souches basales du virus à Madagascar, alors que l'isolat Mg25 appartient à un variant géographique caractéristique de sa région d'origine. En raison de la grande homogénéité du RYMV à Madagascar, les différences moléculaires entre Mg16 et Mg25 restent très réduites. Cependant, deux autres isolats originaires de la même région que Mg25 ont aussi montré une aptitude élevée au contournement (cf. Chapitre II). Le variant Mg16 possède donc des caractéristiques qui le rendent aptes à contourner la résistance de la variété *Bekarosaka*.

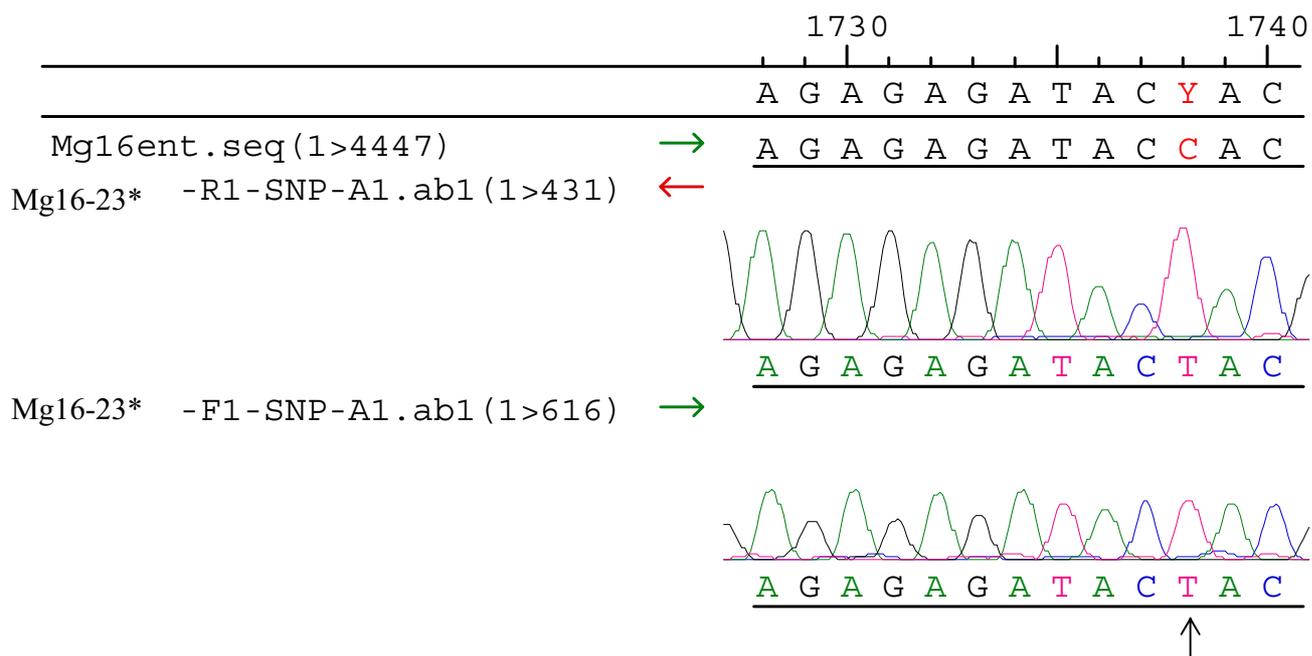


Figure 35. Electrophorégramme de la mutation à la position 1738-1740 de l'isolat Mg16-23 illustrant les mutations des isolats Mg16-12, Mg16-89, Mg16-121 et Mg16-148 où le codon CAC de l'isolat avirulent Mg16 a muté en TAC

Tableau 13. Cinétique des mutations sur la position 1738-1740

Isolat	1 mois après inoculation	3 mois après inoculation	5 mois après inoculation
Mg16-12	CAC/TAC (his/tyr)	CAC/TAC (his/tyr)	TAC (tyr)
Mg16-23	TAC (tyr)	TAC (tyr)	TAC (tyr)
Mg16-39	CAC (his)	Non testé	CAC/TAC (his/tyr)
Mg16-89	TAC (tyr)	TAC (tyr)	CAC (his)
Mg16-121	TAC (tyr)	TAC (tyr)	TAC (tyr)
Mg16-148	Non testé	CAC/TAC (his/tyr)	CAC (his)
Témoin Mg16	CAC (his)		

en rouge: mutation
en vert: réversion

Le séquençage de la VPg des 17 variants virulents a montré l'existence de 3 codons de la VPg impliqués dans la virulence. Il a déjà été montré que la VPg est le facteur d'avirulence chez plusieurs espèces de potyvirus vis-à-vis de résistance impliquant aussi des facteurs d'initiation de la traduction (Keller, 1988; Harrison, 2002). Chez le RYMV, une mutation dans la VPg d'un isolat d'Afrique de l'Ouest est responsable du contournement de la résistance élevée de la variété Gigante (Hébrard *et al*, 2006). Il s'agissait plus précisément de la mutation G1729T (mutation de G en T à la position 1729) donnant ATA (isoleucine, aa hydrophobe) à partir de AGA (arginine, aa basique) chez l'isolat avirulent sur la variété Gigante. L'analyse des séquences des variants virulents vis-à-vis de la variété *Bekarosaka* a montré que le même codon 1728-1730 est impliqué dans la virulence de 9 des isolats sur 17 testés. Cependant, trois mutations différentes sont apparues après infection de la variété *Bekarosaka*. Elles sont différentes de celle apparue chez l'isolat ouest-africain CI4* inoculé à la variété Gigante. La cinétique d'apparition de ces mutations à 1, 3 et 5 mois après inoculation ainsi que la présence de mélanges de mutations ont permis de comprendre le processus de fixation des nucléotides impliqués dans la virulence. Le passage de AGA en GAA, l'état majoritaire et ultime à cinq mois après inoculation, se fait en deux étapes : la première étape consiste en changement de AGA en GGA par la mutation A1728G, et la deuxième étape en changement de GGA en GAA par une mutation additionnelle G1729A. La durée de ces étapes est pourtant variable entre plantes. Le codon GAA est apparu 1 mois après inoculation chez certains variants, et de 3 à 5 mois chez d'autres. La mutation en GAA est spécifique à la variété *Bekarosaka*. Elle a été retrouvée chez les variants virulents de l'isolat Mg16 et chez le témoin virulent CI44A. Par contre, le codon ATA est spécifique à la variété Gigante et n'a jamais été retrouvée après infection de la variété *Bekarosaka*. Tous les changements d'acides aminés induits associés à la virulence impliquaient un changement de classe d'acides aminés.

Outre le codon 48, majoritaire, deux autres codons, minoritaires, sont impliqués dans le contournement de la résistance de la variété *Bekarosaka*. L'un est le codon 42, situé à 6 aa en 'amont' du codon 48. L'autre est le codon 52 localisé 4 aa en 'aval' du codon 48. Certains de ces variants sont transitoires et sont éliminés par la suite par la sélection conservatrice. D'autres sont spécifiques du contournement de la variété *Bekarosaka*. Ils ne sont pas apparus après infection de la variété Gigante, alors que les deux variétés possèdent le même allèle de résistance. Cette différence suggère que le fond génétique de la plante module les chemins mutationnels empruntés par le virus pour contourner cette résistance.

3.6 CONCLUSION

La possibilité d'émergence d'isolats virulents ne peut pas être exclue quand une variété à résistance élevée est déployée. L'isolat Mg16 qui est à l'origine avirulent sur la variété *Bekarosaka* l'a bien démontré mais le phénomène n'est pas généralisé sur tous les isolats, l'isolat Mg25 n'ayant pas pu contourner. La base moléculaire de contournement du RYMV réside sur la mutation dans le gène du VPg. Une seule mutation dans une position est suffisante mais n'est pas viable longtemps et tend à une réversion tandis qu'une double mutation au sein de cette même position possède une valeur adaptative plus élevée. Plusieurs types de mutations peuvent surgir sur plusieurs positions dans le VPg. Mais en commun, les mutations sont dirigées vers un changement de classe d'acides aminés aussi bien chez la variété *Bekarosaka* que chez la variété Gigante et que ce soit avec un isolat africain ou malgache.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Devant l'importance de la maladie causée par le RYMV à Madagascar, la solution variétale a été optée comme méthode de lutte par sa facilité pratique, son moindre coût et son respect à l'environnement au-dessus des luttes agronomique et chimique. A cela s'ajoute la richesse de Madagascar en ressources génétiques qui méritent d'être valorisées et exploitées afin de contribuer à la concrétisation de la vision « Madagascar, naturellement » (MAP, 2006 <http://www.madagascar-presidency.gov.mg/MAP>). Mais l'appréhension du danger de l'utilisation de variété résistante si les informations sur le pathogène ne sont pas assez fournies a conduit à mettre au préalable l'étude de la diversité, des relations phylogénétiques entre les isolats du virus prospectés de toutes les principales régions rizicoles de l'île. En Afrique, la recherche variétale allait de pair avec l'étude de la diversité du RYMV. Juste après que la variété à résistance élevée Gigante a été identifiée et profondément étudiée (Ndjiondjop *et al.*, 1999; Ndjiondjop *et al.*, 2001), des isolats contournant cette résistance ont été repérés à la fois sur des isolats naturels et aussi suite à une création en serre par des passages en série d'un isolat avirulent sur la variété à résistance élevée Gigante (Fargette *et al.*, 2002a). Diverses situations supportaient l'opportunité de la considération de la diversité ou variabilité du RYMV à Madagascar. D'abord, la diversité bioclimatique due à la diversité du relief de Madagascar, le divise en différents domaines caractérisés par de microclimats et microenvironnements spécifiques. Ensuite, la haute diversité des pathogènes importants comme le *Pyricularia oryzae* qui possèdent différentes souches dont la plupart sont endémiques (Andriatsimialona, communication personnelle) et la souche *East African cassava mosaic virus* (EACMV) (Swanson and Harrison, 1994) et les souches *African cassava mosaic virus* (ACMV) et *South african cassava mosaic virus* (CACMV) (Ranomenjanahary, 2002) causant la maladie *Cassava mosaic disease* (CMD) sont reportés à Madagascar. Enfin, peu d'information est disponible sur le RYMV à Madagascar sur des échantillons non représentatifs bien que des études sur la recherche variétale aient été entamées (Rasoanary, 1990).

