



LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE VEGETALE

Année universitaire : 2012-2013

THESE

Présentée à l'UFR Biosciences pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE FÉLIX HOUPHOUËT-BOIGNY

En Physiologie Végétale

Option : Virologie

Par

ISSAKA Souley

THEME :

**LA PANACHURE JAUNE DU RIZ EN AFRIQUE DE L'OUEST : EPIDEMIOLOGIE,
DISTRIBUTION, PATHOGENIE ET VARIABILITE DU *RICE YELLOW MOTTLE VIRUS*
(RYMV) AU NIGER.**

Soutenue publiquement, le **21 Mars 2013**, devant le jury composé de :

M. ZOUZOU Michel	Professeur Titulaire, Université FHB (Abidjan)	Président
M. AKE Séverin	Professeur Titulaire, Université FHB (Abidjan)	Directeur de Thèse
M. SERE Yacouba	Directeur de Recherches, AfricaRice Tanzanie	Co-directeur
M. FARGETTE Denis	Directeur de Recherches, IRD Montpellier	Examineur
M. KONE Daouda	Maître de Conférences, Université FHB (Abidjan)	Rapporteur
M. KOUASSI K. Nazaire	Maître de Recherches, LCB-CNRA (Abidjan)	Rapporteur

A

*Mes merveilleux parents,
mon adorable épouse Mariama et
ma princesse Nadira (en guise d'exemple).*

AVANT-PROPOS

Les travaux de cette thèse ont été financés par la Fondation Internationale pour la Science (IFS), le Centre du riz pour l'Afrique (ex-ADRAO) et le Département Soutien et Formation (DSF) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Ils ont été réalisés en alternance entre l'Institut National de la Recherche Agronomique du Niger (INRAN), le Centre du riz pour l'Afrique (AfricaRice Center), le Laboratoire des Résistances des Plantes aux Bioagresseurs (RPB) de l'IRD de Montpellier et le Laboratoire de Physiologie Végétale de l'Université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire). Toutes ces structures ont contribué efficacement à la préparation et à l'aboutissement desdits travaux.

La panachure jaune est la maladie virale du riz la plus répandue en Afrique, avec de fortes incidences et des pertes économiques importantes. A défaut d'une solution définitive et durable à la propagation de l'épidémie au champ, les études sont axées sur l'importance de l'épidémie dans les différentes zones rizicoles, la connaissance du pathogène (sérologique, biologique et moléculaire) qu'est le RYMV (*Rice yellow mottle virus*) et l'utilisation des gènes de résistance. Actuellement, au-delà de la caractérisation épidémiologique des périmètres rizicoles et de l'évaluation séro-biologique des souches de RYMV potentiellement pratiquée, les études utilisent l'outil moléculaire pour procéder à une étude fine de la diversité (pathologique et génétique) des isolats du virus et du déterminisme du contournement de la résistance de l'hôte (le riz).

Toutes ces études visent à identifier des variétés résistantes adaptées aux écologies rizicoles contrastées d'Afrique, en vue de leur déploiement efficace. C'est pourquoi notre étude ayant pour thème «La panachure jaune du riz en Afrique de l'Ouest : épidémiologie, distribution, pathogénie et variabilité du *Rice yellow mottle virus* (RYMV) au Niger» s'est intéressée à l'évaluation de l'épidémie de la panachure jaune du riz au Niger. Elle s'est appuyée surtout sur l'incidence, les pertes de productions engendrées, la structure des populations du virus et le rôle des adventices et du riz sauvage dans la propagation de la maladie au Niger. L'étude a aussi porté sur les aspects de la diversité génétique et pathologique du virus et a contribué à la connaissance des bases moléculaires de la pathogénie de la souche RYMV-Niger et du contournement de la résistance du riz ; toutes ces informations contribuant à conseiller efficacement les utilisateurs de la filière riz.

Nos travaux ont bénéficié de l'expertise des grandes institutions avancées (ci-dessus énumérées) dans l'étude du virus de la panachure jaune du riz.

REMERCIEMENTS

Je loue Dieu, le miséricordieux, l'omnipotent pour m'avoir donné la force, le courage et les ressources morales nécessaires à l'accomplissement des travaux de cette thèse.

Les résultats de cette thèse ont été obtenus grâce aux soutiens financiers de l'IFS (Fondation Internationale pour la Science), du Centre du riz pour l'Afrique (AfricaRice) et de l'IRD (Institut de Recherche pour le développement). Ils ont été encadrés, compilés et présentés à l'UFR Biosciences de l'Université Félix Houphouët-Boigny.

Je remercie la **Fondation Internationale pour la Science** (IFS), pour l'allocation octroyée et la contribution dans l'amélioration du projet de thèse. Je voudrais particulièrement remercier les conseillers scientifiques et les administrateurs de la Fondation pour leur inestimable appui et leur disponibilité.

Je remercie les **Doyens successifs de l'UFR Biosciences** pour m'avoir accepté en DEA puis en thèse de Physiologie et Pathologie Végétales (2008-2012). Je remercie aussi tous les responsables de la scolarité qui m'ont toujours dans mes démarches d'inscription.

Les **membres du jury de la thèse** ont accepté d'évaluer mon travail, malgré leurs multiples occupations. Je les remercie pour les précieuses observations, suggestions et contributions qu'ils ont bien voulu apporter à mes travaux.

Le **Prof. Zouzou Michel** m'a fait l'honneur de présider cette thèse malgré ses différentes occupations. Je lui en suis très reconnaissant et le remercie vivement pour sa précieuse contribution à l'amélioration du document. Professeur, merci aussi pour votre encadrement scientifique de mon mémoire de DEA !

Le **Prof. Aké Séverin** a accepté de diriger cette thèse malgré ses multiples tâches scientifiques, administratives et d'encadrement. C'est pourquoi je lui exprime ici toute ma reconnaissance aussi bien pour son encadrement et sa rigueur scientifiques, ses appuis multiformes et ses précieux encouragements que pour sa grande disponibilité. Ces éléments ont été très déterminants dans la conduite et la finalisation des travaux. Professeur, je vous remercie vivement pour tout l'intérêt que vous avez accordé à ce travail.

J'apprécie hautement le précieux encadrement scientifique du **Prof. Yacouba Séré** (Co-directeur de thèse). Ce dernier est l'artisan principal de ce travail depuis le montage jusqu'à l'aboutissement. Qu'il en soit sincèrement remercié pour ses multiples efforts et qu'il

trouve ici l'expression de ma profonde gratitude. Il est pour moi plus qu'un tuteur scientifique. Professeur, vous êtes un model.

Les travaux moléculaires et les tests sérologiques ont été possibles grâce l'inestimable encadrement scientifique et la parfaite collaboration du **Prof. Denis Fargette** (Directeur de Recherches IRD Montpellier, Co-directeur Thèse). Je lui exprime ici toute ma reconnaissance pour sa précieuse contribution scientifique, son indefectible soutien et ses encouragements.

Le **Prof. Koné Daouda** (Maître des Conférences, UFHB) a accepté d'évaluer et de participer au jury de soutenance de cette thèse malgré ses différentes occupations. Je le remercie beaucoup pour ses conseils avisés et ses utiles suggestions.

Je remercie le **Prof. Kouassi Koffi Nazaire**, Directeur du Laboratoire central de biotechnologies (LCB) du CNRA d'Adiopodoumé (Côte d'Ivoire), pour avoir accepté d'évaluer et de participer au jury de soutenance de cette thèse. Je le remercie beaucoup pour ses précieuses critiques et observations qui ont permis d'améliorer la qualité du travail. Professeur, merci aussi pour l'heureuse opportunité que vous m'avez offerte en m'accordant un stage de sérologie dans votre illustre laboratoire!

Les **enseignants du Laboratoire** de Physiologie Végétale de l'Université Félix Houphouët-Boigny ont grandement contribué à ma formation de DEA et à mon encadrement. Qu'ils soient remerciés pour leur rigueur scientifique. J'adresse un remerciement particulier au **Prof. Anno Abo Pierre**, pour m'avoir accepté dans son DEA. J'apprécie aussi fortement l'appui constant de **Dr. Sorho Fatogoma** tout au long de cette thèse (merci cher aîné).

L'AfricaRice a accepté de loger les travaux de cette thèse et d'être le bailleur principal. Je le remercie pour cette disposition et je salue l'inestimable appui administratif du **Dr. Papa Seck** (Directeur Général) et des Directeurs de la recherche (**Marco Wopereis**) et de la formation (**Ada Cyril**).

Je remercie le **Département Soutien et Formation** (DSF) et le laboratoire **RPB** (Résistance des Plantes aux Bioagresseurs) de l'**IRD**, pour la bourse à moi octroyée et pour l'accueil. Je remercie en particulier **Dr. Nicole Michel** (Directeur de l'UMR 186-RPB), pour m'avoir accueilli dans son unité et pour toutes les commodités dont j'ai bénéficiées à Montpellier. J'exprime aussi ma reconnaissance à **Dr. Eugénie Hébrard**, pour son appui scientifique et sa disponibilité.

L'**Institut National de la Recherche Agronomique du Niger** (INRAN) a été mon institution d'attachement où le travail a été initié et démarré. C'est donc pour moi un devoir de remercier **Dr. Issaka Mamane** (Ex-Directeur général), **Dr. Mohamadou Gandah** (Ex-

Directeur scientifique), **Dr. Barkiré Gabdakoye** (Ex-Directeur CERRA Kollo), **Dr. Amir Sido** (Ex-Chef DCI) et **Dr. Haougui Adamou** (Ex-Directeur de CERRA) pour la disponibilité, les facilités administratives et l'appui scientifique dont j'ai bénéficié.

Les **assistants, doctorants, techniciens et tout le personnel** de l'INRAN, de l'Unité de Phytopathologie d'AfricaRice et du laboratoire RPB / IRD m'ont chacun en ce qui le concerne facilité les conditions de travail. Je les remercie alors pour leurs appuis et leur convivialité. Je remercie en particulier **Dr. Amos Onasanya** et **Dr. Akator Koffi**, tous deux assistants de recherche à AfricaRice, pour leur accompagnement et leurs appuis dans les manipulations. J'exprime aussi ma reconnaissance à **Mme Agnès Pinel** (Ingénieur de Recherche à l'IRD) pour m'avoir efficacement initié et accompagné en biologie moléculaire (merci, Mme l'Ingénieur !). Un grand merci à **M. Mahamadou Bizo**, **M. Chaibou Sodé**, **M. George Soton** et **M. Jamel Aribi** 'Afrique', pour s'être occupés de mes essais. J'apprécie aussi la disponibilité et l'accompagnement de **Mme Sylvie Pounhet**, gestionnaire à l'UMR RPB/IRD de Montpellier.

Je rends un hommage posthume à feu **Dr. Nguessan Koffi Placide** (de son vivant Phytovirologue et Chef du programme Riz du CNRA de Man - Côte d'Ivoire) qui fut mon maître de mémoire de DEA et qui m'a initié à la virologie. C'est le lieu d'avoir une pensée particulière pour lui. C'est aussi pour moi le lieu d'avoir une pensée pieuse à l'endroit de mon regretté oncle **Ibrahim Mayaki**, lui qui m'exhortait à poursuivre si loin les études. Ce travail est le fruit de ses incommensurables conseils et encouragements. Qu'ils reposent tous deux en paix!

J'exprime mon amitié à mes condisciples doctorants **Basso Adamou**, **Sow El. Hassimi Mounirou**, feu **Amancho Nicaise** (paix à son âme), **Nils Poulicard** et **Théophile Odjo** avec qui j'ai partagé les différents moments de la thèse et qui m'ont souvent remonté le moral.

Au-delà de ce travail, nombreux sont mes parents et amis qui m'ont soutenu durant mes longues années d'étude. Ce travail a été possible grâce à leur accompagnement. J'apprécie surtout le soutien filial et fraternel de mon oncle **Assoumi Mayaki** et de mes petits frères **Zakari** et **Garba Issaka**. J'associe à ces remerciements tous mes amis du CAS (Club des amis solidaires), notamment **Attanine Saïdou**, **Hamani Soumaïla**, **Amadou Issaka** et **Amadou Boureïma**, pour leur indéfectible soutien. J'exprime aussi mon amitié à mon condisciple **Bomborou Boureïma** que j'encourage à poursuivre la thèse.

Je remercie enfin, à défaut de pouvoir nommer individuellement, tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement des travaux de cette thèse.

SOMMAIRE	Page
AVANT-PROPOS	ii
REMERCIEMENTS	iii
SOMMAIRE	vi
SIGLES ET ABREVIATIONS	xi
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	xvii
INTRODUCTION GENERALE	1
1 ^{ère} PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Chapitre 1 : Généralités sur le Riz (<i>Oryza sp.</i>)	4
1. 1. Classification et distribution	4
1. 2. Conditions de culture	4
1. 3. Importance et contraintes de la riziculture	5
Chapitre 2 : Les maladies virales	7
2. 1. Aperçu sur les virus	7
2. 2. Modes de transmission des virus et de contamination des plantes	9
2. 3. Cycle de développement des virus	10
2. 4. Diagnostic et lutte contre les maladies virales	10
2. 5. Mécanismes de défense des plantes contre les virus	11
2. 6. Gènes de résistance des plantes aux virus	12
2. 6. 1. Gènes dominants R de résistance	12
2. 6. 2. Gènes récessifs de résistance aux virus à ARN	13
2. 7. Contournement des résistances des plantes par les virus	15
2. 8. Phylogénie et méthodes de construction phylogénétique	15
2. 8. 1. Phylogénie et phylogéographie	16
2. 8. 2. Méthodes de reconstruction phylogénétique	16
Chapitre 3 : La panachure jaune du riz	18
3. 1. Distribution géographique et incidence	18
3. 2. Epidémiologie	18
3. 2. 1. Symptômes de la panachure jaune du riz	18
3. 2. 2. Gamme d'hôtes du RYMV (<i>Rice Yellow Mottle Virus</i>)	20
3. 2. 3. Modes de transmission du RYMV	24

3. 3. Le virus de la panachure jaune du riz (RYMV)	25
3. 3. 1. Classification, purification et structure du virus	25
3. 3. 2. Organisation génomique	28
3. 3. 3. Localisation et propriétés des particules virales.....	28
3. 3. 4. Cycle du RYMV.....	30
3. 3. 5. Variabilité génétique du RYMV	31
3. 3. 5. 1. Variabilité sérologique du RYMV en Afrique	31
3. 3. 5. 2. Variabilité moléculaire du RYMV en Afrique.....	32
3. 3. 5. 3. Variabilité génétique du RYMV au Niger	33
3. 3. 6. Variabilité pathogénique	33
3. 3. 7. Résistance du riz au RYMV	36
3. 8. Déterminisme de la résistance du riz au RYMV et son contournement par le RYMV ...	38
3. 8. 1. Déterminisme de la résistance du riz au RYMV	38
3. 8. 2. Déterminisme du contournement de la résistance du riz au RYMV	38
3. 9. Méthodes de lutte contre le RYMV	40
3. 9. 1. Lutte culturale et chimique.....	40
3. 9. 2. Lutte génétique.....	40
Chapitre 4 : Milieu d'étude et sites d'expérimentation	42
4. 1. Zone d'étude.....	42
4. 1. 1. Zone Ouest du Niger	42
4. 1. 2. Zone d'étude de l'Est du Niger	42
4. 1. 3. Zones rizicoles prospectées au Nigeria	44
4. 2. Sites d'expérimentation.....	44
4. 2. 1. Site expérimental des tests pathologiques et sérologiques.....	44
4. 2. 2. Site des tests moléculaires.....	44
2^e PARTIE : MATERIEL ET METHODES.....	45
Chapitre 5 : Matériel.....	45
5. 1. Matériel	45
5. 1. 1. Matériel végétal.....	45
5. 1. 1. 1. Matériel végétal de caractérisation biologique préliminaire du RYMV-Niger.....	45
5. 1. 1. 2. Matériel végétal d'évaluation biologique du RYMV-Niger	45
5. 1. 1. 3. Matériel végétal des infections mixtes de pathotypes du RYMV-Niger	45
5. 1. 2. Matériel viral	47
5. 1. 3. Anticorps de RYMV	47

5. 1. 4. Amorces de RYMV	53
5. 1. 5. Séquences de référence de RYMV	53
Chapitre 6 : Méthodes	57
6. 1. Collecte d'échantillons et évaluation de l'épidémiologie sur les sites rizicoles de Niger	57
6. 2. Echantillonnage	57
6. 3. Détection du virus dans les échantillons collectés	58
6. 4. Evaluation biologique du RYMV-Niger	58
6. 5. Infections mixtes des pathotypes	60
6. 6. Détermination des hôtes réservoirs	60
6. 7. Inventaire des isolats du virus et cartographie de la maladie	62
6. 8. Techniques moléculaires	62
6. 8. 1. Extraction des ARNs totaux	62
6. 8. 2. Réaction RT-PCR	63
6. 8. 2. 1. Transcription reverse (RT)	63
6. 8. 2. 2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	63
6. 8. 2. 3. Révélation des amplicons par gel d'agarose	64
6. 8. 3. Séquençage des portions d'ADN amplifiées et analyse des séquences obtenues	64
6. 8. 4. RT-PCR quantitative	65
6. 8. 4. 1. Extraction de l'ARN viral et RT	66
6. 8. 4. 2. qPCR SYBR Green Brillant II	66
6. 8. 4. 3. Quantification et uniformisation des ARNs	66
6. 8. 5. Recherche d'isolats contournants	67
6. 8. 6. Recherche des mutations de contournement	67
6. 9. Collecte des données des études d'évaluation biologique	68
6. 9. 1. Données d'évaluation biologique du RYMV-Niger	68
6. 9. 2. Données des tests d'infection mixte de pathotypes	68
6. 10. Dispositif expérimental et analyses statistiques des données pathologiques	69
3^e PARTIE : RESULTATS	70
Chapitre 7 : Epidémiologie de La panachure jaune du riz au sein des périmètres irrigués du Niger	70
7. 1. Monographie des sites visités	70
7. 2. Cartographie et importance de la maladie dans les rizières du Niger	72
7. 3. Hôtes réservoirs du RYMV-Niger	72
7. 4. Structure des populations de RYMV au Niger	76

Chapitre 8 : Variabilité génétique et Biologique du <i>Rice Yellow Mottle Virus</i> (RYMV) au sein des périmètres irrigués du Niger	80
8. 1. Variabilité génétique du RYMV au Niger	81
8. 1. 1. Résultats sérologiques	81
8. 1. 1. 1. Résultats sérologiques avec les anticorps polyclonaux (Pabs).....	81
8. 1. 1. 2. Résultats sérologiques avec les anticorps monoclonaux (Mabs)	81
8. 1. 2. Phylogénie et phylogéographie du RYMV au Niger	81
8. 2. Variabilité biologique du RYMV au Niger et déploiement des gènes de résistance	87
8. 2. 1. Interactions et groupage des isolats et des variétés	87
8. 2. 2. Prévalence et distribution des différents types d'isolats de RYMV au Niger.....	98
Chapitre 9 : Déterminisme génétique et moléculaire de la pathogénie du RYMV et du contournement de la résistance du riz	100
9. 1. Base génétique de la pathogénie : Présence de deux pathotypes du RYMV au Niger ..	100
9. 2. Prévalence des isolats RB et leur distribution dans l'écologie rizicole du Niger	103
9. 3. Bases génétiques et moléculaires du contournement des allèles <i>rymv1-2</i> et <i>rymv1-3</i> des isolats RYMV-Niger	108
Chapitre 10 : Determinisme génétique de l'adaptation du RYMV au fond génétique de riz	111
10. 1. Réactions des pathotypes T et E de RYMV vis-à-vis des deux espèces de riz.....	111
10. 1. 1. Symptômes observés selon le fond génétique utilisé	111
10. 1. 2. Quantité d'ARNs extraits des plants en simples inoculations.....	113
10. 2. Comportement des pathotypes (T et E) de RYMV en infections simples	113
10. 3. Sélection du pathotype (T ou E) par le fond génétique de riz co-inoculé.....	116
10. 4. Mécanisme (s) d'adaptation des pathotypes T et E aux fonds génétiques de riz	118
4^e PARTIE : DISCUSSION	119
Epidémiologie de la panachure jaune du riz au sein des périmètres irrigués du Niger	119
Fréquence des génotypes cultivés sur les périmètres prospectés	119
Distribution géographique et importance de la panachure jaune du riz au Niger	119
Hôtes réservoirs du RYMV au Niger	120
Structure des populations du RYMV au Niger	121
Variabilité génétique et biologique du <i>Rice Yellow Mottle Virus</i> (RYMV) au Niger	122
Variabilité génétique du RYMV-Niger.....	122
Variabilité biologique du RYMV dans les rizières du Niger	124

Déterminisme génétique et moléculaire de la pathogénie et du contournement des allèles <i>rymv1-2</i> et <i>rymv1-3</i> au Niger	126
Déterminisme génétique de la pathogénie du RYMV-Niger et distribution des pathotypes .	126
Déterminisme génétique et moléculaire du contournement de la résistance des allèles <i>rymv1-2</i> et <i>rymv1-3</i> au Niger.....	129
Adaptation des pathotypes du RYMV-Niger aux fonds génétiques <i>O. sativa</i> et <i>O. glaberrima</i>	132
Sélection du pathotype (T ou E) en fonction du fond génétique de riz.....	132
Mécanismes d'adaptation des pathotypes aux fonds génétiques de riz et distribution actuelle des pathotypes en Afrique	133
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
ANNEXES	156

SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ADRAO : Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest
(Connue depuis 2003 sous le nom de Centre du Riz pour l'Afrique ou AfricaRice)

AFRICARICE : Centre du riz pour l'Afrique

AGRHYMET : Centre régional pour l'agriculture, l'hydrologie et la météorologie

ARN : acide ribonucléique

BET : Bromure d'Ethidium

Bké 189 : variété Bouaké 189

Cv ou cv. : Cultivar

CNRA : Centre National de Recherche Agronomique

CERRA : Centre Regional de Recherche Agronomique

DSF : Département Soutien et Formation de l'IRD

DCI : Département des Cultures Irriguées

ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

Gig : variété Giganté

IFS : Fondation Internationale pour la Science

IITA : Institut International pour l'Agriculture Tropicale

INRAN : Institut National de la Recherche Agronomique du Niger

IRD : Institut de Recherche pour le Développement

IRRI : Institut International de Recherche sur le Riz

J : jour

JAI : Jour Après Inoculation

JAS : Jour Après Semis

JAS : Jour Après Transplantation

Kb : Kilo base

Kda : kilodalton

Kg : kilogramme

l : litre

m² : mètre carré

Mabs : anticorps monoclonaux

M-MLV-RT : Moloney- Murin Leukomie Virus – Reverse Transcriptase ou enzyme de transcription reverse

NERICA : Nouveau riz pour l’Afrique

ONAHA : Office National des Amenagements Hydro-Agricole

ORF : Open Reading Frame ou cadre ouvert de lecture

Pabs : anticorps polyclonaux

PBST : Phosphate Buffer Saline Tween

PC ou CP : Protéine de Capside

PCR : Polymerase Chain Reaction ou Réaction d’amplification et polymérisation en chaine

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction ou PCR quantitative

PTGS : Post Transcriptional Gene Silencing ou Suppression post-transcriptionnelle

QTL : Quantitative trait loci

RPB : Laboratoire de la Résistance des Plantes aux Bioagresseurs

RT : Transcription Inverse

RT-PCR : Réaction de transcription inverse-Réaction d’Amplification et de polymérisation en Chaîne

RYMV : *Rice Yellow Mottle Virus* (Virus de la panachure jaune du riz)

RECA Niger : réseau des chambres d’agriculture du Niger

S 1- CA : Souche S1 d’Afrique du Centre

S1-AO : Souche S1 d’Afrique de l’Ouest

S1-AOC : Souche S1 d’Afrique Ouest-Centrale

Ser : Sérotype

Sg : séro groupe

Spad / Spad meter : modèle d’appareil pour mesurer le taux de la chlorophylle

TEA : Tri-Acétyl-Ethylène

TP309 : Variété de riz Tapei 309

Tog : Tropical Oryza Glaberrima

V : Volt

VIGS : Suppression du gène viral d’induction (Viral induced gene silencing)

VPg : Protéine Virale liée au Génome (viral protein genome linked).

LISTE DES FIGURES	Page
Figure 1 : Carte de distribution de la panachure jaune du riz en Afrique (Issaka, 2010).....	19
Figure 2 : Panachure et jaunissement caractéristiques (cercle bleu) de la panachure jaune du riz dans une parcelle de Kollo, Niger (Issaka, 2007).	21
Figure 3 : Rabougrissement et nanisme d'un pied de riz virosé (cercle bleu) en parcelle paysanne à Liboré, Niger (Issaka, 2008).....	21
Figure 4 : Symptômes caractéristiques de la panachure jaune du riz en champ paysan à Saga, Niger (Issaka, 2010).	22
Figure 5 : Plants de variétés de riz sensibles avec et sans symptômes de panachure jaune (flèches) en serre à AfricaRice Cotonou (Issaka, 2008).....	22
Figure 6 : Début de l'infection de panachure jaune du riz en bordure de champ (cercle bleu) à Saga, Niger (Issaka, 2010).	23
Figure 7 : Structure du <i>Rice Yellow Mottle Virus</i> (RYMV) à différentes résolutions (Qu <i>et al.</i> , 2000, cités par Kaouassi <i>et al.</i> , 2005)	27
Figure 8 : Organisation génomique du <i>Rice Yellow Mottle Virus</i> (Fargette <i>et al.</i> , 2004).....	29
Figure 9 : Localisation géographique du delta intérieur du Niger (entouré en rouge).....	34
Figure 10 : Modélisation du facteur d'initiation de la transcription eIF (iso) 4G du riz (Albar <i>et al.</i> , 2006).....	37
Figure 11 : Modélisation du facteur d'initiation de la transcription eIF 4G du riz et de l'interaction avec la VPg du RYMV (Hébrard <i>et al.</i> , 2006).	39
Figure 12 : Représentation des deux zones rizicoles (Ouest et Est) prospectées (Issaka, 2010)	43
Figure 13 : Sens de fixation des amorces lors de la PCR et du séquençage du génome de RYMV (Issaka, 2010).	56
Figure 14 : Carte des sites rizicoles prospectés au Niger et incidence de la panachure jaune du riz (Issaka, 2009).	73
Figure 15 : Symptômes caractéristiques de panachure jaune produits sur quatre variétés de riz inoculées avec l'isolat virulent Ng144 (cas de contournement) à AfricaRice (Issaka, 2008) .	77
Figure 16 : Phylogénie et phylogéohgraphie du RYMV en Afrique de l'Ouest et du Centre : cas du Niger (Issaka, 2010)	85
Figure 17 : Phylogénie de la Souche RYMV du Niger (Issaka, 2010)	86
Figure 18 : Effet principal de l'interaction génotype (variété) x environnement (isolats) sur la sévérité des isolats RYMV-Niger, selon le modèle AMMI (Issaka, 2010)	92

Figure 19 : Effet de l'interaction génotype (variété) x environnement (isolats) sur la sévérité des isolats RYMV-Niger, selon le modèle AMMI.	93
Figure 20 : Dendrogramme montrant les pathogroupes du RYMV-Niger, révélés par l'analyse AMMI.	96
Figure 21 : Dendrogramme des 9 variétés de riz testés vis-à-vis du RYMV-Niger	97
Figure 22 : Alignement des séquences d'acides (AA) de la VPg des isolats du RYMV-Niger testés : polymorphisme E et T en position 49 (*) de la VPg.	102
Figure 23 : Prévalence des différents pathotypes du RYMV-Niger, révélés par différentes méthodes de diagnostic du virus.	105
Figure 24 : Carte de distribution des isolats contournants dans l'environnement rizicole du Niger (Issaka, 2010).	107
Figure 25 : Alignement des séquences d'AA de la VPg des isolats RB du RYMV-Niger comparés aux isolats sauvages	109
Figure 26 : Score moyens des symptômes induits à 21 et 42 JAI chez les variétés IR64 et Tog5673 simplement inoculées par les pathotypes T et E. (JAI : jours après inoculation)..	112
Figure 27 : Score moyens des symptômes induits à 21 et 42 JAI (jours après inoculation) chez les variétés IR64 et Tog5673 co-inoculées par les pathotypes T et E.	112
Figure 28 : Quantité moyenne d'ARNs produits par pathotype de RYMV sur la variété de riz Tog5673	114
Figure 29 : Quantité moyenne d'ARNs produits par pathotype de RYMV sur la variété de riz IR64	114

LISTE DES TABLEAUX	Page
Tableau I : Principaux virus du riz (Calvert <i>et al.</i> , 2003 ; Siré et Brugidou, 2002).....	8
Tableau II : Espèces virales membres définitifs et provisoires du genre <i>Sobemovirus</i> (Fauquet <i>et al.</i> 2005)	26
Tableau III : Identité des variétés testées	46
Tableau IV : Isolats utilisés dans le sérotypage (avec les Pabs) et les tests biologiques.....	48
Tableau IV : Isolats utilisés dans le sérotypage (avec les Pabs) et les tests biologiques (suite et fin)	49
Tableau V : Liste des isolats du RYMV-Niger utilisés dans l'étude de la diversité génétique et dans le contournement de la résistance du riz par le RYMV	50
Tableau VI : Isolats utilisés dans l'étude de phylogénie du RYMV-Niger	51
Tableau VII : Isolats utilisés dans les compétitions entre pathotypes E et T	52
Tableau VIII : Anticorps polyclonaux utilisés dans le sérotypage du RYMV-Niger	52
Tableau IX : Profil de réaction des souches du RYMV aux anticorps monoclonaux	52
Tableau X : Amorces d'amplification et de séquençage de la VPg du RYMV.....	54
Tableau XI : Amorces d'amplification et de séquençage de la CP du RYMV.....	54
Tableau XII : Liste des amorces utilisées dans le séquençage du génome entier.....	55
Tableau XIII : Amorces spécifiques utilisées dans la qPCR.....	56
Tableau XIV : Echelle de notation des symptômes de panachure jaune du riz (Anonyme, 1998).....	59
Tableau XV : Couples de pathotypes co-inoculés aux variétés IR64 et Tog5673.....	61
Tableau XVI : Fréquence des variétés cultivées sur les périmètres rizicoles échantillonnés au Niger (Tableau de synthèse, Issaka, 2010).....	71
Tableau XVII : Incidence de la panachure jaune du riz dans les rizières du Niger.....	74
Tableau XVIII : Importance des pertes de production dans les rizières fortement attaquées par le RYMV au Niger	74
Tableau XIX : Espèces d'adventices hébergeant le RYMV dans l'écologie du Niger	75
Tableau XX : Structure des populations virales RYMV du Niger (avec $R < 3$).....	78
Tableau XXI : Répartition des séro-groupes (Sg) dans l'écologie rizicole du Niger	82
Tableau XXII : Profils de réaction des isolats du RYMV originaires du Niger avec les Mabs	83
Tableau XXIII : ANOVA de la sévérité des isolats (Sev), du taux de réduction de la chlorophylle (RédChl.) et du taux d'accroissement de la charge virale (Chvir).....	88

Tableau XXIV : Interaction qualitative entre les variétés et les isolats testés	89
Tableau XXIV : Interaction qualitative entre les variétés et les isolats testés (suite et fin) ...	90
Tableau XXV : Spectre de virulence de la population nigérienne du virus de la panachure jaune du riz révélé par 9 géotypes de riz (R<3).	91
Tableau XXVI : Réactions de compatibilité entre les 9 géotypes de riz et les 60 isolats RYMV-Niger.	91
Tableau XXVII : Répartition des pathogroupes de RYMV dans les rizières irriguées du Niger, révélée par AMMI.....	94
Tableau XXVII : Répartition des pathogroupes de RYMV dans les rizières irriguées du Niger, révélée par AMMI (Suite et fin).....	95
Tableau XXVIII : Répartition des isolats du RYMV-Niger par site et par pathotype	101
Tableau XXIX : Profils de réaction et statut des isolats de RYMV-Niger suite à l'inoculation de géotypes résistants de riz	104
Tableau XXX : Distribution géographique des isolats RB et fixation des mutations de contournement de résistance	106
Tableau XXXI : Effet du géotype de riz sur le pathotype de RYMV en cas de simples inoculations à 42 JAI.....	115
Tableau XXXII : Sélection des pathotypes (T et E) par les géotypes de riz à 60 JAI.....	117

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

- **Issaka S.**, Onasanya A., Basso A., Sorho, F., Haougui A., Sido A.Y, Ake S., Fargette D. and Sere Y. **2012**. Existence of several pathotypes among *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV) isolates collected in Niger republic. *Trends in Applied Sciences Research* **7** (1): 32-45. [doi: 10.3923/tasr. 2012. ISSN 1819-3579].
- **Issaka S.**, Basso A., Sorho F., Onasanya A., Haougui A., Sido A.Y., Aké S., Fargette D. et Séré, Y. **2012**. Diagnosis and Importance of Rice Yellow Mottle Disease Epidemics in Niger Republic. *Journal of Applied Biosciences* **50**: 3501– 3511. ISSN 1997–5902.
- Ndikumana I., Gasoré R., **Issaka S.**, Pinel-Galzi G., Onasanya A., Hassani-Mehraban A., Fargette D., Peters D. and Séré Y. **2011**. *Rice Yellow Mottle Virus* in rice in Rwanda: first report and evidence of strain circulation. *New Disease Reports* **23**, 18. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.023.018]
- Basso A., **Issaka S.**, Haougui A., Séré Y. et Halidou A. **2010**. Caractérisation biologique d'isolats du virus de la panachure jaune du riz au Niger. *Annales de l'Université Abdou Moumouni*, **Tome XI-A**, pp 112-119.
- Traoré O., Pinel-Galzi A., **Issaka S.**, Poulicard N., Aribi J. Aké S., Ghesquière A., Séré Y., Konaté G., Hébrard E. et Fargette D. **2010**. The adaptation of *Rice Yellow Mottle Virus* to the eIF (iso) 4G mediated rice resistance. *Virology* **408** : 103-108.
- Basso A., Onasanya A., **Issaka S.**, Sido A.Y., Haougui A., Adam T., Séré Y. et Saadou M. **2011**. Le flétrissement bactérien du riz au Niger: diversité pathologique d'isolats collectés sur les périmètres irrigués. *Journal of Applied Biosciences* **38** : 2551 – 2563. ISSN 1997–5902
- Zouzou M., Kouakou T. H., Koné M. and **Issaka S.** **2008**. Screening rice (*O. sativa* L.) varieties for resistance to rice yellow mottle virus. *Scientific Research and Essay* Vol. **3** (9), pp. 416-424. ISSN 1992-2248.
- Fargette D, Pinel A., Rakotomalala M., Sangu E., Traoré O., Séré D., Sorho F., **Issaka S.**, Hébrard E., Séré Y., Kanyeka Z. and Konaté G. **2008**. *Rice Yellow Mottle Virus*, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *J Virol* **82**: 3584–3589.

Communications

- **Issaka S.**, Fargette D., Séré, Y., Aké S., Pinel, A., Sido Y. A., Adamou B. **2006**. Variabilité sérologique et moléculaire du virus de la panachure jaune du riz (RYMV). *Communication* à la plénière du Congrès du riz en Afrique tenu à Dars-Salam, Tanzanie (Afrique de l'Est) du 31/07/2006 au 04/08/2006.
- Sido Y. A., Basso A., **Issaka S.**, Halidou A., Sidi A. et Ibroh G. **2006**. Evaluation des lignées intra et interspécifiques de riz de bas-fond /irrigué au Niger. *In Proceedings of AfricaRice Congress 2006*, pp 9-12.

INTRODUCTION GENERALE

Le riz (*Oryza sp.*) est une céréale essentiellement cultivée pour ses grains et sa paille qui sont utilisés dans l'alimentation humaine et animale ainsi que dans l'industrie et l'artisanat (Thibaud et Bonneau, 2001). Il est la deuxième céréale la plus cultivée dans le monde et constitue la base alimentaire de plus de la moitié de la population mondiale (Abo *et al.*, 1998 ; Anonyme 1, 2009). Au Niger, le riz constitue la troisième céréale après le mil et le sorgho, tant du point de vue de la superficie que de la production (Anonyme 2, 2006 ; Sido, 2010).