1. CONNAISSANCES ACQUISES SUR LE RYMV A MADAGASCAR

1.1 Homogénéité moléculaire des isolats malgaches due à un goulot d'étranglement

L'étude de la diversité de RYMV sur 25 isolats prospectés dans six principales régions rizicoles infectées par le virus consistait en typage sérologique et typage moléculaire. Le typage sérologique comprenait une première phase de diagnostic du virus à l'aide d'un antisérum polyclonal contre RYMV et une deuxième phase de test avec 5 anticorps monoclonaux (Mabs) discriminants sur des isolats séropositifs. Les isolats ont montré une diversité sérologique dont le type majeur est le sérotype Ser4 et deux types mineurs Ser1 et Ser5. Les isolats africains ont été typés en 5 sérotypes (Ser1 à Ser5) selon la réaction ou non aux Mabs. Le type Ser4 qui est commun aux isolats de l'Afrique de l'est a la particularité de réagir à tous les Mabs (N' Guessan *et al.*, 2000). Les sérotypes sont corrélés aux types moléculaires basés sur la capsid de protéine (CP), de ce fait les isolats malgaches de type Ser4 sont aussi de type moléculaire ou souche S4 (Fargette *et al.*, 2002b). L'arbre phylogénétique basé sur la CP de ces 25 isolats a montré une forte homogénéité entre les souches avec une distance génétique de 2,4% qui est faible comparé celui des isolats africains variant entre 3,6 et 11,4% (Pinel *et al.*, 2000) et à celui de 12,5% des isolats de Tanzanie qui ont montré la plus haute variabilité de toute l'Afrique (Abubakar *et al.*, 2003). Cette faible divergence illustre un cas de goulot d'étranglement ou « genetic drift » qui survient lors d'une erreur d'échantillonnage dans une petite population. C'est un cas original de toute l'Afrique et suggère une contamination en une seule fois sans additionnel flux génétique. De plus, la population n'a pas encore eu assez de temps de se diversifier suggérant une contamination récente. L'absence d'ARN satellite sur les 17 isolats représentatifs testés pourrait renforcer cette hypothèse car parmi les isolats africains qui ont diversifiés auparavant la prévalence variait de 36% à 75% allant de l'est à l'ouest dont la plus faible prévalence est située à l'est (Pinel *et al.*, 2003). Pourtant cette petite population a subi une rapide expansion et provoque des épidémies qui sont des événements courants après un goulot d'étranglement (Aboim, 2005). La position insulaire de Madagascar induisant une isolation géographique expliquerait cette situation. Un cas similaire a été reporté à la Martinique lors de l'invasion du Zucchini yellow mosaic virus dans cette île venant de l'Europe probablement. Le virus présentait une faible variabilité moléculaire quand les séquences du N-terminal de la CP qui est la région la plus variable de son génome ont été analysées. Les isolats de la Martinique ne représentaient qu'une

fraction de la variabilité rencontrée dans le monde et les autres souches n'ont pas été présentes dans cette île (Desbiez C., 1996). Similairement, la souche S4 de RYMV seule est représentée à Madagascar et les cinq autres sont absentes.

1.2 Hypothèse sur l'origine des isolats malgaches de RYMV

L'analyse moléculaire des séquences du génome entier de trois isolats dont Mg16 et deux autres qui ont été séquencés avant cette étude, en comparaison avec 20 isolats représentant les différentes souches africaines a montré la position du groupe malgache parmi les isolats africains. Les isolats tanzaniens sont les plus basaux sur l'arbre phylogénétique donc les plus anciens suggérant que l'origine des ancêtres de tous les autres isolats provient de l'est de l'Afrique. Ensuite, la différenciation se divise en deux branches donnant deux groupes monophylétiques distincts, le groupe monophylétique des isolats de l'Afrique centrale et de l'ouest et le groupe monophylétique des isolats malgaches. Le groupe monophylétique de l'Afrique centrale et de l'ouest a subi une différenciation de direction est-ouest (Fargette *et al.*, 2004) tandis que celui des isolats malgaches a subi une différenciation descendue vers le sud, probablement à Mozambique et a été introduit à Madagascar par un évènement unique à l'ouest de Madagascar qui est la côte la plus proche et où les isolats sont les plus anciens.

1.3 Phylogéographie de RYMV à Madagascar

Les isolats de nord-ouest et du sud-ouest de Madagascar sont les plus anciens donc les plus proches de l'ancêtre commun des isolats malgaches. Ils sont aussi les plus proches entre eux et ne présentaient pas de divergence génétique même s'ils sont éloignés de plusieurs centaines de kilomètres du nord au sud. La différenciation suivante a été le nord-est puis le Moyen-est et enfin le Sud-est suggérant la direction ouest-nord-est-moyen-est-sud-est. Les isolats de la côte est ont montré une corrélation significative entre les distances génétiques et les distances géographiques suggérant une structuration géographique. La plus grande distance génétique a été trouvée entre les isolats du Nord-est et les isolats du Sud-est malgré la faible divergence nucléotidique générale. Un cas similaire a été trouvé en Tanzanie où les distances génétiques les plus élevées sont corrélées avec les distances géographiques les plus longues (Abubakar *et al.*, 2003). La direction de la structuration spatiale des isolats malgaches peut s'expliquer par la présence de la falaise du nord au sud cloisonnant la côte est de la côte ouest obligeant le virus à les contourner. Elle facilite aussi la dispersion du virus par les vecteurs qui ont une faible capacité de vol et qui

peuvent alors assurer la transmission de rizières en rizières qui sont continues. A l’opposé, le virus ne pouvait pas contourner au sud où les rizières sont discontinues et espacées due aux bioclimats semi-aride et sub-aride voire désertique. En plus de cette limitation physique, RYMV a montré une distribution thermique très marquée. Le seuil de 20°C a été le facteur limitant la dispersion de RYMV à Madagascar : le virus peut se multiplier et se disséminer à une température supérieure ou égale à ce seuil et le cas contraire survient en dessous de ce seuil. Par-dessus tout, l’existence des domaines de variétés de riz et de vecteurs contribue à ce phénomène. Les variétés de riz cultivées sont plus homogènes et de type indica principalement dans les côtes alors que dans les hauts plateaux le type *japonica* prédomine avec le riz pluvial. Les principaux vecteurs possèdent une distribution géographique ; *Dicladyspa gestroi* prédomine dans toutes les côtes aussi bien à l’est qu’à l’ouest tandis que *Trichispa sericea* se confine dans les hauts plateaux. Il existe alors un relais entre les deux hispines dans la transmission du virus au niveau des zones intermédiaires où ils cohabitent. Tous ces facteurs contribuent à l’explication de la localisation du virus dans les zones côtières et son absence dans les hautes terres tempérées.

2. CONNAISSANCES ACQUISES SUR LA RESISTANCE DES VARIETES MALGACHES AU RYMV

2.1 Divers types de résistances des variétés malgaches

Le germoplasme national malgache conserve aux environs de 4000 variétés constitués d’une part les variétés traditionnelles collectées au cours des prospections des sélectionneurs nationaux ou dans le cadre des collaborations avec l’IBPGR, l’IRRI et d’autre part les introductions sélectionnées dans différentes régions de Madagascar et des lignées issues des croisements locaux pour divers objectifs. Une population de 503 variétés représentant les variétés les plus cultivées à Madagascar et les introductions de Nigeria et de l’IRRI qui sont à l’origine résistantes au RYMV ont été criblées par symptomatologie contre le virus avec un isolat local. Deux cents trente cinq variétés ont été retenues lors du premier crible basé sur les notations de symptôme et ont passé au 2^e crible assisté par le test DAS-ELISA. Des *glaberrima* et des riz pluviaux ont montré des résistances élevées exhibés par l’absence de symptôme et de charge virale extrêmement faible voire nulle. Comme le RYMV sévit dans les rizières aquatiques, le choix pour une étude plus approfondie s’est porté sur des variétés traditionnelles et les lignées Tox qui ont régulièrement montré de bonnes résistances. Au laboratoire de l’IRD Montpellier, ces

variétés ont été soumises à des tests avec des isolats connues et comparées avec des variétés à résistance connue et profondément étudiée. Sur les 12 variétés testées, une résistance élevée significativement équivalente à celle de la variété *Gigante* a été trouvée chez une variété traditionnelle nommée *Bekarosaka* issue d'une population locale et indiquée par les paysans d'Ambanja. Une résistance partielle significativement équivalente à celle de la variété connue à résistance partielle *Azucena* a été trouvée chez les deux lignées Tox3219-51-1-3-2-1B et Tox 3233-31-6-2-1-1A. Les lignées Tox (tropical *oryza* cross) sont des lignées issues de croisement entre des variétés résistantes au RYMV pluviale ou sauvage avec des variétés de bas-fonds les plus cultivées en Afrique de l'ouest particulièrement par l'IITA au Nigeria. La résistance partielle de la variété *Azucena* est polygénique et est portée par le QTL12 en épistasie avec le QTL7 (Ahmadi *et al.*, 2001). D'autres variétés *Mahadigny*, *Maintimboty*, ON332, ON333, T70722 et T70723 se sont avérées tolérantes au RYMV et le reste des variétés testées composé de lignées issues de croisement avec *Oryza longistaminata* et des variétés de bas-fonds malgaches ont montré une forte sensibilité aux isolats de Burkina Faso BF1 et de Madagascar SBV17 (Mg15). Le phénotype de la résistance de *Bekarosaka* s'apparentait à celui de *Gigante* et non pas à celui de Tog 5681 quand elle a été testée avec les isolats CI4gig8 et BFa5 discriminant *Gigante* et Tog5681. C'est une résistance spécifique et présente la même spécificité que celle de *Gigante* : résistante à BF1 et à tous les isolats malgaches et sensible à CI4gig8 et BFa5. Elle est stable vis-à-vis des isolats malgaches représentatifs des régions agro-écologiques sujettes à la panachure jaune de riz et des isolats représentant les souches africaines. La résistance élevée de *Gigante* et de Tog 5681 est gouvernée par un même gène monogénique récessif cartographié sur le long bras du chromosome 4 du riz et des marqueurs encadrant son locus ont été développés (Ndjondjop *et al.*, 2001; Albar *et al.*, 2003). Grâce à ces informations et à ces outils, il a été possible d'identifier si le gène de résistance élevée de *Bekarosaka* est original ou si c'est le même gène de résistance déjà trouvé chez les variétés *Gigante* (*O. sativa*) et Tog 5681 (*O. glaberrima*). D'abord, la sous-espèce de la variété *Bekarosaka* a été vérifiée par trois méthodes : morphologie, test au phénol et marqueurs microsatellites. Les trois méthodes ont affirmé que la variété *Bekarosaka* appartient à *O. sativa indica* comme la plupart des variétés malgaches de la riziculture aquatique (Rabary, 1989). Le déterminisme génétique du gène de résistance de *Bekarosaka* a été démontré par le ratio plantes sensibles/plantes résistantes observé sur les générations F1 et F2 des croisements *Bekarosaka* x IR64 (variété sensible) et *Bekarosaka* x *Gigante*. Le premier croisement donnant le ratio 1 :3 indique que c'est un gène majeur récessif et le second donnant des plantes toutes résistantes en F1 et en F2 suggère que *Bekarosaka* possède le même gène de résistance de

Gigante et de Tog 5681. Les marqueurs microsatellites RM252 et RM273 ont indiqué une colocalisation du gène de résistance de la variété *Bekarosaka* avec le gène majeur des variétés *Gigante* et Tog 5681. De plus, la mutation G en A dans un exon du gène de résistance de *Gigante* et qui la différencie des variétés sensibles et qui semble alors conférer cette résistance élevée a été retrouvée dans les séquences d'une plante de *Bekarosaka*. En conclusion, la variété *Bekarosaka* qui est d'origine malgache est la deuxième variété de type *indica* trouvée jusqu'à ce jour posséder une résistance élevée. Les isolats discriminants développés avec les variétés *Gigante* et Tog 5681 ne permettent pas de différencier l'allèle de *Bekarosaka* et de *Gigante*, ils indiquent jusqu'ici qu'elles partagent le même allèle.

2.2 Emergence d'isolats contournant la résistance élevée de la variété Bekarosaka

Devant l'homogénéité de la population du RYMV à Madagascar, son expansion rapide et ses épidémies signifiant une haute potentialité d'émergence de variants dans les conditions naturelles, la valorisation de la variété à résistance élevée *Bekarosaka* doit tenir compte de la durabilité de cette résistance. L'apparition d'isolats mutants à la suite de l'inoculation de Mg16 sur une population de 150 plantes de *Bekarosaka* a remis en cause le danger de déploiement d'une variété résistante dans les champs. L'émergence de l'isolat contournant la résistance de *Gigante* faisait suite à des passages en série de l'isolat avirulent sur les variétés *Gigante* et *Azucena*. Elle consistait à une augmentation de la pathogénie au cours des passages et s'expliquait par la sélection du variant ayant la plus grande mobilité qui peut surmonter le blocage du virus à mouvoir dans la cellule d'une variété résistante (Fargette *et al.*, 2002a) la résistance étant associée à la perturbation du mouvement du virus de cellule en cellule (Ndjondjop *et al.*, 2001). Le contournement de la résistance de *Bekarosaka* a surgi dès le premier passage à un mois après inoculation. Mais ce contournement n'est pas généralisé à tous les isolats puisque Mg 25 n'a pas pu le faire avec un nombre de plantes plus élevé et la même concentration harmonisée d'inoculum tenant compte que c'est un facteur de virulence (Sohro *et al.*, 2005). Le pouvoir contournant d'un isolat serait spécifique.

2.3 Bases moléculaires du mécanisme de contournement

Les bases moléculaires de ce contournement sont liées au VPg au sein duquel trois domaines de mutations ont été observés. La mutation dans le VPg associée au contournement a été démontrée chez les potyvirus (Harrison, 2002). Récemment, la comparaison de séquence de l'isolat virulent CI4* obtenu après passage en série de l'isolat avirulent de Côte d'Ivoire CI4 sur la variété *Gigante* a montré une mutation G1729T dans le VPg (Hébrard et al, 2005). L'originalité du contournement de la variété *Bekarosaka* réside sur le fait que cette mutation G1729T n'a jamais été retrouvée chez elle mais par contre elle a la mutation G1729A en cette position en plus de la mutation A1728G sur le codon 1728-1730. L'apparition de deux mutations à la phase finale donne le motif GAA qui lui est spécifique. Certains motifs ATA, GTA chez les isolats mutants dérivés de CI4 sur *Gigante* n'ont pas été retrouvés chez *Bekarosaka* non plus. Même CI4* et ses variants utilisés comme témoins sur la variété *Bekarosaka* ont montré toujours les mutations A1728G et/ou G1729A supportant que cette spécificité est plutôt liée à la variété et non pas à l'isolat. Le deuxième domaine concerne la position 1708-1710 consistant en la mutation A1709T transformant le codon de Mg16 AAC en ATC. Cette mutation n'est jamais apparue chez *Gigante* jusqu'à ce jour et est spécifique à la variété *Bekarosaka*. Le 3^e domaine se trouve sur la position 1738-1740 consistant en la mutation C1738T amenant le codon CAC de Mg16 en TAC. Cette mutation n'est pas spécifique à la variété *Bekarosaka* car elle a été trouvée chez un isolat naturel de Mali qui a contourné spécifiquement la résistance de la variété *Gigante*. Il y a à chaque mutation un changement de classe d'acides aminés que ce soit chez la variété *Bekarosaka* que chez la variété *Gigante*.

3. PERSPECTIVES

3.1 Suivi de la variabilité de RYMV

Malgré l'homogénéité des isolats malgaches, il serait toujours intéressant de faire un suivi régulier de sa variabilité en milieu naturel. L'étude a simulé en serre la pression de sélection exercée par l'utilisation de variétés résistantes en champs. L'existence potentielle de variétés résistantes traditionnelles comme *Bekarosaka* dont la diffusion n'est pas maîtrisée par la recherche et les organismes de développement pourraient induire l'émergence de variants dans les champs. Une collecte régulière d'isolats naturels doit être faite.

3.2 Test des isolats mutants dérivés de Mg16 sur les variétés résistantes Gigante et Tog 5681

Concernant les variants de Mg16, il serait intéressant de voir dans l'immédiat s'ils peuvent infecter aussi la variété *Gigante* et voir si les mutations restent telles étaient chez *Bekarosaka* ou changent.

3.3 Etude des valeurs sélectives des mutants par des transmissions successives sur variété résistante et sensible

L'étude a montré que l'isolat Mg16 est entouré de plusieurs variants dont une fraction a été sélectionnée lors du contournement de la variété *Bekarosaka* et probablement plusieurs autres variants potentiels n'ont pas été sélectionnés. Il serait intéressant de voir en serre la viabilité de ces variants pour mieux apprécier le danger de déploiement d'une variété résistante. Pour le concrétiser, les variants obtenus au cours de cette étude seraient transmis en un ou plusieurs passages sur *Bekarosaka* et sur une variété sensible et les symptômes, la teneur en virus puis les mutations seront suivies.

3.4 Validation fonctionnelle des mutations rencontrées par la mutagenèse dirigée

Pour s'assurer que le contournement est bien conféré par les mutations observées dans cette étude, on pourrait procéder à une mutagenèse dirigée sur les nucléotides 1709, 1728, 1729 et 1738 d'un clone infectieux de RYMV.

CONCLUSION GENERALE

Malgré la mégadiversité existante à Madagascar, la population du *Rice yellow mottle virus* qui cause la panachure jaune de riz, une maladie de haute importance économique a montré une forte homogénéité moléculaire et des relations phylogénétiques étroites. Les distances génétiques entre isolats sont faibles par rapport à celles des isolats du continent africain. L'insularité et l'isolation par la distance sont les causes probables de cette faible diversité. La contamination est récente et unique et semble avoir été facilitée par un événement du genre cyclone qui a parachuté les vecteurs virulifères dans la côte ouest de Madagascar comme l'indique la position basale des isolats de cette région sur l'arbre phylogénétique. Les isolats malgaches de RYMV forme un groupe monophylétique à part mais partage un ancêtre commun avec les autres groupes monophylétiques de l'Afrique de l'est, centrale et de l'ouest. Cet ancêtre est d'origine extrême -est de Tanzanie et s'est diversifié en deux directions : est-ouest pour les isolats de l'Afrique centrale et de l'ouest, et vers le sud de Tanzanie pour un autre groupe d'isolats. C'est de là que l'ancêtre des isolats malgaches a attendu l'évènement de sa contamination à Madagascar. Son entrée à Madagascar via vecteur vraisemblablement a fait perdre beaucoup de variants et a amené le phénomène de goulot d'étranglement exhibé par une forte homogénéité moléculaire entre les isolats représentatifs des régions rizicoles. Une structuration spatiale de direction ouest-nord-est-sud-est régit la dissémination du virus à Madagascar avec d'imprévisibles épidémies dues au fait que la population subit une expansion soudaine suite au goulot d'étranglement.

L'échantillon de 503 variétés de riz malgaches a montré deux sortes de résistance naturelle au RYMV. Une résistance élevée chez la variété traditionnelle *Bekarosaka* et une résistance partielle chez deux variétés introduites Tox 3219-51-1-3-2-1B et Tox 3233-31-6-2-1-1A. D'autres variétés *Mahadigny* et *Maintimboty*, ON332, ON333, T70722 et T70723 sont tolérantes. Le phénotype de la résistance partielle ressemble à celle de la variété témoin Azucena : symptôme consistant à des panachures mais pas de diminution en taille et teneur en virus moyen en DAS-ELISA. Le phénotype de la résistance élevée de la variété *Bekarosaka* consiste en une absence totale de symptôme et en une teneur en virus en dessous du seuil de détection en DAS-ELISA. De plus, cette résistance est spécifique, les isolats contournant la résistance de la variété témoin à résistance élevée *Gigante*, CI4* et CI4gig8 sont aussi virulents sur la variété *Bekarosaka*. Elle est stable avec les isolats malgaches représentatifs des régions rizicoles et avec les isolats africains représentatifs des six souches de RYMV. Elle est gouvernée

par un gène monogénique récessif qui se trouve colocalisé sur le chromosome 4 tout comme celui de *Gigante* et Tog 5681. La variété *Bekarosaka* partage donc le même gène de résistance au RYMV avec ces deux variétés. Mais elle partagerait plutôt l'allèle de la variété *Gigante* mais pas celle de la variété Tog5681. Elle est la deuxième variété *indica* trouvée possédant ce gène rare. Cette résistance élevée n'est pas durable. La confrontation de l'isolat Mg16 avec une population large de 150 plantes de *Bekarosaka* a induit l'émergence d'une multitude de variants contournant cette résistance. La base moléculaire de ce contournement consiste en des mutations dans le VPg. Ces mutations sont localisées sur trois domaines différents. La position 1728-1730 est la plus fréquente et présente les mutations A1728G et/ou G1729A donnant les motifs GGA et GAA quand celui de Mg16 avirulent est AGA. Cette position a été observée dans le contournement de la variété *Gigante* mais les mutations ne sont pas toutes les mêmes. Le motif GAA est spécifique à la variété *Bekarosaka* et à la place *Gigante* présente les motifs qui aussi lui sont spécifiques ATA et GTA.