En dépit de son importance économique, la culture du riz et sa production au Niger, comme dans le reste du monde, sont gravement affectées par de nombreux facteurs abiotiques (conditions climatiques défavorables, mauvaise qualité des sols etc.) et biotiques (ravageurs et parasites). Au nombre des contraintes biotiques, les maladies virales constituent des problèmes phytosanitaires majeurs du riz dans le monde, avec près d'une quinzaine de viroses répertoriées (Siré et Brugidou, 2002). Parmi elles, trois ont provoqué des épidémies graves à travers le monde. Il s'agit de :

- la maladie du Tungro due au RTBV (*Rice Tungro bacilliform virus*) qui est largement répandue en Asie (Rivera *et al.*, 1965) ;
- la maladie du *Hoja blanca virus*, observée en Amérique Latine (Jennings, 1963) ;
- la panachure jaune du riz causée par le *Rice yellow mottle virus* (RYMV), grandement répandue à travers le seul continent africain (Bakker, 1970).

De part sa fréquence et l'importance des pertes causées, la panachure jaune du riz demeure l'une des principales contraintes de la riziculture en Afrique et à Madagascar (Kouassi *et al.*, 2005 ; Ndikumana *et al.*, 2011). Elle est présente dans tous les types de riziculture avec des pertes de production de 20 à 100 % (Abo *et al.*, 1998 ; Konaté *et al.*, 2001 ; Fargette *et al.*, 2006 ; Séré *et al.*, 2008 a). La maladie a été découverte au Niger, pour la première fois en 1984 par Rechkaus et Adamou (1986), et des pertes de production excédant 25 % y ont été rapportées.

Des méthodes de lutte basées sur l'utilisation en sélection des gènes de résistance au pathogène (le RYMV) ont été développées et le déploiement des variétés résistantes dans les écologies rizicoles est préconisé (Albar *et al.*, 1998 ; Anonyme 3, 2001 ; Sorho *et al.*, 2005). Des résultats intéressants sur la diversité du virus et son épidémiologie dans plusieurs zones rizicoles sont aussi disponibles ((Nguessan *et al.*, 2000 ; Pinel *et al.*, 2000 ; Traoré *et al.*, 2005 ; Traoré *et al.*, 2009).

Cependant, très peu de travaux ont été consacrés aux isolats du *Rice yellow mottle virus* (RYMV) originaires du Niger. Aucun travail de surveillance systématique n'a permis d'évaluer la distribution géographique de la panachure jaune du riz, son importance en termes de pertes causées aux cultures ainsi que la variabilité du virus. De même, aucun renseignement n'est disponible sur les facteurs de l'environnement au Niger qui seraient susceptibles d'atténuer ou au contraire d'aggraver les dégâts dus à la maladie. Aussi, il n'existe presque pas d'informations sur la pathogénie des souches nigériennes du virus et sur le rôle des hôtes alternatifs dans la propagation de la panachure jaune du riz au champ. Le déploiement des gènes de résistance dans cet espace rizicole demeure alors incertain.

Notre hypothèse générale est qu'il est possible de contrôler la panachure jaune du riz par une meilleure connaissance de l'épidémie et du virus responsable (RYMV).

Nos hypothèses spécifiques sont les suivantes :

- (i) la panachure jaune du riz est très répandue au Niger ;
- (ii) le RYMV-Niger est très diversifié (génétique et biologie) ;
- (iii) les isolats de RYMV du Niger sont capables de contourner les allèles de résistance identifiés ;
- (iv) les pathotypes du RYMV sont adaptés aux fonds génétiques de riz cultivé.

L'objectif général de cette thèse est d'évaluer l'épidémiologie de la panachure jaune du riz et la diversité du RYMV au Niger.

Les objectifs spécifiques consistent à :

- (i) diagnostiquer la panachure jaune du riz (épidémiologie, importance et rôle des hôtes alternatifs) et sa distribution au Niger ;
- (ii) Evaluer la variabilité génétique et biologique du RYMV au Niger,
- (iii) déterminer le ou les mécanisme (s) de la pathogénie du RYMV-Niger et du contournement de la résistance du riz ;
- (iv) caractériser le déterminisme génétique de l'adaptation du RYMV aux fonds génétiques de riz cultivé (*O. sativa* et *O. glaberrima*).

Pour atteindre ces objectifs, notre étude a consisté d'abord à la caractérisation systématique de toute l'écologie rizicole du Niger, à la collecte d'échantillons de feuilles (de riz et d'adventices) suspectées malades et à l'évaluation des échantillons collectés. Puis, les caractéristiques biologiques et génétiques du virus ont été déterminées respectivement par criblage variétale et analyses sérologiques et moléculaires (transcription reverse - amplification et polymérisation en chaîne ou RT-PCR et séquençage) de la protéine de capsid (CP). La portion d'ARN codant pour la protéine virale liée au génome (VPg) des isolats contournant et non contournant la résistance du riz a aussi été transcrite et amplifiée par RT-PCR. La VPg des isolats étudiés a été séquencée et les acides aminés discriminant les pathotypes (types pathogéniques) ont été inventoriés. Aussi, les pathotypes majeurs du virus obtenus ont été co-inoculés aux variétés sensibles de riz IR64 (*Oryza sativa*) et Tog5673 (*Oryza glaberrima*), dans le but de comprendre le mécanisme de leur adaptation au riz et leur dissémination actuelle à travers l'Afrique.

Les résultats attendus de cette étude sur le RYMV au Niger sont les suivants :

- (i) l'importance (incidence et pertes de production) de la panachure jaune du riz, sa cartographie et le rôle des adventices hôtes réservoirs du RYMV au Niger sont connues ;
- (ii) la variabilité génétique et biologique du RYMV-Niger et ses impacts sur l'utilisation des gènes de résistance sont caractérisés ;
- (iii) les bases génétiques et moléculaires de la pathogénie des isolats RYMV du Niger et du contournement de la résistance du riz sont déterminées ;
- (iv) le mécanisme d'adaptation des pathotypes du RYMV-Niger aux fonds génétiques de riz emblavés (*Oryza sativa* et/ou *Oryza glaberrima*) et la distribution actuelle des pathotypes du virus en Afrique sont expliqués.

Le plan de cette thèse est le suivant :

Après une introduction générale, la première partie présente une revue bibliographique sur le riz, les maladies virales, la panachure jaune du riz et le milieu d'étude. Dans la deuxième partie le matériel et les méthodes utilisés au cours des expérimentations sont décrits. La troisième partie donne les résultats obtenus et la quatrième partie discute ces résultats et leurs implications (agronomiques et scientifiques). Enfin, la dernière partie porte sur les conclusion et perspectives tirées de cette étude.

1^{ère} PARTIE :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LE RIZ (*Oryza sp.*)

1. 1. Classification et distribution

Le riz est une Poacée à fort potentiel du point de vue agronomique et génétique (Siré *et al.*, 2002). Il appartient à la famille des Poacées et au genre *Oryza* (Anonyme 4, 2004). Le genre *Oryza* comporte les complexes, *sativa*, *officinalis*, *ridleyi* et *granulata* (Vaughan *et al.*, 2003, cités par Thiémélé *et al.*, 2012). Le complexe *sativa* est subdivisé en espèces : *O. sativa* L., *O. glaberrima* Steud, *O. rufipogon* et *O. barthii*. Le riz cultivé appartient au genre *Oryza*, très divers. Deux espèces sont cultivées. Il s'agit des espèces *O. sativa* et *O. glaberrima* qui sont toutes deux diploïdes ($2n = 24$) et généralement autogames (Clément, 1987). L'espèce *O. glaberrima* est originaire d'Afrique et est principalement cultivée en Afrique de l'Ouest. Elle est issue de la domestication de l'espèce *Oryza barthii* et proviendrait du delta du Niger au Mali où sa culture remonte à 3500 ans (Portères, 1976, Jacquot *et al.*, 1997).

L'espèce *O. sativa* dérive de l'espèce sauvage *O. rufipogon*. Elle est subdivisée en 3 groupes morphologiques (Chang, 1976) ou sous-espèces (*indica*, *japonica* et *javanica*). L'espèce *O. sativa* serait originaire de l'Asie du Sud-est. Elle a aujourd'hui une distribution mondiale et supplante largement l'espèce *O. glaberrima* (Jacquot *et al.*, 1997), en raison de ses qualités agronomiques (bon usinage, résistance à la verse, grande productivité etc.).

1. 2. Conditions de culture

Le riz est cultivé sous divers environnements allant de 40 ° et même 50 ° de latitude nord et 2000-2500 m d'altitude en zone tropicale, subtropicale et tempérée chaude (Traoré, 2006 ; Jacquot *et al.*, 1997 ; Thiémélé *et al.*, 2012). Il tolère des conditions de culture aquatique mais n'en dépend pas absolument. Sa culture a lieu sous une lame d'eau de 1 à 10 cm d'épaisseur voire plusieurs mètres, selon les variétés.

En fonction de l'alimentation hydrique, on distingue la riziculture irriguée (avec maîtrise d'eau) ou inondable avec submersion (sans maîtrise d'eau) et la riziculture pluviale sur nappe ou pluviale stricte. La riziculture irriguée représente le mode de culture dominant (57 %) alors que la riziculture en montagne, en pluviale et en immersion occupent respectivement 9 %, 31 % et 3 % des superficies cultivées à travers le monde (Jacquot *et al.*, 1997 ; Thiémélé *et al.*, 2012).

En fonction de la durée du cycle végétatif (Traoré, 2006), les variétés de riz se classent en variétés précoces (cycle inférieur à 120 j), semi-précoces (cycle d'environ 160 j) et tardives (cycle compris entre 170 et 180 j).

Le riz cultivé est une plante de jours courts. Plusieurs variétés traditionnelles sont sensibles à la photopériode. Toutefois, les variétés modernes sont en général insensibles à la longueur de la journée (Jacquot *et al.*, 1992).

Au Niger, la culture du riz est pratiquée à grande échelle avec maîtrise d'eau. Les zones rizicoles occupent des espaces aménagés le long des deux rives du fleuve Niger (à l'Ouest) et au bord de la Komadougou yobé (à l'Est). Ce sont des périmètres irrigués gérés par des groupements coopératifs (Sido, 2010) sous la supervision technique d'une structure étatique appelée ONAHA (Office National des Aménagements Hydro-Agricoles). La culture du riz est aussi pratiquée de façon traditionnelle et dans des aménagements irrigués privés de petite taille, à l'Ouest et à l'Est ainsi qu'au centre du pays (Anonyme 5, 2006).

1. 3. Importance et contraintes de la riziculture

Le riz est la céréale la plus cultivée dans le monde après le blé (Abo *et al.*, 1998). Sa production est de 675 millions de tonnes de paddy (soit 451 millions de tonnes de riz usiné) en 2009 (Anonyme 1, 2009), environ 57 kilos par habitant et par an. L'essentiel de la production mondiale du riz est assurée par l'Asie (90 %). L'Afrique et le reste du monde n'en fournissent que moins de 10 % (Clément *et al.*, 2003). L'Afrique ne produit que 3,6 % de la production mondiale de riz, mais elle en importe près des 25 % (Kouassi *et al.*, 2005), afin de satisfaire une demande sans cesse croissante.

Le riz constitue la base alimentaire pour plus de la moitié de la population mondiale, notamment sa frange pauvre (Anonyme 1, 2009). Les plus grands consommateurs de riz sont l'Asie et l'Afrique. Le riz a aussi de nombreuses utilités dans l'artisanat, l'industrie, l'alimentation animale et la confection d'engrais organiques (Thibaud et Bonneau, 2001).

Au Niger, le riz irrigué occupe près de 30 000 ha de superficie (Traoré *et al.*, 2005). Il est la céréale la plus cultivée, après le mil et le sorgho (Sido, 2010). Sa production annuelle est de 110 000 tonnes de paddy (environ 66 000 tonnes de riz blanc), soit le tiers de la consommation nationale (Anonyme 2, 2006). Le pays reste ainsi déficitaire pour le reste de ses besoins, malgré une politique d'intensification de la riziculture pour assurer la sécurité alimentaire. Le riz constitue la principale source de calories pour les populations citadines et

riveraines, sans cesse croissantes avec l'urbanisation (Sido, 2010).

En dépit de l'importance du riz, sa culture reste menacée par de nombreux facteurs abiotiques et biotiques (Jacquot *et al.*, 1992). Le rendement du riz est surtout affecté par diverses agressions d'origine biologique (Siré et Brugidou, 2002). Il s'agit des ravageurs (rongeurs, oiseaux, insectes etc.) et des parasites (champignons, virus, bactéries et nématodes). Parmi les affections, les maladies virales causent d'énormes problèmes au développement de la riziculture (Siré et Brugidou, 2002). Au Niger, la panachure jaune et le flétrissement bactérien du riz (bacterial Blight) sont les contraintes biotiques majeures de la riziculture, de par l'incidence et l'importance des pertes de récoltes qu'ils engendrent (Issaka *et al.*, 2006 ; Basso *et al.*, 2011).

CHAPITRE 2 : LES MALADIES VIRALES

Environ 30 maladies virales des plantes ont été répertoriées dans le monde. Cinq de ces maladies sont présentes en Afrique (Abo et Fadhila, 2001). Il s'agit du *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV), du *Rice Stripe Necrosis Virus* (RSNV), du *Rice Crinkle Disease* (RCD), *Maize Streak Virus* (MSV) genre *Geminivirus* souche A et de *African Cereal Streak Virus* (ACSV). Parmi les maladies virales des plantes, 15 ont été dénombrées sur le riz (Calvert *et al.*, 2003 ; Siré et Brugidou, 2002). Le tableau I donne la liste des virus causant des maladies chez le riz, leurs vecteurs, leur distribution géographique et les caractéristiques de leurs agents pathogènes.

2. 1. Aperçu sur les virus

Le mot "virus" signifie en latin poison, suc ou venin (Le Petit Larousse). Un virus est un parasite subcellulaire obligatoire (Daniel et Brigitte, 2004, Feng *et al.*, 2006). Il est constitué d'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), en double ou simple brin, codant au moins pour sa protéine de réplication et induisant sa multiplication à l'intérieur de son hôte.

Un virus se multiplie à partir de son seul matériel génétique en utilisant l'équipement enzymatique cellulaire de son hôte. Son matériel génétique est entouré d'une coque de protéines appelée capsid à symétrie hélicoïdale ou icosaédrique et parfois d'une enveloppe. Les virus sont originaux de part leur taille, la nature de leur information génétique et leur système de synthèse protéique (Astier *et al.*, 2001). Ils sont capables d'envahir toutes sortes d'organismes, les végétaux comme les animaux ainsi que les bactéries, les champignons et même les virus (Daniel et Brigitte, 2004).

Deux types de virus subdivisés en sept groupes ont été observés selon la nature, le nombre de brin et la particularité de leur molécule d'acide nucléique (Fauquet *et al.*, 2005). Les virus à ARN se scindent en virus à ARN double et simple brin et se structurent en deux sous-groupes dont l'un est à polarité positive et l'autre à polarité négative (Tableau I). Les phytovirus (virus végétaux) s'attaquent essentiellement aux organismes végétaux. Ils ont la particularité de pénétrer la cellule de leur hôte afin de détourner à leur profit les mécanismes de la cellule et permettre aux virus de se reproduire. Tous les virus du riz, excepté le *Rice Tungro bacilliform virus* (RTBV), sont à ARN, simple ou double brin linéaire (Tableau I).

Tableau I : Principaux virus du riz (Calvert *et al.*, 2003 ; Siré et Brugidou, 2002)

Nom, acronyme	Vecteur	Acide nucléique	Distribution
<i>Rice tungro bacilliform virus</i> , RTBV	Cicadelles	ADN db circulaire	Asie
<i>Rice necrosis mosaic virus</i> , RNMV	Plasmodiophoracées	2 ARN sb+ linéaire	Asie
<i>Rice stripe necrosis virus</i> , RSNV	Plasmodiophoracées	4 ARN db+ linéaire	Afrique/Amérique
<i>Rice giallume viru</i> , RYDV-RGV	Aphides	1 ARN sb+ linéaire	Europe
<i>Rice transitory yellowing virus</i> , RTYV	Cicadelles	1 ARN sb- linéaire	Asie
<i>Rice black streaked dwarf virus</i> , RBSDV	Delphacides	10 ARN db linéaire	Asie
<i>Rice dwarf virus</i> , RDV	Cicadelles	12 ARN db linéaire	Asie
<i>Rice brunchy stunt virus</i> , RBSV	Cicadelles	12 ARN db linéaire	Asie
<i>Rice Galldwarf virus</i> , RGDV	Cicadelles	12 ARN db linéaire	Asie
<i>Rice ragged stunt virus</i> , RRSV	Delphacides	10 ARN db linéaire	Asie
<i>Rice tungro spheral virus</i> , RTSV	Cicadelles	1 ARN sb+ linéaire	Asie
<i>Rice yellow mottle virus</i> , RYMV	Chrysomélides	1ARN sb+ linéaire.	Afrique
<i>Rice stripe virus</i> , RSV	Delphacidés	4ARN sb- / sb-linéaires	Asie
<i>Rice grassy stunt virus</i> , RGSV	Delphacidés	4 ARN sb- & sb- linéaire	Asie
<i>Rice hoja blanca virus</i> , RHBV	Delphacidés	4 ARN sb- & sb- linéaire.	Amérique latine

* db : double brin ; sb : simple brin ; sb+ : simple brin positif ; sb- : simple brin négatif ;

2. 2. Modes de transmission des virus et de contamination des plantes

Les virus sont transmis aux plantes *via* des insectes et autres organismes vivants (acariens, nématodes, champignons et animaux). Ainsi, tous les virus du riz, excepté le *Rice stripe necrosis virus* et le *Rice necrosis mosaic virus* véhiculés par champignon, sont transmis aux plantes par des insectes (Siré et Brugidou, 2002). Toutefois, l'impact de certains virus est limité par la mobilité ou la présence des insectes vecteurs. L'infection primaire de l'hôte a lieu selon les modes circulant et non-circulant (Kummert et Lepoivre, 2003).

Les virus non-circulants sont transportés par les pièces buccales du vecteur et introduits dans la plante hôte, suite à la prise de nourriture du vecteur. Ils sont soit non persistants (durée de vie hors de la plante et délai d'acquisition très courts) soit persistants (durée de vie et temps d'acquisition très longs).

Les virus circulants vivent dans le tube digestif, l'hémolymphe puis le canal salivaire de l'animal-vecteur par lequel ils sont introduits dans une nouvelle plante. Ces virus sont tous persistants ou semi-persistants (Hébrard *et al.*, 1999). Ainsi, leur temps d'acquisition chez le vecteur et leur durée de vie hors de la plante varient-ils de quelques heures à plusieurs jours, précédés par une longue période de latence.

Tous les deux modes de transmission ont été observés chez les virus du riz. A titre illustratif, le virus de la panachure jaune du riz (RYMV) est transmis de façon non circulante tandis que le virus de la rayure nécrosée du riz (RSNV) a un mode de transmission circulant.

Les virus transmis à la plante passent d'abord de cellule en cellule, à travers les plasmodesmes cellulaires (Bonneau *et al.*, 1998 ; Brugidou *et al.*, 2002). Puis, ils colonisent les autres parties de la plante hôte (par les vaisseaux conducteurs) et provoquent une infection systémique (Leisner *et al.*, 1993 ; Brugidou *et al.*, 1995). Le mouvement de cellule à cellule se fait grâce à des protéines membranaires qui forment un complexe ribonucléique avec le génome viral. La protéine P1, par exemple, est responsable du mouvement de cellule à cellule et de la suppression post-transcriptionnelle (PTGS) chez le PVY (*Potato Virus Y*) et le RYMV (Leisner *et al.*, 1993 ; Bonneau *et al.*, 1998).

La transmission des virus d'une plante à l'autre se produit mécaniquement, lors des greffes, sous l'effet des vents et par les pratiques culturales ainsi que par la multiplication végétative. En revanche, à quelques exceptions près, les virus ne sont pas transmissibles ni par les semences ni par le pollen (Bakker, 1974 ; Konaté *et al.*, 2001, Allarangaye *et al.*, 2006).

2. 3. Cycle de développement des virus

Les virus ne se multiplient qu'au sein de cellules vivantes, par réplication de leur acide nucléique. La multiplication d'un virus après l'infection de l'hôte comporte différentes étapes, parfois chevauchantes (Daniel et Brigitte, 2004) : Il s'agit de :

- l'adhésion, la décapsidation et l'injection de l'acide nucléique viral (ARN) : il y a d'abord interaction entre les protéines capsidiales du virus et les molécules membranaires des cellules de l'hôte puis, décapsidation du virus et libération de son information génétique dans les cellules de l'hôte. La pénétration au sein de l'hôte est facilitée chez certains virus par des enzymes qui dégradent localement la membrane cellulaire ;
- la synthèse des constituants du virus et la réplication de l'ARN viral : la pénétration de l'ARN viral modifie de façon brutale le fonctionnement cellulaire et, induit la synthèse des constituants viraux (protéines virales intervenant dans la réplication, le mouvement, la transmission, la protection etc.) au détriment de ceux de l'hôte. Parallèlement, l'ARN viral se duplique ou se transcrit selon sa nature (ADN ou ARN), pour donner de nombreuses copies de l'information génétique du virus ;
- l'encapsidation des constituants viraux et la migration des virions : après un détournement total de la machinerie de l'hôte, l'acide nucléique et les protéines virales synthétisées s'assemblent spontanément pour former de nouvelles particules virales (virions) qui ne peuvent ni croître ni se diviser. Les particules virales synthétisées s'accumulent dans la cellule sans provoquer sa mort, sauf dans le cas d'une infection lytique où il y a éclatement de la cellule hôte. Elles migrent d'abord de cellule à cellule puis à longue distance, pour établir une infection systémique.

2. 4. Diagnostic et lutte contre les maladies virales

La diversité des virus inventoriés rend difficile le diagnostic et la lutte contre les maladies qu'ils engendrent. Depuis fort longtemps le diagnostic est basé sur la symptomatologie, c'est à dire l'observation des symptômes visuels de la maladie. De nos jours, la reconnaissance d'une maladie virale utilise à la fois l'indexage biologique, la microscopie électronique, et les techniques immunologiques et moléculaires (Anonyme 4, 2004).

L'indexage biologique consiste à inoculer mécaniquement, sous serre, des plants sains de variétés hôtes sensibles avec le broyat de feuilles présentant les symptômes de la maladie

virale à diagnostiquer et, à observer les symptômes sur les plantes inoculées. La microscopie électronique permet de visualiser les virus “*in-situ*” et de les déterminer par leur architecture.

La technique immunologique consiste à utiliser des anticorps spécifiques pour détecter le virus dans un échantillon provenant de sujet suspecté, en se basant sur l’interaction caractéristique antigène (virus) / anticorps (protéine enzymatique dirigée contre le virus).

La technique moléculaire, quant à elle, procède d’abord à l’amplification et au séquençage de tout ou partie du génôme viral puis, à l’analyse de la séquence de nucléotides ou d’acides aminés des portions amplifiées (protéine de capsid, protéine virale liée au génome, polyprotéine, etc.), ce qui révèle les caractéristiques génomiques du virus recherché.

Le contrôle des viroses végétales repose sur la lutte contre les vecteurs, les méthodes prophylactiques (basées sur la propriété des biotopes végétaux) et la lutte contre les pathogènes viraux (prémunition, pratiques culturales, techniques d’assainissement et utilisation des variétés résistantes) (Chalak *et al.*, 2007). De nos jours, les gènes de résistance sont grandement utilisés dans la lutte contre les phytovirus (Albar *et al.*, 2003).

2. 5. Mécanismes de défense des plantes contre les virus

Les plantes utilisent généralement trois mécanismes distincts pour se défendre contre les virus (Fraser, 1992). Il s’agit de la résistance non-hôte, de la résistance variétale et de la résistance conférée.

La résistance non-hôte se manifeste par la non-expression de la maladie (absence de symptômes caractéristiques et non détection de particules virales dans les cellules) chez les espèces non hôtes. Ce type de résistance, bien que sous contrôle génétique, est difficilement exploitable en sélection.

La résistance variétale se caractérise par l’aptitude génétique de la plante à tolérer ou à ne pas contenir les particules virales et à être indemne de maladie. Elle est principalement basée sur la présence de gènes induisant des réactions physiologiques et biochimiques de résistance aux virus. Ce type de résistance est exploitable en sélection. Il se traduit entre autre par une interférence inhibitrice avec le cycle viral, le blocage du mouvement de cellule à cellule et à longue distance du virus ou une réaction d’hypersensibilité provoquant des nécroses susceptibles de limiter l’infection aux cellules déjà infectées (Astier *et al.*, 2001). La résistance variétale est aussi axée sur le PTGS (Post-transcriptionnal gene suppression = suppression de l’expression des gènes de virulence virale) qui est un mécanisme de défense

des plantes contre les virus consistant à inhiber la transcription du génome viral et à limiter sa multiplication (Siré *et al.*, 2008). Toutefois, les virus peuvent contourner cet obstacle en synthétisant une ou des protéines capables de retarder ou de supprimer l'effet d'inhibition exercé sur leurs génomes (Siré *et al.*, 2008).

D'un point de vue génétique, la résistance variétale peut être classée en deux types : la résistance monogénique (qualitative), contrôlée par un seul gène, et la résistance polygénique (quantitative), contrôlée par un ou plusieurs gènes ayant des effets additifs (Fraser, 1985 ; Thiémélé *et al.*, 2012). Plus de 80 % de résistances monogéniques sont répertoriées pour la résistance aux virus, les autres étant de nature polygénique. La résistance monogénique a été décrite chez *Lycopersicon hirsutum* vis-à-vis du PVY (*Potato Virus Y*) et elle est désormais utilisée dans le contrôle des virus provoquant de graves épidémies (Leynani *et al.*, 1995). La résistance polygénique quant à elle a été observée chez certaines variétés de riz (*O. sativa*) contre le RYMV, notamment chez les accessions d'*O. glaberrima* et chez la variété partiellement résistante Azucena (Albar *et al.* 1998 ; N'djiondjop *et al.*, 1999).

La résistance conférée est la résistance induite à la plante hôte soit par traitement chimique, génétique ou par génie génétique. Des lignées iso-géniques ou transgéniques sont obtenues, à partir de l'insertion des gènes de résistance identifiés dans le génome de la plante ou par introgression d'une portion des gènes de virulence du virus (Albar *et al.*, 1998 ; Pinto *et al.*, 1999 ; Kouassi *et al.*, 2006).

2. 6. Gènes de résistance des plantes aux virus

On distingue 2 types de résistance des plantes aux virus, la résistance spécifique et la résistance générale (horizontale) ou non-spécifique (Caranta *et al.*, 2003). La résistance générale d'une plante est un type de résistance efficace contre toutes les souches virales pathogènes (Lecoq *et al.*, 2004). La résistance est dite spécifique lorsqu'elle est effective pour les souches avirulentes mais contournée par les souches virulentes. Ce type de résistance est toujours monogénique (c'est-à-dire contrôlée par un seul gène majeur) alors que la résistance polygénique est sous la dépendance de plusieurs gènes mineurs ou QTLs / Quantative Trait Locus (Caranta *et al.*, 2003).

2. 6. 1. Gènes dominants R de résistance

La majorité des résistances contre les bactéries, les champignons, les nématodes ou les insectes caractérisées chez les plantes est contrôlée par des gènes dominants de type R

Charron, 2007). Ce type de résistance implique des mécanismes de reconnaissance du pathogène conduisant à l'induction d'un vaste ensemble de réactions de défense.

Le concept de Flor (1971), appelé « modèle gène à gène » et confirmé au niveau moléculaire, explique la grande majorité des résistances monogéniques dominantes : les mécanismes de résistance sont induits si et seulement si la protéine codée chez la plante résistante par le gène R "reconnait" la protéine synthétisée chez l'agent pathogène par un gène dominant dit d'avirulence (gène *Avr*). Il existe 2 modes de reconnaissance entre les protéines R (de la plante hôte) et *Avr* (du pathogène) : (i) une détection directe ou modèle "éliciteur-récepteur" ou (ii) une détection indirecte dans laquelle la protéine R n'intervient que pour sensibiliser l'interaction entre la protéine *Avr* et une autre protéine de la plante (Charron, 2007). Cette interaction physique entre les 2 protéines a été observée chez les couples *Avr/Pto* de *Pseudomonas syringae* / *Pto* de tomate (Scofield *et al.*, 1996) et *AvrL567* de la rouille du lin / *L* du lin (Dodds *et al.*, 2006).

Il existe une douzaine de gènes dominants impliqués dans la résistance aux virus identifiés chez les plantes cultivées (pomme de terre, tomate, tabac, soja, pois et riz) et *Arabidopsis thaliana* (Ndjondjop *et al.*, 1999 ; Ioanidou *et al.*, 2000 ; Maule *et al.*, 2007). Par exemple une interaction directe entre le produit du gène de résistance N chez le tabac et la réplicase P50 (une protéine enzymatique) de Tobacco mosaic virus (TMV) a été identifiée (Ueda *et al.*, 2006, cités par Charron, 2007).

2. 6. 2. Gènes récessifs de résistance aux virus à ARN

Contrairement aux résistances contre les bactéries, les champignons, les nématodes ou les insectes qui sont majoritairement dominantes, près de la moitié des résistances monogéniques

vis-à-vis des virus des plantes, notamment les potyvirus sont récessives (Diaz-Pendo *et al.*, 2004) ; le genre potyvirus représente un quart des virus de plantes et inclut quelques uns des virus les plus communs et ravageurs de nombreuses plantes cultivées à travers le monde, dont le virus Y de la pomme de terre (Potato virus Y, PVY). Les potyvirus appartiennent à la famille de Potyviridae. Plusieurs facteurs de résistance, gènes majeurs et QTLs contrôlent la résistance des plantes aux virus (Albar *et al.*, 1998 ; Ruffel *et al.*, 2004).

Les résistances gouvernées par les gènes récessifs présentent différents phénotypes, allant de la résistance totale au niveau cellulaire ou pendant le mouvement de cellule à cellule ou de longue distance, jusqu'à différents niveaux de résistance partielle, se traduisant par une

accumulation réduite du virus, une diminution du mouvement de cellule à cellule et/ou du mouvement systémique (Charron, 2007).

A l'opposé de la plus part des résistances dominantes caractérisées par une réponse hypersensible ou un phénotype de résistance extrême, les résistances récessives montrent une importante diversité de phénotypes de résistance. Les résistances récessives s'expliquent par l'hypothèse généralement admise de Fraser (1990) selon laquelle l'allèle dominant de sensibilité code pour une protéine nécessaire à l'accomplissement du cycle du pathogène dans la plante. Le clonage moléculaire du premier gène récessif *pvr2* du piment *Capsicum spp.* impliqué dans la résistance à 2 potyvirus (*Potato virus Y*, PVY et *Tobacco etch virus*, TEV) a permis de valider cette hypothèse. Ainsi, des substitutions d'acides aminés dans la protéine eIF (4) E (eukaryotic Initiation Factor 4 E) conduisent-elles à une résistance récessive pour une large gamme de plantes incluant le *Capsicum spp.* contre les potyvirus (Charron *et al.*, 2008). Le gène *pvr2* code pour une protéine eIF4E et des mutations dans cette protéine sont responsables de la résistance observée (Ruffel *et al.*, 2002).

Depuis, toutes les études de clonage ont confirmé le rôle prépondérant des mutations dans le facteur eIF (4) E dans la résistance d'un large spectre de virus à ARN de plantes (Robaglia and Caranta, 2006). Chez le riz, la résistance au *Rice Yellow Mottle Virus*, RYMV est due au gène RYMV1. Celui-ci code pour le facteur eIF (iso) 4 G impliqué dans ladite résistance (Albar *et al.*, 2006).

Le rôle clé des facteurs eIF (4) E dans la résistance des plantes aux virus à ARN a été confirmé par la caractérisation d'autres gènes récessifs de résistance entre autres chez la laitue, le pois et le melon (Nieto *et al.*, 2006). La résistance résulte toujours des modifications dans la séquence protéique du facteur eIF (4) E. Très peu de mutation différencient les allèles récessifs de résistance des allèles dominants de sensibilité (Ruffel *et al.*, 2005). La sensibilité de la plante hôte s'explique par une interaction compatible entre le facteur eIF (4) E ou eIF (4) G et la protéine virale de virulence appelée VPg, viral protein genomique-linked (Robaglia and Caranta *al.*, 2006 ; Albar *et al.*, 2006). La résistance des plantes aux virus est caractérisée par l'abolition de l'interaction entre la VPg du virus et le facteur eIF (4) E ou eIF (4) G de la plante hôte.

Les substitutions d'acides aminés dans le facteur eIF (4) E induisent une résistance récessive aux potyvirus. Elles proviennent d'une évidence fonctionnelle de co-évolution entre le facteur eIF (4) E de *Capsicum annum* et la VPg des potyvirus (Charron *et al.*, 2008). On assiste, cependant, à l'avènement du contournement des résistances récessives observées,

suite à des modifications dans l'enchaînement des nucléotides de la VPg.

2. 7. Contournement des résistances des plantes par les virus

La résistance des plantes aux virus à ARN est due à une interaction non compatible entre la VPg et le facteur eIF (4) E ou eIF (4) G codé par les gènes récessifs. Des mutations dans le domaine central de la VPg virale sont responsables du contournement des gènes récessifs de résistance codant pour la plupart des protéines eIF (4) E (Moury *et al.*, 2004). Les mutations nécessaires pour qu'un isolat viral surmonte une résistance peuvent être très différentes (Harrison *et al.*, 2002). Par exemple, les substitutions de 5 acides aminés dans la partie centrale de la VPg du PVY (un potyvirus) sont responsables du contournement de la résistance contrôlée par les allèles *pvr1* et *pvr2* chez le piment, *Capsicum annuum* et la substitution d'un seul acide aminé dans cette région suffit au contournement du gène récessif de résistance *pot1* chez la tomate, *L. esculentum* (Charron *et al.*, 2008). Des substitutions dans la VPg sont également à l'origine du contournement des résistances contrôlées par *sbm1* chez le pois *Pisum sativum* (Borgstrom *et al.*, 2001) et chez le tabac *Nicotiana tabacum* (Nicolas *et al.*, 1997).

Une seule mutation dans la VPg du RYMV, genre *Sobemovirus*, peut entraîner le contournement de l'allèle récessif de résistance du gène RYMV1 codant pour la synthèse de la protéine eIF (iso) 4 G du riz (Hébrard *et al.*, 2006). De même, le déterminant de la virulence des isolats sur les allèles récessifs de résistance *rym4* et *rym5* de l'orge par le *Barley Yellow Mottle Virus* (BaYMV, genre *Bymovirus*) se situe vraisemblablement dans la zone centrale de la VPg (Charron, 2007) ; la virulence est l'aptitude génétique d'un pathogène à contourner une résistance génétiquement déterminée et à causer une interaction compatible conduisant à la maladie (Fraser, 1985 ; Shaner *et al.*, 1992).

2. 8. Phylogénie et méthodes de construction phylogénétique

2. 8. 1. Phylogénie et phylogéographie

La phylogénie est l'étude des parentés entre différents individus à partir de leurs séquences de nucléotides, d'acides aminés ou de protéines, en vue de comprendre l'évolution des organismes vivants. On peut étudier la phylogénie d'un groupe d'espèces mais aussi la généalogie (au niveau intra-spécifique) entre populations ou entre individus (Philippe *et al.*, 2002).

La phylogénie étudie donc les relations existant entre les différents composants d'une population virale. La systématique phylogénétique (ou cladistique) permet de retrouver les parentés évolutives entre espèces en les rassemblant en groupes monophylétiques (ou clades), c'est à dire composés d'un ancêtre commun et de l'ensemble de ses descendants. Cette méthode est basée sur l'homologie des caractères qui signifie leur similarité dérivée d'un ancêtre commun.