Le deuxième domaine concerne la position 1708-1710 montrant les mutations A1709T, A1709C, G1708AA1709T transformant le codon de Mg16 AAC en ATC, ACC et GCC, respectivement. Ces mutations ne sont jamais apparues chez *Gigante* jusqu'à ce jour et sont originales à la variété *Bekarosaka*. Le 3^e domaine se trouve sur la position 1738-1740 consistant en la mutation C1738T amenant le codon CAC de Mg16 en TAC. Cette mutation n'est pas spécifique à la variété *Bekarosaka* car elle a été trouvée chez un isolat naturel de Mali qui a contourné spécifiquement la résistance de la variété *Gigante*.

Ces spécificités pourraient installer une démarcation pathogénique entre les deux variétés.

Les mutations rencontrées au cours des contournements chez les variétés *Bekarosaka* et *Gigante* avec quel soit l'isolat sont régies par un changement de classe d'acides aminés.

La valorisation de ces variétés résistantes trouvées dans cette étude doit tenir compte de la possibilité d'émergence d'isolats nouveaux après déploiement d'une résistance élevée. Malgré la faible diversité du RYMV dans les conditions actuelles à Madagascar, il est fort possible que certains isolats naturels avirulents deviennent virulents face à une pression de sélection élevée. L'expérience en milieu contrôlé sur Mg16 l'a bien démontré. Bien que certains variants de l'isolat Mg16 montraient une faible valeur adaptative, la majeure partie avait une longue viabilité.

Alors, il n'est pas recommandé de déployer en grande échelle la variété *Bekarosaka* surtout dans les autres régions où elle n'est pas encore cultivée. Elle peut être utilisée toutefois comme un bon donneur de résistance dans des travaux d'amélioration de la résistance des

variétés locales et possède une facilité pratique du fait que c'est une *indica* sans problème de barrières rencontrées dans les croisements interspécifiques. La méthode de pyramidage de gènes peut être adoptée étant la meilleure méthode pour éviter le contournement de résistance. Comme les variétés possédant une résistance partielle exercent moins de pression de sélection sur les virus, il est moins risqué de les utiliser directement et en même temps elles sont toujours propices au pyramidage avec une variété à résistance élevée.

REFERENCES

- Abo, M.E., Alegbejo, M.D., Sy, A.A. et Misari, S.M.** (2000). An overview of the mode of transmission, host plants and methods of detection of rice yellow mottle virus. *Journal of Sustainable Agriculture* **17** (1), 19-36.
- Aboim, M.A., Menez, G.M., Schlitt, T. Rogers, A.D.** (2005). Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. *Molecular Ecology* **14**, 1343-1354.
- Abubakar, Z., Ali, F., Pinel, A., Traore, O., N'-Guessan, P., Notteghem, J.L., Kimmins, F., Konate, G. et Fargette, D.** (2003). Phylogeography of rice yellow mottle virus in Africa. *Journal of General Virology*. 2003; 84(3): 733 743.
- Ahmadi, N., Albar, L., Pressoir, G., Pinel, A., Fargette, D. et Ghesquiere, A.** (2001). Genetic basis and mapping of the resistance to Rice yellow mottle virus. III. Analysis of QTL efficiency in introgressed progenies confirmed the hypothesis of complementary epistasis between two resistance QTLs. *Theoretical and Applied Genetics* **103**, 1084-1092.
- Ahmadi, N., T. Becquer, C. Larroque, M. Arnaud.** (1988). Variabilité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) à Madagascar. *L'Agronomie Tropicale* **43-3**, 209-221.
- Albar, L., Ndjioudjop, M.N., Eshak, Z., Berger, A., Pinel, A., Jones, M., Fargette, D. et Ghesquiere, A.** (2003). Fine genetic mapping of a gene required for Rice yellow mottle virus cell-to-cell movement. *Theoretical and Applied Genetics* **107**, 371-378.
- Aldahoud R., D.W.O., Jones G.E.** (1989). Rapid, random evolution of the genetic structure of replicating tobacco mosaic populations. *Intervirology* **30**, 227-233.
- Ali, F.H. et Abubakar, Z.** (1995) Incidence of rice yellow mottle virus in Zanzibar
- Astier S., A.J., Maury Y., Lecoq H.** (2001). Principes de Virologie Végétale. *INRA*, 444.
- Awoderu, V.A.** (1991). The rice yellow mottle virus situation in West Africa. *Journal of Basic Microbiology*. 1991; 31(2): 91 99.
- Awoderu, V.A., Alam, M.S., Thottappilly, G. et Alluri, K.** (1987). Outbreaks and new records. Ivory Coast. Rice yellow mottle virus in upland rice. *FAO Plant Protection Bulletin*. 1987; 35(1): 32 33.
- Bakker, W.** (1970). Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya (Wageningen, Netherlands Centre for Agricultural Publishing and Documentation..).
- Bakker, W.** (1974). Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya. *Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya*. 1974; [8 +] 152.
- Bousalem, M., Douzery E., Fargette D.** (2000). High genetic diversity, distant phylogenetic relationship and intraspecies recombination events among natural population of Yam mosaic virus: a contribution to understanding potyvirus evolution. *J Gen Virol* **81**, 243-255.
- Brown, J.H., Lomolino MV.** (1998). Biogeography, 691p.
- Desbiez C., W.-S.C., Granier F., Robaglia C., Delaunay T., Lecoq H.** (1996). Biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus on the island of Martinique. *Plant Dis.* **80**, 203-207.
- Eigen, M.** (1993). Les Quasi-espèces virales. *Pour la Science* **Vol. 191**, 36-45.

- Eigen, M.** (1996). On the nature of viral quasispecies. *Trends in Microbiol.* **Vol.4**, 212-214.
- FAO.** (2004). Le riz, c'est la vie. *Année internationale de riz.*
- Fargette, D., Pinel, A., Traore, O., Ghesquiere, A. et Konate, G.** (2002a). Emergence of resistance-breaking isolates of Rice yellow mottle virus during serial inoculations. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 585-591.
- Fargette, D., Pinel, A., Halimi, H., Brugidou, C., Fauquet, C. et Van Regenmortel, M.** (2002b). Comparison of molecular and immunological typing of isolates of Rice yellow mottle virus. *Archives of Virology* **147 (3)**, 583-596.
- Fargette, D., Pinel, A., Abubakar, Z., Traore, O., Brugidou, C., Fatogoma, S., Hebrard, E., Choisy, M., Sere, Y., Fauquet, C. et Konate, G.** (2004). Inferring the evolutionary history of Rice yellow mottle virus from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *Journal of Virology* **78**, 3252-3261.
- Fauquet, C. et Thouvenel, J.C.** (1977). Isolation of the rice yellow mottle virus in Ivory Coast. *Plant Disease Reporter.* 1977; 61(6): 443 446.
- Garcia-Arenal, F., Fraile A., Malpica J.M.** (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *ANNU Re. Phytopathol.* **39**, 157-186.
- Ghesquiere, A., Albar, L., Lorieux, M., Ahmadi, N., Fargette, D., Huang, N., McCouch, S.R. et Notteghem, J.L.** (1997). A major quantitative trait locus for rice yellow mottle virus resistance maps to a cluster of blast resistance genes on chromosome 12. *Phytopathology* . 1997; 87(12): 1243 1249.
- Hall, B.G.** (2001). Phylogenetic trees made easy. *Manual*, 179p.
- Harrison, B.D.** (2002). Virus variation in relation to resistance breaking in plants. *Euphytica* **124**, 181-192.
- Humbert, H.** (1995). Les territoires phytogéographiques de Madagascar. In: Colloques Internationaux du CNRS, Les divisions écologiques du monde, Année biologique.
- IRRI.** (1995). Manual of operations and procedures of the International Rice Genebank. *Genetic Resources Center, IRRI Los Banos Philippines*, 116p.
- John, V.T., Thottapilly, G. et Awoderu, V.A.** (1984). Occurrence of rice yellow mottle virus in some Sahelian countries in West Africa. *FAO Plant Protection Bulletin.* 1984; 32(3): 86 87.
- Keller, K.E., Johansen, I.E., Martin, R.R., Hampton, R.O.** (1988). Potyvirus genome linked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant Microbe Interaction* **11**, 124-130.
- Kochko, A.D.** (1988). Variabilité enzymatique des riz traditionnels malgaches *Oryza sativa* L. *L'Agronomie Tropicale* **43-3**, 203-208.
- Koechlin.** (1974). Les Bioclimats de Madagascar.
- Koklu, G. et Yilmaz, O.** (2004). Research on rice ragged stunt and rice yellow mottle viruses on rice grown in Edirne, Turkey. *Cereal Research Communications* **32**, 387-394.
- Konate, G., Traore, O. et Coulibaly, M.M.** (1997). Characterization of rice yellow mottle virus isolates in Sudano-Sahelian areas. *Archives of Virology.* 1997; 142(6): 1117 1124.
- Konate, G., Sarra, S. et Traore, O.** (2001). Rice yellow mottle virus is seed-borne but not seed transmitted in rice seeds. *European Journal of Plant Pathology* **107**, 361-364.

- Kouassi, N.K., P, N.G., Albar, L., Fauquet, C.M. et Brugidou, C.** (2005). Distribution and characterization of Rice yellow mottle virus: A threat to African farmers. *Plant Disease* **89**, 124-133.
- Lecop, H., Moury, B., Desbiez C., Palloix, A., Pitrat, M.** (2004). Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Research*.
- MAEP.** (2003). Enquête annuelle sur la production agricole. Campagne 2002-2003. *Bulletin* **17**.
- Matthews, R.E.F.** (1991). Plant Virology. *Academic Press, London UK*, 835p.
- McCouch, S.R., ChenX., Panaud O., Temnykh S., Xu Y., Cho Y.G., Huang N., Ishii T., Blair M.** (1997). Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* **35**, 89-99.
- N' Guessan, P., Pinel, A., Caruana, M.L., Frutos, R., Sy, A., Ghesquiere, A., Fargette, D., Abo, M.E., Alegbejo, M.D. et Sy, A.A.** (2000). Evidence of the presence of two serotypes of rice yellow mottle sobemovirus in Cote d'Ivoire. *European Journal of Plant Pathology* **106**, 167-178.
- Ndjondjop, M.N., Albar, L., Fargette, D., Fauquet, C. et Ghesquiere, A.** (1999). The genetic basis of high resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivars of two cultivated rice species. *Plant Disease*. 1999; *83(10)*: 931 935.
- Ndjondjop, M.N., Brugidou, C., Zang, S., Fargette, D., Ghesquiere, A. et Fauquet, C.** (2001). High resistance to rice yellow mottle virus in two cultivated rice cultivars is correlated with failure of cell to cell movement. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 309-316.
- N'-Guessan, P., Pinel, A., Sy, A.A., Ghesquiere, A. et Fargette, D.** (2001). Distribution, pathogenicity, and interactions of two strains of Rice yellow mottle virus in forested and savanna zones of West Africa. *Plant Disease*. 2001; *85(1)*: 59 64.
- Okioma, S.N.M., Muchoki, R.N. et Gathuru, E.M.** (1983). Alternate hosts of rice yellow mottle virus in the Lake Victoria basin of Kenya. *Tropical Pest Management*. 1983; *29(3)*: 295 296.
- Patry-Bres, C.** (2000). Diversité génétique et dynamique des formes adventices de riz en Camargue, 31 mars 2000 ENSAM.
- Pinel, A., P, N.G., Bousalem, M. et Fargette, D.** (2000). Molecular variability of geographically distinct isolates of Rice yellow mottle virus in Africa. *Archives of Virology* **145 (8)**, 1621-1638.
- Pinel, A., Abubakar, Z., Traore, O., Konate, G. et Fargette, D.** (2003). Molecular epidemiology of the RNA satellite of Rice yellow mottle virus in Africa. *Archives of Virology* **148**, 1721-1733.
- Pinto, Y.M.** (2000). Transgenic resistance to rice yellow mottle virus disease: highlighting some of the issues facing the potential introduction of biotechnological products into Africa. *AgBiotechNet*. 2000; *2(ABN 039)*: 1 4.
- Pressoir, G., Albar, L., Ahmadi, N., Rimbault, I., Lorieux, M., Fargette, D. et Ghesquiere, A.** (1998). Genetic basis and mapping of the resistance to rice yellow mottle virus. II. Evidence of a complementary epistasis between two QTLs. *Theoretical and Applied Genetics*. 1998; *97(7)*: 1155 1161.
- Qu, C.X., Liljas, L., Opalka, N., Brugidou, C., Yeager, M., Beachy, R.N., Fauquet, C.M., Johnson, J.E. et Lin, T.W.** (2000). 3D domain swapping modulates the stability of members of an icosahedral virus group. *Structure* **8**, 1095-1103.

- Rabary, E., Noyer J-L, Benyayer, Arnaud M, Glaszman J-C.** (1989). Variabilité génétique du riz (*Oryza sativa* L.) à Madagascar; origine de types nouveaux. *L'Agronomie Tropicale* **44-4**, 305-312.
- Randriamanantsoa, R.** (1994). Le contrôle intégré du pou épineux du riz (*Dicladispa gestroi*). *Rapport d'activité FOFIFA*.
- Ranomenjanahary, S.R., R. Robinson, DJ.** (2002). Occurrence of three distinct begomoviruses in cassava in Madagascar. *Annals of Applied Biology*. 2002; *V104 N°3* **3**.
- Rasoanary, M.** (1990). Application d'un test immunoenzymatique à l'étude de la résistance du riz au Rice yellow mottle virus, 67.
- Raymundo, S.A. et Buddenhagen, I.W.** (1976). A rice virus disease in West Africa. *International Rice Commission Newsletter*. 1976; *25(1/2)*: 58.
- Raymundo, S.A. et Konteh, I.K.** (1980). Distribution, importance, screening methods and varietal reaction to rice pale yellow mottle disease. *International Rice Commission Newsletter*. 1980; *29(1)*: 51 53.
- Reckhaus, P.M. et Randrianangaly, S** (1990). Rice yellow mottle virus (RYMV) on rice in Madagascar. *IRRI Newsletter* 15, 30
- Reckhaus, P.M. et Andriamasintseho, H.F.** (1997). Rice yellow mottle virus in Madagascar and its epidemiology in the northwest of the island. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 1997; *104(3)*: 289 295.
- Rossel, H.W., Ayotade, K.A., Thottapilly, G., Adeoti, A.A., Alluri, K., Alam, M.S. et Zan, K.** (1982). A new record of rice yellow mottle virus disease in Badeggi, Nigeria. *International Rice Commission Newsletter*. 1982; *31(2)*: 23 24.
- Sarra, S. et Peters, D.** (2003). Rice yellow mottle virus is transmitted by cows, donkeys, and grass rats in irrigated rice crops. *Plant Disease* **87**, 804-808.
- Sarra, S., Oevering, P., Guindo, S. et Peters, D.** (2004). Wind-mediated spread of Rice yellow mottle virus (RYMV) in irrigated rice crops. *Plant Pathology* **53**, 148-153.
- Traore, O., Pinel, A., Fargette, D. et Konate, G.** (2001). First report and characterization of Rice yellow mottle virus in Central Africa. *Plant Disease*. 2001; *85(8)*: 920.
- Van Regenmortel, M.H.V., M.C, Dubs.** (1993). Serological procedures. In: *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. *CRC Press Inc, Florida*, 374p.
- Worobey, M., Holmes E.C.** (1999). Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **Vol. 80**, 2535-2543.

ANNEXES

Annexe 1. Liste des isolats et des études faites correspondantes

Isolats	Régions	Lieux	Identifiant	Année	DO	Mabs	ARN	Séquence	Satellite	VPg
MRV1	NO	Maevatanana		avant 2003	0,01					
MRV2	NO	Tsaratana		avant 2003	1,21	mabs				
MRV3	NO	Ambondromamy		avant 2003	4	Ser 4				
MRV4	NO	Ambalanjanakomby		avant 2003	0,36	Ser 4				
MRV5	NO	Madirokely/Tsararano		avant 2003	0,06					
MRV6	NO	Ambanja		avant 2003	0,14					
MRV7	NO	Antsohihy		avant 2003	4,38	Ser 4				
MRV8	NO	Port-Bergé	Mg10	avant 2003	3,78	Ser 4	ARN	ORF4		
MRV9	NO	Mampikony		avant 2003	3,92	Ser 4				
MRV10	NO	Tsaramandroso		avant 2003	4,65	Ser 4				
MRV11	NO	AmbatoBoeny		avant 2003	4,23	Ser 4				
MRV12	NO	Amboromalandy		avant 2003	4,02	Ser 4				
MRV13	NO	Manaratsandry		avant 2003	0,13					
MRV14	NO	Ambinanidimy		avant 2003	3,91	Ser 4				
MRV15	NO	Mampikony		avant 2003	4,33	Ser 4				
MRV16	NO	Amboronazy		avant 2003	4,19	Ser 4				
MRV17	NO	Madirokely/Tsararano	Mg16	avant 2003	3,34	Ser 4	ARN	ORF4+entière	absence	VPg
MRV18	NO	Anosy/Bekoratsaka		avant 2003	4,22	Ser 4				
MRV19	NO	Mangapaika		avant 2003	2,58	?				
MRV20	NO	Miadana	Mg11	avant 2003	4,04	Ser 4	ARN	ORF4	absence	
MRV21	NO	Mahajanga	Mg12	avant 2003	4,21	Ser 1	ARN	ORF4	absence	
MRV22	NO	Port-Bergé		avant 2003	0,01	?				
MRV23	NO	Bekoratsaka		avant 2003	4,04	Ser 4				
MRV24	NO	PortBergé		avant 2003	0,005	Ser 4 ?				
MRV25	NO	Ambalabe		avant 2003	3,88	Ser 4 ?				
MRV26	NO	Mahajanga		avant 2003	3,87	Ser 4				
SBV1	NE	Sambava		2003	4,28	Ser 4				

SBV2	NE	Ambalabe/Sambava		2003	4,61	Ser 4	ARN		absence	
SBV3	NE	Ampanefena/Vohémar		2003	0,03					
SBV4	NE	Anjangoveratra/Sambava/Ririnina		2003	4,27	Ser 4				
SBV5	NE	Befandriana/Sambava		2003	3,88	Ser 4				
SBV6	NE	Ambalabe/Sambava/Taona		2003	0,22	Ser 4	ARN		absence	
SBV7	NE	Antsirabe/Andapa		2003	5,92	Ser 4				
SBV8	NE	Mazava/Vohémar		2003	3,89	Ser 4				
SBV9	NE	Mazava/Vohémar		2003	0,1					
SBV10	NE	Anomadio/Andapa		2003	0,19					
SBV11	NE	Nosivarika/Andapa	Mg13	2003	4,06	Ser 4	ARN	ORF4		
SBV12	NE	Ahimalaza/Andapa		2003	0,4					
SBV13	NE	Ahimalaza/Andapa		2003	3,82	Ser 4				
SBV14	NE	Antanambao/Sambava	Mg14	2003	3,8	Ser 5	ARN	ORF4	absence	
SBV15	NE	Ampanefena/Vohémar		2003	3,34	Ser 4				
SBV16	NE	Befandriana/Sambava		2003	0,02					
SBV17	NE	Anomadio/Andapa	Mg15	2003	3,89	Ser 4	ARN	ORF4	absence	
SBV18	NE	Anjangoveratra/Sambava/Ririnina		2003	4,09	Ser 4				
SBV19	NE	Ratsianarana/Antalaha	Mg17	2004	5,3	-	ARN		absence	
SBV20	NE	Adihazomamy/Sambava/Taona		2004	1,01	-	ARN	ORF4		
SBV21	NE	Adihazomamy/Sambava/Taona		2004	0,96	-	ARN	ORF4		
SBV22	NE	Ampanefena/Vohémar/Asara		2004	1,01	-				
SBV23	NE	Antsahavanona/Sambava/Taona	Mg18	2004	4,6	-	ARN	ORF4	absence	
CALA1	ME	Ampongabe		2004	1,15	Ser 4				
CALA2	ME	Ampongabe	Mg21	2004	1,21	Ser 4	ARN	ORF4	absence	
CALA3	ME	Ampongabe	Mg30	2004	1,11	Ser 4	ARN	ORF4		
CALA4	ME	Indice 3bis		2004	1,1	Ser 4				
CALA5	ME	Indice 3bis	Mg31	2004	1,03	Ser 4	ARN	ORF4		
CALA6	ME	PC15		2004	1,02	Ser 4			absence	
CALA7	ME	PC15		2004	1,01	Ser 4				
CALA8	ME	PC15		2004	1,03	Ser 4	ARN			
CALA9	ME	CMS Anosiboribory	Mg22	2004	1,15	?	ARN	ORF4	absence	
SO1	SO	Mangolovolo/Morombe		2004	1,22	Ser 4				
SO2	SO	Tanandava/Morombe	Mg19	2004	1,22	?	ARN	ORF4	absence	
SO3	SO	Morondava	Mg27	2004	1,13	Ser 4	ARN	ORF4		
SO4	SO	Mahabo	Mg28	2004	1,12	Ser 4	ARN	ORF4		