Les progrès du séquençage ont amené un flot de données qui se prêtent particulièrement bien à l'analyse phylogénétique. L'utilisation des séquences pour retracer l'histoire évolutive des êtres vivants a révolutionné la systématique du vivant, notamment celle des procaryotes (Sanger *et al.*, 1987). Les séquences d'ADN (ou ARN) ou de protéines (donc des espèces dont elles sont issues) constituent dès lors le fondement de la phylogénie moléculaire (Philippe *et al.*, 2002).

La phylogénie moléculaire utilise des séquences de macromolécules biologiques (ARN, ADN et protéines) pour obtenir des informations sur l'histoire évolutive des êtres vivants et établir leurs liens de parentés (Hillis *et al.*, 1996 ; Philippe *et al.*, 2002) ; l'analyse de phylogénie moléculaire (ou cladistique) permet de reconstituer sous forme d'arbre phylogénétique les liens de parentés entre les individus (Astier *et al.*, 2001).

La phylogéographie recherche l'impact de l'environnement sur la structure d'une population donnée. Ainsi, la phylogéographie intra-spécifique correspond-elle à l'étude des relations entre la généalogie (relation de parenté entre les populations) et la distribution des espèces. Elle permet de formuler des hypothèses sur les migrations de populations en relation avec l'histoire de leur écologie (Philippe *et al.*, 2002).

2. 8. 2. Méthodes de reconstruction phylogénétique

Trois méthodes de reconstruction phylogénique sont actuellement disponibles (Darlu et Tassy, 2004). Chacune d'elles recherche l'arbre phylogénétique selon des critères différents. Ces méthodes sont :

La méthode de parcimonie : méthode reposant sur le principe de parcimonie maximale et qui considère qu'il s'est produit un minimum d'événements mutationnels dans les séquences (Philippe *et al.*, 2002). Pour expliquer les différences qui existent entre les séquences (c'est-à-dire entre les espèces) actuelles on choisit l'arbre phylogénétique qui minimise le nombre de changements (transitions, transversion) de nucléotides ou d'acides aminés au cours de l'évolution. L'arbre supposé correct est celui qui a le plus faible nombre

de changement parmi tous les arbres possibles reliant les espèces.

La méthode de maximum de vraisemblance : c'est une méthode probabiliste qui consiste à maximiser pour une topologie d'arbre donnée la probabilité d'obtenir les séquences observées sous un modèle de substitution fixé (Philippe *et al.*, 2002). Cette probabilité est la vraisemblance (Dalsuc et Tassy, 2004). Selon ce principe, l'arbre optimal parmi toutes les topologies possibles est celui dont la vraisemblance est la plus élevée. Cette méthode décrit de façon explicite le processus de substitution.

La méthode des distances : la première étape consiste à calculer la distance évolutive c'est-à-dire le nombre de substitutions entre deux séquences homologues ayant divergé à partir d'un ancêtre commun, à l'aide de méthodes statistiques basées sur des modèles d'évolution (ensemble des hypothèses portant sur les processus d'évolution) des séquences (Philippe *et al.*, 2002). La reconstruction des phylogénies est ensuite effectuée à partir de matrices de distances obtenue en utilisant différents algorithmes comme le célèbre *Neighbour-Joining* inventé par Saitou et Nei (1987). C'est un algorithme classique très employé en phylogénie moléculaire et qui est basé sur le principe d'évolution minimale similaire ou principe de parcimonie maximale, à savoir qu'il cherche l'arbre pour lequel la quantité de changements est la plus faible, étant donnée la matrice des distances traitée.

CHAPITRE 3 : LA PANACHURE JAUNE DU RIZ

3. 1. Distribution géographique et incidence

La panachure jaune du riz est une maladie virale émergente (Kouassi *et al.*, 2005) qui a été décrite pour la première fois en 1966 au lac Victoria, Kenya (Bakker, 1970). Depuis, elle a été observée dans d'autres pays d'Afrique de l'Est, notamment au Zanzibar (Tanzanie) ainsi qu'à Madagascar et dans de nombreux pays (Figure 1) d'Afrique de l'Ouest (Fauquet et Thouvenel, 1977 ; Awoderu, 1991 ; Abo *et al.*, 1998 ; Kouassi *et al.*, 2005). La maladie a été aussi décrite en Afrique centrale, principalement au Tchad et au Cameroun (Konaté *et al.*, 2001) ainsi que dans d'autres pays comme l'Ouganda (Fargette *et al.*, 2006) et la Gambie (Séré *et al.*, 2008 a). Récemment encore la panachure jaune du riz a été observée au Rwanda (Ndikumana *et al.*, 2011).

La panachure jaune du riz affecte tous les types de riziculture (Thresh *et al.*, 1991 ; Kouassi *et al.*, 2005). Elle reste confinée au seul continent africain. Son incidence et sa sévérité sont dépendantes de la variété, du stade de l'infection et de l'environnement (Kouassi *et al.*, 2005). Les pertes de production varient entre 20 et 100 % (Awoderu, 1991; Abo *et al.* 1998 ; Nguessan *et al.*, 2001). Des réductions de production de 75 % ont même été observées au Sahel entre 1983 et 1986 (Awoderu, 1991). Même chez les variétés tolérantes pluviales, des incidences de 54 % ont été signalées (Fomba, 1988).

La panachure jaune du riz est apparue au Niger suite à l'intensification de la riziculture, avec l'introduction de variétés exotiques et productives d'Asie au détriment des variétés africaines présentant une résistance / tolérance à la maladie (Thresh *et al.*, 1991 ; Kouassi *et al.*, 2005). Des pertes excédant 25 % et allant jusqu'à 68 % ont été rapportées (Reckhaus et Adamou 1986). A cette époque ces pertes atteignaient 100 % dans les périmètres de Liboré, saga et Saadia, situés au Sud-est de Niamey (Awoderu, 1991). Des rizières entières ont aussi été détruites par la maladie entre 2004 et 2007 (Observations personnelles).

3. 2. Epidémiologie

3. 2. 1. Symptômes de la panachure jaune du riz

La nature et l'importance des symptômes varient selon la variété et l'âge de l'infection du plant. Toutefois, les symptômes apparents sont surtout la panachure et le jaunissement des

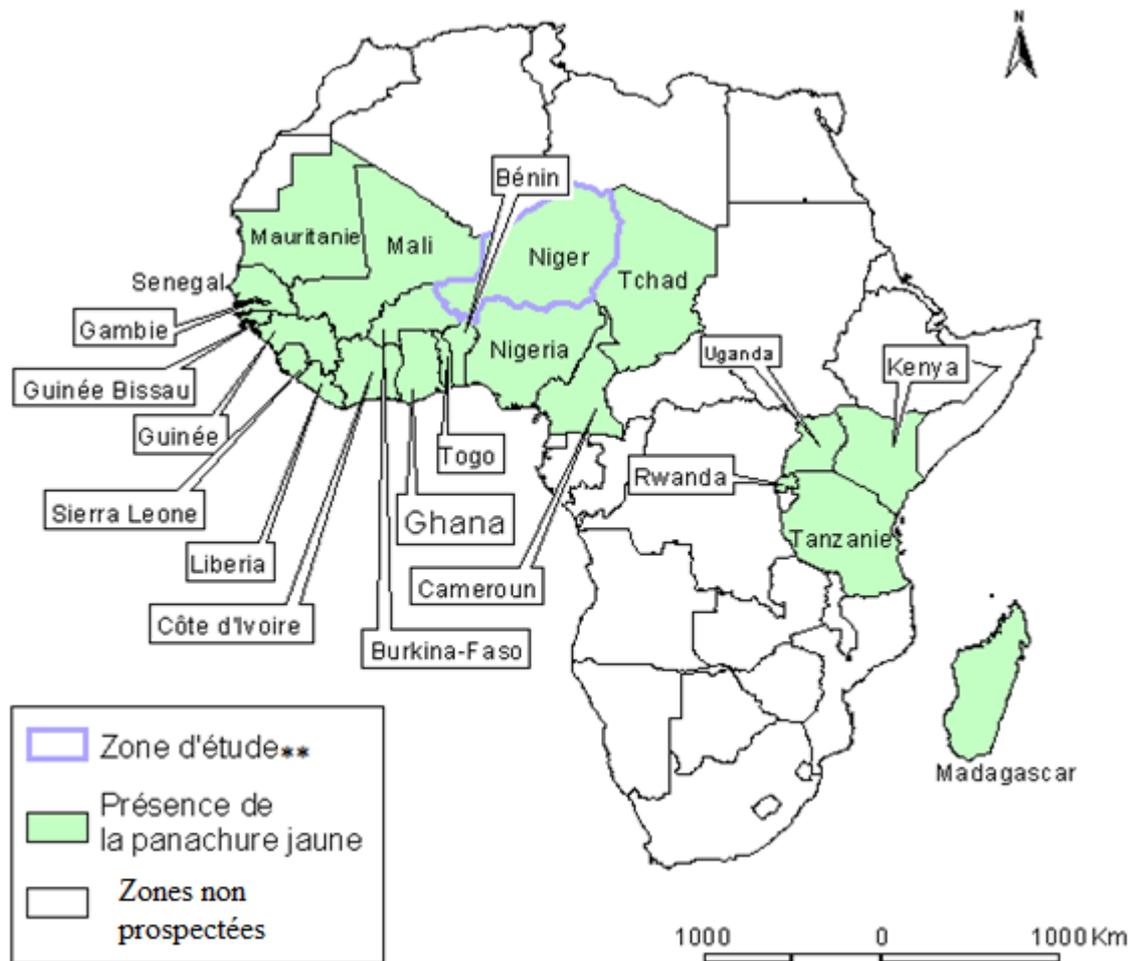


Figure 1 : Carte de distribution de la panachure jaune du riz en Afrique (Issaka, 2010).

*** Pays peu exploré faisant l'objet de la présente étude*

feuilles (Figure 2), le rabougrissement et le nanisme des plants (Figure 3), la malformation et l'émergence incomplète des panicules et la stérilité des épillets (Bakker, 1970 ; Fauquet et Thouvenel, 1977 ; Kouassi *et al.*, 2005). La maladie provoque aussi un arrêt de la croissance, une baisse de la production, une réduction du nombre de talles chez certaines variétés ou un tallage excessif avec de nombreuses petites talles chez d'autres (Abo *et al.*, 1998 ; Raymundo et Bagddenhagen, 1976 ; Rossel *et al.*, 1982). Dans le plus grave des cas, elle entraîne la mort des plants infectés.

L'infection commence d'abord par de petites taches jaunes-vert, allongées linéairement à la base des feuilles systémiques (Figure 4). Les autres feuilles deviennent par la suite jaune-orangé puis se nécrosent et meurent complètement (Figure 5). En serre, la maladie provoque des spots jaune-vert sur les jeunes feuilles et les feuilles âgées sont jaune-orangé (Figure 5). Ces symptômes apparaissent 1 à 2 semaines après l'inoculation (Kouassi *et al.*, 2005).

En champ, les symptômes apparaissent 3 à 4 semaines après le repiquage, selon la variété, le moment et la gravité de l'attaque. Ils se manifestent par des plages jaunes ou jaunes-orangé qui commencent en bordure (Figure 6), se propagent à l'intérieur et envahissent toute la parcelle (Kouassi *et al.*, 2005). Les symptômes s'observent à tous les stades de développement de la plante, de la pépinière jusqu'à la récolte. Ils peuvent quelques fois être confondus avec les carences en fer et en azote ou à la toxicité ferreuse (Abo *et al.*, 1998 ; Thottappilly et Rossel, 1993).

3. 2. 2. Gamme d'hôtes du RYMV

La gamme d'hôtes du virus de la panachure jaune du riz se limite aux *Graminées* et aux *Eragrostidae* (Séré *et al.*, 2008b). Les espèces de riz cultivé (*Oryza sativa*, *Oryza glaberrima*) et sauvage (*Oryza longistaminata*, *Oryza barthii*) ont été rapportées hôtes systémiques du virus.

Certaines espèces d'adventices ont aussi été identifiées hôtes réservoirs du virus (Abo *et al.*, 1998). Au nombre de celles-ci figurent entre autres *Eleusine indica*, *Echinochloa colona*, *Echinochloa crus-galli*, *Panicum repens*, *Panicum maximum*, *Dinebra retroflexa*, *Eragrostis tenuifolia* et *Eragrostis atrovirens* (Desf). T. Ex Steud (Awoderu, 1991 ; Konaté *et al.*, 1997 ; Nguessan *et al.*, 2001). L'espèce *O. longistaminata* est considérée comme l'un des principaux réservoirs du virus en Afrique de l'Ouest (John *et al.*, 1984 ; Sarra et Peters, 2003).



Figure 2 : Panachure et jaunissement caractéristiques (cercle bleu) de la panachure jaune du riz dans une parcelle de Kollo, Niger (Issaka, 2007).



Figure 3 : Rabougrissement et nanisme d'un pied de riz virosé (cercle bleu) en parcelle paysanne à Liboré, Niger (Issaka, 2008).



Figure 4 : Symptômes caractéristiques de panachure jaune du riz en champ paysan à Saga, Niger (Issaka, 2010)



Plants Bk1 189 malades Plants de Bouaké sains Plants IR64 malades Plants IR64 sains

Figure 5 : Plants de variétés de riz sensibles avec et sans symptômes de panachure jaune (flèches) en serre à AfricaRice Cotonou (Issaka, 2008).



Figure 6 : Début de l'infection de panachure jaune du riz en bordure de champ (cercle bleu) à Saga, Niger (Issaka, 2010).

3. 2. 3. Modes de transmission du RYMV

Plusieurs modes de transmission du RYMV à partir des réservoirs naturels ont été signalées. Il s'agit de la transmission par les insectes, la transmission mécanique, la transmission par les mammifères et les autres modes de transmission.

Initialement, le virus est transmis par les insectes Coléoptères de la famille des Chrysomélidés (Bakker, 1974). Les espèces *Sessilia pusilla*, *Chaetocnema pulla* Chapuis, *Chaetocnema sp. nov. prope varicornis* Jacoy, *Trichispa sericea* Guerin-Meneville, *Dicladispa gestroi* Chapuis et *Dicladispa viridicyana* ont été décrites vecteurs du virus (Bakker, 1971; Rossel, 1986; Banwo *et al.*, 2001 ; Abo *et al.*, 2002 ; Traoré, 2006). *Trichispa sericea* est le principal vecteur du virus en Afrique de l'Ouest, notamment au Mali, en Côte d'Ivoire et au Niger (Abo *et al.*, 2002). Des espèces de sauterelles telles que *Gonocephalus merimontanus* Sjostedt et *Gonocephalus longipennis* et de criquets, *Oxya spp.* ont aussi été déclarées vecteurs du RYMV (Bakker, 1974). La transmission du virus par les insectes se fait selon un mode non-circulant et semi-persistant (Brunt *et al.*, 1990). La durée pendant laquelle le vecteur reste virulifère varie selon l'espèce.

La transmission du RYMV aux plants s'effectue par le biais des blessures des feuilles (Fauquet et Thouvenel, 1977). Elle a lieu au champ accidentellement lors des travaux culturaux où les membres et les vêtements du paysan ainsi que les outils de culture constituent des facteurs de dissémination du virus (Sarra *et al.*, 2004, Traoré *et al.*, 2009). Le vent et la pluie contribuent par leurs effets aux blessures vectrices de transmission mécanique du virus, en frottant les feuilles malades contre les feuilles saines (Abo *et al.*, 2000 ; Sarra *et al.*, 2004). Ce mode de transmission induit une contamination de plus de 44 % des plants sains (Traoré *et al.*, 2008 ; Traoré *et al.*, 2006 a).

Les animaux mammifères et les rongeurs constituent aussi des vecteurs non négligeables de la transmission secondaire du virus. En se nourrissant successivement sur le riz malade et le riz sain, les bœufs, les rats, les ânes et mêmes les oiseaux contribuent à la propagation du virus dans les rizières (Sarra et Peters, 2003).

Les pépinières contribuent à l'infection primaire, à la faveur des manipulations des transplants (Sarra *et al.*, 2004 ; Traoré *et al.*, 2006 a ; Traoré *et al.*, 2009)). En effet, la manipulation des plants (arrachage, mise en bottes et repiquage) entre la pépinière et le champ est un facteur de contamination des plants sains à partir des plants infectés. Ce type de

contamination engendre une infection secondaire des champs à hauteur de 4,5 %, mais il ne provoque une épidémie de panachure jaune qu'au seuil de 2,5 % (Traoré *et al.*, 2006 a).

L'eau d'irrigation, les mains contaminées, l'enchevêtrement des racines des plants malades et des plants sains, la contamination du sol et la bouse de vache ont également été rapportés comme des facteurs de transmission de la panachure jaune du riz (Sarra, 1998 ; Reckhaus et Andriamasintseheno, 2001). Toutefois, le rôle de l'eau d'irrigation et celui de l'enchevêtrement des racines restent négligeables dans la transmission du virus (Traoré *et al.*, 2008). Aussi, la survie du virus dans le sol contaminé décroît-elle rapidement et ne dépasse guère deux semaines après la contamination (Traoré *et al.*, 2009).

Le RYMV n'est pas transmis par les nématodes et les graines (Bakker, 1974 ; Fauquet et Thouvenel, 1977 ; Konaté *et al.*, 1997). En effet des études portant sur plusieurs espèces de nématodes ont révélé qu'ils sont incapables de transmettre la maladie (Bakker, 1974 ; Abo *et al.*, 2000). Aussi, aucune transmission de celle-ci par les semences n'a-t-elle été obtenue ni chez le riz cultivé (Konaté *et al.*, 2001) ni au niveau des espèces hôtes sauvages (Allarangaye *et al.*, 2006). Toutefois, le virus est présent dans presque toutes les parties de la graine (glumelles, endosperme et embryon) dans des proportions de 65 à 100 % (Konaté *et al.*, 2001). La non-transmission du virus malgré sa présence s'expliquerait par son inactivation au cours du processus de maturation de la graine.

3. 3. Le virus de la panachure jaune du riz (RYMV)

3. 3. 1. Classification, purification et structure du virus

Le RYMV appartient au genre des *Sobemovirus* (Bakker, 1974 ; Fauquet *et al.*, 2005). Le genre *Sobemovirus* regroupe actuellement 13 membres définitifs et 4 membres provisoires (Tableau II). Il est constitué des virus à ARN, simple brin de polarité positive. L'exemple type est le virus de la mosaïque du haricot du sud (*Southern Bean Mosaic Virus*, SBMV) qui a conféré son nom au genre.

Le RYMV est facile à purifier, à partir des feuilles infectées (Bakker, 1970). Les rendements de purification varient de 1 à 6 mg de virus par gramme de feuilles infectées (Bakker, 1970 ; Mansours et Baillis, 1994). Les particules virales comportent 20 % d'ARN et 80 % de protéine, sans lipides ni hydrate de carbone (Opalka *et al.*, 2000. Kouassi *et al.*, 2005). Elles sont faciles à visualiser, par électromicroscopie associée à la modélisation (Figure 7A). Les particules du RYMV sont compactes, de forme stable et de type isométrique

Tableau II : Espèces virales membres définitifs et provisoires du genre *Sobemovirus* (Fauquet *et al.*, 2005)

Nom en français	Nom en Anglais, acronyme	Vecteurs	Distribution
Membres définitifs			
Le virus de la déformation filiforme de la myrtille	<i>Blueberry shoestring virus, BSSV</i>	Aphides	Amérique du Nord
Le virus de la panachure du dactyle.	<i>Cocksfoot mottle virus, CoMV</i>	Coléoptères	Europe
Le virus de la striure transitoire de la luzerne.	<i>Lucerne transient streak virus, LTCV</i>	ND	Australie, Canada
Le virus de la panachure jaune du riz	<i>Rice yellow mottle virus, RYMV</i>	Coléoptères,	Afrique
Le virus de la panachure du Ryegrass	<i>Ryegrass mottle virus, RGMoV</i>	ND	Japon, Allemagne
Le virus de la mosaïque du Sesbania	<i>Sesbania mosaic virus, SeMV</i>	ND	Inde
Le virus de la panachure jaune du <i>S. nodiflorum</i>	<i>Solanum nodiflorum mottle viru, SNMoV</i>	Coléoptères	Australie, Amérique du Sud
Le virus de la mosaïque du haricot du Sud	<i>Southern bean mosaic virus, SBMV</i>	Coléoptères	USA, Afrique, Europe, Asie
Le virus de la mosaïque du niébé	<i>Southern cowpea mosaic virus, SCPMV</i>	Coléoptères	USA, Afrique, Europe
Le virus de la mosaïque du sowbane (SoMV)	<i>Sowbane mosaic virus, SoMV</i>	Coléoptères	Amérique, Afrique, Australie
Le virus de la panachure du trèfle souterrain	<i>Subterranean clover mottle virus, SCMoV</i>	Coléoptères	Europe
Le virus de la rosette du navet	<i>Turnip rosette virus, TRoV</i>	Coléoptères	Ecosse
Le virus de la panchure du tabac hirsute	<i>Velvet tobacco mottle virus, VTMoV</i>	Myrides	Australie
Membres provisoires			
Le virus de la mosaïque légère du dactyle	<i>Cocksfoot mild mosaic virus, CMMV</i>	Coléoptères	Europe
Le virus de la panachure du Cynosurus	<i>Cynosurus mottle virus, CnMoV</i>	Aphides	Europe, Nouvelle-Zélande
Le virus de la moucheture chlorotique du gingembre	<i>Ginger chlorotic fleck virus, GCFV</i>	ND	Asie
Le virus de la panachure jaune du <i>S. nodiflorum</i>	<i>Solanum nodiflorum mottle virus, SNMoV</i>	Myrides	Australie, Amérique du Sud

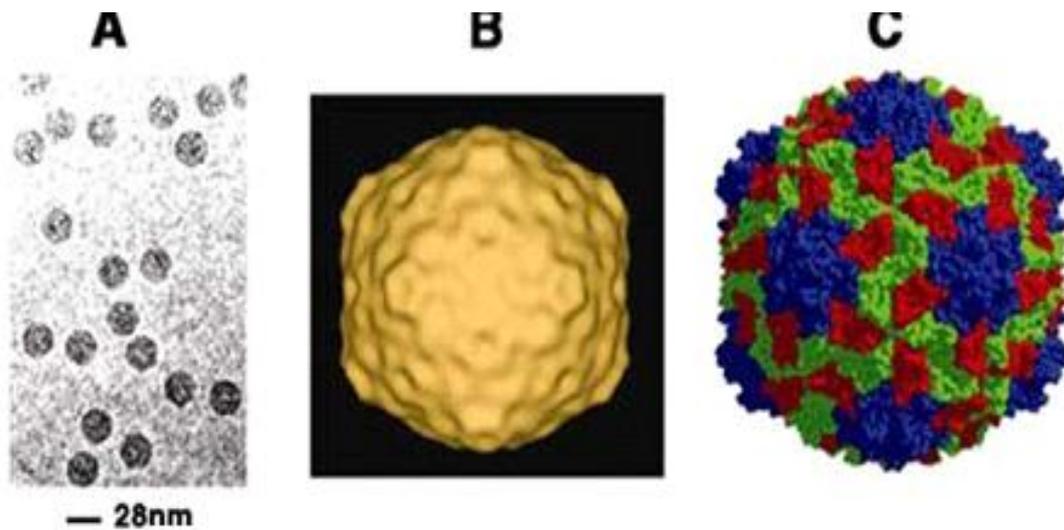


Figure 7 : Structure du *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV) à différentes résolutions (Qu *et al.*, 2000, cités par Kouassi *et al.*, 2005)

A: micrographie cryo-électronique de particules du RYMV natives.

B: surface tri-dimensionnelle de la particule dérivée de la cryo-électromicroscopie

C: modèle de la particule du RYMV obtenu à partir de données de cristallographie aux rayons X

(Figure 7 B) avec un diamètre de 26 à 30 nm (Bakker, 1974 ; Fauquet et Thouvenel, 1977). La cristallographie par diffraction aux rayons X, avec une précision de 2,8 Å (angströms), a permis d'établir la structure tridimensionnelle des particules du RYMV (Opalka *et al.*, 2000 ; Qu *et al.*, 2000). L'enveloppe (ou capsid) du virus présente une symétrie icosaédrale de type T = 3 (Figure 7 C). Elle est composée de 180 sous-unités capsidaires (protéique) identiques, de 26 kDa, unies et stabilisées par des ions Ca²⁺ pH indépendants (Brugidou *et al.*, 2002).

3. 3. 2. Organisation génomique

Le RYMV est un virus à ARN, simple brin, linéaire, de polarité positive, ayant un ARN subgénomique et de poids moléculaire 1.4 x 10⁶ Da (Bakker, 1974 ; Tamm et Truve 2000 ; Fauquet *et al.*, 2005). La molécule d'ARN est liée à l'extrémité 5' terminale à une protéine appelée VPg (Protéine Viral liée au génome ou Viral Protein genome linked) d'environ 10 à 12 Kda. L'extrémité 3' terminale est dépourvue de queue poly-adénylée.

La séquence nucléotidique de l'ARN génomique du RYMV comprend entre 4450 et 4452 nucléotides (Ngon A. Yassi *et al.*, 1994 ; Fargette *et al.*, 2002 ; Fargette *et al.*, 2004). Elle est organisée en 4 cadres de lecture ouverts (Open Reading Frame, ORFs) d'au moins 240 nucléotides (nt) de longueur, agencée (Figure 8) selon l'organisation génomique du virus de la panachure du Dactyle (*Cooksfoot mottle virus*, CfMV). L'ORF1 code pour la protéine P1. L'ORF2 ayant un signal de changement de cadre de lecture (frameshift) comporte deux portions : l'ORF2a gouverne la synthèse de la protéase et de la VPg et assure une autre fonction non encore élucidée. L'ORF2b code pour la synthèse de l'ARN polymérase ARN dépendante. Enfin, l'ORF4 est traduit à partir d'un ARN subgénomique et code pour la protéine de capsid (Fargette *et al.*, 2004).

3. 3. 3. Localisation et propriétés des particules virales

Le RYMV se réplique de manière intense et présente une stabilité remarquable dans son hôte (Ou *et al.*, 2000). Il est présent dans presque toutes les cellules de l'hôte, avec une accumulation préférentielle dans les tissus du mésophile, dans les cellules parenchymateuses du xylème et dans la sève, sous forme d'amas cristallins (Opalka *et al.*, 1998 ; Brugidou *et al.*, 2002). Les particules du virus sont très stables dans l'extrait brut et dans les feuilles sèches.

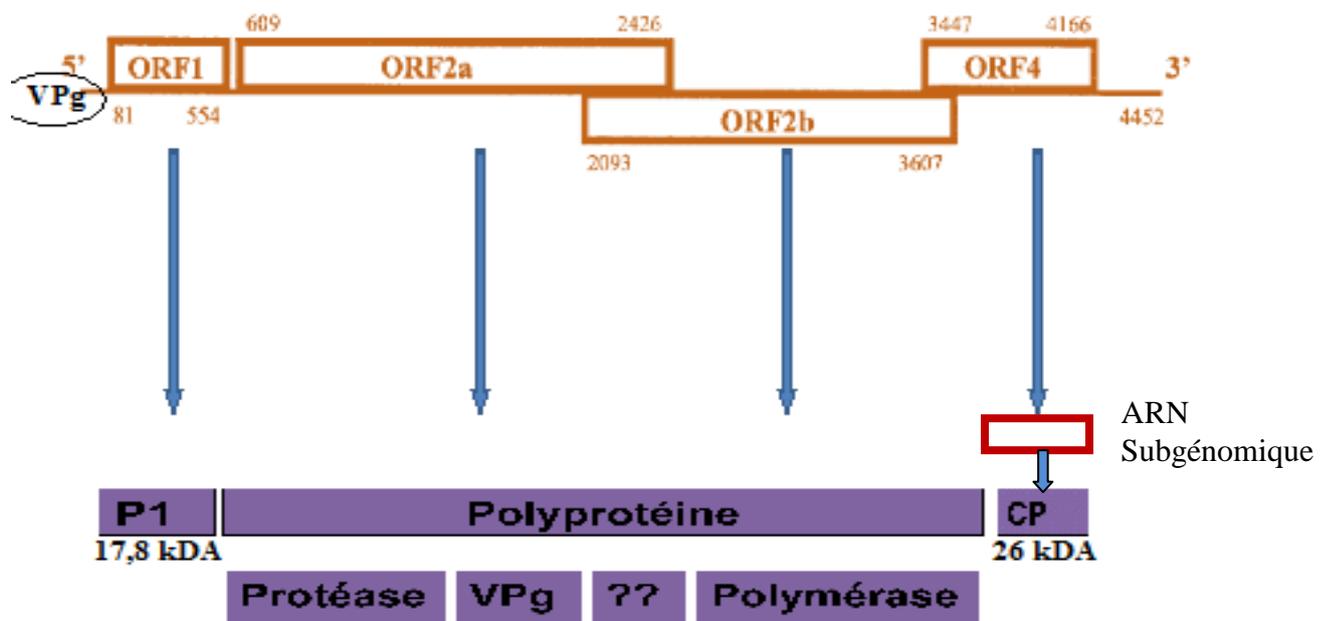


Figure 8 : Organisation génomique du *Rice Yellow Mottle virus* (Fargette *et al.*, 2004).

L'**ORF1** code pour la protéine de mouvement **P1** (17,8 kDA). L'**ORF2**, subdivisé en ORF2a et ORF2b, est vraisemblablement traduit sous forme de **polyprotéine**. L'**ORF2a** code pour une **protéase** à sérine et la VPg mais la fonction de sa partie C-terminale reste méconnue. L'**ORF2b** synthétise une **ARN polymérase** ARN dépendante. Par homologie avec le CoMV, la VPg a été localisée après la protéase. Enfin, l'**ORF4** est traduite à partir d'un ARN subgénomique et code pour la protéine de capside.

Elles peuvent survivre dans des conditions très défavorables comme les mandibules d'un coléoptère, les tissus vasculaires de la plante ou le sol (Siré et Brugidou, 2002). Leur maturation a lieu dans les vacuoles, suite à leur forte accumulation et par fixation des particules aux ions Ca^{2+} cellulaires de l'hôte (Brugidou *et al.*, 2002).

Le point de thermo-inactivation du virus est compris entre 70 et 80°C et sa concentration dans la plante (400 à 600 mg /Kg de feuilles) est très élevée (Ou *et al.*, 1985). La stabilité des particules virales n'est pas pH dépendante mais, elle est fonction des ions Ca^{2+} (Brugidou *et al.*, 2002). Toutefois, à un stade précoce de l'infection, le pH cellulaire influence la stabilité des particules virales (Hull, 1988).

3. 3. 4. Cycle du RYMV

Le cycle de propagation du RYMV comporte 4 étapes, parfois non distinctes. Il s'agit de l'entrée du virus, sa décapsidation, sa multiplication et la migration des particules virales dans les autres parties de l'hôte.

Le RYMV pénètre dans le plant de riz par le biais des blessures faites par les vecteurs lors de leur prise de nourriture ou lors des activités culturales et autres modes de transmission du virus (Sarra et Peters, 2004 ; Traoré *et al.*, 2006 a). Une fois à l'intérieur de l'hôte, la particule virale entière libère son génome par décapsidation et initie la transcription et la traduction de l'ARN, à partir de la machinerie enzymatique de l'hôte. Ce qui conduit à la production de plusieurs copies d'ARN de RYMV. Après la décapsidation et la réplication dans les premières cellules infectées, le RYMV migre de cellule à cellule pour induire une infection systémique chez son hôte (Bonneau *et al.*, 1998 ; Brugidou *et al.*, 2002).

Comme chez tous les virus des plantes, la migration du RYMV au sein de son hôte a lieu *via* les plasmodesmes et grâce à des protéines de mouvement (MP) qui forment avec le génome viral un complexe ribonucléo-protéique (RNP). Ce complexe est nécessaire au mouvement du virus dans les cellules des feuilles infectées (Daniel et Brigitte, 2004). La protéine P1 et la CP (protéine de capsid) sont capables de se lier conjointement ou non au complexe RNP, pour permettre le mouvement de cellule à cellule du RYMV (Bonneau *et al.*, 1998).

La protéine P1 est responsable du mouvement de cellule à cellule du virus et constitue un suppresseur de la PTGS de l'hôte (Siré *et al.*, 2008). En effet, à l'instar de plusieurs virus, le RYMV produit des protéines qui suppriment l'effet inhibiteur (PTGS) exercé sur leur

génomique par les protéines spécifiques de la plante hôte. Des travaux de mutagenèse avec la protéine P1 ont révélé un lien étroit entre certains acides aminés spécifiques de cette protéine et la suppression par PTGS ainsi que le mouvement de cellule à cellule du virus (Siré *et al.*, 2008).

Le mouvement vasculaire ou mouvement de longue distance des particules virales s'effectue par les vaisseaux conducteurs de l'hôte qui sont les tubes criblés du phloème et du xylème (Leisner *et al.*, 1993). Ce mouvement est indispensable à l'établissement de l'infection systémique, même si les mécanismes de ce transport restent encore mal connus. Selon Brugidou *et al.*, (1995), la protéine de capsid, indispensable à l'infection systémique, interviendrait dans le mouvement vasculaire du RYMV.

3. 3. 5. Variabilité génétique du RYMV

3. 3. 5. 1. Variabilité sérologique du RYMV en Afrique

La variabilité sérologique du RYMV avait été suspectée pour la première fois par Fauquet et Thouvenel, (1977) qui avaient montré que l'isolat du Niger est sérologiquement lié à celui du Nigéria (pays limitrophe). Aussi, l'isolat de Côte d'Ivoire était sérologiquement différent de celui du Kenya (en Afrique de l'Est).

Mansours et Baillis (1994) ont confirmé l'existence de la variabilité sérologique du RYMV. Ils ont rapporté, sur la base des profils de réactions types de cinq isolats (du Niger, Nigéria, Côte d'Ivoire, Sierra-Léone et Kenya), l'existence de trois groupes sérologiques. Trois groupes sérologiques (RYMV1, RYMVII et RYMVIII) ayant une distribution géographique différente mais partiellement chevauchante ont aussi été mis en évidence à l'aide d'anticorps polyclonaux du virus (Konaté *et al.*, 1997).

Le typage sérologique avec des anticorps polyclonaux (Pabs) et monoclonaux (Mabs) réalisés sur une large gamme d'isolats (125 au total) a révélé la présence de cinq groupes sérologiques de RYMV (Ser1, Ser2, Ser3, Ser4 et Ser5) dans les différentes zones rizicoles de l'Afrique (Nguessan *et al.*, 2000). Par la suite, un sixième sérotype, nommé Ser-sa, a été observé en zone de savane d'Afrique de l'Ouest (Traoré *et al.*, 2001).

Les six sérotypes déterminés se répartissent dans trois pôles géographiques distincts. Les Ser1, Ser2, Ser3 et Ser-sa ont été trouvés dans les zones de forêt et de savanes d'Afrique de l'Ouest et du Centre tandis que les deux autres sérotypes (Ser4 et Ser5) sont présents en Afrique de l'Est et à Madagascar (Nguessan *et al.*, 2000 ; Fargette *et al.*, 2002a).

3. 3. 5. 2. Variabilité moléculaire du RYMV en Afrique

L'approche moléculaire par séquençage du gène de la protéine de capsid et de la partie 3' non codante du RYMV a confirmé et précisé les bases de la structuration de la diversité du virus, révélée par les analyses sérologiques (Nguessan *et al.*, 2000 ; Traoré *et al.*, 2001 ; Fargette *et al.*, 2002 a). Six souches du RYMV (S1, Sa, S2, S3, S4 et S5) correspondant aux 6 sérotypes antérieurement définis et une nouvelle souche dénommée S6 ont été identifiées, confirmant la distribution Est-Centre-Ouest des souches du virus (Pinel *et al.*, 2000 ; Traoré *et al.*, 2001 ; Traoré *et al.*, 2005).