SO5	SO	Ambatolahy		2004	0,72	?				
SO6	SO	Ambatolahy	Mg29	2004	1,14	?	ARN	ORF4		
SO7	SO	Miandrivazo	Mg20	2004	1,1	Ser 4	ARN	ORF4	absence	
SO8	SO	Miandrivazo		2004	0,62	Ser 4				
KJV1	SE	Kianjavato	Mg25	2004	0,98	?	ARN	ORF4	absence	VPg
KJV2	SE	Kianjavato	Mg26	2004	0,9	Ser 4	ARN	ORF4	absence	
KJV3	SE	Kianjavato		2004	0,87	Ser 4				
MNJ1	SE	Morafeno/Mananjary	Mg32	2004	0,91	Ser 4				
MNJ2	SE	Ankatafana/Mananjary	Mg33	2004	0,82	Ser 4				
MNJ3	SE	Antsenavolo/Mananjary		2004	0,8	Ser 4 ?				
MNJ4	SE	Ampasimanjeva	Mg23	2004	0,82	Ser 4 ?	ARN	ORF4	absence	
MNJ5	SE	Sahasinaka		2004	0,82	Ser 4				
MNJ6	SE	Tanambao	Mg34	2004	0,85	Ser 4 ?	ARN	ORF4		
MNJ7	SE	Manakara	Mg24	2004	1,01	Ser 4 ?	ARN	ORF4	absence	
MNJ8	SE	Vohipeno		2004	1,15	Ser 4 ?				
MNJ9	SE	Ambalatany		2004	1,12	Ser 4 ?				
Mg1	NO	?	Mg1	Avant étude		Ser 4	ARN	ORF4+entière	présence	
Mg2	NO	Marovoay	Mg2	Avant étude		Ser 4	ARN	ORF4+entière	présence	
Mg3	S	Ranohira	Mg3	Avant étude		Ser 4				
Mg4	HPN	Ambatobe	Mg4	Avant étude		Ser 4				
Mg5	HPN	Talata	Mg5	Avant étude		Ser 4				

Annexe 2. Les différentes amorces utilisées

Amorce	Fragment	Tm	Séquence
<u>Sens</u>			
R1 : position 1	ORF1	61,2°C	5'CAA TTG AAG CTA GGA AAG GAG3'
R5bis : position 890	ORF2a		5'CTC GGG GTT ACG TGG TTG ATG TTT3'
F1SNP : position 1469	ORF2a	48°C	5'CCC GCT CTA CCA CAA3'
Position 2136	ORF2b	55,4°C	5'CAT GCT GGG AAA AGT GTC TG3'
III : position 3442	ORF4	54,5°C	5'CAA AGA TGG CCA GGA A3'
Sate : position 9-28	ORF1		5'GCAGGGGGCGGAGATTTTGT3'
F12	ADN		5'GAGCCCACCTTCTGTCCGATG3'
<u>Antisens</u>			
R6 : position 981	ORF1	60,3°C	5'ACC CCA GGA TTT ACT CTT T3'
R14bis : position 2399	ORF2a	60,3°C	5'ACT TCG CCG GTT TCG CAG AGG ATT3'
R1SNP : position 2117	ORF2a	44°C	5'AAA GAT GAC ACC CGA3'
Position 3577bis	ORF2b	53,35°C	5'GGC CAG GTT TTA GAA GAT AG3'
II : position 4450	ORF4	78,4°C	5'CTC CCC CAC CCA TCC CGA GAA TT3'
MA : position 4298	ORF4	77,6°C	5'GTG GGT GCG ATT CCC CAC ATG3'
Sate : position 197	ORF1		5'TGCCGGAGCACGATGACTGA3'
R6	ADN		5'AGTAGCTCACCAATTAGACGG3'

Tm: température de fusion (temperature of melting)

Annexe 3. Liste des variétés du germoplasme entrées dans les criblages

Variétés/lignées	Symptôme	DO à 15jai	DO à 30jai	DO à 45jai
<u>Prospection (48)</u>				
Vary mananelatra	3			
Ntsivy herina	5			
Karanimahia	7			
Mandriravina	5			
Komoja	3			
Vary patsa	5			
Malady afara	5			
Vary lavakely	5			
Taratasindrabà	5			
Tsipalandrazana	5			
Mamoriaka	7			
Tsimahabetrosa	5			
Intelomidina	5			
Telovolana Sambirano	5			
Mahafakovina	5			
Menamenabe	5			
Sambirano	5			
Andramonta	5			
Rambonohy Soavaly	5			
Tsipala menahara	5			
Tsipala A	3			
Boina 1329	5			
Ali Combo	5			
Komoja	3			
Ozalahy	3			
Vary lava kely	3			
Tsipalandrazana	3			
Telovolana	1			
1583	5			
1329	7	0,556	1,136	1,278
Tsipala A	9			
Kiriminy fotsy	7			
Sary Tsipala	9			
2822 Rojomena	9			
Varinimasera	7	0,361	0,585	1,09
Bekarosaka	1	0,125	0,024	0,026
VG 1317	5			
VG 668	5			
VG 1316	7			
VG 769	7			
VG 617	7			
VG 539	5			
Maintimbotsy	3	0,526	0,528	0,749
<u>Sélection/région (76)</u>				
Bater merah				
Tanpa Nama				

BM				
Nurdial				
Ipyenma caka x ME	5			
Pamela	5			
Canjur puttin	5			
Yenti	5			
PB 36	5			
Cisokan I	5			
Tangomerah	5			
PB 38	5			
Cianjur merah	7			
Cikapundung	5			
Semurah	5			
Leter H	5			
Kelara	5			
Citandui	5			
Bater merah	7			
H.9	7			
Mamunti	5			
IR 64	7			
DK 93	7			
Cisodan II	5			
Cica 8	5			
3309	5			
1697	5			
2345	5			
Suakoko	5			
5865 C-13F	5			
CNA 2009	7			
CNA 3462	5			
CNA 3464	7			
CNA 3470	7			
CNA 3762	3			
CNA 3771	5			
CNA 3922	5			
CNA 5662	5			
B 448	5			
166 C	5			
F 31/5	7			
F 73	5			
F 84/4	5			
12 R-5-15	3			
12 R-8-13	7			
12 R -10-6	5			
12 R -10-16	5			
12 R-10-66	5			
12 R-11-1	7			
23 R-2-1	5			
23 R -4-5	5			
IR 5931	5			

IR 9236	5			
Cica 8	7			
1055	7			
3308	9			
3309	5			
SINISIR	5			
Tado d shun	3			
Tche kouai	9			
B 54B/KN/12-2-2	7			
HB 96	7			
P 882-2-1-13-4-6	5			
KISUKE	9			
Mbosa Kabila	5			
RP 1125-1526	5			
2067 Chianan 2	3			
Jasmine	5	0,385	0,502	1,303
2787 Soamalandy	5			
V2	7			
V3	7			
V4	5	0,385	0,502	1,303
V5	5			
CISADANE	3			
ITA 306	3			
ITA336	1			
BG 90-2	7	1,238		
<u>IRRI lines (96)</u>				
IR 64	7			
X 372	7			
X307	7			
X111	5			
X 279	5			
X 386	5			
X 763	7			
IR 8	3			
IR 22	5			
IR 38	3			
X 360	5			
IR 20	5			
IR 21015-80-3-3-1-2	7			
3190 IR 38	5			
X 360 IR 21015-80-3-3-1-2	5			
2152 IR 20	7			
IR 50	3			
1811 IR 8	5			
X 29 IR 19743-46-2-3-3-2	3			
X 111 IR 54	5			
X 259 IR 13540-56-3	5			
X 279 Kaoshiung Sen Yu 252	7			
X 307 BR 11	5			

X 372 IR 9830-26-3-3	3			
X 386 Taichung Sen 10	7			
X 515 IR 19431-72-2				
X 591 Cica 8	5			
X 592 Ciwini	3			
X 763 IR 29692-94-2-1-3	5			
X 931 Tox 502-2-SRL-2-156-B	3			
X 954 IRAT 144	7			
X 957 SR 26 B	3			
X 1220 SR 7466-18-1-2-3-4				
X 1237 TAU 6464	3			
X 1248 IR 352	3			
X 1259 Tox 1769-3-1-1	9			
X 1280 BW 293-2	7			
X 1281 H4	3			
X 1282 MI 273	7			
X 1283 Suakoko	7			
X 1243 IR 31802-48-2-2-2	7			
IR 3149-23-3	7			
IR 8	7			
X 691 BKN FR 76042-18-1-1	7			
X 708 DWCT114-1-0-1-1-1-0-1	7			
X 265 IR 15579-24-2	9			
X 264 IR 15579-135-3	3			
Q 57 IR 19743-8-1-2-2	7			
IR 20913-B-60	7			
X 723 IR 21567-R-10-2-2	7			
X 1527 IR 29692-99-3-2-1	7			
Q111 IR 29874-B-8-4-1-1	7			
X 1251 IR 31787-16-1-2-3-2	7			
Q2 IR 32429-47-3-2-2	7			
X 1517 IR 33380-72-1-3	7			
Q 114 IR 33950-5-4-1-3-2	7			
X 1577 IR 34681-154-1-2-1	7			
Q116 IR 39133-7-4-3-1	7			
Q5 IR 39357-133-3-2-2-2	5			
X1563 IR 42068-22-3-3-1-3	5			
Q 25 IR 48563-166-3-1-1	9			
Q 43 IR 50363-27-3-2-3	9			
Q 44 IR 50363-61-1-1-2-2	7			
Q 53 IR 552280-96-2-2	7			
Q 50 IR 52786-162-3-2	9			
X 1193	9			
X 1526 IR 68	9			
1228 IR 8806-30-3-7	7			
IR 21015-80-3-3-1-2 MRV	7			
IR 21015-80-3-3-1-2 MPK	9			
IR 46 (Andapa)	5			
IR 9763-11-2-2-3	9			
X 415 SPR 9297-432-1-2-1	5			

X 1666 IR 55047-UBN-2-2-1	5			
X 1669 IR 57530-9-1-2-3-1	5			
X 1672 IR 60290-CPA-2-1-1-1-2	5			
X 265 IR 15579-24-2	7			
IR 9830-2-3-3	7			
X243	7	0,711	0,652	1,284
X360	3	0,379	0,358	1,241
X372	7	0,519	0,489	1,312
X398	5	0,435	0,457	1,322
X415	7	0,498	0,591	1,358
IR75083-21-23	7	0,379	0,358	1,241
IR75083-31-2	7	0,519	0,489	1,312
IR75083-33-25	7	0,435	0,457	1,322
IR75083-33-29	7	0,498	0,591	1,358
IR75083-45-11	5			
61	5			
IR75083-49-10	5			
IR75083-60-16	5			
IR75083-73-10	7			
IR75083-73-14	5			
IR75083-73-29	5			
IR 46	5			
IR 64	1			
<u>Tox lines (48)</u>	7			
Tox 1764	5			
TOX 3058-41-1-1-2-4-2	7			
TOX 3217-69-3-1	7			
TOX 3211-14-1-2-1-2A	5			
TOX 3219-51-1-3-1-1B	5			
TOX 3219-51-2-1-1-2A	5			
TOX 3233-3-2-6-2-2B	3			
TOX 3233-31-6-2-1-2A	7			
TOX 3389-60-2-2	7			
TOX 3399-75-1-3-3	7			
TOX 3399-75-3-1-3	3			
TOX 3399-158-3-3-3-1	3			
TOX 3413-104-3-2	9			
TOX 3413-172-1-3	7			
TOX 3440-16-1-2-1	9			
TOX 3440-16-3-1-1	7			
TOX 3440-49-1-2-1-1	5			
TOX 3440-49-1-2-1-2	5			
TOX 3441-123-2-1-1	5			
TOX 3441-123-2-2-1	7			
TOX 3441-123-2-2-2	7			
Tox 3217-69	7			
Tox 3217-71	9			
Tox 3219-51	3	0,123	0,37	0,156
Tox 3233-31	3	0,163	0,505	0,161
Tox 3211-1-1-2-2-1A	3	0,351	0,331	0,432

Tox 3211-31-4-1-4	3	0,222	0,425	0,5
Tox 3217-71-2-1	3	0,123	0,37	0,156
Tox 3219-14-2-4	3	0,163	0,505	0,161
Tox 3219-48-1-1	3			
Tox 3219-51-1-3-2-2B	1			
Tox 3219-64-2-4	3			
Tox 3220-14-4-1	3			
Tox 3223-26-4-2-1	1			
Tox 3226-5-2-2-2	3			
Tox 3229-1-9-2-3	3			
Tox 3233-31-6-2-1-1A	3			
Tox 3108-56-4-2-2-1	3			
Tox 3217-71-2-1	3			
Tox 3219-64-2-4	3			
Tox 3219-51-1-3-1-2A	3			
Tox 3220-14-4-2-4	3			
Tox 3226-5-2-2-2	3			
Tox 3229-31-6-2-3-2A	3			
Tox 3233-31-6-2-3-2A	3			
<u>Tog lines (7)</u>	5			
TOG 6472	7			
TOG6508	3			
TOG 6589	7			
TOG 6597	7			
TOG 6629	7			
TOG 5674-1	7			
TOG5675-1	1			
OG (144)	3			
OG 392-6	1			
OG392-10	3			
OG 392-12	5			
OG 392-14	5			
OG 392-17	7			
OG 394-4	7			
OG 394-8	7			
OG 394-11	7			
OG 394-12	7			
OG 395-7	7			
OG 397-1	7			
OG 397-2	7			
OG 399-2	7			
OG 401-8	7			
OG 401-13	7			
OG 402-3	7			
OG 402-4	7			
OG 402-7	7			
OG 402-11	7			
OG 402-12	7			
OG 402-13	3	1,336	1,276	1,117
OG 402-15	7	1,336	1,046	0,791

OG 403-1	9	1,073	1,238	1,022
OG 382-2	9	1,151	0,963	1,103
OG 382-5	9	1,071	1,145	1,067
OG 382-26	7	1,087	0,774	1,077
OG 382-33	9	1,171	1,070	0,868
OG 382-34	9	1,371	1,180	0,978
OG 906 bulk	9	1,257	0,841	0,904
OG 909 bulk	7	1,176	1,717	0,520
OG 912 bulk	7	0,821	0,902	0,936
OG 714 bulk	9	1,125	0,963	1,172
OG 936 bulk	7	1,062	0,006	1,074
OG 939 bulk	9	0,987	0,604	1,066
OG 923 bulk	7	1,234	0,727	1,419
OG 927 bulk	7	1,014	0,878	1,426
OG 932 bulk	5	0,461	0,563	1,526
OG 880 bulk	9	0,990	0,701	1,246
OG 436-4	9	1,151	3,126	1,298
OG 437-9	7	0,949	0,568	1,336
OG 437-12	7	0,807	0,833	1,548
OG 437-13	7	0,818	0,796	1,147
OG 437-15	7	1,072	0,143	0,678
OG 437-19	5	0,302	0,046	0,042
OG 437-20	9	0,888	0,754	0,651
OG 438-1	7	1,106	0,628	0,884
OG 438-6	1	0,868	0,600	0,003
OG 440-2	9	0,168	0,625	0,593
OG 440-3	5	0,608	0,712	0,526
OG 440-7	7	1,082	0,529	0,705
OG 440-11	1	0,640	0,409	0,029
OG 440-bulk	9	0,639	0,363	0,558
OG 441-17	7	2,778	0,688	0,747
OG 4401-20	9	0,611	0,093	0,939
OG 441-21	7	0,795	0,539	0,682
OG 441-bulk	9	0,65	0,714	1,006
OG 442-20	9	0,872	0,527	1,163
OG 442-23	7	0,317	0,642	0,814
OG 442-24	9	1,262	0,761	0,845
OG 442-32	9	1,129	0,546	0,936
OG 443-16	9	1,485	0,897	0,982
OG 443-17	7		0,524	0,987
OG 443-19	9	1,342	0,662	0,702
OG 443-39	9	1,511	0,677	0,790
OG 443-40	9	1,526	0,755	0,749
OG 443-42	9	1,223	0,024	0,717
OG 444-bulk	5	1,173	0,824	1,037
OG 445-13	5	1,031	0,829	0,791
OG 445-26	7	1,539	0,384	0,684
OG 445-bulk	9	0,867	0,574	0,766
OG 1238-bulk	9	0,667	0,571	0,767
OG 1241-bulk	9	1,327	0,402	0,587

OG 1243bulk	7	0,793	0,534	0,390
OG 1247 bulk	9	1,224	0,576	2,918
OG 1250 bulk	5	0,071	0,087	0,010
OG 1254 bulk	9	1,529	0,484	0,534
OG 1257 bulk	1	1,188	0,452	0,619
OG 1259 bulk	5	1,159	0,367	0,473
OG 1263 bulk	5	0,834	0,386	0,618
OG 1270 bulk	7	1,092	0,654	0,952
OG375-3	7	0,738	0,663	0,784
OG375-6	9	0,616	0,659	0,612
OG375-10	1	1,195	0,581	0,728
OG376-6	9	0,291	0,404	2,724
OG376-8	7	0,050	0,694	0,759
OG446-13	7	0,871	0,496	2,866
OG446-15	9	0,732	0,573	0,909
OG446-16	5	1,019	0,322	0,516
OG446-18	7	0,610	0,099	1,205
OG447-1	9	0,742	0,168	0,725
OG447-3	9	0,653	0,435	0,669
OG447-11	9	0,903	0,312	0,824
OG447-18	7	0,746	0,287	0,706
OG447-19	7	0,983	0,684	2,863
OG448-bulk	7	0,795	0,075	0,526
OG449-12	7	0,934	0,833	0,759
OG449-20	7	1,149	0,82	0,625
OG449-24	9	1,211	0,677	0,830
OG449-27	7	0,931	0,652	0,538
OG449-29	1	0,935	0,19	0,850
OG449-31	1	0,009	0,186	0,705
OG450-1	9	1,094	0,607	1
OG450-8	9	0,892	0,467	0,936
OG450-10	9	0,606	0,495	0,844
OG450-11	9	0,669	0,362	0,910
OG450-12	9	1,254	0,698	0,744
OG451-12	9	1,042	0,227	2,931
OG451-17	9	3,068	0,623	0,990
OG451-23	9	1,504	0,191	0,715
OG451-23	9	0,795	0,538	0,644
OG451-bulk	7	0,886	2,855	0,702
OG873-bulk	9	1,043	0,643	1,118
OG1280-bulk	7	0,89	0,908	0,971
OG1286-bulk	7	0,978	0,457	0,909
OG1289	7	1,232	0,565	0,656
OG1295-bulk	9	0,553	0,534	0,487
OG1298	9	1,291	0,689	0,744
OG1300	9	0,492	0,54	1,132
OG1304-bulk	7	0,54	0,481	0,858
OG347-1	9	2,893	0,607	1,217
OG347-2	9	0,688	0,131	1,215
OG347-5	9	0,41	0,134	1,181

OG350-49	9	0,443	2,738	0,804
OG352-9	9	1,052	0,849	1,259
OG352-24	7	0,613	0,553	0,720
OG352-25	9	0,462	0,495	1,081
OG352-28	7	0,72	0,53	0,592
OG359-1	9	0,44	1,135	0,898
OG383-4	7	0,611	0,85	0,948
OG383-11	7	0,596	0,713	1,077
OG 797 bulk	5	0,599	0,946	0,675
OG 453-21	7	2,815	0,577	0,908
OG 454-1	9	0,975	0,217	1,137
OG 455-7	7	0,529	0,591	1,439
OG 456-7	7			1,332
OG 1308 bulk	7			1,37
OG 1311 bulk	7			1,268
OG 1317 bulk	7			1,173
OG 1328	7			1,03
OG 1333	7			1,27
OG 357-1	7			1,285
OG 358-3	7			1,489
OG 861bulk	7			1,315
OG 898 bulk	7			1,298
<u>Upland rice (10)</u>				1,378
Morobérékan	7			1,003
Lac 23	7			0,125
Faro 2	1			1,38
Faro 41	7			
Faro 43	1			
IRAT 104	1			
IRAT 156	1			
IRAT 161	1			
IITA 235	1 (3)			
IITA 305	1			
<u>ON lines (2)</u>	1			
ON332	5	0,452	1,042	0,744
ON333	5	0,523	1,211	0,653
<u>Tsararano lines (72)</u>				
T61001				
T61002	3	0,452	1,042	0,744
T61003	3	0,523	1,211	0,653
T61004	7			
T61005	7	1,074	1,019	1,371
T61006	7	0,953	0,893	1,11
T61007	7	0,928	1,272	0,492
T61008	3	0,708	1,009	0,196
T61009	3	0,328	0,355	0,172
T61010	3	1,19	0,883	0,136
T61011	3	0,841	0,435	0,609
T61012	3	0,451	0,325	0,134
T61013	3	0,175	0,204	0,08