La filiation des isolats est basée sur leur origine géographique et les aires de distribution des souches du virus sont partiellement chevauchantes (Konaté *et al.*, 1997 ; Nguessan *et al.*, 2000 ; Pinel *et al.*, 2000 ; Fargette *et al.*, 2002b ; Abubakar *et al.*, 2003). Les souches S1, S2, S3 et Sa sont originaires d'Afrique de l'Ouest et du Centre et, les souches S4, S5 et S6 sont inféodées à l'Afrique de l'Est (Traoré *et al.*, 2005).

Les isolats du sérotype Ser1 originaire des savanes d'Afrique Centrale d'une part et d'Afrique de l'Ouest d'autre part appartiennent à deux lignées sœurs (S1-Afrique de l'Ouest ou S1-AO et S1-Afrique Centrale ou S1-AC) suggérant ainsi qu'ils dérivent d'un ancêtre commun adapté à l'écologie de savane (Traoré *et al.*, 2001).

La lignée S1-AC renferme aussi les isolats de certains pays d'Afrique de l'Ouest : d'où sa renomination en lignée Afrique Ouest-Centrale, S1-AOC (Traoré *et al.*, 2005). Cette lignée se subdivise en deux clades : le clade S1-AOC Dahomey Gap (Togo, Bénin et Niger) et celui typique d'Afrique Centrale (Tchad, Cameroun), appelé S1-AOC Afrique Centrale.

Les trois souches d'Afrique de l'Est (S4, S5 et S6) sont toutes présentes dans la seule Tanzanie, révélant une grande diversité génétique du RYMV dans cette zone géographique (Traoré *et al.*, 2005). Le même classement et la même distribution des souches ont été confirmés après le séquençage des gènes des différents ORFs (Pinel *et al.*, 2000 ; Fargette *et al.*, 2002 b) et du génome entier (Fargette *et al.*, 2004).

Les isolats d'Afrique de l'Ouest et du Centre appartiennent à un groupe monophylétique avec une diversité génétique maximale de 9 %. Par contre, plusieurs groupes sont distingués chez les isolats d'Afrique de l'Est, notamment ceux de la Tanzanie parmi lesquels la diversité génétique atteint 13 % (Abubakar *et al.*, 2003 ; Traoré *et al.*, 2005). Ces résultats renforcés par la topologie des arbres phylogénétiques font de la Tanzanie (Afrique de l'Est) le centre d'endémisme et de diversification primaire du RYMV avec dispersion vers

l'Afrique du Centre et de l'Ouest. Dans cette dernière région, le delta intérieur du Niger au Mali (Figure 9) constitue un centre secondaire d'endémisme et de diversification du virus. Car toutes les souches RYMV d'Afrique de l'Ouest (S1, S2, S3 et Sa) y sont présentes, avec une grande diversité génétique (4,1 %) de la souche Sa (Fargette *et al.*, 2004 ; Traoré *et al.*, 2005).

Certains isolats d'Afrique de l'Est sont caractérisés par des phénomènes de recombinaisons qui affectent leurs génomes, favorisant leur variabilité génétique et induisant leur évolution temporelle (Pinel *et al.*, 2009). Les événements de recombinaison ont été observés par séquençage de la CP et de l'ORF2a. Ils ont confirmé l'évolution rapide du RYMV. La vitesse d'évolution de ce dernier est comprise entre 4×10^{-4} et 8×10^{-4} nucléotides / site / an (Fargette *et al.*, 2008 b).

3. 3. 5. 3. Variabilité génétique du RYMV au Niger

La variabilité génétique du RYMV a été très peu étudiée. Des études sérologiques et moléculaires préliminaires réalisées respectivement sur 10 et trois (3) isolats du virus ont montré que les isolats RYMV-Niger appartiennent au sérotype S1-AC et à la souche S1-AOC. Ils sont génétiquement liés au clade S1-AOC Dahomey Gap, ce qui suggère une faible diversité génétique du virus au Niger (Traoré *et al.*, 2005).

3. 3. 6. Variabilité pathogénique

La pathogénie est le processus permettant à un parasite d'induire une maladie sur un organisme hôte. Elle se caractérise chez les virus par l'agressivité et la virulence (Van Der Plank, 1968). La virulence est l'aptitude génétique d'un pathogène à contourner une résistance génétiquement déterminée chez des variétés, conduisant à une maladie (Fraser, 1977 ; Shaner, 1992). C'est une propriété qualitative dont le contraire est l'aviorulence.

L'agressivité exprime l'intensité des symptômes chez une variété sensible. Par exemple, un isolat est plus ou moins agressif selon qu'il induit des symptômes plus ou moins forts chez une variété sensible. L'agressivité est donc une propriété quantitative (Astier *et al.*, 2001).



Figure 9 : Localisation géographique du delta intérieur du Niger (entouré en rouge)

(Source : Anonyme 6, 2011)

L'étude de la variabilité pathogénique du RYMV a commencé avec l'observation de différences d'agressivité des isolats géographiques du virus vis-à-vis de différentes variétés de riz (Lecomte *et al.*, 1993). Depuis, deux (2) à trois (3) pathogroupes du virus (hautement pathogène, moyennement pathogène et faiblement pathogène) ont été identifiés dans les écologies rizicoles contrastées d'Afrique, indiquant une certaine diversité biologique du RYMV (Konaté *et al.*, 1997 ; Nguessan *et al.*, 2001 ; Onasanya *et al.*, 2006).

Des isolats capables de contourner les résistances identifiées ont été observés. Les isolats virulents de RYMV forment un pathogroupe appelé RB (Resistance Breaking isolates). Ils ont d'abord été obtenus naturellement (Konaté *et al.*, 1997), puis par des inoculations successives d'un isolat sauvage avirulent à une variété sensible (Fargette *et al.*, 2002 c ; Hébrard *et al.*, 2006 a) et enfin à partir de l'inoculation mécanique d'isolats du virus provenant directement des écologies rizicoles d'Afrique de l'Ouest et du Centre (Traoré *et al.*, 2006 b).

De nos jours, les recherches sont orientées vers la connaissance du déterminisme génétique de la variabilité pathologique. Initialement l'agressivité des isolats du RYMV a été attribuée à la CP (Nguessan *et al.*, 2001). Plus tard, des travaux d'analyses moléculaires ont montré que c'est la VPg qui détermine la capacité du RYMV à contourner la résistance du gène RYMV1 (Hébrard *et al.*, 2006 b). Les résultats préliminaires du séquençage de cette protéine suggéraient d'une part que le déterminisme génétique de la pathogénie du virus est lié au polymorphisme E (présence d'acide glutamique) ou T (présence de thréonine) en position 49 de ladite protéine et d'autre part que la fixation des mutations dans la séquence de nucléotides du gène codant pour cette même protéine détermine le contournement de la résistance (Pinel *et al.*, 2007).

La connaissance de la distribution des différents pathogroupes, notamment celle des isolats virulents constitue un préalable au déploiement des sources de résistance dans les différentes écologies rizicoles. Cependant, les caractéristiques biologiques du RYMV au Niger sont insuffisamment étudiées. Une première évaluation biologique basée sur 10 isolats RYMV originaires de sept sites rizicoles du Niger a montré une différence de pathogénie entre les isolats étudiés (Basso *et al.*, 2010). Toutefois, aucun isolat contournant n'a été inventorié dans cette étude et la taille de l'échantillonnage n'a certainement pas permis d'apprécier l'étendue de la diversité biologique du virus au Niger. Aussi, aucune étude moléculaire sur le déterminisme de la pathogénie de la souche RYMV-Niger n'a été conduite.

3. 3. 7. Résistance du riz au RYMV

Deux types de résistance naturelle vis-à-vis du RYMV ont été caractérisés, suite à l'évaluation de nombreuses variétés de riz cultivé et sauvage (Rossel et Thottappilly, 1993). Il s'agit de la résistance dite élevée et de la résistance partielle.

La résistance élevée a été observée chez Giganté et Bekarossaka (*O. sativa*) (Albar *et al.*, 2003 ; Rakotomalala *et al.*, 2008) et chez quelques accessions d'*O. glaberrima* dont la variété Tog5681 (Ndjiondjop *et al.*, 1999 ; Ioanidou *et al.*, 2000). Elle se manifeste par une absence de symptômes de panachure jaune et une faible teneur en virus. C'est une résistance récessive monogénique stable qui est exploitable en sélection (Ndjiondjop *et al.*, 1999). La résistance élevée est due au même gène de résistance chez les deux espèces de riz. En effet, le gène RYMV1, localisé sur le chromosome 4, est responsable de la haute résistance de Giganté, Bekarossaka et Tog5681 (Ndjiondjop *et al.*, 2001 ; Albar *et al.*, 2003). Ce gène présente un allèle dominant de sensibilité (*rymv1-1*) et 4 allèles récessifs de résistance *rymv1-2*, *rymv1-3*, *rymv1-4* et *rymv1-5* (Albar *et al.*, 2003 ; Thiémélé *et al.*, 2010).

Le gène RYMV1 code pour la protéine d'initiation de la transcription appelée eIF (iso) 4 G (Figure 10), une protéine qui régule l'interaction riz-RYMV (Albar *et al.*, 2006 ; Hébrard *et al.*, 2006 b). La résistance élevée contre le RYMV est également induite par un deuxième gène de résistance appelé RYMV2 (Thiémélé *et al.*, 2010).

La résistance partielle a été identifiée d'abord chez certaines variétés traditionnelles comme Os6, Lac-23 et Moroberekan (Rossel et Thottappilly, 1993) puis chez la variété Azucena (*O. sativa japonica*) (Ndjiondjop *et al.*, 1999). Elle est caractérisée par un retard dans l'apparition des symptômes et une forte accumulation du virus. Cette résistance de type polygénique (Ghesquière *et al.*, 1997 ; Ioanidou *et al.*, 2000 ; Ndjiondjop *et al.*, 2001) est associée aux variétés *japonica* pluviales (Albar *et al.*, 1998). Les sélectionneurs s'emploient à l'introduire dans leurs programmes d'amélioration variétale. Les *QTLs* (Quantitative Trait Locus) et leurs combinaisons ont été incriminés dans le déterminisme de la résistance partielle du riz au RYMV (Albar *et al.*, 1998 ; Pressoir *et al.*, 1998). Mais seule la combinaison entre les *QTLs* 12 et 7 joue un rôle déterminant dans l'expression de la résistance partielle. La construction de lignées iso-géniques, par introgression du gène RYMV1, du QTL 12 et / ou de la combinaison gène RYMV1/*QTL* 12 dans des fonds génétiques sensibles à haut potentiel agronomique a été réalisée et le transfert de résistance obtenu (Ndjiondjop *et al.*, 2001 ; Sorho *et al.*, 2005).

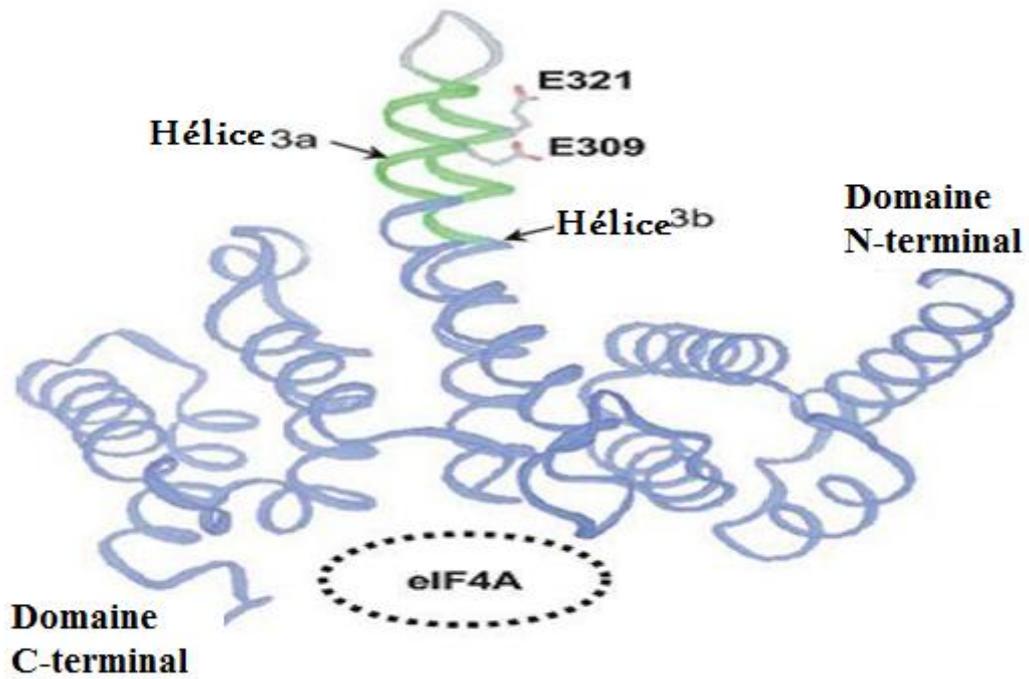


Figure 10 : Modélisation du facteur d'initiation de la transcription eIF (iso) 4G du riz (Albar *et al.*, 2006).

3. 8. Déterminisme de la résistance du riz et de son contournement par le RYMV

3. 8. 1. Déterminisme de la résistance du riz au RYMV

La résistance du riz au RYMV est due à une mutation dans l'allèle dominant (*rymv1-1*) du gène RYMV1 (Albar *et al.*, 2006 b). Cette mutation provoque un changement (substitution, délétion) de certains acides aminés du facteur eIF (iso) 4 G du riz sensible, faisant de lui une variété résistante. Cette résistance est consécutive à la suppression de la réaction de compatibilité observée entre l'eIF (iso) 4 G de la variété sensible (ayant l'allèle *rymv1-1*) et la protéine VPg du virus (Figure 11). Il s'agit d'une réaction négative c'est-à-dire incompatible entre le facteur eIF (iso) 4G de la variété de riz résistante et la VPg de l'isolat du RYMV sauvage. Cette interaction est basée sur la réaction entre les acides aminés basiques et les acides aminés acides des deux protéines interagissantes (Hébrard *et al.*, 2006 b).

Deux gènes de résistance du riz vis-à-vis du RYMV ont été inventoriés chez quelques variétés de riz cultivé (Thiémélé *et al.*, 2010) des espèces *O. sativa* (gène RYMV1) et *O. glaberrima* (gènes RYMV1 et RYMV2). Chez le gène RYMV1, les allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* sont respectivement responsables de la résistance élevée de Giganté et Tog5681 (Albar *et al.*, 2003 ; Thiémélé *et al.*, 2010).

3. 8. 2. Déterminisme du contournement de la résistance du riz au RYMV

Les résistances obtenues sont susceptibles d'être contournées par les isolats virulents dits isolats RB (Resistance breaking isolates) ou contournants (Fargette *et al.*, 2002 c ; Traoré *et al.*, 2006 b). L'aptitude du contournement de la résistance des allèles *rymv1-2* de Giganté et Bekarossaka et *rymv1-3* de Tog5681 est en général liée à des mutations spécifiques dans le domaine central de la protéine VPg (Pinel *et al.*, 2007 ; Hébrard *et al.*, 2008).

Ces mutations dites de contournement interviennent dans la VPg et rétablissent l'interaction compatible avec l'eIF (iso) 4 G codé par le gène RYMV1 muté de la variété résistante. La fixation des mutations de contournement dépendrait de l'acide aminé 49 de la VPg. En effet, la présence de la thréonine (T) ou de l'acide glutamique (E) chez un isolat de RYMV le prédisposerait respectivement à fixer une mutation contre les allèles de résistance *rymv1-3* et *rymv1-2* (Pinel *et al.*, 2007).

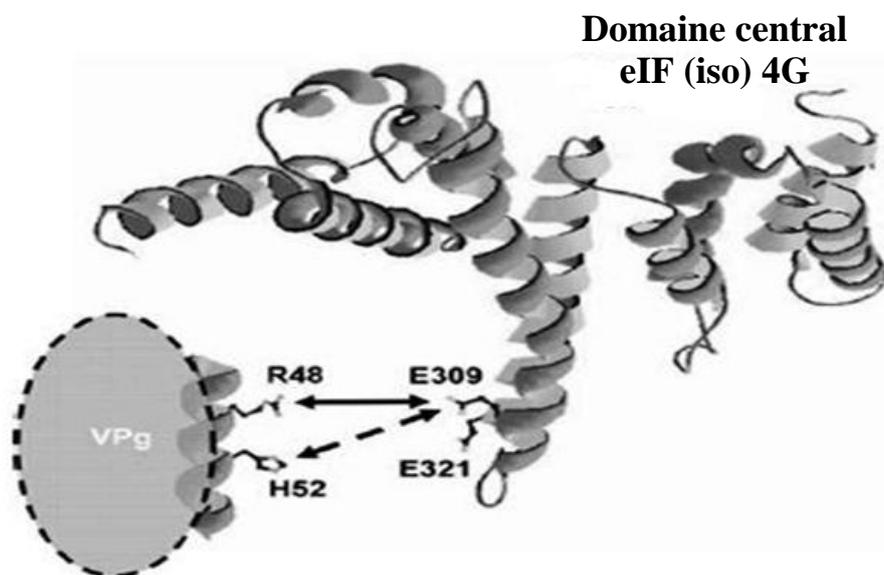


Figure 11 : Modélisation du facteur d'initiation de la transcription eIF (iso) 4G du riz et de l'interaction avec la VPg du RYMV (Hébrard et *al.*, 2006).

Contrairement au déterminisme génétique de la résistance, les bases génétiques de la pathogénie des isolats du RYMV restent très peu explorées. Au Niger, le déterminisme de la pathogénie du virus n'a pas encore été étudié.

3. 9. Méthodes de lutte contre le RYMV

3. 9. 1. Lutte culturale et chimique

La lutte culturale est basée sur la bonne application des itinéraires techniques. Elle renferme un ensemble de mesures prophylactiques destinées à réduire la disponibilité de l'inoculum viral ou de freiner la propagation de la maladie au champ (Abo *et al.*, 1998). Les mesures de réduction des sources d'inoculum consistent généralement à : (i) détruire les résidus de récoltes (ii) arracher très tôt les plants infectés (iii) nettoyer les diguettes, digues, canaux d'irrigation et abords des parcelles et (iv) assécher les rizières en inter-campagne.

La lutte contre la propagation de la maladie au champ est basée surtout sur la rotation des pépinières, la précaution dans la manipulation des plants, la synchronisation des repiquages et l'éradication des plants malades. Enfin des insecticides peuvent être utilisés pour éliminer les insectes vecteurs et éviter leur pullulation (Abo *et al.*, 1998 ; Traoré *et al.*, 2009).

3. 9. 2. Lutte génétique

La lutte génétique consiste à exploiter les résistances naturelles en vue de contrôler la panachure jaune du riz. Plusieurs sources de résistance ont été obtenues (Fomba *et al.*, 1988 ; Thottappilly et Rossel, 1993 ; Albar *et al.*, 1998). En effet, les résistances élevée et partielle sont utilisées dans l'amélioration des variétés sensibles à fort potentiel de rendement.

Les premiers résultats d'amélioration variétale ont donné plusieurs descendants dont les NERICA (New Rice for Africa) qui combinent à la résistance au RYMV, d'autres performances agronomiques (Anonyme 3, 2001). Des lignées iso-géniques (NILs) ayant un niveau de résistance partielle et présentant de caractéristiques agronomiques intéressantes ont été obtenues (Sorho *et al.*, 2005). Ces variétés ont été mises au point par introgression et sélection assistée par marqueur du gène de résistance RYMV1 de Giganté ou du *QTL 12* du cultivar Azucena partiellement résistant (Albar *et al.*, 1998 ; Ahmadi *et al.*, 2001) dans plusieurs variétés élites de riz (IR64, Bouaké 189, Jaya, BG-90 etc.).

Un pyramidage (introgression d'une combinaison de plusieurs gènes de résistance) des gènes de résistance RYMV1 et *QTL 12* a même été réalisé pour rendre plus efficace la lutte génétique contre la panachure jaune du riz (Ahamadi *et al.*, 2001 ; Sorho, 2006). Les travaux d'introgression des gènes de résistance dans les variétés élites se poursuivent encore au sein de l'équipe de génétique du riz de l'IRD et dans les autres centres spécialisés.

En génie génétique, une résistance partielle dérivée de l'agent pathogène a été obtenue chez la variété Bouaké 189, par introgression d'une partie ou de la séquence entière de ORF2 codant pour l'ARN polymérase ARN dépendante du RYMV (Pinto *et al.*, 1999). L'introgression de différentes séquences de la CP du virus a été réalisée chez la variété TP309. Les lignées transformées par l'ARN antisens de la CP ont été les seules à présenter une résistance partielle au RYMV (Kouassi *et al.*, 2006) pendant que les lignées exprimant l'ARN sens de la CP étaient plus sensibles que le témoin de sensibilité (Bouaké189). Plusieurs lignées transgéniques de riz ont ainsi été obtenues. La résistance dérivée se manifeste par le processus de VIGS (viral induced gene silencing = suppression de l'induction du gène viral) au cours duquel l'ARN viral est spécifiquement dégradé après sa transcription, ce qui aboutit à l'extinction définitive du génome de RYMV (Pinto *et al.*, 1999).

CHAPITRE 4 : MILIEU D'ETUDE ET SITES D'EXPERIMENTATION

4. 1. Zone d'étude

La zone d'étude couvre les deux rives aménagées de l'Ouest du fleuve Niger, zone rizicole par excellence du pays ainsi que les rizières modernes bordant la Komadougou Yobé à l'Est (Figure 12). Elle occupe une superficie d'environ 30 000 ha, morcelée en 35 périmètres rizicoles ou sites de taille variable regroupés dans deux principales zones rizicoles.

Les parties Est et Ouest du Nigéria (Sud du Niger) ont aussi été un peu visitées, afin de chercher les relations phylogénétiques reliant des isolats du Niger à ceux du Nigéria voisin.

4. 1. 1. Zone Ouest du Niger

C'est la plus grande zone rizicole du Niger. Elle a été très peu prospectée et moins de 10 isolats du virus provenant de quelques sites seulement ont été caractérisés. Une large prospection dans cette écologie a permis d'y évaluer l'épidémiologie de la panachure jaune du riz et d'étudier la variabilité du RYMV. Un isolat est un échantillon de feuilles (de riz ou d'adventives) suspecté de contenir le virus et testé positif à l'ELISA par rapport au témoin infecté ou à la PCR (réaction de polymérisation par chaîne) ou dont le broyat est capable de régénérer des symptômes types de panachure jaune sur un témoin sensible.

4. 1. 2. Zone d'étude de l'Est du Niger

Cette zone du Niger est à la limite entre l'Afrique de l'Ouest et du Centre. Elle n'a jusque là jamais été explorée. Les caractéristiques des isolats qui y sont présents sont complètement inconnues. Par contre, la phylogénie et la phylogéographie des isolats des pays limitrophes dont le Tchad et un peu le Nigéria ont été étudiées.

L'étude des isolats de cette zone rizicole du Niger, notamment le séquençage du génome entier des isolats Ng218 (originaires de Diffa, à l'Est du Niger), Ng36, Ng140 et Ng161 (récoltés à l'Ouest du Niger) a permis de connaître la diversité génétique des souches du RYMV-Niger ainsi que ses relations avec les souches voisines. Une souche est un groupe d'isolats ayant les mêmes caractéristiques génétiques. Elle peut être subdivisée en lignées puis en clades.



Figure 12 : Représentation des deux zones rizicoles (Ouest et Est) prospectées (Issaka, 2010)

En gris encadré, les deux zones de prospection.

4. 1. 3. Zones rizicoles prospectées au Nigeria

Quelques sites des états du Niger (à l'Ouest) et du Bénoué (à l'est) en république fédérale du Nigeria ont été prospectés et les propriétés génétiques des isolats collectés ont permis d'établir les relations phylogénétiques qui lient les isolats de ces deux zones limitrophes à ceux du Niger. Ces zones ont été auparavant peu explorées.

4. 2. Sites d'expérimentation

4. 2. 1. Site expérimental des tests pathologiques et sérologiques

Les essais d'évaluation de la diversité biologique ont été conduits dans les serres de la station expérimentale d'AfricaRice Cotonou (Bénin), à l'abri des insectes et en conditions de biosécurité. Les tests sérologiques ont également été réalisés à la même station.

Une autre évaluation biologique des isolats RYMV-Niger a été reprise dans les serres de l'UMR 186 RPB (IRD de Montpellier), dans le but de rechercher les isolats contournants et étudier le déterminisme de la pathogénie, du contournement de la résistance du riz et de l'adaptation des pathotypes du RYMV aux espèces de riz cultivées.

4. 2. 2. Site des tests moléculaires

Les expérimentations ont été conduites dans les serres et laboratoire de l'UMR 186 RPB IRD de Montpellier. Ces serres de confinement de type S2 ont permis de manipuler les souches du RYMV-Niger, sans risque de les propager dans l'environnement hôte.

2^e PARTIE :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE 5 : MATÉRIEL

5. 1. Matériel

5. 1. 1. Matériel végétal

Trois types de matériel végétal ont été utilisés. Il s'agit du :

- matériel de caractérisation biologique préliminaire du RYMV-Niger ;
- matériel d'évaluation biologique du RYMV-Niger ;
- matériel utilisé dans les infections mixtes des pathotypes du RYMV-Niger.

5. 1. 1. 1. Matériel végétal de caractérisation biologique préliminaire du RYMV-Niger

Chacun des échantillons de riz et d'adventices, collectés dans les périmètres du Niger, a été propagé sur 4 variétés de référence (Tableau III) : les variétés Giganté (Tete) et Tog 5681 porteuses respectivement des allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv 1-3* du gène de résistance RYMV1 du riz (Ndjondjop *et al.*, 2001 ; Albar *et al.*, 2003 ; Albar *et al.*, 2006) et deux variétés témoins sensibles (Bouaké 189 et IR64), ayant l'allèle *rymv1-1* de sensibilité au RYMV.

5. 1. 1. 2. Matériel végétal d'évaluation biologique du RYMV-Niger

Il a été constitué de neuf variétés de riz (Tableau III) dont six différentielles (Anonyme 3, 2001). Il s'agit des variétés résistantes Giganté (V1) et Tog5681 (V2) porteurs respectivement des allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv1-3*, deux variétés partiellement résistantes (V3, V4) et cinq sensibles (V5 à V9) parmi lesquelles trois largement cultivées au Niger (V7, V8 et V9). L'évaluation biologique du contournement de la résistance a porté sur les variétés IR64, Giganté, Tog5681 et Tog5672 ayant l'allèle *rymv1-4* (Tableau III).

5. 1. 1. 3. Matériel végétal des infections mixtes de pathotypes du RYMV-Niger

Le matériel végétal des infections mixtes de pathotypes a été constitué de deux génotypes sensibles de riz, IR 64 (*O. sativa*) et Tog 5673 (*O. glaberrima*). Ces variétés se sont révélées capables de discriminer les pathotypes T et E du RYMV (Poulicard *et al.*, 2010).

Tableau III : Identité des variétés testées

Code	Génotype / Variété	Espèce / S/Espèce	Allèle de résistance	Références*
V1	Giganté	<i>O. sativa (indica)</i>	<i>rymv1-2</i>	HR
V2	Tog 5681	<i>O. glaberrima</i>	<i>rymv1-3</i>	HR
V3	Moroberekan	<i>O. sativa (japonica)</i>	<i>QTL</i>	MR
V4	PNA 647F4-56	<i>O. sativa (japonica)</i>	<i>QTL</i>	MR
V5	Bouaké 189	<i>O. sativa (indica)</i>	<i>rymv1-1</i>	S
V6	IR 64	<i>O. sativa (indica)</i>	<i>rymv1-1</i>	HS
V7	Bassirou Moa	<i>O. sativa (indica)</i>		VVS
V8	IR 1529-680-3	<i>O. sativa (indica)</i>		VVS
V9	Kassoum Moa	<i>O. sativa (indica)</i>		VVS
?	Tog5672	<i>O. glaberrima</i>	<i>rymv1-4</i>	HR

*HR : hautement résistant, MR : moyennement résistant, S : sensible, HS : hautement sensible et VVS : variété vulgarisée sensible au Niger.

5. 1. 2. Matériel viral

Le matériel de caractérisation biologique préliminaire du RYMV au Niger a été constitué de 500 échantillons de feuilles de riz et d'adventices, suspectés de contenir le virus et collectés sur l'ensemble des rizières du Niger. Soixante six (66) isolats du RYMV-Niger, issus de cette pré-caractérisation, ont été sérotypés avec des anticorps polyclonaux du virus (Tableau IV). Parmi eux, 60 ont été évalués au plan pathologique. Les isolats testés sont originaires de 23 périmètres rizicoles irrigués (sur les 31 prospectés) du Niger (Tableau IV). Ces isolats ont été collectés en 2007 et 2008 et testés par ELISA avant d'être régénérés sur la variété IR 64 (témoin sensible).

Trente trois (35) isolats représentatifs de la diversité géographique du virus au Niger (Tableau V) et sélectionnés après les études biologiques (Issaka *et al.*, 2010) ont été utilisés, afin d'étudier la diversité génétique du RYMV-Niger. Parmi eux 28 ont servi dans les études de contournement contre 26 pour la détermination des pathotypes.

Quatre vingt six (86) isolats du RYMV-Niger couvrant tout l'espace rizicole du Niger et 6 isolats du Nigéria ont servi dans les études de la diversité sérologique du virus au Niger (Tableau VI). Au cours des infections mixtes cinq isolats sauvages de pathotypes E et T (3 isolats à E et 2 isolats à T) ont été utilisés (Tableau VII).

5. 1. 3. Anticorps de RYMV

Dix anticorps polyclonaux (Pabs) produits (Tableau VIII) par le Centre du riz pour l'Afrique (Afolabi *et al.*, 2009) ont servi à caractériser sérologiquement les isolats étudiés. Un pool d'anticorps polyclonal constitué des 6 anticorps produits à partir des isolats du Niger a été utilisé dans l'évaluation sérologique préliminaire des isolats du virus.

Six anticorps monoclonaux (Mabs), A, B, C ou M, D et E (Tableau IX) ont été utilisés dans la caractérisation des sérotypes du RYMV-Niger. Ces anticorps ont été produits par le laboratoire RPB de l'IRD de Montpellier, selon la méthode de N'guessan *et al.*, (2000).

Tableau IV : Isolats utilisés dans le sérotypage avec les Pabs et les tests biologiques

Code	Isolat	Localité	ELISA	Origine *	Ecologie	Date de collecte
I1	Ng28	Saadia	+	IR64	Irrigué	13/04/2008
I2	Ng7	Saga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I3	Ng17	Seberi	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I4	Ng20	Say-1	+	IR64	Irrigué	13/04/2008
I5	Ng24	Saadia	+	IR64	Irrigué	13/04/2008
I6	Ng26	Saadia	+	IR64	Irrigué	13/04/2008
I7	Ng29	Namarde	+	IR64	Irrigué	14/04/2008
I8	Ng31	Namarde	+	IR64	Irrigué	14/04/2008
I9	Ng33	Karegorou	+	IR64	Irrigué	14/04/2008
I10	Ng35	Karegorou	+	IR64	Irrigué	14/04/2008
I11	Ng39	Daiberi	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I12	Ng45	Daiberi	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I13	Ng47	Daiberi	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I14	Ng53	Daikaina	-	IR64	Irrigué	15/04/2008
I15	Ng11	Libore	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I16	Ng23	Say-1	+	IR64	Irrigué	13/04/2008
I17	Ng34	Karegorou	+	IR64	Irrigué	14/04/2008
I18	Ng36	Karegorou	+	IR64	Irrigué	14/04/2008
I19	Ng37	Karegorou	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I20	Ng40	Daiberi	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I21	Ng50	Daikaina	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I22	Ng54	Daikaina	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I23	Ng1	Tara	+	IR64	Irrigué	11/04/2008
I24	Ng6	Saga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I25	Ng12	Libore	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I26	Ng15	N'Dounga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I27	Ng41	Daiberi	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I28	Ng48	Daikaina	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I29	Ng51	Daikaina	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I30	Ng2	Tara	+	IR64	Irrigué	11/04/2008
I31	Ng3**	Tara	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I32	Ng5	Saga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I33	Ng9	Saga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I34	Ng10	Saga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I35	Ng13	N'Dounga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I36	Ng14	N'Dounga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I37	Ng16	N'Dounga	+	IR64	Irrigué	12/04/2008
I38	Ng18	Seberi	+	IR64	Irrigué	12/04/2008

+ Positif ; - négatif ; * isolats testés proviennent de la variété IR64 ; ** isolats non testés biologiquement.

**Tableau IV : Isolats utilisés dans le sérotypage (avec les Pabs) et les tests biologiques
(suite et fin)**

Code	Isolat	Localité	ELISA	Origine *	Ecologie	Date de collecte
I39	Ng19	Say-1	+	IR64	Irrigué	13/04/2008
I40	Ng22	Say-1	+	IR64	Irrigué	13/04/2008
I41	Ng104	Koutoukale	+	IR64	Irrigué	7/12/2007
I42	Ng107	Yelwani	+	IR64	Irrigué	6/12/2007
I43	Ng55	Toula	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I44	Ng63	N`dounga 1	+	IR64	Irrigué	7/07/2008
I45	Ng65	Seberi	+	IR64	Irrigué	7/07/2008
I46	Ng77	N`dounga 3	+	IR64	Irrigué	7/07/2008
I47	Ng80	Karma	+	IR64	Irrigué	5/12/2007
I48	Ng83	Koutoukale	+	IR64	Irrigué	5/12/2007
I49	Ng88**	Yelwani	+	IR64	Irrigué	6/12/2007
I50	Ng57**	Toula	+	IR64	Irrigué	7/12/2007
I51	Ng61**	N`dounga 1	+	IR64	Irrigué	7/07/2008
I52	Ng69**	Seberi	+	IR64	Irrigué	8/12/2007
I53	Ng73**	N`dounga 3	+	IR64	Irrigué	7/07/2008
I54	Ng59	Toula	+	IR64	Irrigué	15/04/2008
I55	Ng91	Diomana	-	IR64	Irrigué	6/12/2007
I56	Ng99	Diambala	+	IR64	Irrigué	6/12/2007
I57	Ng100	Daibery	-	IR64	Irrigué	7/12/2007
I58	Ng96	Lata	+	IR64	Irrigué	7/12/2007
I59	Ng102	Say	+	IR64	Irrigué	8/12/2007
I60	Ng98	Seberi	+	IR64	Irrigué	8/12/2007
I61	Ng81	Karma	-	IR64	Irrigué	5/12/2007
I62	Ng85	Koutoukale	-	IR64	Irrigué	5/12/2007
I63	Ng86	Yelwani	-	IR64	Irrigué	6/12/2007
I64	Ng93	Bonfeba	-	IR64	Irrigué	6/12/2007
I65	Ng95	Toula	-	IR64	Irrigué	7/12/2007
I66	Ng109	Say-2	+	IR64	Irrigué	8/12/2007

+ Positif ; - négatif ; * isolats testés proviennent de la variété IR64 ; ** isolats non testés biologiquement.