T61014	7	1,167	0,085	1,082
T61015	7	1,021	1,108	1,168
T61016	7	0,951	1,07	1,183
T61017	7	1,002	0,802	1,088
T61018	7	1,053	0,779	1,168
T61019	7	0,925	1,065	0,721
T61020	7	1,044	1,008	1,091
T61021	7	1,38	1,128	1,23
T61022	7	0,801	0,912	1,258
T61023	7	0,989	0,899	1,234
T61024	7	0,987	0,785	0,867
T61025	7	1,163	1,105	1,119
T61026	7	1,021	1,031	1,142
T61027	7	1,307	1,148	1,113
T61028	7	0,981	0,902	1,398
T61029	7	0,851	0,921	1,062
T61030	7	0,989	1,266	0,936
T61031	7	1,386	0,938	0,726
T61032	5	1,001	0,871	0,427
T61033	5	0,782	0,805	0,456
T61034	5	0,706	0,844	0,435
T61035	3	0,443	0,305	0,161
T61036	7	0,73	0,795	0,924
T61037	7	0,847	1,096	1,074
T61038	7	0,82	1,145	0,915
T61039	5	0,526	0,615	0,328
T61040	7	0,927	0,788	0,896
T70691	5	0,282	0,861	0,257
T70692	3	0,256	1,011	0,199
T70693	3	0,367	0,564	0,263
T70694	5	0,85	0,753	0,676
T70695	7	0,73	0,766	1,161
T70696	7	0,776	0,62	0,78
T70697	7	1,072	1,202	1,28
T70698	7	0,673	1,159	1,421
T70699	7	0,957	1,099	1,303
T70700	7	0,473	0,578	0,916
T70701	5	1,002	0,903	0,335
T70702	3	0,955	0,563	0,149
T70703	7	1,293	0,943	1,256
T70704	7	1,341	0,77	1,539
T70705	7	0,872	1,264	1,421
T70706	7	0,982	0,884	1,287
T70707	7	0,876	0,846	0,876
T70708	7	0,736	0,924	1,203
T70709	7	0,588	0,61	0,728
T70710	7	1,222	1,344	1,304
T70721	7	1,016	1,267	1,214
T70722	7	0,639	0,774	1,212
T70723	7	0,766	1,234	1,268

T70751	7	0,631	1,101	1,006
T70752	5	0,005	0,018	0,002
T70753	1	0,011	0,001	0,003
T70754	5	0,018	0,040	0,002
T70755	5	0,016	0,014	0,033
T70756	7	0,025	0,022	0,025
T70757	7	0,023	0,019	0,003
T70758	7	0,779	0,009	0,507
T70761	7	0,579	0,001	0,603

Title : Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Madagascar, Identification and Characterization of the rice variety Bekarosaka resistance

ABSTRACT : A sustainable control of the Rice yellow mottle virus lies on the understanding of the virus diversity, dispersion and phylogeography. These data allow the best efficiency of the use of available rice varietal resistance. The study showed that the Malagasy isolates showed a low serological (serotype ser 4) and molecular diversity and a closed phylogenetic relationship, suggesting a founder effect due to only one contamination or several ones from a same strain coming from the closest African coast, probably Mozambique. Malagasy isolates follow a sudden expansion population model that occurs, in most of case, in a founder effect. This result is consistent with the absence of satellite RNA, in opposite to the isolates from east Africa. RYMV arrived probably in the west coast of Madagascar, then spread and differentiated following the northwest-northeast-southeast direction. Compared to African strain representative isolates, those of Madagascar form a monophyletic cluster belonging to the strain S4 and differentiated from Tanzanian isolates later than the west and central African isolates.

In the other hand, symptom and ELISA based screening of 503 samples of the Malagasy germplasm showed two types of resistance. They showed that the traditional *Oryza sativa indica* variety named Bekarosaka that originated from Ambanja in the north of Madagascar was highly resistant. The introduced Tox 3219-51-1-3-2-2B and Tox 3233-31-6-2-1-1A lines showed partial resistance. Tolerance was found in the traditional cvs Maintimbotsy, in Mahadigny selected from IR21015-80-1-1-2, and in the local accessions ON332, ON333, T70722 and T70723. The other varieties were highly susceptible to RYMV.

Response of cultivar Bekarosaka to RYMV was characterised by a total absence of symptoms and undetectable virus content in ELISA tests. The resistance was stable towards representative Malagasy isolates and African strains of RYMV. However, the resistance was readily overcome by a pathotype originating from the northwest region of the country. The response of cv Bekarosaka to a range of RYMV pathotypes was similar to that of cv Gigante, an *indica* variety carrying the resistance gene *Rymv1*. Furthermore, the sequence of the middle domain of the eIF(iso)4G of cv Gigante, the genetic determinant of *Rymv1* high resistance on chromosome 4, was similar to that of cv Bekarosaka. Altogether, this suggests that cvs Bekarosaka and Gigante share the same allele of resistance *Rymv1-2* and indicates that Bekarosaka is the second highly resistant *indica* cultivar toward RYMV. However, these two cultivars *indica* have different morphology and geographic origin.

Resistance breaking mechanism of the isolate Mg16 consisted of three mutations in the VPg. A major domain of mutation was found on the 1726-1730 position where two successive substitutions change the wild type AGA (arginine) to GGA (glycine) then to GAA (glutamic acid). Two minor domains of mutation were observed in the 1708-1710 position with two successive substitutions, changing the wild type AAC (asparagine) to ACC (threonine) then to GCC (alanine); and in the 1738-1740 position with one substitution changing the wild type CAC (histidine) to TAC (tyrosine). In common, all mutations consisted to amino-acid class change.

These results contribute to the elucidation of the general mechanism of rice resistance breaking by RNA viruses. They give awareness in the deployment of the highly resistant cultivar Bekarosaka in Madagascar to avoid emergence of RYMV new variants in the field. However, the resistance gene of this *indica* variety offers a good opportunity to improve easily, without interspecific barrier, the resistance of traditional or improved susceptible varieties belonging to the same sub-species. It can be used in the resistance gene pyramiding with the newly identified tolerant and partially resistant varieties.

Key words: RYMV, phylogeography, resistance, pathotype, resistance breaking

Author : Rakotomalala Rasoafalimanana Mbolarinosy

Director of thesis: Ramavovololona, Département de la Biologie et Ecologie Végétale,
Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo Madagascar

Titre : Phylogéographie du Rice yellow mottle virus à Madagascar, Identification et Caractérisation de la résistance élevée de la variété de riz Bekarosaka

RESUME : Le contrôle durable du virus de la panachure jaune du riz ou *Rice yellow mottle virus* (RYMV) repose sur la compréhension de la diversité du virus, de sa dispersion et de sa phylogéographie. Ces informations permettent de valoriser avec une meilleure efficacité les résistances variétales du riz. L'étude a montré que la population d'isolats malgaches du RYMV affiche une faible diversité sérologique (sérotypage ser 4) et moléculaire, puis une relation phylogénétique étroite, reflétant un effet fondateur dû à une contamination unique ou à partir d'une même souche, probablement issue de la côte africaine la plus proche, probablement Mozambique. Elle exhibe aussi le modèle d'une population en expansion soudaine qui dérive, pour plusieurs cas, d'un goulot d'étranglement. Ce phénomène est en concordance avec l'absence d'ARN satellite chez les isolats malgaches, contrairement aux isolats de l'Afrique de l'est. Le RYMV serait arrivé sur la côte ouest de Madagascar et sa voie de dispersion et de différenciation aurait suivi une direction nord-ouest – nord-est – sud-est. Par rapport aux isolats représentatifs des souches africaines, ceux de Madagascar forment un groupe monophylétique appartenant à la souche S4. Leur différenciation à partir des isolats de la Tanzanie est plus récente que celle de l'Afrique centrale et de l'ouest.

D'un autre côté, le criblage par symptomatologie et par ELISA, de 503 échantillons du germoplasme malgache a révélé deux types de résistance au RYMV. Une résistance élevée est identifiée chez une variété traditionnelle d'*Oryza sativa indica* nommée Bekarosaka, venant d'Ambanja sis au nord de Madagascar. Une résistance partielle est trouvée chez Tox3219-51-1-3-2-2B et Tox 3233-31-6-2-1-1A introduite de l'IITA, Nigeria. La variété traditionnelle Maintimbotsy, la sélection Mahadigny (ex IR 21015-80-1-1-2) et les créations locales ON332, ON333, T70722 et T70723 ont exhibé une tolérance. La majorité des variétés testées s'avèrent très sensibles au virus. La réponse de la variété Bekarosaka au RYMV se manifeste par l'absence totale de symptôme et par une teneur en virus indétectable par le test ELISA. Cette résistance est stable vis-à-vis des isolats représentatifs des régions rizicoles malgaches et des souches africaines. Cependant, elle a été contournée par un pathotype Mg16 venant de la région du nord-ouest de Madagascar. La réaction de la variété Bekarosaka à une gamme de pathotypes est similaire à celle de la variété Gigante qui porte le gène de résistance *Rymv1*. Par ailleurs, la séquence d'acides aminés du domaine central de l'eIF(iso)4G de Gigante qui est le déterminant génétique du gène de résistance *Rymv1* localisé sur le chromosome 4, est semblable à celle de la variété Bekarosaka. Ces résultats suggèrent que les variétés de type *indica* Bekarosaka et Gigante partagent le même allèle de résistance *Rymv1-2*. et indique que la variété Bekarosaka est la deuxième variété de type *indica* à résistance élevée. Ces deux variétés sont pourtant différentes du point de vue morphologie et origine géographique.

Le mécanisme de contournement de la résistance de la variété Bekarosaka par l'isolat Mg16 consiste en trois mutations au niveau du VPg. Le domaine majoritaire de la mutation réside à la position 1728-1930 avec deux substitutions successives du codon AGA (arginine) en GGA (glycine) et puis en GAA (acide glutamique). Deux domaines minoritaires de mutations se trouvent sur la position 1708-1710 consistant en deux substitutions du codon AAC (asparagine) en ACC (thréonine) et ensuite en GCC (alanine) et sur la position 1738-1740 consistant en une substitution du codon CAC (histidine) en TAC (tyrosine). Toutes les mutations coïncident à un changement de classe d'acides aminés.

Ces résultats contribuent à l'élucidation du mécanisme de contournement de la résistance du riz par les virus à ARN, en général. Ils donnent aussi une certaine réserve au déploiement de la variété à résistance élevée Bekarosaka à Madagascar pour éviter l'apparition de nouveaux variants du RYMV dans la nature. Le gène de résistance de la variété Bekarosaka de type *indica* présente pourtant un atout dans l'amélioration de la résistance des variétés traditionnelles ou améliorées sensibles de la même sous-espèce, sans problème de barrière interspécifique. Il peut aussi être impliqué dans le pyramidage de gènes avec les variétés tolérantes ou à résistance partielle nouvellement identifiées.

Mots-clefs : RYMV, phylogéographie, résistance, pathotype, contournement de la résistance

Auteur : Rakotomalala Rasoafalimanana Mbolarinosy

Directeur de thèse: Ramavovololona, Département de la Biologie et Ecologie Végétale,
Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo Madagascar