Tableau V : Liste des isolats du RYMV-Niger utilisés dans l'étude de la diversité génétique et dans le contournement de la résistance du riz par le RYMV

S/N	Isolat	Origine	Localité	Propagation			
				IR64	Tog5681	Tog5672	Giganté
1	Ng1	IR64	Tara	+	-	-	-
2	Ng2	IR64	Tara	+	+	+	+
3	Ng9	IR64	Saga	+	+	+	+
4	Ng10	IR64	Saga	+	+	+	+
5	Ng15	IR64	N'Dounga	+	+	+	+
6	Ng19	IR64	Say1	+	+	+	+
7	Ng22	IR64	Say1	+	-	-	-
8	Ng23	IR64	Say1	+	+	+	+
9	Ng34	IR64	Kareygorou	+	+	+	+
10	Ng36	IR64	Kareygorou	+	+	+	+
11	Ng37	IR64	Sébéri	+	+	+	+
12	Ng40	IR64	Daïbéry	+	+	+	+
13	Ng48	IR64	Daïkaina	+	+	+	+
14	Ng50	IR64	Daikaina	+	+	+	+
15	Ng69	IR64	Sébéri	+	+	+	+
16	Ng70	IR64	Sébéri	+	-	-	-
17	Ng76	IR64	Nd'dounga 3	+	-	-	-
18	Ng84	IR64	Koutoukalé	+	+	+	+
19	Ng87	IR64	Yelwani	+	+	+	+
20	Ng101	IR64	Daibéry	+	+	+	+
21	Ng115	IR64	Say-2	+	+	+	+
22	Ng 126	IR64	Sona	+	+	+	+
23	Ng130	IR64	Sona	+	+	+	+
24	Ng134	IR64	Kokomani	+	+	+	+
25	Ng140	IR64	Kollo	+	+	+	+
26	Ng144	IR64	Kollo	+	+	+	+
27	Ng151	IR64	Kirkissoye	+	+	+	+
28	Ng161	IR64	Kirkissoye	+	+	+	+
29	Ng163	IR64	Gaya	+	+	+	+
30	Ng184	IR64	Bonféba	+	+	+	+
31	Ng200	IR64	Say 1	+	+	+	+
32	Ng201	IR64	Say 1	+	+	+	+
33	Ng217	champ	Diffa	+	nt	nt	Nt
34	Ng218	champ	Diffa	+	nt	nt	Nt
35	Ng221	champ	Diffa	+	nt	nt	Nt

+ : testé positif ; - : testé négatif ; nt : non testé à l'ELISA

Tableau VI : Isolats utilisés dans l'étude de phylogénie du RYMV-Niger

S/N	Localité	Nbre isolats		Hôte	Ecologie	Isolats séquencés (CP / VPg)
		testés				
1	Bonfeba	4		Riz	Rive gauche	Ng184
2	Daibery	3		Riz	Rive gauche	Ng40 & Ng101
3	Daikaina	2		Riz	Rive gauche	Ng48 & Ng50
4	Diambala	2		Riz	Rive gauche	-
5	Diomana	4		Riz	Rive gauche	-
6	Diffa	0		Riz	Est-Niger	Ng217, Ng218*, Ng221
7	Firgoune	1		Riz	Rive gauche	-
8	Gatawani	1		Riz	Rive gauche	-
9	Gaya	5		Riz	Rive gauche	Ng163
10	Karegorou	4		Riz	Rive droite	Ng223, Ng34 & Ng36*
11	Karma	3		Riz	Rive gauche	Ng224
12	Kirkissoye	4		Riz	Rive droite	Ng161*
13	Kokomani	2		Riz	Rive gauche	-
14	Kollo	4		Riz	Rive gauche	Ng140* & Ng144
15	Koutoukalé	2		Riz	Rive gauche	Ng84*
16	Lata	2		Riz	Rive droite	-
17	Liboré	1		Riz	Rive gauche	-
18	N`dounga	1		Riz	Rive gauche	Ng15
19	N`dounga1	3		Riz	Rive gauche	-
20	N`dounga3	2		Riz	Rive gauche	Ng76
21	Namarde	2		Riz	Rive gauche	-
22	Namari	2		Riz	Rive gauche	-
23	Saadia	1		Riz	Rive droite	-
24	Saga	3		Riz	Rive gauche	Ng9
25	Say1	6		Riz	Rive droite	Ng22, Ng23, Ng201
26	Say-2	3		Riz	Rive droite	-
27	Seberi	5		Riz	Rive gauche	Ng69 & Ng70
28	Sona	3		Riz	Rive gauche	-
29	Tara	3		Riz	Rive gauche	Ng1
30	Toula	3		Riz	Rive gauche	Ng225
31	Yelwani	2		Riz	Rive droite	-
32	Est Nigéria	4		Riz	Etat du Niger	Ni106, Ni107, Ni108 & Ni111
33	Ouest Nigéria	2		Riz	Etat du Bénoué	Ni118 & Ni124
	Total	85				33

*1 = voir figure 6 ; 0= aucun isolat testé ; - = non séquencé ; * = séquençage entier*

Tableau VII : Isolats utilisés dans les compétitions entre pathotypes E et T

S/N	Isolats	Hôte	Localité	Pathotype	Origine
1	Ng40	IR64	Daikaina	E	IR64
2	Ng1	IR64	Say 1	E	IR64
3	Ng161	IR64	Kirkissoye	E	IR64
4	Ng36	IR64	Kareygorou	T	IR64
5	Ng140	IR64	Kollo	T	IR64

Tableau VIII : Anticorps polyclonaux utilisés dans le sérotypage du RYMV-Niger

S/N	N° anticorps	Code anticorps	Origine isolat	Pays
1	8	RYMV-M-8	Kogoni K7	Mali
2	10	RYMV-BF-2	Kafirguela	Burkina Faso
3	11	RYMV-IITA	IITA	Nigeria
4	12	RYMV-Ng-1*	Saga	Niger
5	13	RYMV-Ng-2*	Kollo	Niger
6	14	RYMV-Ng-3*	Kirkissaye	Niger
7	15	RYMV-Ng-4*	Bonfeba	Niger
8	16	RYMV-Ng-5*	SayI	Niger
9	17	RYMV-Ng-6*	Diomana	Niger
10	18	RYMV-CI-1	M'be	Côte d'Ivoire

**isolats ayant servi à la constitution du pool d'anticorps utilisé dans l'évaluation biologique préliminaire.*

Tableau IX : Profil de réaction des souches du RYMV aux anticorps (Ac) monoclonaux

Souche	Ac A	Ac B	Ac C	Ac D	AcE	Ac G	AcM
S1	+	+/-	+	-	+	+	+
S2	-	+/-	+	+	+	+	+
S3	+	+/-	+	+	+	-	+
S4	+	+/-	+	+	+	+	+
S5	+	+/-	+	+	-	+	+

Réactions : + positif, - négatif et +/- positif ou négatif

5. 1. 4. Amorces de RYMV

Les amorces sont de courtes portions de séquence de nucléotides qui servent de moule (avec l'aide d'enzymes spécifiques) dans la transcription de l'ARN viral en ADN et/ou l'amplification de l'ADN codant pour une protéine donnée. Les tableaux X et XI donnent les différentes amorces utilisées respectivement dans la RT-PCR et le séquençage des portions du génome codant pour la VPg et la CP. Le tableau XII indique les amorces d'amplification et de séquençage du génome entier.

L'amorce RYMVM a été utilisée pour transcrire (RT) l'ARN viral codant pour la portion de la CP en ADNc et l'amplification de l'ADN obtenu a été réalisée à l'aide du couple d'amorces RYMVII/RYMVM. La portion d'ARN viral codant pour la CP a aussi été transcrite, amplifiée et séquencée avec le couple d'amorces RYMVII/RYMVIII (Tableau XI)

Huit amorces spécifiques sens et antisens (Tableau XII) ont été utilisées pour transcrire, amplifier et séquencer les 4 cadres de lecture (ORFs) des isolats Ng218, Ng36, Ng140 et Ng161. L'amplification des ADNs est réalisée avec des couples d'amorces spécifiques dont les correspondances sont données dans la Figure 13. Les ORFs 1, 2a, 2b et 4 ont été amplifiés et séquencés, respectivement, à l'aide des couples d'amorces R1 / R6, R5 bis / R14 bis, 2136 / 3577 Bis et RYMVIII / RYMVII (Figure 13).

Les amorces R0 et F1-qPCR (Tableau XIII) ont été utilisées dans la qRT-PCR (PCR de quantification) de l'ARN viral. La qPCR a été réalisée dans les études de l'adaptation des pathotypes de RYMV aux fonds génétiques de riz. Elle a consisté à quantifier les ARNs viraux issus des plantes simplement inoculées.

5. 1. 5. Séquences de référence de RYMV

Toutes les séquences de référence de RYMV utilisées ont été téléchargées de la banque des gènes du NCBI (www.ncbi.org, du 15 janvier 2011).

Tableau X : Amorces d'amplification et de séquençage de la VPg du RYMV.

Code	Position	Température de fusion	Séquence nucléotidique
Amorces Sens (Upper primers) : S			
F1/SNP	1469	40 °C	5'CCC GCT CTA CCA CAA3'
Amorces antisens (Lower primers) : AS			
R1/SNP	2117-2131	36 °C	5'AAA GAT GAC ACC CGA3'
R14 Bis	2399	36,2 °C	5'ACT TCg CCg gTT TCg Cag TCA ATT3'

Tableau XI : Amorces d'amplification et de séquençage de la CP du RYMV

Code	Position	Température de fusion*	Séquence nucléotidique
Amorces Sens (Upper primers) : S			
RYMV III	3442	54,5 °C	5' CAA AGA TGG CCA GGA A3'
RYMV B	3451	62,2 °C	5' CCA GGA AGG GCA AGA AAA 3'
Reclé	3766	66,6 °C	5' TTA CCT CCC TGA GGT GAG CG 3'
Amorces antisens (Lower primers) : AS			
RYMV M	4207	71,8 °C	5' CGC TCA ACA TCC TTT TCA GGG TAG 3'
RYMV A	4310	64,0 °C	5' GTG AGT GCA ACT CCT CAC GTA G 3'
RYMV II	4450	78,4 °C	5' CTC CCC CAC CCA TCC CGA GAA TT 3'
RecléAS	3766	66,6 °C	5' CGC TCA CCT CAG GGA GGT AA 3'

* Outre les amorces utilisées, le temps de première dénaturation et la température d'hybridation de l'ADNc différencient l'amplification des portions génomiques codant pour la CP et la VPg.

Tableau XII: Liste des amorces utilisées dans le séquençage du génome entier

Code	Portion	Position	Température de fusion	Séquence nucléotidique
Amorces Sens (Upper primers) : S				
R1	ORF1	1	61,2°C	5'CAA TTG AAG CTA GGA AAG GAG 3'
R5Bis	ORF2a	890	59,9 ° C	5'CTC GGG GTT ACG TGG TTG ATG TTT3'
2136	ORF2b	2136	55,4°C	5' CAT GCT GGG AAA AGT GTC TG 3'
RYMV III	ORF4	3442	54,5 °C	5' CAA AGA TGG CCA GGA A3'
Amorces antisens (Lower primers) : AS				
R6	ORF1	981	60,3°C	5' ACC CCA GGA TTT ACT CTT T3'
R14Bis	ORF2a	2339	60,9	5'ACT TCg CCg gTT TCg Cag TCA ATT3'
3577Bis	ORF2b	3577	53,35°C	5' ggC CAG gTg TTA gAA gAT Ag3'
RYMV II	ORF4	4450	78,4 °C	5' CTC CCC CAC CCA TCC CGA GAA TT 3'

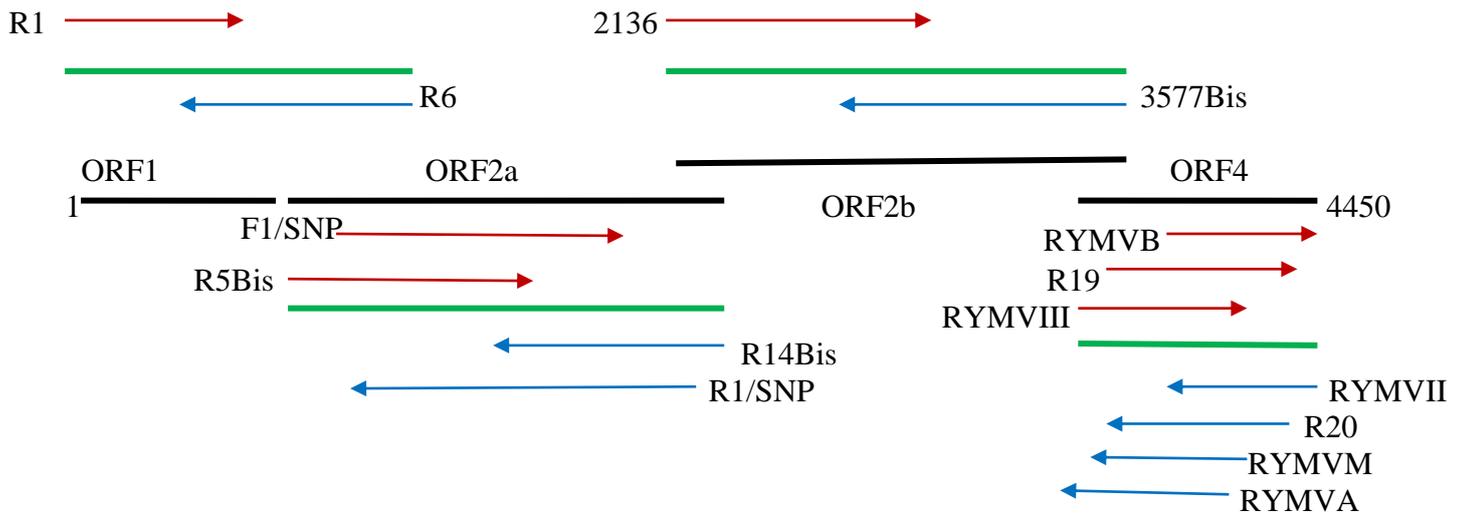


Figure 13 : Sens de fixation des amorces lors de la PCR et du séquençage du génome de RYMV (Issaka, 2010).

En noir : les portions du génome viral ; en vert : portions du génome amplifiée ; en rouge : amorces sens ; en bleu : amorces antisens

Tableau XIII : Amorces spécifiques utilisées dans la qPCR

Code	Position	Température fusion	Séquence nucléotidique
Amorces Sens (Upper primers) : S			
F-qPCR	1360-1377	42 °C	5' GAG GCT CGT CAT CTA CTG3'
Amorces antisens (Lower primers) : AS			
R-qPCR	1503-1520	46 °C	5' ATC CGC AGC ACC TAT ATG3'
R0	1748-1767	58° C	5'GGC CGG ACT TAC GAC GTT CC3'

CHAPITRES 6 : METHODES

6. 1. Collecte d'échantillons et évaluation de l'épidémiologie sur les sites rizicoles du Niger

Une enquête a été conduite auprès des producteurs et de la direction régionale de l'ONAHA (Office National des Aménagements Hydro Agricoles). Cette enquête a été associée à une compilation des documents statistiques de l'AGRHYMET, en vue de décrire les caractéristiques des périmètres surveillés.

L'estimation de l'importance de la panachure jaune du riz au Niger a consisté à visiter l'ensemble de périmètres rizicoles et à dénombrer ceux qui sont infectés, afin d'estimer leurs niveaux d'infestation (Cochran et Cochran, 1977 ; Konaté *et al.*, 1997). Les incidences ont été évaluées par comptage, sur trois lignes (espacées de 20 cm) prises au hasard dans un champ fortement infesté (de 0,25 ha) du nombre de pieds malades et sains afin de déterminer le niveau le plus élevé de l'infection. Pour estimer le pôle inférieur de l'incidence, le procédé a été le même, à la différence que le champ concerné est faiblement infesté.

Des carrés de sondage d'un mètre carré (1 m²) de superficie ont été posés dans des plages apparemment saines et des plages malades des périmètres fortement infestés de Sébéri, Kollo, Liboré et Kirkissoye, afin de calculer les pertes de récoltes dues à la maladie en champ paysan. Les périmètres d'implantation des carrés de rendement ont été identifiés endémiques lors de la prospection, avec de fortes incidences (Reckhaus et Adamou, 1986 ; Awoderu, 1991). La perte de production (PPd) est calculée à partir de l'Incidence (I) et de la perte potentielle (Ppt) déduite des récoltes des carrés de sondage, selon la formule :

$$PPd = (Ppt \times I)/100$$

6. 2. Echantillonnage

Tous les périmètres rizicoles des zones d'étude ci-dessus décrite ont été échantillonnés. Des échantillons de feuilles de riz et de *Graminées* adventices présentant des symptômes typiques ou non de panachure jaune ont été prélevés. Lors du prélèvement, soin est pris d'envelopper les mains par des sachets plastiques et de retourner les sachets sans toucher aux feuilles avec les mains nues. Les échantillons ont ensuite été placés dans une glacière, puis transportés au laboratoire où ils ont été analysés en condition de confinement pour respecter les règles de biosécurité.

6. 3. Détection du virus dans les échantillons collectés

Les échantillons collectés ont d'abord été testés à l'ACP-ELISA appelé Antigen Coating Plate Enzym Linked Immunosorbent Assay (Annexe 1.4), pour vérifier la présence du virus. L'ELISA a été réalisée selon la méthode d'Afolabi *et al.*, (2009), à l'aide du pool d'anticorps polyclonaux préparé avec des isolats RYMV du Niger (Séré *et al.*, 2007). L'ACP-ELISA est une technique immunologique basée sur la reconnaissance des réactions anticorps-antigène (particules de RYMV) qui permet la détection des particules virales dans les échantillons récoltés.

6. 4. Evaluation biologique du RYMV-Niger

Les grains des variétés utilisées ont été pré-germés pendant 72 h avant d'être transplantés dans des pots (de 2 l) préalablement remplis de terre argileuse. La transplantation des plants a été faite, à raison de 3 plants par pot et un pot par combinaison variété / isolat.

Les échantillons de feuilles ou isolats ont été broyés dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,2 (KH_2PO_4 0,1M + Na_2HPO_4 0,1M), à raison de 1 g de feuilles pour 10 ml de tampon d'inoculation. Du carborundum (600 mesh) a été additionné au broyat (à raison de 0,1 g pour 100 μl de broyat), pour servir d'abrasif lors de l'inoculation (Konaté *et al.*, 1997 ; N'guessan *et al.*, 2001 ; Onasanya *et al.*, 2006). L'inoculum obtenu avec chaque isolat a été uniformisé à la même concentration (DO du broyat = 0,12). L'inoculation a lieu à 14 JAT (Jours Après Transplantation). Elle a consisté à frotter chaque plant (excepté les témoins) avec l'inoculum. Les plants témoins ont été inoculés avec un inoculum constitué du tampon d'inoculation et de l'abrasif dans les mêmes concentrations.

Dans les tests de caractérisation biologique préliminaire, la maladie a été évaluée à 14 puis 21 j après inoculation (JAI) à l'aide de l'échelle de sévérité 1-9 présentée dans le Tableau XIV où 1 représente l'absence de symptômes et 9 la mort des feuilles).

Dans les tests pathologiques, la maladie a été évaluée à 42 JAI. Des tests ACP-ELISA (décrit ci-dessus) ont aussi été réalisés pour vérifier la présence du RYMV dans les plants infectés. Il a été apporté 1 g de NPK par pot au semis, 0,2 g d'urée par pot à 21 puis 42 JAS. Des désherbages manuels ont également été effectués au besoin.

Tableau XIV : Echelle de notation des symptômes de panachure jaune du riz (Anonyme, 1998).

Score	Teinte foliaire	Nanisme	ELISA
0	Verte	Néant	-
1	Verte	Néant	+/-
3	Verte/Tâches éparses	Nanisme	+++
5	Vert mosaïque distincte	Léger, 25 %	+++
7	Jaune pâle	50 %	+++
9	Jaune, orangé, assèchement plante	75 %	+++

- : *ELISA négatif par rapport au témoin* ; +/- : *douteux* et +++ : *ELISA positif*

6. 5. Infections mixtes des pathotypes

Les variétés sensibles IR64 et Tog5673 ont été semées chacune dans des pots d'un litre de volume, à raison de cinq grains correspondants à cinq plants par pot et par variété. Deux lots de semis ont été effectués : le semis pour l'inoculation simple ou passage individuel des pathotypes sur les génotypes et celui des inoculations mixtes de pathotypes E et T.

L'inoculum a été préparé comme précédemment indiqué, puis uniformisé par qPCR à une concentration de 10^{11} copies d'ARN viral par pathotype, selon la méthode du fournisseur et celle de Poulicard *et al.*, (2010). L'inoculation des pathotypes aux deux génotypes sensibles IR64 et Tog5673 a eu lieu à 14 JAS. Un pot de chaque génotype a été inoculé par pathotype dans les cas de simples inoculations et pour les cas d'inoculations mixtes, deux pots de chaque variété ont été inoculés.

L'inoculation a consisté à frotter les feuilles des plants avec l'inoculum uniformisé associé au carborundum (600 mesh). Chaque plant a été inoculé avec une quantité de 100 μ l d'inoculum. Dans les cas de simples inoculations, 100 μ l d'inoculum, constitués de 50 μ l de broyat de pathotype et 50 μ l de tampon d'inoculation, ont été inoculés à chaque plant. Pour les inoculations mixtes, l'inoculum a été formé d'un mélange équimolaire d'inoculum des 2 pathotypes co-inoculés, à raison de 50 μ l d'inoculum de chacun des pathotypes du couple (Tableau XV). La concentration équimolaire a été obtenue après des dilutions appropriées de l'inoculum initial.

6. 6. Détermination des hôtes réservoirs

Les échantillons d'hôtes réservoirs (riz sauvage et adventices) du virus ont été collectés en vue de les décrire et de les identifier. A cet effet un herbier a été constitué pour faciliter leur conservation. Les clés de détermination de la classification générale taxonomique et l'herbier de l'Institut National de la Recherche Agronomique du Niger (INRAN) ont permis d'identifier les hôtes impliqués dans la transmission du RYMV.

Tableau XV : Couples de pathotypes co-inoculés aux variétés IR64 et Tog5673

Isolats à T	Isolats à E		
	Ng1	Ng40	Ng161
Ng36	Ng36/ Ng1 / IR 64	Ng36 / Ng40 / IR 64	Ng36 / Ng161 / IR 64
	Ng36/ Ng1 / Tog5673	Ng36 / Ng40/ Tog5673	Ng36/ Ng161 / Tog5673
Ng140	Ng140 / Ng1 / IR 64	Ng140 / Ng40 / IR 64	Ng140 / Ng161 / IR 64
	Ng140 / Ng1 / Tog5673	Ng140 / Ng40 / Tog5673	Ng140/ Ng161/ Tog5673

6. 7. Inventaire des isolats du virus et cartographie de la maladie

Suite aux tests biologiques et sérologiques préliminaires, les échantillons ayant permis de régénérer les symptômes caractéristiques de panachure jaune sur les variétés de riz sensibles et / ou testés positifs à l'ELISA ont été inventoriés comme isolats du RYMV. La carte de distribution de la maladie au Niger a été établie, grâce aux coordonnées géographiques des sites d'appartenance des isolats. Ces coordonnées géographiques des sites ont été relevées par le GPS (Garmin GPS 60).

6. 8. Techniques moléculaires

Les techniques moléculaires ont servi à déterminer les bases moléculaires de la pathogénie du RYMV et le mécanisme de son adaptation aux fonds génétiques de riz emblavés. La technique moléculaire a consisté à extraire l'ARN du RYMV (et ceux du riz), à le transcrire en ADN codant pour la protéine virale liée au génome (VPg) ou la protéine de capsid (CP) du virus, à amplifier l'ADN obtenu, à le séquencer et analyser la séquence de nucléotides dudit ADN.

6. 8. 1. Extraction des ARNs totaux

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à l'aide du Kit RNeasy plant minikit Qiagen, selon la méthode du fournisseur, modifiée par Pinel *et al.*, (2000). Les isolats du virus (sous forme de feuilles de riz) ont été pesés (à raison de 0,05 g de feuilles) et placés dans des tubes (ependorf) de 2 ml puis trempés dans de l'azote liquide avant d'être lysés à l'aide d'un broyeur à bille (Restsch Tissuelyser II Qiagen). Le broyat a été homogénéisé en présence d'un tampon fortement dénaturant qui contient de la guanidine isothiocyanate (GITC).

Le tampon inactive les RNases et assure l'isolement de l'ARN intact après rupture et lyse des membranes cellulaires. L'ARN total a été fixé sélectivement sur la membrane de gel dans une mini-colonne RNeasy.

6. 8. 2. Réaction RT-PCR

La transcription inverse – réaction de polymérisation en chaînes (RT-PCR) est une technique de synthèse de l'ADN appelé ADNc (ADN complémentaire), à partir de l'ARN, suivie de l'amplification de l'ADNc (en plusieurs copies). Elle a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques (Tableaux X, XI et XII), d'inhibiteur d'ARN (RNase inhibitor 20 U/ml), d'enzymes spécifiques (M-MLV-RT et Dynazyme), un appareil PCR ou thermo-cycler PTC 100 (MJ Research, Inc.) et divers matériels de laboratoire.

La RT-PCR a été scindée en deux étapes, la réaction de transcription inverse ou RT et la réaction de polymérisation en chaînes appelée PCR (Annexes 1.6, 1.7 et 1.8).

6. 8. 2. 1. Transcription reverse (RT)

Les ARNs totaux ont été convertis en ADNc par l'utilisation de l'enzyme M- MLV-RT (Promega) et des amorces spécifiques, selon la méthode développée par Pinel *et al.*, (2000). L'amorce RYMV II ou M 100 μ M (concentration 100 μ M) a été spécifiquement utilisée pour transcrire l'ARN viral en ADN codant pour la protéine de capsid et l'amorce R1 SNP ou R14 bis SNP (100 μ M) a permis de synthétiser le gène de la VPg (Tableaux X et XI). La transcription du génome entier des isolats Ng218, Ng36, Ng140 et Ng161 a été faite à l'aide des amorces spécifiques du tableau XII. Dans chaque cas, la transcription commence par la fixation de l'amorce utilisée en position 3' du gène à transcrire (Annexe 1.7).

6. 8. 2. 2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet de synthétiser plusieurs copies de l'ADNc, par amplification cyclique. Elle a consisté à utiliser les couples d'amorces RYMV II ou B / RYMV III ou M et R1/SNP ou R14 bis SNP / F1 SNP, pour amplifier les portions d'ADN codant respectivement pour la CP et la VPg. Les amorces sens (Tableaux X, XI et XII) ont été fixées en position 5' de la portion correspondante du génome viral et les antisens ont été accrochés à la position 3'.

L'amplification a eu lieu dans un mélange réactionnel approprié (Annexes 1.8), en 3 phases :

- **la dénaturation** qui a consisté à rompre les points d'hydrogène maintenant les 2

brins de la molécule d'ADN (à 94°C) pendant 30 secondes ;

- **l'hybridation** ou la fixation d'amorces qui consiste à fixer de petits fragments d'ADN monocaténaire (amorces). La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1minute). La température est comprise entre 45-60 °C. Elle est appelée température d'annealing (accrochage) des amorces et est obtenue à partir de la T_m (température de fusion ou Melting temperature) des deux amorces.
- **L'élongation** a lieu à une température (72°C) qui assure le fonctionnement de la dynazyme (enzyme de polymérisation). Cette étape permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN matrice à une température optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette phase dépend de la taille du fragment à amplifier.

6. 8. 2. 3. Révélation des amplicons par gel d'agarose

La révélation de l'amplification permet de vérifier la présence de l'amplicon cible, c'est à dire la portion d'ADN recherchée, dans le produit PCR. La quantité et la qualité de l'ADN ont été estimées par électrophorèse, sur un gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium (BET) selon la méthode de Pinel *et al.*, (2000).

Après la polymérisation, 2 µl de tampon de charge 10 X auxquels sont ajoutés 10 µl du produit PCR ont été déposés sur le gel, parallèlement à 10 µl de marqueur de poids moléculaire 1Kb (mélange congelé de 100 µl de marqueur 1 Kb, 100 µl de tampon de charge et 800 µl d'eau).

La migration des amplicons a été faite dans une cuve à gel I-Mupid (Cosmo Bio. Ltd) dans du tampon TAE 0,5 X pendant 45 mn ou une heure à 100 V. A la fin de la migration, la photo du gel réalisée à l'aide du logiciel Gel Doc 2000 (Bio-rad) a permis de mettre en évidence l'amplicon recherché.

6. 8. 3. Séquençage des portions d'ADN amplifiées et analyse des séquences obtenues

La technique utilisée est une adaptation de la méthode développée par Sanger *et al.*, (1977), avec remplacement du marquage radioactif de l'ADN par un marquage fluorescent. Elle a consisté à réaliser une sorte de PCR aléatoirement interrompue.

La méthode repose sur l'élongation d'un grand nombre de copies de l'un des brins de l'ADN matrice par une ADN polymérase grâce à une amorce spécifique fixée à l'extrémité 3'OH. Des arrêts aléatoires de la copie synthétisée ont intervenu par ajout de didésoxynucléotides (ddNTP), ce qui a conduit à la synthèse de fragments de toutes les tailles possibles. Les fragments synthétisés ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, afin de repérer la position de chaque nucléotide. La réaction de séquençage est une réaction cyclique (dénaturation, hybridation, élongation). Chaque cycle a permis de copier un brin de matrice et, contrairement à une amplification en PCR classique, les brins des matrices ne sont pas ré-utilisés, rendant l'amplification linéaire.

Le séquençage des ADNc codant pour la synthèse de la VPg et de la CP des isolats RYMV ainsi que celui du génome entier des isolats testés a été effectué par la société Cogenics online BECKMAN COULTER GENOMICS basée à Londres (Royaume uni). Il a été réalisé avec des amorces spécifiques (Figure 13) dans des thermocyclers automatés Genesis RSP 150 (TECAN) et Sciclone (Zymark), selon la méthode du Taq Terminator sequencing Kit et celle de l'Applied biosystem 373 A sequencer décrites par Traoré *et al.*, (2005) et Fargette *et al.*, (2000). Le génome entier a été séquençé en quatre portions représentées à la figure 13. Les séquences de nucléotides ont été ensuite purifiées pour éliminer les dNTP et les ddNTP fluorescents. Les ions résiduels ont aussi été captés. Les séquences de nucléotides ont été données directement sous forme d'électrophorégrammes par un microordinateur connecté au thermocycler automate. Les séquences de nucléotides codant pour les protéines cibles ont été analysées par le logiciel DNASTAR. Les fragments de séquence (appelés contigs) ont d'abord été assemblés par le logiciel SEQMAN et les séquences consensus ont été éditées par le logiciel EDITSEQ (Thompson *et al.*, 1994).

6. 8. 4. RT-PCR quantitative

La RT-PCR quantitative ou quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) est une technique moléculaire qui permet de doser la quantité d'ARN ou d'ADN (en nombre de copies) d'un organisme cible par mg d'échantillon ou par µl de volume dudit échantillon. Il s'agit de doser la quantité d'ARN de RYMV contenue dans 1 mg de feuilles virosées ou dans 1 µl de broyat des mêmes feuilles (inoculum).

6. 8. 4. 1. Extraction de l'ARN viral et RT

Le procédé d'extraction de l'ARN pour le dosage de la quantité d'ARN d'un isolat ou d'un inoculum a été le même que celui utilisé pour une extraction ordinaire d'ARNs totaux ci-dessus décrit. La préparation du broyat de pathotype a été la même que celle décrite précédemment.

Dix μl du broyat obtenu ont été utilisés pour extraire et doser l'ARN viral. L'extraction a commencé par l'ajout de 450 μl de tampon de lyse aux 10 μl d'inoculum. Pour chaque extraction, deux RT ont été réalisées avec l'amorce R0 (Tableau XIII) et l'enzyme M-MLV promega. Les autres constituants du mélange réactionnel et les différentes étapes ont été les mêmes que ceux décrits en RT classique.

6. 8. 4. 2. qPCR SYBR Green Brillant II

La qPCR a été réalisée à l'aide d'amorces de qPCR (Tableau XIII) et d'un mixte spécifique appelé SYBR Green Brillant II, selon la méthode du fournisseur. Elle a lieu dans un thermocycler MX3105P (Stratagene, Etats unis) et diffère de la PCR classique.

Deux qPCR ont été faites avec chaque produit RT (donc 4 qPCR/ ARN). Au préalable, le produit RT a été dilué dans de H_2O au 1 /1250^e (soit 1 μl d'ADNc pour 1249 μl d'eau). La technique qPCR a consisté à amplifier le produit RT en présence d'amorces spécifiques que sont la R-qPCR (antisens) et la F-qPCR (sens) avec du SYBR Green Brillant II.

6. 8. 4. 3. Quantification et uniformisation des ARNs.

La quantification du nombre de copies d'ARN viral a été faite par rapport à un standard quantifié par Poulicard *et al.*, (2010). Le standard utilisé pour quantifier le nombre de copies d'ARN viral contenues dans l'inoculum et dans les plants infectés correspond à l'ADNc d'un virus purifié (le CIa, souche S2/S3). Il est quantifié au Nanodrop. Des séries de dilutions ont été effectuées avec une gamme d'ADN standards de 5.10^8 à 5.10^5 copies pour chaque réaction de qPCR ; les ADN standards ont été aliquotés et stockés à -20°C . Le nombre de copies par réaction a été estimé à l'aide du logiciel Stratagene MX3005 version 2.02. Le même logiciel a été utilisé pour quantifier le nombre de copies d'ARN viral par mg de feuilles infectées.

La concentration de l'ARN pur quantifié de l'isolat CIa a été estimée à $2,0552 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ et une molécule d'ARN de RYMV pèse $2,475 \cdot 10^{-18} \text{ g}$ (1 molécule d'ARN de RYMV équivaut à $1,5 \cdot 10^6 \text{ Da}$ et $1 \text{ Da} = 1,65 \cdot 10^{-24} \text{ g}$). Sachant que $7,5 \mu\text{l}$ d'ARN pur ont servi à préparer $20 \mu\text{l}$ de RT et $5 \mu\text{l}$ de cette RT diluée au $1/1250^{\text{e}}$ ont été utilisés pour faire la qPCR. La concentration seuil dans les $5 \mu\text{l}$ de produit qPCR a été de : $(2,0552 \cdot 10^{-6} \times 7,5/2,475 \cdot 10^{-18}) / (20/5) = 1,557 \cdot 10^{12}$ copies d'ARN.

6. 8. 5. Recherche d'isolats contournants

Deux tests complémentaires d'étude du contournement de la résistance du riz au RYMV-

Niger ont été conduits, respectivement à AfricaRice Cotonou et à l'IRD de Montpellier. Ces tests ont consisté à inoculer une gamme d'isolats du RYMV-Niger aux variétés résistantes de riz Tog5681 (*rymv1-3*), Tog5672 (*rymv1-4*) et Giganté (*rymv1-2*) (Ndjondjop *et al.*, 1999 ; Thiémélé *et al.*, 2010) et la variété sensible IR 64.

Le contournement de résistance a été évalué à l'aide des symptômes exprimés et/ou la concentration virale estimée par ELISA chez les variétés inoculées. Le score visuel a été noté grâce à l'échelle de notation de 1-9 de l'IRRI et la charge virale a été estimée par DAS-ELISA (Annexe 1.10).

6. 8. 6. Recherche des mutations de contournement

La RT-PCR a été utilisée pour transcrire l'ARN viral des isolats sauvages (pris sur IR64) et des isolats contournants (récoltés sur les variétés résistantes contournées) et amplifier les ADNs codant pour la VPg. Les portions d'ADNs amplifiées ont été séquencées et les séquences de nucléotides (ou d'acides aminés) analysées et comparées entre elles. Les codons de nucléotides qui différencient les isolats sauvages entre eux et avec les isolats contournants ont été repérés, ce qui a permis d'identifier les pathotypes et les mutations de contournement.

Les séquences de nucléotides de l'ADN codant pour la VPg des isolats de RYMV étudiés, avant et après contournement, ont été analysées selon la méthode décrite au paragraphe 6. 9. 3. Elles ont été alignées par le logiciel MEGALIGN, sous programme Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), ce qui a permis de déterminer, par comparaison des différentes

positions nucléotidiques et protéiniques, les signatures moléculaires propres à chaque isolat du RYMV-Niger.

6. 9. Collecte des données des études d'évaluation biologique

6. 9. 1. Données d'évaluation biologique du RYMV-Niger

Seuls les symptômes de la maladie ont été notés à 42 jours après inoculation (JAI) lors de la caractérisation biologique préliminaire. Par contre, dans les tests pathologiques, le score, le taux de réduction de la chlorophylle des feuilles (à l'aide du Spad meter 502), le taux de réduction de la hauteur des plants et la concentration virale ont tous été évalués à la même date.

La sévérité (S) des isolats vis-à-vis des génotypes de riz a été calculée à partir des symptômes visuels par la formule :

$$S = \{(n1*1 + n3*3 + n5*5 + n7*7 + n9*9)*100\} / \{(n1 + n3 + n5 + n7 + n9)*9\}$$

n1, n3, n5, n7 et n9 correspondent au nombre de plants ayant respectivement le score 1, 3, 5, 7 et 9 sur l'échelle de sévérité.

(Fininsa, 2003).

Le taux de réduction de la chlorophylle chez les variétés inoculées a été calculé à partir des valeurs prises avec le Spadmètre 502 (Monje et Dugbee, 1992 ; Martines et Cuiamet, 2004). Le taux de réduction de la hauteur et de la chlorophylle ainsi que l'accroissement de la charge virale chez les variétés inoculées ont été déterminés en faisant le rapport entre les valeurs mesurées chez les plantes inoculées (avec le virus) et les plantes témoins (non inoculées).

6. 9. 2. Données des tests d'infection mixte de pathotypes

Les symptômes de la maladie ont été évalués à 21 puis 30 JAI, à l'aide de l'échelle de notation SES (Anonyme 7, 1998). A 30 JAI, les dernières feuilles dégainées de trois plants de chaque cas de simples inoculations et de deux plants par variété dans les cas d'infections mixtes ont été récoltées. Les ARNs viraux ont été extraits à partir des feuilles précédemment récoltées.

La quantité d'ARN viral dans les inoculations simples a été dosée par qRT-PCR à 30 JAI et les ADNs codant pour la VPg des cas de co-inoculations ont été amplifiés par RT-PCR et séquencés à 42 ou 60 JAI. Les séquences ont été analysées et comparées à celles des deux pathotypes T et E co-inoculés. En effet, les électrophorégrammes des séquences obtenues et ceux des pathotypes co-inoculés ont d'abord été comparés à l'aide du logiciel SEQMAN (DNA STAR), puis les séquences consensus issues des cas d'infection mixte ont été alignées avec des séquences de référence par le logiciel MEGALIN. Cela a permis d'identifier le pathotype sélectionné dans le fond génétique hôte.

6. 10. Dispositif expérimental et analyses statistiques des données pathologiques

Le dispositif expérimental utilisé dans les tests pathologiques est un bloc aléatoire complètement randomisé (RBC), avec 3 répétitions pour chaque isolat. Pour chaque bloc, une série de témoins a été prévue.

Toutes les données recueillies ont été analysées par ANOVA, à l'aide du logiciel IRRISTAT Version 4. 3. La comparaison des moyennes a été faite en cas de différence significative entre isolats et entre variétés, à l'aide du test de Duncan au seuil de 5 %.

L'effet des interactions environnement (isolats) x génotype (cultivars) a été évalué à l'aide du modèle AMMI, Additive Main effect and Multiplicative Interaction (Ebdon et Gauch, 2002 ; Onasanya *et al.*, 2006). Les dendrogrammes classant les isolats et les variétés selon leurs profils de réaction ont également été établis par le modèle AMMI.

3^e PARTIE : RÉSULTATS

CHAPITRE 7 : EPIDEMIOLOGIE DE LA PANACHURE JAUNE DU RIZ AU SEIN DES PERIMETRES IRRIGUES DU NIGER

Introduction

Avant cette étude, Reckhaus et Adamou (1986) ont rapporté que la panachure jaune du riz était présente dans quelques périmètres rizicoles du Niger. Depuis, aucune autre étude n'a été consacrée à la maladie et à son épidémiologie ainsi que les facteurs qui favorisent sa dispersion.

Dans ce chapitre, nous avons évalué l'importance et la distribution de la panachure jaune du riz dans l'écologie rizicole du Niger. Le rôle des hôtes alternatifs dans la propagation de la maladie au champ a été déterminé. A cette fin, tous les périmètres rizicoles ont été systématiquement caractérisés et les échantillons collectés dont des *Graminées* adventices ont été séro-biologiquement testés (paragraphe 6.1, 6.2, 6.3, 6.6 et 6.7).

Les résultats suivants ont été obtenus :

- (i) la monographie des sites visités,
- (ii) l'importance et la cartographie de la panachure jaune du riz au Niger,
- (iii) les hôtes alternatifs et leurs rôles dans la propagation de la maladie et
- (iv) la structure des populations du RYMV-Niger.

7. 1. Monographie des sites visités

Les enquêtes auprès des paysans et la compilation des documents statistiques de l'ONAHA ont révélé que les périmètres rizicoles ont quasiment tous deux campagne dont une en saison hivernale (juin-novembre) et l'autre en saison sèche (décembre-avril). Toutefois, le calendrier cultural est légèrement différent d'un périmètre à l'autre.

Quatre variétés de riz ont été principalement cultivées (Tableau XVI). La variété IR1529-683-1 a été la plus répandue puisqu'elle occupait tous les sites rizicoles (fréquence 100 %). La variété WITA8 cultivée dans plus de 60 % des périmètres et la Guiza emblavée dans 40 % des sites ont été classées respectivement deuxième et troisième. La variété Kassoumo a occupé le quatrième rang des variétés largement cultivées avec une fréquence de 37 %.

Tableau XVI : Fréquence des variétés cultivées sur les périmètres rizicoles échantillonnés au Niger (Tableau de synthèse, Issaka, 2010).

Zone rizicole	Nombre de sites	Variétés emblavées sur les sites prospectés					
		IR1529	Kassoumo	Bassiroumo	Wita8	Guiza	Locale
Rive droite	8	8	0	1	8	8	2
Rive gauche	21	21	11	4	11	4	1
Zone Diffa	1	1	0	0	0	0	1
Nombre de périmètres		30	11	5	19	12	4
Fréquence (%)		100	37	17	63	40	13

Les chiffres (police normale) indiquent le nombre de sites emblavés avec les différentes variétés de riz et les chiffres en gras représentent le nombre de périmètres occupés et la fréquence des variétés cultivées.

Toutefois, le service régional de l'ONAHA Tillabéry a indiqué que la variété Bassiroumo (17 %), dérivée de la variété IR1529, occupait près de 80 % des périmètres emblavés de la région de Tillabéry (Sud-Ouest du Niger) qui est la principale zone productrice de riz.

7. 2. Cartographie et importance de la maladie dans les rizières du Niger

La panachure jaune du riz a été observée dans toutes les exploitations rizicoles du Niger, aussi bien sur le riz cultivé que sur le riz sauvage ainsi que chez les *Graminées* adventices (Figure 14). Elle a occupé les deux zones rizicoles du pays dont l'une est située à l'Ouest et l'autre à l'Est, constituant deux pôles distincts de prédilection de la maladie au Niger.

L'incidence de la maladie au champ a varié entre 5 et 90 %, avec des niveaux d'infestation variables selon les périmètres (Tableau XVII). Les périmètres de Kirkissoye, Saga, Liboré, Kollo, Sébéri et yelwani ont été fortement infestés, avec des incidences allant jusqu'à 60 - 90 %. Par contre, dans les sites de Diomana, Diambala et N'dounga 1 les niveaux d'infestation de la maladie n'ont guère excédé 30 %. L'incidence de la panachure jaune du riz au Niger a été aussi plus importante en saison hivernale qu'en campagne sèche. En effet, l'incidence de la maladie est passée de 60 – 90 % à 5 – 10 % dans les périmètres de kirkissoye, Liboré, Kollo et Sébéri.

Les résultats des carrés de rendement placés dans les périmètres de Sébéri, Kollo, Liboré et Kirkissoye ont montré des pertes de production avoisinant 71 %. La moyenne des pertes de récoltes observées a varié entre 35 et 71 % (Tableau XVIII). Les pertes ont été variables selon les sites concernés. Les plus faibles pertes de production ont été enregistrées à Sébéri (35 %) alors que dans toutes les autres localités concernées par l'étude elles ont dépassé 45 % et les pertes les plus importantes ont été obtenues à Kollo (plus de 70 %).

7. 3. Hôtes réservoirs du RYMV au Niger

Sur les 215 isolats de RYMV obtenus, 60 ont été observés sur des *Graminées* adventices (Tableau XVIII). Ces hôtes réservoirs regroupés en 10 espèces (Tableau XIX, Annexe 1. 2) ont été recensés chez le riz sauvage (*Oryza longistaminata*) et les familles des Poacées et Cypéracées. Chez les Poacées, les espèces *Laersia hexandra*, *Paspalum emplectens*, *Eulesine indica*, *Echinochloa colona* et *Panicum repens* ont été identifiées hôtes

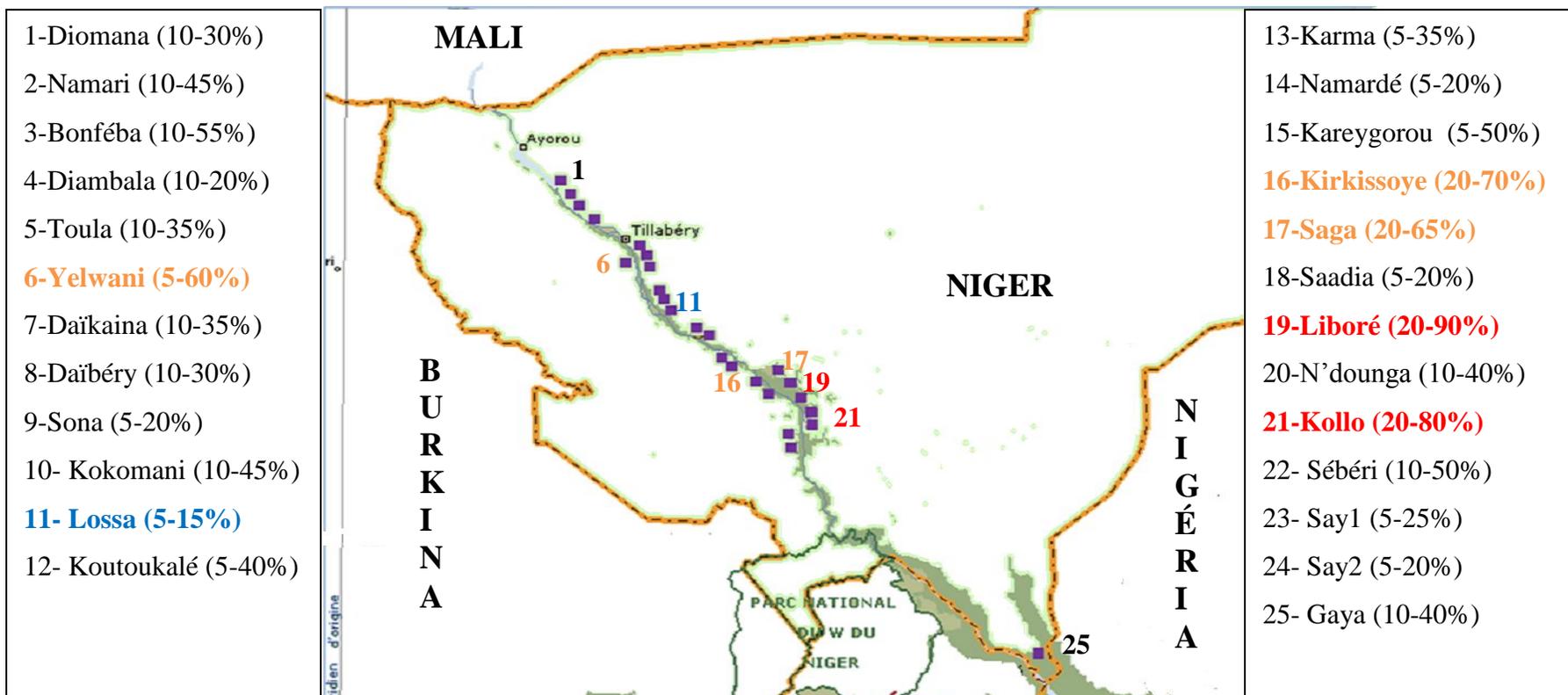


Figure 14 : Carte des sites rizicoles prospectés au Niger et incidence de la panachure jaune du riz (Issaka, 2009).

NB : Les sites sont classés dans l'ordre de 1 à 25 le long du fleuve Niger ; la zone de Diffa (à l'Est du pays) n'est pas montrée car un seul site a été visité et l'incidence de la maladie n'y a pas été estimée. En couleur : les fourchettes d'incidence (avec en rouge foncé =80-90 %, orange = 60-70 % et bleu foncé = 15 %, au maximum).

Tableau XVII : Incidence de la panachure jaune du riz dans les rizières du Niger

S/N	Localité	Incidence (%)		Isolats identifiés		
		Saison humide	Saison sèche	Riz irrigué	Adventices	Total
1	Bonfeba	10-55	-	2	3	5
2	Daiberi	10-30	5-20	12	0	12
3	Daikaina	10-35	5-15	7	1	8
4	Diambala	10-20	-	2	0	2
5	Diomana	10-30	-	3	0	3
6	Karegorou	10-50	5-20	12	4	16
7	Karma	5-25	-	2	3	5
8	Koutoukale	5-40	-	8	3	11
9	Lata	5-30	-	1	0	1
10	Liboré	20-90	5-10	5	3	8
11	Lossa	5-15	-	1	6	7
12	Namarde	5-20	5-15	4	1	5
13	N'Dounga	15-25	5-15	4	1	5
14	N'dounga 1	10-40	-	4	0	4
15	N'dounga 3	10-50	-	9	1	10
16	Saadia	5-20	5-20	2	0	2
17	Saga	20-65	5-10	6	0	6
18	Say-2	5-20	-	3	6	9
19	Say-1	5-25	5-15	9	3	12
20	Sébéri	10-60	5-15	9	2	11
21	Tara	15- 50	-	4	0	4
22	Toula	10-35	-	6	4	10
23	Yelwani	5-60	-	5	0	5
24	Gaya	10-40	5-15	3	8	11
25	Kirkissoye	20-70	-	9	3	12
26	Kollo	20-80	-	7	4	11
27	Namari	10-45	-	2	0	2
28	Kokomani	10-45	-	2	3	5
29	Sona	5-20	-	8	0	8
30	Diffa	5-20	-	1	1	2
		Total		155	60	215

- : incidence non déterminée

Tableau XVIII : Importance des pertes de production dans les rizières fortement atteintes par le RYMV au Niger

Localité	Incidence (%)	Baisses de production (%)	Pertes enregistrées (%)
Sébéri	60	57,2	34,3
Kollo	80	82,4	65,9
Liboré	90	77,9	70,1
Kirkissoye	70	65,00	45,5

Tableau XIX : Espèces d'adventices hébergeant le RYMV dans l'écologie du Niger

S/N	Espèces	Famille	Nombre de site	Nombre d'isolats
1	<i>Echinochloa colona</i>	Poacée	3	3
2	<i>Leersia hexandra</i>	Poacée	12	25
3	<i>Cyperus rotundus</i>	Cypéacée	3	3
4	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéacée	6	7
5	<i>Paspalum emplectens</i>	Poacée	4	6
6	<i>Panicum repens</i>	Poacée	1	1
7	<i>Oryza longistaminata</i>	Poacée	3	4
8	<i>Kylinga squamulata</i>	Cypéacée	1	1
9	<i>Cyperus sp.</i>	Cypéacée	2	2
10	<i>Eleusine indica</i>	Poacée	7	8
		Total		60

réservoirs du RYMV, puisque leurs échantillons ont été testés positifs à l'ELISA et/ou leur broyat a produit des symptômes typiques de panachure jaune du riz sur les variétés sensibles. Parmi les Cypéracées, les espèces ayant abrité le virus ont été *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus sp.* et *Kilinga sp.* L'espèce *Laersia hexandra* a été la plus infectée dans l'environnement rizicole du Niger (Tableau XIX), suivie des espèces *Eleusine indica* et *Cynodon dactylon*.

7. 4. Structure des populations de RYMV au Niger

Plus de 500 échantillons de feuilles de riz et de Graminées adventices, avec ou sans symptômes de panachure jaune ont été collectés dans toutes les rizières du Niger, entre 2005 et 2008 (Tableau XVII, Annexe 1.1). Les résultats des tests sérologiques et pathologiques réalisés sur ces échantillons ont attesté la présence de la panachure jaune du riz dans l'ensemble des sites rizicoles prospectés. Ces résultats font référence à deux catégories d'isolats dont : (i) les isolats sauvages qui sont des isolats originels ayant été capables de se développer uniquement sur les variétés sensibles et n'ayant subi aucune modification génomique d'adaptation aux dites variétés et (ii) les isolats contournants ou isolats RB (Resistance Breaking isolates) qui sont des isolats ayant contourné la résistance du riz au RYMV. Ils ont montré dans la plus part des cas une mutation dans la portion d'ARN codant pour la VPg, ce qui leur a conféré l'appellation d'isolats contournants (voir Chapitre 9).

Les résultats biologiques et sérologiques préliminaires obtenus ont permis de classer les isolats du RYMV-Niger en 3 grandes catégories (Figure 15 ; Tableau XX ; Annexe 1.1) dont :

- les isolats sauvages (S) positifs à l'ELISA et ayant provoqué des symptômes uniquement sur les variétés sensibles Bouaké 189 et IR 64 ;
- les isolats contournants ayant surmonté la résistance élevée de l'une et/ou l'autre des variétés résistantes de riz (Giganté et Tog5681). Les allèles de résistance ci-après ont été contournés par les différents isolats RB (Figure 15) :
 - ✓ *rymv1-2* de Giganté pour les isolats RB1 ;
 - ✓ *rymv1-3* de Tog5681 pour les isolats RB2 ;
 - ✓ *rymv1-2* et *rymv1-3* à la fois pour les isolats RB3 ;
- les isolats à pathogénie particulière :
 - ✓ isolats ayant été positifs au test ELISA sans produire des symptômes



Figure 15 : Symptômes caractéristiques de panachure jaune produits sur quatre variétés de riz inoculées avec l'isolat virulent Ng144 (cas de contournement) en serre à AfricaRice (Issaka, 2008)

*+ présence de symptômes visibles ; * symptômes moins importants.*

Tableau XX : Structure des populations virales RYMV du Niger (avec R<3)

Localité	Total isolats	Sauvages	Isolats virulents			Isolats particuliers
			RB1	RB2	RB3	
Bonfeba	5	5	-	-	-	-
Daiberi	12	7	1	1	-	3
Daikaina	8	4	3	1	-	-
Diambala	2	2	-	-	-	-
Diomana	3	2	-	-	-	1
Karegorou	16	8	8	-	-	-
Karma	5	5	-	-	-	-
Koutoukale	11	7	-	-	-	4
Lata	1	1	-	-	-	-
Libore	8	5	2	1	-	-
Lossa	7	4	3	-	-	-
Namarde	5	4	1	-	-	-
N'Dounga	5	1	-	1	3	-
N'dounga 1	4	-	4	-	-	-
N'dounga 3	10	5	4	1	-	-
Saadia	2	2	-	-	-	-
Saga	6	2	-	1	3	-
Say-2	9	3	2	-	3	1
Say-1	12	7	1	-	3	1
Sébéri	11	3	6	1	-	1
Tara	4	-	-	1	3	-
Toula	10	4	1	-	2	3
Yelwani	5	1	1	-	-	3
Gaya	11	10	1	-	-	-
Kirkissoye	12	9	2	-	1	-
Kollo	11	10	-	-	1	-
Namari	2	2	-	-	-	-
Kokomani	5	3	2	-	-	-
Sona	8	6	1	-	1	-
Diffa	2	-	2	-	-	-
Total	215	125	45	8	20	17
Total RB (%)*				33.9		

R<3 score inférieur à 3, la variété a été considérée comme résistante ;

RB1 a contourné l'allèle rymv1-2 seul ; RB2 a contourné l'allèle rymv1-3 seul ;

RB3 a contourné les allèles à la fois ;

** la proportion d'isolats virulents a été de 14,9 % lorsque l'on a considéré le score 5 (résultats non montrés).*

sur l'une ou l'autre des variétés sensibles lors de la propagation ;

- les solats à pathogénie particulière :
 - ✓ isolats ayant été positifs au test ELISA sans produire des symptômes sur l'une ou l'autre des variétés sensibles lors de la propagation ;
 - ✓ isolats ayant été négatifs au test ELISA sans attaquer l'une ou l'autre des deux variétés sensibles ;

Conclusion partielle

La panachure jaune du riz affecte tous les périmètres rizicoles du Niger avec des incidences (5 – 90 %) et des pertes de production (35 – 71 %) variables selon les sites. Des adventices appartenant aux familles des Poacées et des Cypéracées ont été proposés hôtes réservoirs du RYMV et leur rôle dans la propagation de la maladie ainsi que les facteurs favorables à sa dispersion ont été déterminés. La structure des populations du virus a indiqué une variabilité du RYMV-Niger qu'il a été nécessaire de prouver dans le chapitre 8.

CHAPITRE 8 : VARIABILITE GENETIQUE ET BIOLOGIQUE DU *RICE YELLOW MOTTLE VIRUS* (RYMV) AU SEIN DES PERIMETRES IRRIGUES DU NIGER.

Introduction

Le Chapitre précédent a permis d'évaluer l'épidémiologie de la panachure jaune du riz et la structure des populations du virus responsable dans l'écologie rizicole du Niger. Il a été suggéré que le RYMV-Niger est variable.

Le présent chapitre a été consacré à l'évaluation de la diversité génétique et biologique du virus de la panachure jaune du riz (*Rice Yellow Mottle Virus*, RYMV) au Niger. Son objectif a été de caractériser la phylogénie et la pathogénie du RYMV-Niger, afin de mieux préparer le déploiement des sources de résistance durable.

Une gamme d'isolats du virus collectés dans divers sites rizicoles du Niger a été d'abord testée à l'aide d'anticorps polyclonaux (Pabs) et monoclonaux (Mabs) du RYMV, puis la portion du génome codant pour la protéine de capsid (CP) de chaque isolat a été séquencée après extraction et RT-PCR (transcription reverse et amplification et polymérisation en chaîne). Une partie des isolats caractérisés a aussi été utilisée pour cribler une gamme de variétés de riz parmi lesquelles figuraient six variétés différentielles (anonyme 3, 2001) et trois variétés largement emblavées au Niger.

Les profils sérologiques, moléculaires et pathologiques des isolats ont révélé la nature de la variabilité du RYMV-Niger. Ce qui a permis de déterminer les sérogroupes, sérotypes et pathogroupes du virus au Niger : (i) le séro groupe est un groupe d'isolats viraux ayant les mêmes profils de réaction vis-à-vis des Pabs (ii) le sérotype regroupe les isolats réagissant de la même façon aux anticorps monoclonaux (Mab) et ayant les mêmes propriétés moléculaires et (iii) le pathogroupe forme l'ensemble d'isolats ayant les mêmes propriétés biologiques..

Les résultats ci-après ont été obtenus :

- (i) la variabilité génétique du RYMV au Niger ;
- (ii) la variabilité biologique du RYMV-Niger et déploiement des gènes de résistance.

8. 1. Variabilité génétique du RYMV au Niger

8. 1. 1. Résultats sérologiques

8. 1. 1. 1. Résultats sérologiques avec les anticorps polyclonaux (Pabs)

Les profils sérologiques des isolats obtenus avec les Pabs ont permis de classer les isolats du RYMV en deux grands groupes sérologiques Sg1 et Sg2. Le sérogroupe Sg1 a été subdivisé en 3 sous-groupes Sg1a, Sg1b et Sg1c alors que le sérogroupe Sg2 a été scindé en 2 sous-groupes, Sg2a et Sg2b (Tableau XXI). Le sérogroupe Sg1 a été numériquement plus fréquent que le sérogroupe Sg2. Aussi, parmi les isolats de sérogroupe Sg1, les isolats de type Sg1 b ont été majoritaires.

Les deux sérogroupe viraux identifiés ont été répartis dans tout l'espace rizicole du Niger. Ils ont coexisté dans la plupart des sites. Cependant, certains périmètres rizicoles ont été caractérisés par la présence d'un seul sérogroupe. A titre d'exemple, seul le sérogroupe Sg1 a été observé à N'dounga et Liboré, pendant que le site de Namardé a été uniquement colonisé par le sérogroupe Sg2.

8. 1. 1. 2. Résultats sérologiques avec les anticorps monoclonaux (Mabs)

Tous les isolats testés ont réagi avec les Mabs G, E, M et A (Tableau XXII). Aucun isolat n'a réagi avec le Mab D. Il n'y a donc pas eu d'isolats des autres sérotypes ouest-africains, notamment les sérotypes Ser 2 et Ser 3 ; le sérotype Ser 3 réagissant avec tous les Mabs et le Ser 2 répondant aux Mabs G, E, M et D, sans réagir avec le Mab A.

Ces profils de réaction ont montré que tous les isolats testés appartiennent au sérotype Ser1-AC. L'espace rizicole du Niger est donc caractérisé par la présence d'un seul sérotype de RYMV.

8. 1. 2. Phylogénie et phylogéographie du RYMV au Niger

La séquence du gène de la protéine de capsid a permis d'assigner un isolat à une souche précise. L'analyse des séquences du gène de cette protéine chez 23 isolats RYMV du Niger et 6 du Nigéria a indiqué que la diversité nucléotidique entre les isolats de l'Afrique de l'Ouest et entre ceux de l'Est du Niger a été faible (<2 %). La diversité nucléotidique entre la

Tableau XXI : Répartition des séro-groupes (Sg) dans l'écologie rizicole du Niger

Site	Sérogroupe Sg 1			Sérogroupe Sg 2		Effectifs
	Sg1a	Sg1b	Sg1c	Sg2a	Sg2b	
Bonfeba (BON)	-	-	1	-	-	1
Daiberi (DAB)	-	2	1	-	2	5
Daikaina (DAK)	2	1	1	-	2	6
Diambala (DIA)	-	1	-	-	-	1
Diomana (DIO)	-	1	-	-	-	1
Karegorou (CAR)	3	-	-	1	1	5
Karma (KAR)	-	-	1	-	1	2
Koutoukale (KOU)	-	1	-	1	1	3
Lata (LAT)	-	1	-	-	-	1
Libore (LIB)	-	1	1	-	-	2
Namarde (NAM)	-	-	-	2	-	2
Lossa (LOS)	-	1	-	-	-	1
N'Dounga (NDO)	2	-	1	-	-	3
N'dounga 1 (NDO1)	-	1	-	1	1	3
N'dounga 3 (NDO3)	-	1	-	-	1	2
Saadia (SAD)	1	-	1	-	1	3
Saga (SAG)	2	-	2	-	1	5
Say-1 (SAY1)	-	2	1	2	1	6
Seberi (SEB)	-	1	-	2	1	4
Tara (TAR)	1	-	1	-	1	3
Toula (TOU)	-	3	-	1	-	4
Yelwani (YEL)	-	1	1	1	-	3
Total	11	18	12	11	14	66

- : absence de sérogroupe

Tableau XXII : Profils de réaction des isolats du RYMV originaires du Niger avec les Mabs

Localité	Nbre isolat	Ac A	Ac D	Ac E	Ac G	Ac M	Souche
Bonfeba	4	+	-	+	+	+	S1
Daibery	3	+	-	+	+	+	S1
Daikaina	2	+	-	+	+	+	S1
Diambala	2	+	-	+	+	+	S1
Diomana	4	+	-	+	+	+	S1
Firgoune	1	+	-	+	+	+	S1
Gatawani	1	+	-	+	+	+	S1
Gaya	5	+	-	+	+	+	S1
Karegorou	4	+	-	+	+	+	S1
Karma	3	+	-	+	+	+	S1
Kirkissoye	4	+	-	+	+	+	S1
Kokomani	2	+	-	+	+	+	S1
Kollo	4	+	-	+	+	+	S1
Koutoukalé	2	+	-	+	+	+	S1
Lata	2	+	-	+	+	+	S1
Liboré	1	+	-	+	+	+	S1
N`dounga	1	+	-	+	+	+	S1
N`dounga1	3	+	-	+	+	+	S1
N`dounga3	2	+	-	+	+	+	S1
Namarde	2	+	-	+	+	+	S1
Namari	2	+	-	+	+	+	S1
Saadia	1	+	-	+	+	+	S1
Saga	3	+	-	+	+	+	S1
Say1	6	+	-	+	+	+	S1
Say-2	3	+	-	+	+	+	S1
Seberi	5	+	-	+	+	+	S1
Sona	3	+	-	+	+	+	S1
Tara	3	+	-	+	+	+	S1
Toula	3	+	-	+	+	+	S1
Yelwani	2	+	-	+	+	+	S1

+ : positif et – négatif

AcA : anticorps A ; AcD : anticorps D ; AcE : anticorps E ; AcG : anticorps G et AcM : anticorps M.

majorité des isolats de l'Ouest et l'isolat Ng161 (un autre isolat de l'Ouest) a dépassé 4 % et celle entre les isolats de l'Est et de l'Ouest du Niger a avoisiné les 6 %.

L'arbre phylogénétique du RYMV (Figure 16) a montré que les isolats du Niger appartiennent à la souche S1, notamment à la lignée d'Afrique Ouest Centrale (S1-AOC). Aucune autre souche du virus n'y a été identifiée, notamment les souches S2, S3 et Sa observées en Afrique de l'Ouest (Figure 17). La lignée S1-AOC observée au Niger a été subdivisée en 3 clades : le clade S1-AOC1 Togo-Bénin-Niger (clade typique du Dahomey gap), le clade S1-AOC2 Cameroun-Tchad-Nigéria (clade type d'Afrique Centrale) et le clade S1-AOC3 Nigéria (clade à cheval entre les deux clades cités).

Les isolats de l'Ouest du pays sont répartis dans 2 clades distincts de la lignée S1-AOC. Ils sont majoritairement apparentés aux isolats du Dahomey Gap représentés le clade S1-AOC1 Togo-Bénin-Niger regroupant les isolats des 3 pays et les isolats Ni118 et Ni124 de l'Ouest du Nigéria (zone limitrophe avec le Sud-ouest du Niger et arrosé par le fleuve Niger). Les isolats de l'Est du Niger sont apparentés au clade S1-AOC2 Afrique Centrale, un clade ayant regroupé les isolats du Cameroun, du Tchad et de l'Est du Nigéria (Ni 106, Ni 107, Ni 108 et Ni 111). Quant à l'isolat Ng161 de l'Ouest du Niger, il est phylogénétiquement lié aux isolats du clade S1-AOC3 Nigéria, un nouveau clade observé en Afrique Ouest Centrale qui est à cheval entre le Niger et le Nigéria. Cette filiation était basée sur de nombreux isolats de l'Ouest de Niger et trois isolats de l'Est (Figure 16).

La construction d'un arbre phylogénétique incluant les séquences entières des isolats Ng218 (de l'Est Niger), Ng36, Ng140 et Ng161 (de l'Ouest du Niger) a confirmé l'appartenance des isolats de l'Est du Niger à la souche S1-AOC. Ainsi, les isolats de l'Est du Niger sont apparentés au clade S1-AOC Afrique Centrale typique, représenté par l'isolat Tc28, l'isolat Ng161 est génétiquement lié au nouveau clade S1-AOC dont le représentant est l'isolat Nia et les isolats de l'Ouest du Niger sont affiliés au clade typique du Dahomey Gap (Figure 17). Les résultats phylogéographiques du virus ont révélé deux pôles distincts de distribution du RYMV au Niger (Figures 16 et 17). Le pôle de l'Ouest est constitué de deux clades de la lignée S1-AOC (S1-AOC du Dahomey Gap et S1-AOC Nigéria) et le pôle de l'Est est occupé uniquement par les isolats du clade S1-AOC Afrique Centrale.

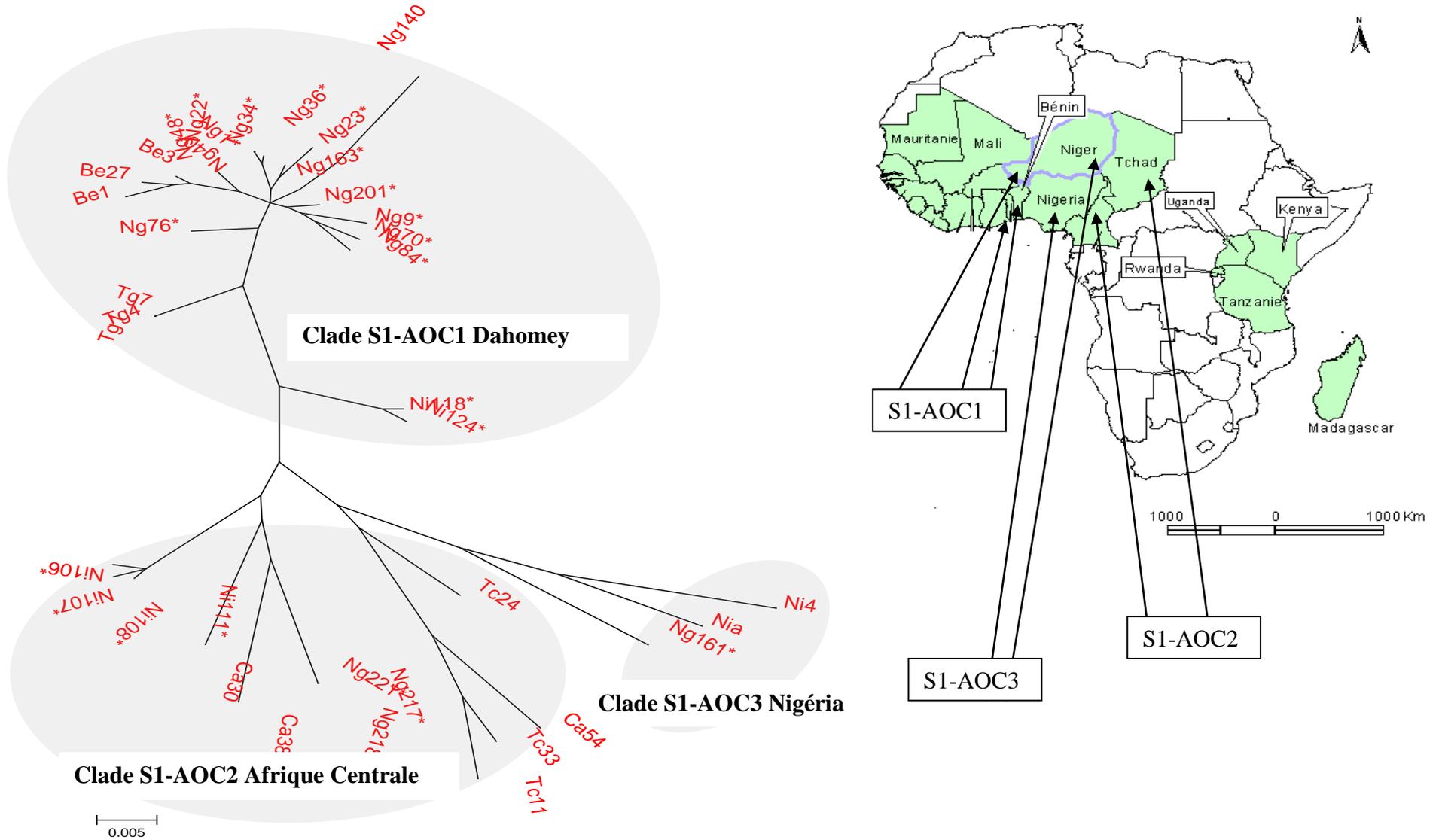


Figure 16 : Phylogénie et phylogéographie du RYMV en Afrique de l’Ouest et du Centre : cas du Niger (Issaka, 2010)

**isolats étudiés dans cette étude ; le nom des isolats est représenté par l’initial du pays d’origine suivi du numéro de l’isolat.*

Arbre non-enraciné (méthode de maximum de vraisemblance, Tamura et al., 2007)

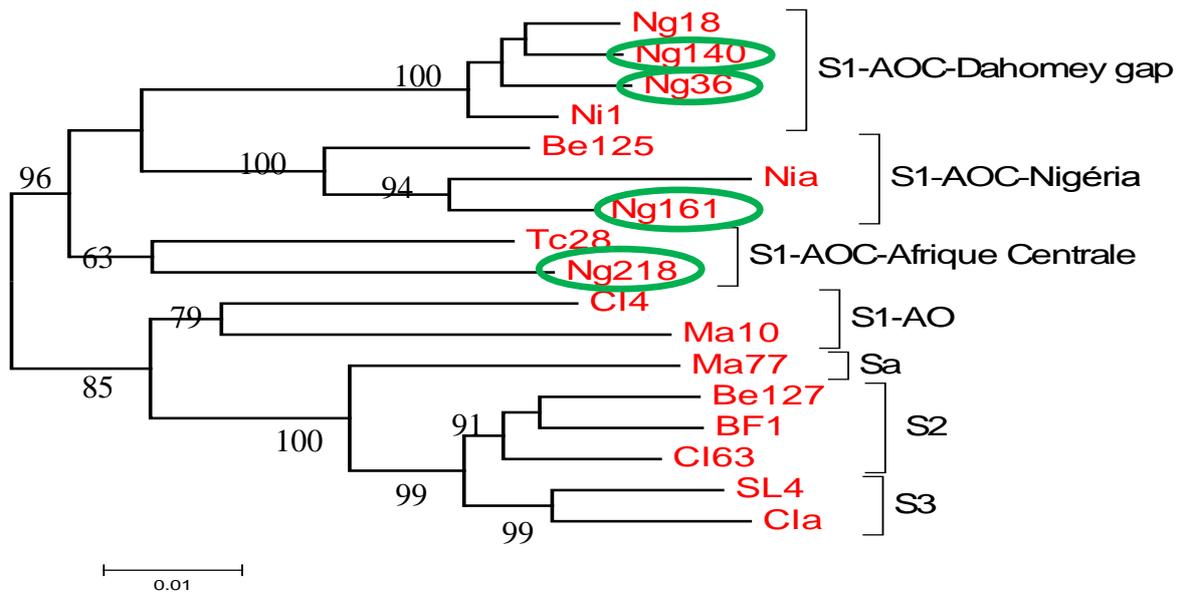


Figure 17 : Phylogénie de la Souche RYMV du Niger (Issaka, 2010)

(Arbre enraciné, Méthode de maximum de vraisemblance avec bootstraps, Tamura et al., 2007)

Be : Bénin ; *BF* : Burkina faso ; *CI* : Côte d'Ivoire ; *Ma* : Mali ; *Mg* : Madagascar ; *Nia*, *Ni* : Nigéria ; *NG*, *Ng* : Niger ; *SL* : Sierra Léone ; *Tz* : Tanzanie ; *Tc* : Tchad ; *AOC* : Afrique Ouest-Centrale ; *AO* : Afrique de l'Ouest ; encerclé : isolats étudiés, Encerclés en vert : L'isolat Ng18 antérieurement séquencé (Traoré et al. 2005) et 4 autres isolats séquencés au cours de cette étude.

8. 2. Variabilité biologique du RYMV au Niger et déploiement des gènes de résistance

L'analyse statistique des données a révélé une différence significative entre les isolats et entre les variétés pour tous les paramètres mesurés (Tableau XXIII). Il y a eu une différence significative entre les isolats et les variétés. Toutefois, seuls les paramètres concernant la sévérité et le taux de chlorose ont véritablement discriminé les isolats et les variétés.

Les données sur la sévérité ont été les plus précises avec un coefficient de variation de 10,4 %. Elles ont servi à comparer les isolats et les variétés à travers leurs réactions moyennes (Tableau XXIV, Annexe 1.3). L'indice de sévérité des 60 isolats RYMV sur les 9 cultivars de riz a donné différentes réactions de compatibilité. Par exemple, les isolats à spectre large ont provoqué des réactions de compatibilité avec presque toutes les structures génétiques testées, tandis que les isolats à spectre étroit n'ont infecté qu'un à quatre variétés de riz. Les isolats à spectre étroit ont été les moins fréquents puisqu'ils n'ont représenté que 8 % de la population pathogène (Tableaux XXV et XXVI). Les variétés Giganté et Tog5681 ont été caractérisées par leur résistance à un grand nombre d'isolats. Cependant leurs allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv1-3* ont été contournés par au moins 20 % des isolats étudiés lorsqu'on a considéré l'effet principal de l'interaction isolats x variétés (Figure 18).

Les interactions Génotype x Environnement ont été examinées à travers le modèle AMMI (Additive Main Multiplicative Interaction) qui associe à l'ANOVA l'analyse en composante principale (ACP) ; l'environnement étant représenté par les différents isolats. Cette analyse a montré que la sévérité est corrélée à l'axe PC1 (52,8 %) qui révèle l'agressivité des isolats et le niveau de sensibilité des variétés (Figure 19). L'axe PC2 (25,3 %) exprime la virulence des isolats et le niveau de résistance des variétés (Figures 19).

8. 2. 1. Interactions et groupage des isolats et des variétés

Quatre types d'interactions variétés x isolats ont été observés, ce qui a donné quatre groupes pathologiques (pathogroupes) majeurs (*Path1* à *Path 4*) et trois groupes de variétés différents (Figure 19 et Tableau XXVII). Ce regroupement est confirmé par les dendrogrammes des isolats et des variétés (Figure 20 et Figure 21).

Tableau XXIII. ANOVA de la sévérité des isolats (Sev), du taux de réduction de la chlorophylle (RédChl) et du taux d'accroissement de la charge virale (Chvir)

Source de variance	DF	F SEV	F RÉDCHL	F CHVIR
Répétition (R)	2	<1	1,77ns	3,54 *
Traitement (T)	539	13,93 **	3,28**	5,69 **
Variété (V)	8	274,76 **	8,87**	102,86 **
Isolat (I)	59	43,72 **	13,75**	21,52 **
VxI	472	5,78 **	1,88**	2,06 **
Erreur	1078			
Total	1619			
CV		10,4 %	45,2 %	51,2 %

** = significatif à 1 % ; * = significatif à 5 %

Sev : sévérité des isolats ; *Spad* : taux de réduction de la chlorophylle ; *Chvir* : taux d'accroissement de la charge virale.

Tableau XXIV: Interaction qualitative entre les variétés et les isolats testés

Variétés de riz	Isolats de RYMV														
	Ng2 8	Ng 7	Ng1 7	Ng2 0	Ng2 4	Ng2 6	Ng2 9	Ng3 1	Ng3 3	Ng3 5	Ng3 9	Ng4 5	Ng4 7	Ng5 3	Ng1 1
Giganté	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S	S	R
Tog 5681	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
Moroberekan	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PNA647F4-56	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bouaké 189	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 64	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bassirou Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 1529-680-3-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kassoum Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Variétés de riz	Isolats de RYMV														
	Ng23	Ng34	Ng36	Ng37	Ng40	Ng50	Ng54	Ng1	Ng6	Ng12	Ng15	Ng41	Ng48	Ng51	Ng2
Giganté	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Tog 5681	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Moroberekan	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PNA647F4-56	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Bouaké 189	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 64	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bassirou Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 1529-680-3-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
Kassoum Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Variétés de riz	Isolats de RYMV														
	Ng5	Ng9	Ng10	Ng13	Ng14	Ng16	Ng18	Ng19	Ng22	Ng104	Ng107	Ng55	Ng63	Ng65	Ng77
Giganté	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
Tog 5681	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Moroberekan	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
PNA647F4-56	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bouaké 189	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 64	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bassirou Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 1529-680-3-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kassoum Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R=résistant ; *S*=sensible

Tableau XXIV: Interaction qualitative entre les variétés et les isolats testés (suite et fin)

Variétés de riz	Isolats de RYMV														
	Ng80	Ng83	Ng88	Ng91	Ng99	Ng100	Ng96	Ng102	Ng98	Ng81	Ng85	Ng86	Ng93	Ng95	Ng109
Giganté	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tog 5681	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Moroberekan	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
PNA647F4-56	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
Bouaké 189	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 64	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
Bassirou Moa	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S
IR 1529-680-3-1	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Kassoum Moa	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S

R=résistant ; S=sensible

Tableau XXV : Spectre de virulence de la population nigérienne du virus de la panachure jaune du riz révélé par 9 géotypes de riz (R<3).

Gig	Profil de virulence*								Spectre**	Isolats		Proportion (%)
	Tog	Moro	PNA	Bké	IR64	Bass	IR1529	Kass		Types	Nbre	
S	S	S	S	S	S	S	S	S	9	RBGT	16	45%
S	S	S	R	R	S	S	S	S	7	RBGT	1	
S	S	S	S	S	S	S	R	S	8	RBGT	2	
R	S	S	S	S	S	S	S	S	8	RBT	4	
S	R	S	S	S	S	S	S	S	8	RBG	4	
R	R	S	S	S	S	S	S	S	7	Sauvage	20	45,7 %
R	R	R	S	S	S	S	S	S	6	Sauvage	5	
R	R	S	S	S	S	R	S	S	6	Sauvage	1	
R	R	R	R	S	S	S	S	S	5	Sauvage	1	
R	R	R	S	S	S	R	S	S	5	Sauvage	1	
R	R	R	S	S	S	R	R	S	4	Particuliers	1	8,3 %
R	R	R	S	S	R	S	R	S	4	Particuliers	1	
R	R	R	S	S	R	R	S	R	3	Particuliers	1	
R	R	R	R	R	S	R	R	R	1	Particuliers	2	
R	R	R	R	R	S	R	R	R	1	Particuliers	2	

* R Réaction d'incompatibilité ; S Réaction de compatibilité ; ** Le spectre de virulence est défini par le nombre de variétés présentant des réactions de compatibilité avec les isolats
 Gig = Gigante ; Tog = Tog5681 ; PNA = PNA 647F4-56 ; Bké = Bouaké 189 ; Bass = Bassirou Moa ; IR1529 = IR 1529-680-3 ; Kass = Kassoum Moa
 R<3 score inférieur à 3, la variété a été considérée comme résistante ;
 Isolats sauvages : isolats originel n'ayant subi aucune modification génomique d'adaptation aux variétés résistantes ; isolats contournants (RBTG, RBT, RBG) sont des isolats ayant muté pour s'adapter aux variétés résistantes ; en gras rouge, les profils qui classent les isolats.

Tableau XXVI : Réactions de compatibilité entre les 9 géotypes de riz et les 60 isolats nigériens de RYMV.

Variétés	Nombre de réaction de compatibilité	Proportion (%)
Giganté	23	38,3
Tog 5681	23	38,3
Moro	48	80,0
PNA	56	93,3
Bouaké 189	57	95,0
IR 64	58	96,7
Bassiroumo	54	90,0
IR 1529	54	90,0
Kassoumo	57	95,0

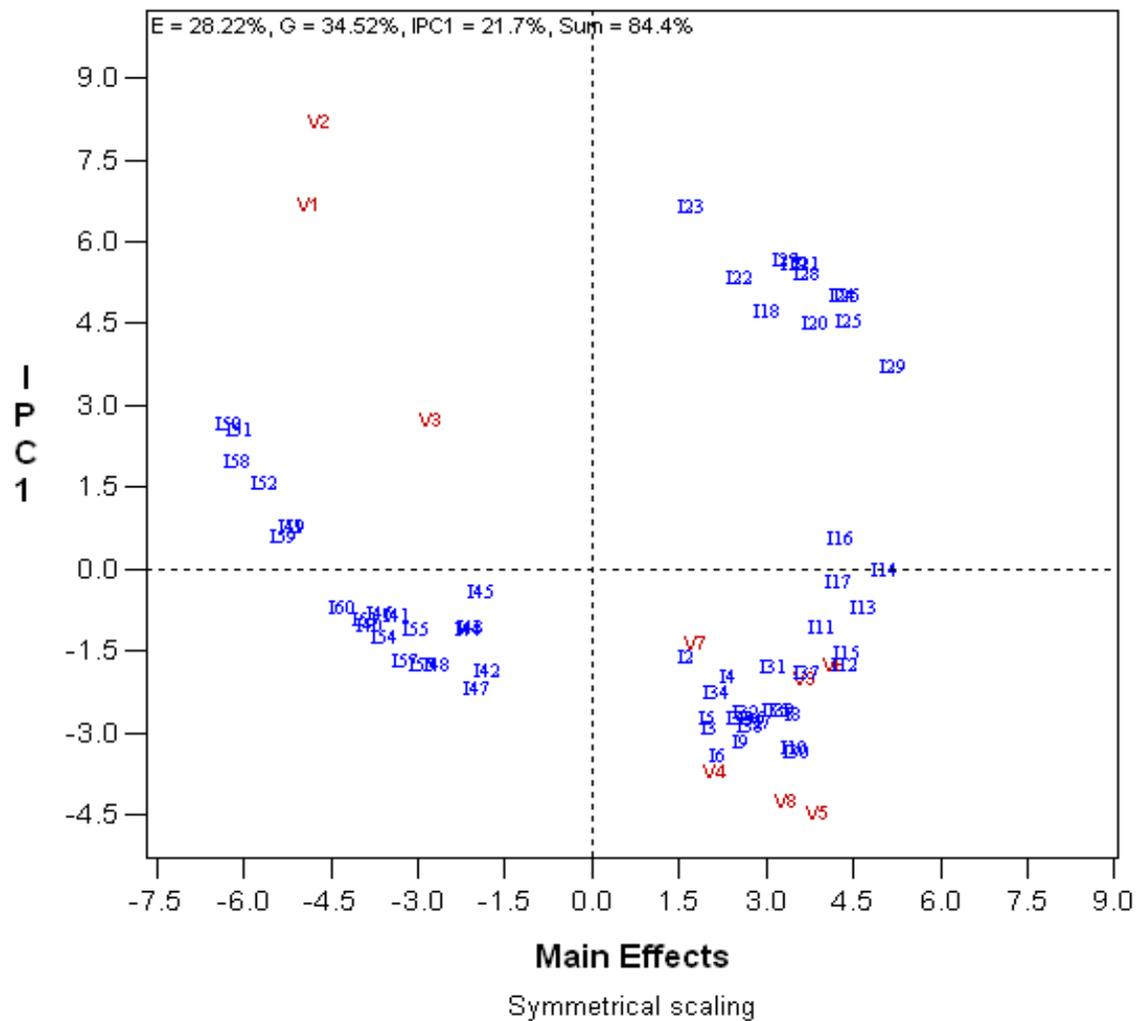


Figure 18 : Effet principal de l'interaction génotype x environnement (isolat) sur la sévérité des isolats RYMV-Niger, selon le modèle AMMI.

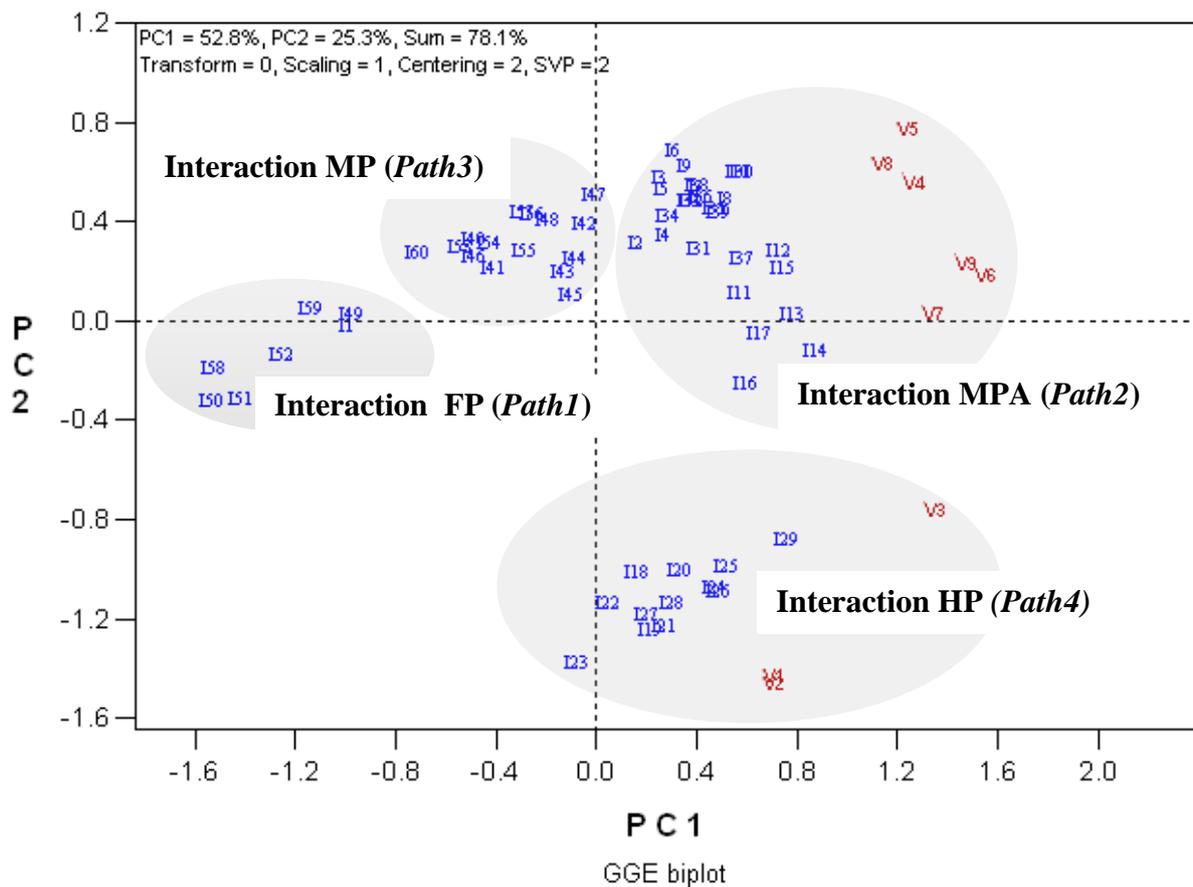


Figure 19 : Effet de l'interaction génotype (variété) x environnement (isolats) sur la sévérité des isolats RYMV-Niger, selon le modèle AMMI.

HP : isolats hautement pathogène ou contournants (RB) ; MPF : isolats sauvages moyennement pathogène et faiblement agressifs ; MPA : isolats moyennement pathogènes et très agressifs et FP : isolats sauvages faiblement pathogènes.

Tableau XXVII : Répartition des pathogroupes de RYMV dans les rizières irriguées du Niger, révélée par AMMI.

Code	Isolat	Localité	Pathogroupe	Proportion	Proportion/Site
I24	Ng6	Saga			
I26	Ng15	N'Dounga			
I25	Ng12	Libore			
I27	Ng41	Daiberi			
I28	Ng48	Daikaina	Isolats contournants (Path4 ou HP)	20 %	31 %
I29	Ng51	Daikaina			
I18	Ng36	Karegorou			
I22	Ng54	Daikaina			
I19	Ng37	Karegorou			
I21	Ng50	Daikaina			
I20	Ng40	Daiberi			
I23	Ng1	Tara			
I40	Ng104	Koutoukale			
I57	Ng86	Yelwani			
I41	Ng107	Yelwani			
I42	Ng55	Toula			
I45	Ng77	N`dounga 3			
I48	Ng59	Toula			
I56	Ng85	Koutoukale	Isolats sauvages moyennement pathogènes (Path3 ou MPF)	25 %	39 %
I55	Ng81	Karma			
I46	Ng80	Karma			
I53	Ng102	Say			
I60	Ng109	Say-2			
I47	Ng83	Koutoukale			
I43	Ng63	N`dounga 1			
I44	Ng65	Seberi			
I54	Ng98	Seberi			
I2	Ng7	Saga			
I4	Ng20	Say-1			
I3	Ng17	Seberi			
I5	Ng24	Saadia			
I9	Ng33	Karegorou			
I6	Ng26	Saadia			
I7	Ng29	Namarde			
I8	Ng31	Namarde			
I10	Ng35	Karegorou			
I30	Ng2	Tara			
I31	Ng5	Saga	Isolats sauvages moyennement pathogènes et très agressifs (Path2 ou MPA)	44 %	48 %
I35	Ng14	N'Dounga			
I32	Ng9	Saga			
I33	Ng10	Saga			
I34	Ng13	N'Dounga			

Tableau XXVII: Répartition des pathogroupes de RYMV dans les rizières irriguées du Niger, révélée par AMMI (Suite et fin)

Code	Isolat	Localité		Proportion	Proportion/Site
I36	Ng16	N'dounga			
I38	Ng19	Say-1			
I37	Ng18	Seberi			
I39	Ng22	Say-1	Isolats sauvages moyennement pathogènes et très agressifs (Path2 ou MPA)		
I11	Ng39	Daiberi			
I16	Ng23	Say-1			
I12	Ng45	Daiberi			
I15	Ng11	Libore			
I13	Ng47	Daiberi			
I14	Ng53	Daikaina			
I17	Ng34	Karegorou			
I1	Ng28	Saadia	Isolats particuliers faiblement pathogènes (Path1 ou FP)		
I49	Ng91	Diomana			
I50	Ng99	Diambala			
I51	Ng100	Daibery		11 %	31 %
I52	Ng96	Lata			
I58	Ng93	Bonfeba			
I59	Ng95	Toula			

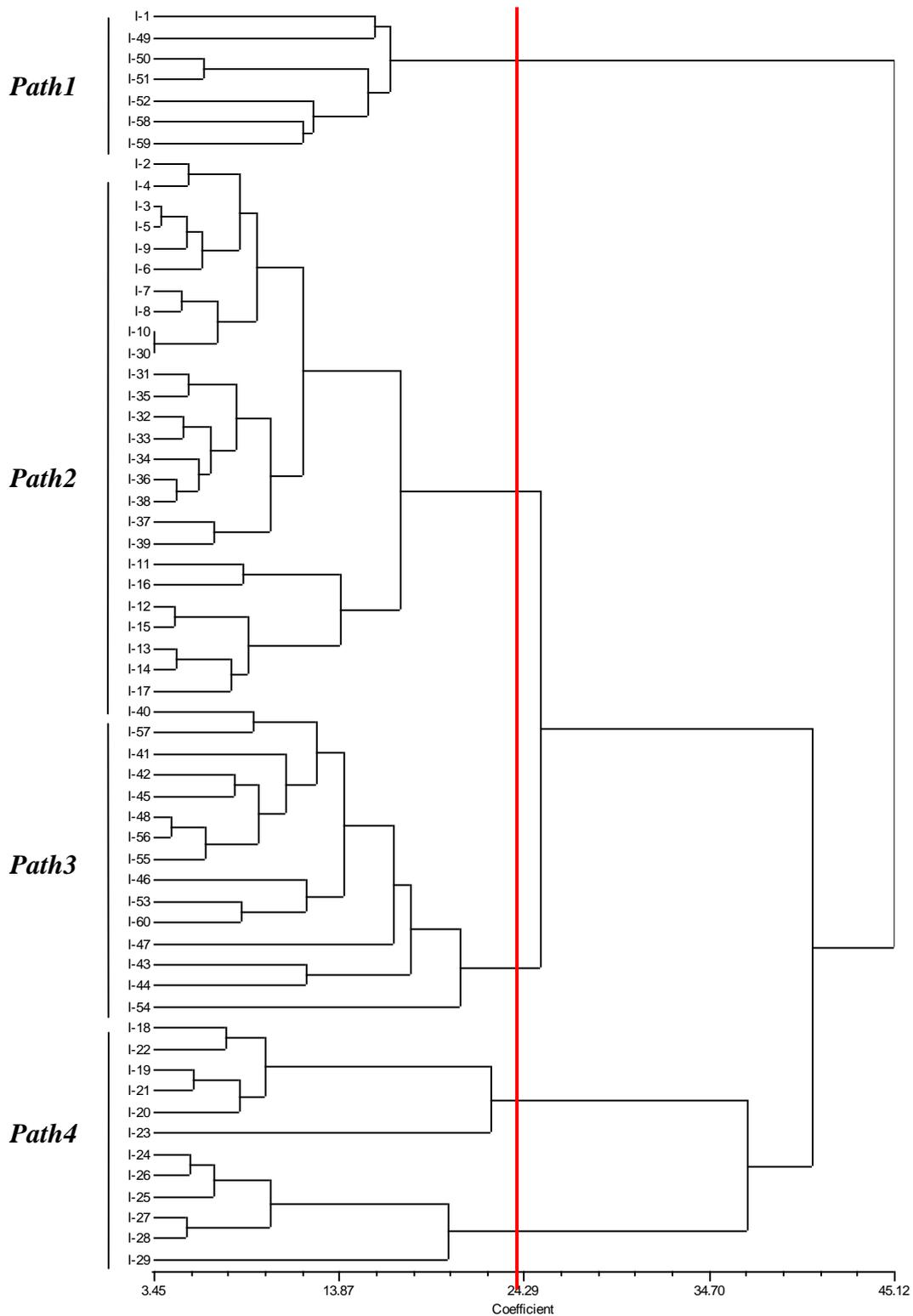


Figure 20. Dendrogramme montrant les pathogroupes du RYMV-Niger, révélés par l'analyse AMMI.

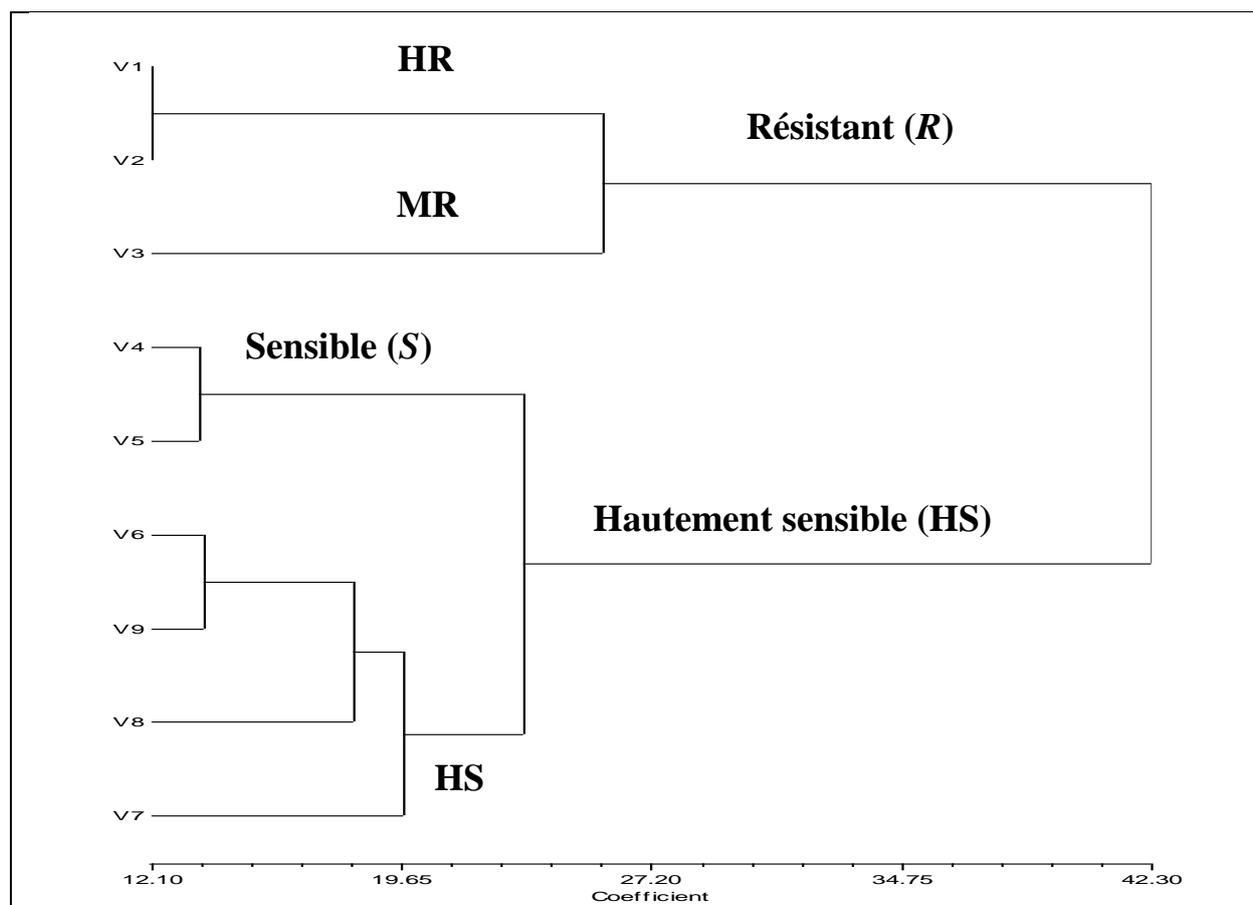


Figure 21 : Dendrogramme des 9 variétés de riz testées vis-à-vis du RYMV-Niger

*HR : hautement résistant ; *MR : moyennement résistant ; HS : hautement sensible.*

Le pathogroupe *Path4* représenté par 12 isolats RYMV du pathogroupe HP (hautement pathogène) a renfermé les isolats contournants (20 %) c'est-à-dire ceux ayant contourné la résistance élevée de Giganté et de Tog5681. Les pathogroupes *Path3* et *Path2* constitués respectivement de 15 et 26 isolats RYMV ont regroupé les isolats de type sauvage et pathogènes. Ils ont inclus d'une part, les isolats moyennement pathogènes et faiblement agressifs (*Path3*=MPF) et d'autre part, les isolats moyennement pathogènes et très agressifs (*Path2*=MPA).

Le quatrième pathogroupe *Path1*, constitué de 7 isolats RYMV, a formé un groupe d'isolats faiblement pathogènes (FP) et n'ayant infecté que quelques variétés hautement sensibles (Tableau XXVII).

L'analyse par le modèle AMMI a indiqué que le pathogroupe *Path2* a été responsable d'une interaction favorable entre les variétés sensibles et les isolats agressifs, eu égard à l'augmentation significative de la sévérité de la maladie due aux isolats dudit pathogroupe sur les cultivars (Fig. 19 et Tableau XXVII). Le même regroupement des isolats du RYMV-Niger a été obtenu, à partir du spectre de virulence des isolats (Tableau XXV). Ce spectre a montré que la sous-population d'isolats RB n'est pas homogène. Certains isolats ont surmonté l'un ou l'autre des allèles de résistance et d'autres les deux allèles à la fois.

Trois types de variétés de riz ont aussi été inventoriés (Figure 21). Il s'agit des groupes de génotypes résistants, sensibles et hautement sensibles. Les cultivars Giganté (V1) et Tog5681 (V2) ont été hautement résistantes (HR) et la variété de riz Morobérékan (V3) a été partiellement résistante (MR). Les variétés PNA 647 F4-56 (V4) et Bouaké 189 (V5) ont été sensibles (S) alors que les cultivars IR64 (V6), Bassiroumo (V7), IR1529-630-3-1 (V8) et Kassoumo (V9) se sont révélées hautement sensibles (HS). Les variétés de riz Giganté et Tog5681 ont été caractérisées par leur résistance à la majeure partie des isolats pathogènes. Toutefois, leurs allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv1-3* se sont avérés inefficaces vis-à-vis de certains isolats nigériens de RYMV (Tableau XXVII). Le dendrogramme des variétés de riz a montré que toutes les trois variétés largement vulgarisées au Niger, (Bassiroumo, IR15-29-690-3-1 et Kassoumo) ont été hautement sensibles aux isolats du virus étudiés.

8. 2. 2. Prévalence et distribution des différents types d'isolats de RYMV au Niger

La structure des populations nigériennes de RYMV a montré un taux de prévalence d'au moins 20 % d'isolats RB (Tableau XXVII). Les isolats de type sauvage et à pathogénie

variable ont été les plus nombreux (69 %). Les isolats contournants et les isolats sauvages ont coexisté avec un groupe restreint d'isolats de pathogénie particulière n'ayant infecté que certaines variétés de riz hautement sensibles, tout en demeurant avirulents sur les autres. Ils ont été nommés isolats FP et ils ont été tolérés par les variétés largement vulgarisées au Niger.

Les proportions respectives des différents types pathogéniques ont été très élevées lorsqu'on a considéré le spectre de virulence des isolats, estimé à partir des moyennes de sévérité (Tableau XXV). Ainsi, la proportion des isolats contournants a dépassé 40 % de la population de RYMV du Niger. Toutefois, le dendrogramme des isolats obtenu par le modèle AMMI (Figure 20 ; Tableau XXVII) a révélé un pourcentage global d'environ 20 % d'isolats contournants dans la même écologie.

La répartition des isolats (Tableau XXVII) dans l'espace rizicole du Niger a montré une large distribution des pathogroupes de RYMV. Les isolats contournants ont occupé 30 % des sites rizicoles du Niger (Tableau XXVII), dans des proportions variables selon les localités. Par exemple dans certains sites comme Daibéry, Daikaina et Kareygorou les isolats RB ont cohabité avec les isolats de types sauvages qui ont présenté des niveaux de pathogénie variables. Les isolats sauvages moyennement agressifs à très agressifs ont occupé près de 90 % des sites rizicoles.

Conclusion partielle

Le RYMV-Niger est très diversifié au plan génétique et biologique. Un seul sérotype, réparti en trois clades a été identifié et quatre groupes d'isolats à pathogénie variable ont été obtenus. Les isolats contournants ont été caractérisés par leur virulence vis-à-vis des allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv1-3*. Ces isolats disposeraient certainement d'une aptitude (génétique et moléculaire) nécessaire à leur virulence et au contournement des allèles de résistance du riz.

CHAPITRE 9 : DETERMINISME GENETIQUE ET MOLECULAIRE DE LA PATHOGENIE DU RYMV ET DU CONTOURNEMENT DE LA RESISTANCE DU RIZ

Introduction

Le chapitre 8 a révélé la présence d'isolats capables de contourner la résistance élevée des variétés de riz Giganté et Tog5681 dans l'environnement rizicole du Niger. Il a été soupçonné l'existence d'une aptitude au contournement de cette résistance.

Le présent chapitre concerne le déterminisme de la pathogénie du RYMV (*Rice Yellow Mottle Virus*) et du contournement de la résistance du riz. Son objectif a été d'une part d'identifier des isolats nigériens du RYMV capables de contourner les allèles de résistance du riz avec une ou des signatures moléculaires de contournement et d'autre part de déterminer les bases génétiques et moléculaires de la pathogénie et du contournement de la résistance.

A cette fin, une gamme d'isolats du RYMV-Niger a d'abord été utilisée pour cribler les variétés résistantes Giganté (*rymv-2*), Tog5681 (*rymv-3*) et Tog5672 (*rymv-4*) et sensible IR64. Puis la VPg des isolats contournants et sauvages a été séquencée, après RT-PCR (transcription inverse – amplification par polymérisation en chaîne) sur les ARNs extraits des génotypes résistants (3) et sensible (1). Pour finir, les acides aminés de la VPg ayant discriminé les isolats contournants et sauvages ont été inventoriés.

Les résultats suivants ont été obtenus :

- (i) les bases génétiques de la pathogénie : présence de deux pathotypes du RYMV au Niger ;
- (ii) la prévalence des isolats contournants et leur distribution ;
- (iii) les bases génétiques et moléculaires du contournement de la résistance du riz.

9. 1. Base génétique de la pathogénie : Présence de deux pathotypes du RYMV au Niger

Les résultats de l'analyse des séquences d'acides aminés de la VPg des isolats sauvages, provenant de 16 sites rizicoles du Niger (Tableau XXVIII), ont montré un polymorphisme E (acide glutamique) et T (Thréonine) au niveau de l'acide aminé 49 (Figure 22). Les isolats à E (30 %) ont été numériquement minoritaires par rapport aux isolats à T (70 %).

Tableau XXVIII : Répartition des isolats du RYMV-Niger par site et par pathotypes

S/N	Isolat	Source	Localité	AA 48-49-50	Pathotype
1	Ng161	IR64	Kirkissoye	RER	E
2	Ng48	IR64	Daïkaina	RER	E
3	Ng40	IR64	Daïbéry	RER	E
4	Ng1	IR64	Tara	RER	E
5	Ng22	IR64	Say1	RER	E
6	Ng217	champ	Diffa	RER	E
7	Ng218	champ	Diffa	RER	E
8	Ng221	champ	Diffa	RER	E
9	Ng200	IR64	Say 1	RER	E
10	Ng23	IR64	Say1	RTK	T
11	Ng9	IR64	Saga	RTK	T
12	Ng69	IR64	Sébéri	RTK	T
13	Ng140	IR64	Kollo	RTK	T
14	Ng84	IR64	Koutoukalé	RTR	T
15	Ng36	IR64	Kareygorou	RTK	T
16	Ng34	IR64	Kareygorou	RTK	T
17	Ng70	IR64	Sébéri	RTK	T
18	Ng76	IR64	Nd'dounga 3	RTK	T
19	Ng101	IR64	Daibéry	RTK	T
20	Ng201	IR64	Say 1	RTK	T
21	Ng50	IR64	Daïkaina	RTK	T
22	Ng15	IR64	N'dounga	RTK	T
23	Ng144	IR64	Kollo	-	-
24	Ng163	IR64	Gaya	RTK	T
25	Ng184	IR64	Bonféba	-	-
26	Ng 128	IR64	Sona	-	-

- non amplifié

R = arginine ; T= thréonine ; K= lysine ; E = acide glutamique

Nom Isolats	Séquences d'acides aminés (i) de la VPg des isolats	
	1	48*50
	RTK.....
	1	48*50
Ng50 VPg.seq	RTK.....
Ng76 VPg ?.seq	RTK.....
Ng101=NG84 VPg	RTR
Ng102=Ng161=NG2	RER
Ng104=Ng23=NG4	RTK.....
Ng105=NG36 VPg?	RTK.....
Ng106=NG9=NG6	RTK.....
Ng107=NG69=NG7	RTK.....
Ng109=NG40 VPg?.	RER
Ng110=Ng70 VPG	RTK.....
Ng111=NG48=NG11	RER
Ng114=NG22 VPg?	RER
Ng115=NG34 VPg	RTK.....
Ng119=NG19=Ng140	RTK.....
Ng15IR64.seq	RTK.....
Ng218 vpg.seq	RER
Ng163 Vpg.seq	RTK.....
Ng217 VPg seq.	RER
Ng1001=NG101 VPg	RTK.....
Ng200Vpg.seq	RER
Ng201 VPg.seq	RTK.....
Ng221 VPg.seq	RER

Figure 22 : Alignement des séquences d'acides (AA) de la VPg des isolats du RYMV-Niger testés : polymorphisme E et T en position 49 (*) de la VPg.

(i) seuls les acides aminés en position 48, 49 et 50 ont été représentés

Le polymorphisme T et E est une signature moléculaire ayant classé les isolats en pathotypes E et T. La figure 22 montre les signatures moléculaires spécifiques liées aux acides aminés 48 et 50 de la VPg. Ces positions d'acides aminés ont été caractérisées par la présence de R (Arginine) et K (Lysine) chez les isolats sauvages à T alors que ceux à E ont présenté R (Arginine) et R aux mêmes positions. L'isolat Ng84 à T s'est singularisé par la présence de l'arginine (R) au lieu de la lysine (K), en position 50 de la VPg (encerclé).

Les pathotypes E ont été exclusivement présents dans l'écologie rizicole de l'Est du Niger, tandis que les rizières de l'Ouest du pays ont été caractérisées par une cohabitation des deux pathotypes T et E (Tableau XXVIII).

9. 2. Prévalence des isolats RB et leur distribution dans l'écologie rizicole du Niger

Les symptômes et/ou les résultats ELISA ont montré que 32 % des 28 isolats testés ont contourné l'un ou l'autre ou les deux allèles de résistance de la plante hôte (Tableau XXIX). La Figure 23 donne les différentes proportions d'isolats sauvages et contournants inventoriés suite aux différentes méthodes de diagnostic. Les isolats sauvages ont été les plus nombreux (68 %) contre 21,4 % d'isolats RB-Tog5681 (allèle *rymv1-3*), 7,1 % d'isolats RB-Giganté (virulents sur l'allèle *rymv1-2*) et 3,5 % d'isolats contournant à la fois les allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* (RB-Giganté/Tog5681). Cependant, aucun isolat n'a surmonté l'allèle *rymv1-4* de Tog5672 avec une mutation de contournement distincte.

Les isolats avirulents du RYMV (nRB) ont été largement majoritaires dans l'écologie rizicole du Niger (Figure 23). Néanmoins, les isolats contournants du virus ont colonisé dans des proportions variables près de 25 % des sites rizicoles étudiés (Tableau XXX). Les isolats ayant contourné l'allèle *rymv1-3* seul ont été retrouvés dans les sites de Say1, Kareygorou, Saga, Kollo et N'dounga. L'allèle *rymv1-2* a été contourné par des isolats de RYMV des sites de Sébéri et de Daibéry (Figure 24).

L'écologie rizicole du Niger a aussi été colonisée par des isolats double-contournants. Ainsi, les isolats Ng69 et Ng36 respectivement originaires des périmètres rizicoles de Sébéri et de Kareygorou ont été les seuls isolats nigériens du RYMV capables de surmonter à la fois les allèles *rymv1-2* et *rymv1-3*.

Tableau XXIX : Profils de réaction et statut des isolats de RYMV-Niger suite à l'inoculation de génotypes résistants de riz

Isolat	Localité	Pathotype	Symptômes à 60 JAI			ELISA (+ positif)			Statut
			Tog5681	Giganté	Tog5672	Tog5681	Giganté	Tog5672	
Ng84	Koutoukalé	T	-	-	-	+/-	-	+	Resistance breaking (RB)
Ng161	Kirkissoye	E	-	-	-	+/-	-	-	n RB (non RB)
Ng23	Say1	T	-	-	-	+	-	-	RB
Ng36	Kareygorou	T	-	-	-	+	+	-	RB* (*double contournant)
Ng9	Saga	T	-	-	-	+	-	-	RB
Ng69	Sébéri	T	-	+	-	+	+	-	RBEIisa+*
Ng40	Daïbéry	E	-	+	-	-	+	-	RB Elisa+
Ng48	Daïkaina	E	-	-	-	-	+/-	-	n RB
Ng34	Kareygorou	T	+	-	-	+	-	-	RB Elisa+
Ng140	Kollo	T	-	-	+	+	-	+	RB
Ng2	Tara	?	-	+/-	-	-	-	-	n RB
Ng10	Saga	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng15	N'Dounga	T	+	-	-	+	-	-	RB Elisa+
Ng19	Say-1	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng37	Karegorou	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng50	Daikaina	T	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng87	Yelwani	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng115	Say-2	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng126	Sona	?	-	-	-	-	-	-	nRB
Ng130	Sona	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng134	Kokomani	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng101	Daibéry	T	-	+	-	-	+	-	RB
Ng144	Kollo	?	-	-	-	-	+/-	-	RB ? (douteux)
Ng151	Kirkissoye	?	-	-	-	-	-	-	n RB
Ng163	Gaya	T	-	+/-	-	-	-	-	n RB
Ng184	Bonfeba	T	-	-	-	-	+/-	+/-	RB ? (douteux)
Ng201	Say-1	T	-	-	-	-	+/-	-	RB ? (douteux)
Ng200	Say 1	T	-	-	-	-	+/-	-	RB ? (douteux)

- : négatif ; + : positif et +/- : douteux ; JAI : jour après inoculation

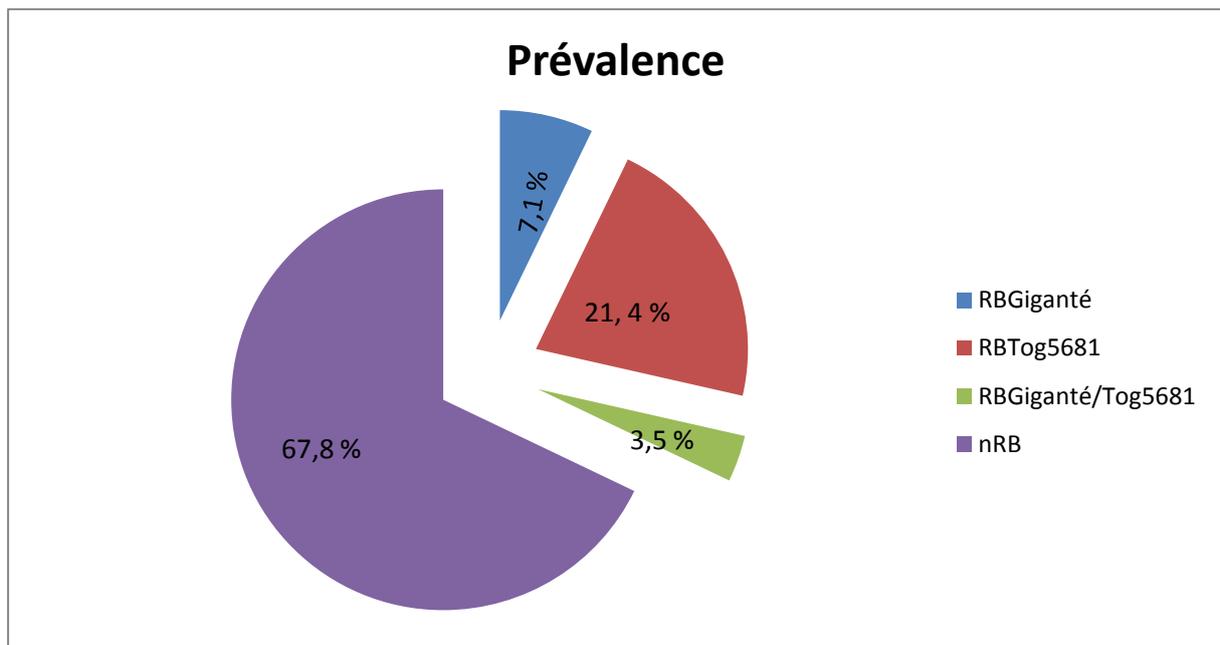
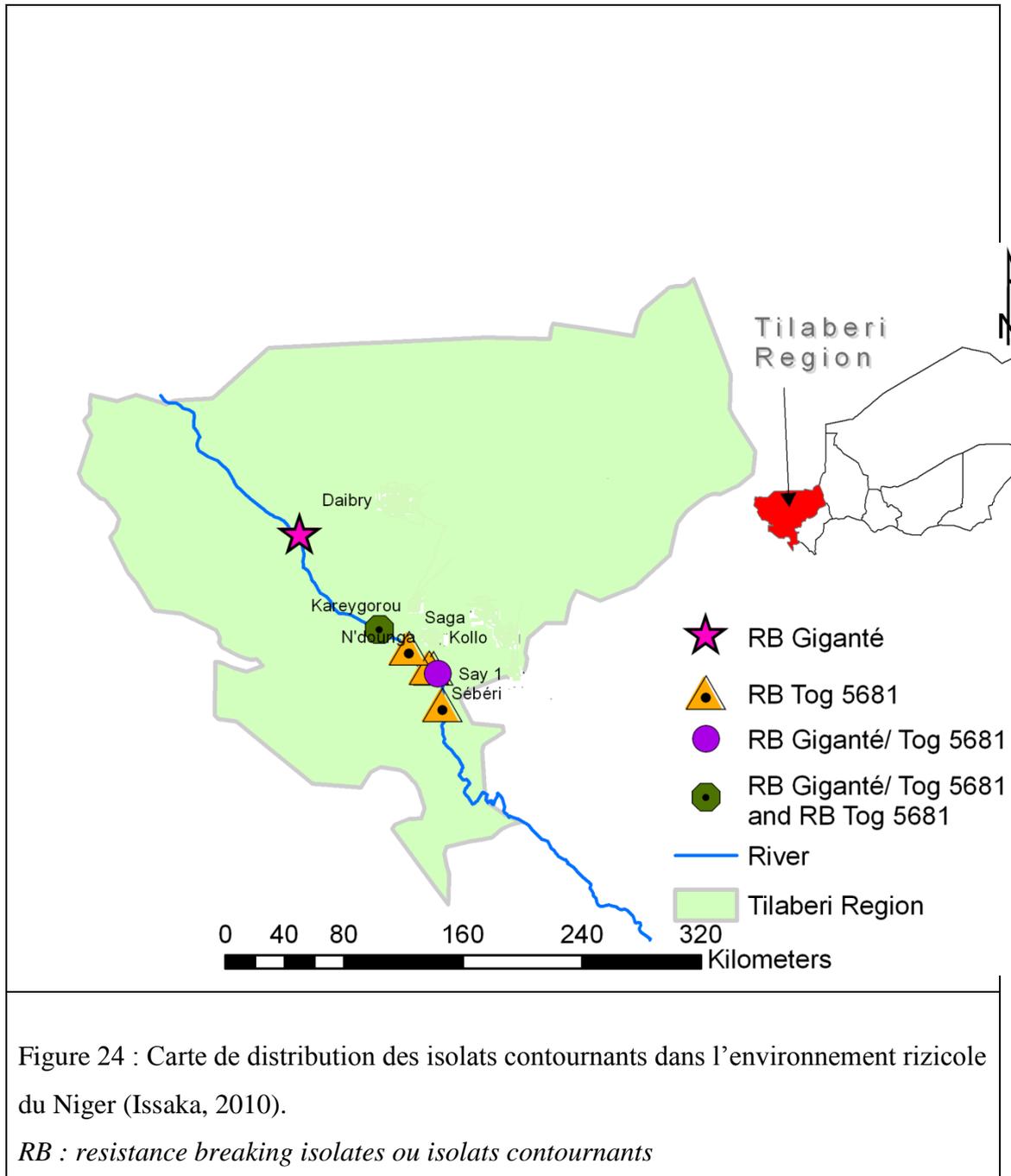


Figure 23 : Prévalence des différents pathotypes du RYMV-Niger, révélés par différentes méthodes de diagnostic du virus.

Tableau XXX : Distribution géographique des isolats RB et fixation des mutations de contournement de résistance

Isolat	Localité	Statut initial	Pathotype	Amplification ADN VPg			Mutations contournement		
				Giganté	Tog5672	Tog5681	Giganté	Tog5672	Tog5681
Ng84	Koutoukalé	Sauvage	T	-	+	-	non testé	0	non testé
Ng161	Kirkissoye	Sauvage	E	-	-	-	non testé	non testé	non testé
Ng23	Say1	Sauvage	T	-	-	+	non testé	non testé	52 Y
Ng36	Kareygorou	Sauvage	T'	+	-	+	43 A	non testé	52 Y
Ng9	Saga	Sauvage	T	-	-	+	non testé	non testé	41 P
Ng69	Sébéri	Sauvage	T'	+	-	+	48 W	non testé	52 Y
Ng40	Daïbéry	Sauvage	E	+	-	-	48 E	non testé	non testé
Ng48	Daïkaina	Sauvage	E	-	-	-	non testé	non testé	non testé
Ng34	Kareygorou	Sauvage	T	-	-	+	non testé	non testé	41A /52Y
Ng140	Kollo	Sauvage	T	-	+	+	non testé	0	41 P
Ng15	N'Dounga	RB1	T	-	-	+	non testé	non testé	41P /52Y
Ng144	Kollo	RB1	?	-	-	-	non testé	non testé	non testé
Ng184	Bonfeba	Sauvage	T	-	-	-	non testé	non testé	non testé
Ng201	Say-1	Sauvage	T	-	-	-	non testé	non testé	non testé
Ng200	Say 1	RB1	E	-	-	-	non testé	non testé	non testé
Ng101	Daibéry	RB1	T	+	-	-	48 W	non testé	non testé
Ng163	Gaya	RB3	T	-	-	-	non testé	non testé	non testé

+ amplifié, - non amplifié, 0 absence de mutations de contournement, A alanine, E glutamate, P proline, Y tyrosine et W tryptophane, 41, 43, 48 et 52 positions de l'acide aminé muté.



9. 3. Bases génétiques et moléculaires du contournement des allèles *rymvI-2* et *rymvI-3* des isolats RYMV-Niger

L'analyse des séquences d'acides aminés de la VPg montre que 9 des isolats testés positifs par score visuel et/ou ELISA ont fixé des mutations de contournement de la résistance (Figure 25). Ces mutations sont des signatures moléculaires spécifiques leur permettant de contourner les allèles *rymvI-2* et *rymvI-3*. Ce contournement, lié au polymorphisme T et E de l'acide aminé 49 de la VPg, est notamment dû à la mutation des acides aminés 41, 43, 48 et 52 de ladite VPg (Figure 25 ; Tableau XXX).

La mutation du codon 48 a conduit au contournement de Giganté (allèle *rymvI-2*) par fixation de l'acide glutamique (E) à la place de l'arginine (R) chez l'isolat Ng40 de pathotype E. Le remplacement de l'arginine au même codon par le tryptophane (W) a induit la virulence des isolats Ng69 et Ng101 (tous deux à T) sur Giganté. La résistance de ce dernier a également été contournée par le Ng36 grâce à la substitution de la thréonine au codon 43 par l'alanine (Figure 25 ; Tableau XXX).

Le contournement de l'allèle *rymvI-3* est dû à une substitution de la sérine (S) du codon 41 soit par l'alanine (A) chez Ng34 soit par la proline (P) dans les séquences de VPg de Ng9, Ng15 et Ng140. Au codon 52, une seule mutation : le remplacement de l'histidine (H) par la tyrosine (Y) a permis aux isolats Ng23 et Ng36 de surmonter la résistance de l'allèle *rymvI-3*, tandis que le contournement du même allèle de résistance chez les isolats Ng34 et Ng15 a nécessité en plus de la fixation de Y52 (substitution de Histidine H / Tyrosine Y en position 52), une autre mutation en 41 (S41P ou S41A), conduisant au remplacement de la sérine (S) par de la proline (P) ou l'alanine (A), respectivement chez les isolats Ng15 et Ng34.

Les isolats Ng69 et Ng36 sont les seuls à fixer deux mutations indépendantes pour contourner à la fois les allèles *rymvI-2* et *rymvI-3*. Ce sont des pathotypes T particuliers, appelés « T' ». L'isolat Ng69 a fixé W48 (substitution de Arginine R / Tryptophane W en position 48) et Y52 pour contourner respectivement les allèles *rymvI-2* et *rymvI-3*. Les deux allèles *rymvI-2* et *rymvI-3* ont aussi été surmontés par l'isolat Ng36 grâce aux mutations indépendantes T43A (substitution de Thréonine T / Alanine A en position 43) et H52Y. Cependant, aucune mutation de contournement n'a été observée dans la portion de la VPg de l'isolat Ng84 ayant contourné la résistance de Tog5672 (avec des symptômes nets), même lorsque l'ADN viral a été amplifié.

Isolat	Séquences d'acides aminés (i) de la VPg des isolats				
	1	*	**50	79	
.....	S . T . . .	R	T	K . H	
NG9=NG6 VPg.seq	S . T . . .	R	T	K . H
Ng9T81-1.seq	P . T . . .	R	T	K . H
Ng15IR?.seq	S . T . . .	R	T	K . H
Ng15T81vpg,.seq	P . T . . .	R	T	K . Y
Ng23=NG4 VPg.seq	S . T . . .	R	T	K . H
Ng23/T81 ok.seq	S . T . . .	R	T	K . Y
NG34 VPg.seq	S . T . . .	R	T	K . H
Ng34/T81.seq	A . T . . .	R	T	K . Y
NG36 VPg?.seq	S . T . . .	R	T	K . H
Ng36/Gig.seq	S . A . . .	R	T	K . H
Ng36T81-2.seq	S . T . . .	R	T	K . Y
NG40 VPg?.seq	S . T . . .	R	E	R . H
Ng40/Gig.seq	S . T . . .	E	E	R . H
NG69=NG7 VPgseq	S . T . . .	R	T	K . H
Ng69/Gig.seq	S . T . . .	W	T	K . H
NG69/T81.seq	S . T . . .	R	T	K . Y
NG84 VPg ?.seq	S . T . . .	R	T	R . H
Ng84T72.seq	S . T . . .	R	T	R . H
NG101/Gig. VPG.seq	S . T . . .	W	T	K . H
NG19=Ng140 VPg.s	S . T . . .	R	T	K . H
Ng140/T72.seq	S . T . . .	R	T	K . H
NG140t81-1.seq	P . T . . .	R	T	K . H
Ng200Vpg.seq	S . T . . .	R	E	R . H
Ng201 VP.seqg	S . T . . .	R	T	K . H

Figure 25 : Alignement des séquences d'AA de la VPg des isolats RB du RYMV-Niger comparés aux isolats sauvages

* site de contournement capable de fixer une mutation et (i) seuls les acides aminés en position 41 ; 43 ; 48, 49 et 50 et 52 ont été représentés

Conclusion partielle

Quatre mutations majeures dans le domaine central de la VPg ont engendré le contournement des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3*. L'avènement de ces mutations de contournement est génétiquement lié à l'acide aminé 49 de la VPg (Thréonine pour le Pathotype T et Acide glutamique pour le Pathotype E), ce qui confirme l'aptitude génétique des pathotypes de RYMV au contournement de la résistance du riz. En effet, les pathotypes E n'ont contourné que l'allèle *rymv1-2* (*Oryza sativa*) et les pathotypes T ont surmonté la résistance des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* (*Oryza glaberrima*). Ce mode de contournement de la résistance des deux espèces de riz cultivées (riz asiatique *O. sativa* et riz africain *O. glaberrima*) pourrait donc impliquer un ou des mécanisme(s) d'adaptation du RYMV aux deux génotypes. Le déterminisme de cette adaptation a été évalué dans le chapitre 10.

CHAPITRE 10 : DETERMINISME GENETIQUE DE L'ADAPTATION DU RYMV AU FOND GENETIQUE DE RIZ

Introduction

Dans le chapitre 9, les bases génétiques et moléculaires de la pathogénie du RYMV-Niger et du contournement de la résistance des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* ont été déterminées. L'allèle *rymv1-2* (*O. sativa*) n'a été contourné que par les isolats à E et T', et l'allèle *rymv1-3* (*O. glaberrima*) a été surmonté uniquement par les pathotypes T et T'. Ce qui indiquerait une différence d'adaptation des pathotypes du virus aux deux espèces de riz cultivées.

Le présent chapitre est consacré à l'évaluation du déterminisme génétique de l'adaptation du RYMV-Niger aux deux espèces de riz emblavées (*Oryza sativa* et *Oryza glaberrima*). A cette fin, des couples de pathotypes (E et T) identifiés au Niger ont d'abord été co-inoculés par infections mixtes à de jeunes plants des deux fonds génétiques de riz. Puis, la portion d'ARN codant pour la VPg a été extraite des plants co-inoculés, transcrite et amplifiée par RT-PCR (transcription reverse – amplification par polymérisation en chaîne) avant d'être séquenée. L'effet du fond génétique dans la sélection des pathotypes du RYMV-Niger a été évalué par score visuel des symptômes de panachure jaune et par quantification de l'ARN viral.

Les résultats ci-après ont été obtenus :

- (i) réactions des pathotypes T et E de RYMV vis-à-vis des deux génotypes de riz ;
- (ii) comportement des pathotypes T et E de RYMV en infections simples ;
- (iii) sélection du pathotype (T ou E) par le fond génétique de riz co-inoculé (IR64 ou Tog5673) ;
- (iv) mécanisme (s) d'adaptation des pathotypes T et E aux fonds génétiques de riz.

10. 1. Réactions des pathotypes T et E de RYMV vis-à-vis des deux espèces de riz

10. 1. 1. Symptômes observés selon le fond génétique utilisé

La réaction type de chaque pathotype et couple de pathotypes vis-à-vis des deux fonds génétiques testés a été évaluée à partir du score moyen des symptômes induits (Figures 26 et 27). Ces derniers ont augmenté dans le temps chez la plupart des pathotypes et couples de pathotypes, quel que soit le fond génétique inoculé.

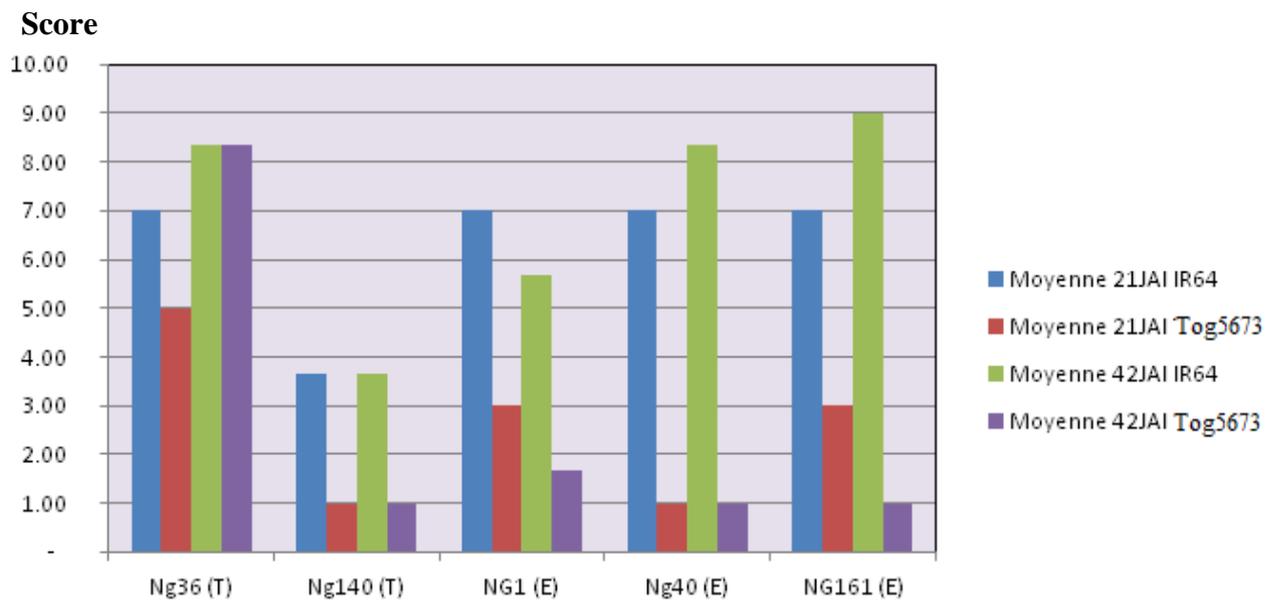


Figure 26 : Score moyens des symptômes induits à 21 et 42 JAI chez les variétés IR64 et Tog5673 simplement inoculées par les pathotypes T et E. (JAI : jours après inoculation)

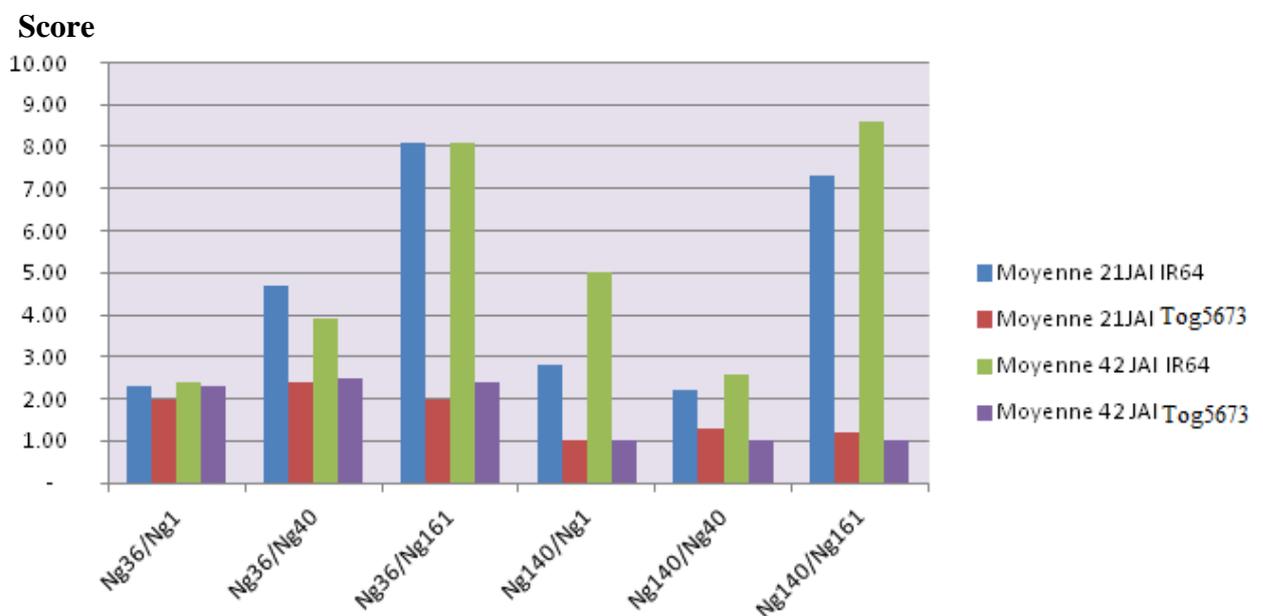


Figure 27 : Score moyens des symptômes induits à 21 et 42 JAI (jours après inoculation) chez les variétés IR64 et Tog5673 co-inoculées par les pathotypes T et E.

Dans les cas des simples inoculations, le score le plus élevé (score 9 = nécrose totale des bouts de feuilles avec souvent la mort du plant infecté) a été obtenu à 42 jours après inoculation de la variété IR64 par l'isolat Ng161 (E). Tous les autres isolats ont infecté la variété IR64 avec un score compris entre 3 et 9. Chez la variété Tog5673 les isolats Ng140 (T) et Ng40 (E) n'ont donné aucun symptôme (score 1) et les autres isolats ont présenté des scores variant entre 3 et 9 (Figure 26).

En inoculations mixtes (Figure 27), les symptômes les plus importants (score 9) ont été observés à 42 JAI sur la variété IR64 par le couple Ng140 (T) / Ng161 (E). Les plus faibles scores enregistrés sur la variété IR64 ont été obtenus avec les couples Ng36 (T) / Ng1 (E) et Ng140 (T) / Ng40 (E) ; les autres couples d'isolats ayant présenté des symptômes moyens voire élevés. Les symptômes ont été faibles sur la variété Tog5673 co-inoculée. Ainsi, ils ont varié entre 1 et 3 avec la moitié des couples co-inoculés. Les couples Ng140 (T) / Ng40 (E) et Ng140 (T) / Ng161 ont enregistré un score moyen supérieur à 1 sur la variété Tog5673, pendant que cette variété a été asymptomatique (score = 1) avec le couple Ng140 (T) / Ng1 (E).

10. 1. 2. Quantité d'ARNs extraits des plants en simples inoculations

Les figures 28 et 29 illustrent respectivement la concentration moyenne en ARN viral chez les variétés de riz sensibles Tog5673 (*O. glaberrima*) et IR64 (*O. sativa*), simplement inoculées. La variété de riz Tog5673 a accumulé entre 10^{11} et 10^{12} copies d'ARN avec la plupart des pathotypes inoculés (Figure 28). Elle a enregistré la plus grande concentration d'ARN viral (10^{12}), lorsqu'elle a été inoculée avec l'isolat Ng36 (T). Par contre, elle n'a enregistré que moins de 10^8 copies d'ARNs en cas de simple inoculation avec l'isolat Ng140 (T).

La variété IR64 a accumulé entre 10^{11} et 10^{12} copies d'ARNs viraux avec tous les pathotypes simplement inoculés (Figure 29). Chez cette variété, la charge virale la plus élevée a été obtenue avec l'isolat Ng140 (10^{12} copies) et la plus faible avec l'isolat Ng161 (10^{11} copies).

10. 2. Comportement des pathotypes (T et E) de RYMV en infections simples

Le tableau XXXI résume les résultats de l'interaction pathotype / genotype de riz lors des inoculations simples des pathotypes (T et E) aux variétés IR64 et Tog5673.

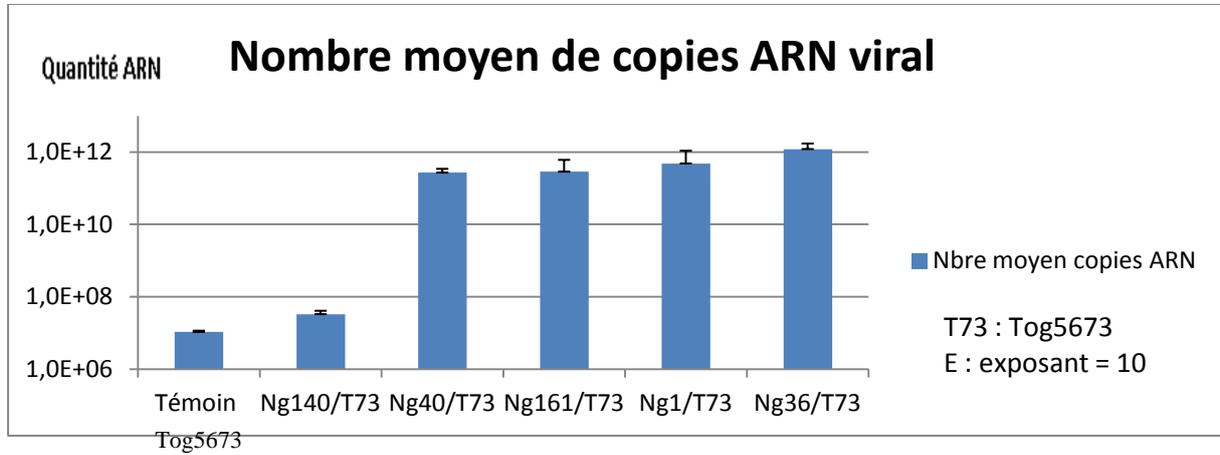


Figure 28 : Quantité moyenne d'ARN produits par pathotype de RYMV sur la variété de riz Tog5673

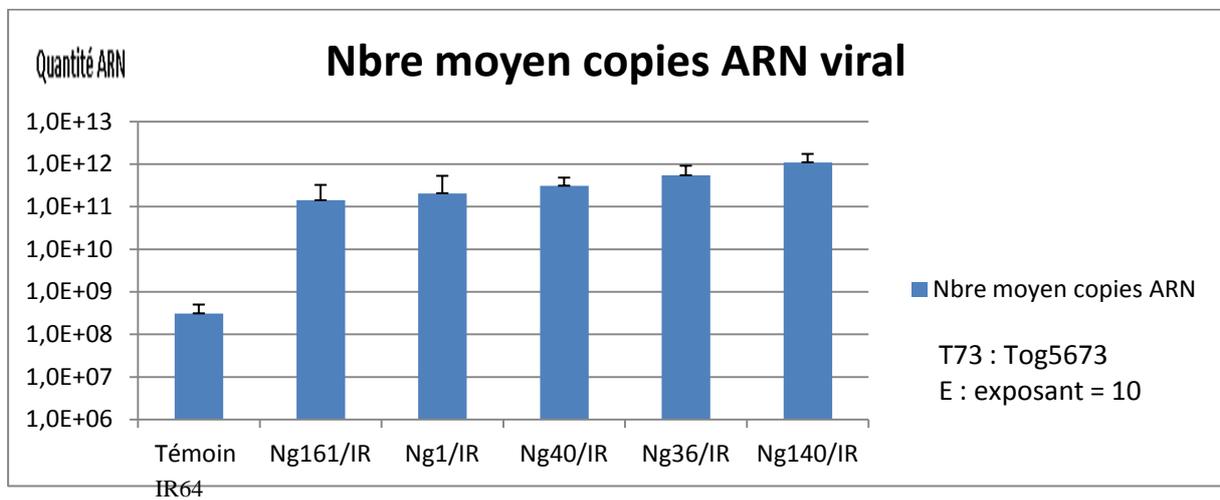


Figure 29 : Quantité moyenne d'ARN produits par pathotype de RYMV sur la variété de riz IR64

Tableau XXXI : Effet du génotype de riz sur le pathotype de RYMV en cas de simples inoculations (à 42 JAI)

Isolat	IR64		Tog5673		Fond génétique favorable**
	Score	Con. en ARNs	Score	Conc. ARNs	
Ng36 (T)	7	5,4.10 ¹¹	7	1,2.10 ^{12*}	Tog5673
Ng140 (T)	3	1,1.10 ^{12*}	1	3,3.10 ^{7*}	IR64
Ng1 (E)	7	2,1.10 ¹¹	3	4,8.10 ¹¹	IR64/ Tog5673
Ng40 (E)	7	3,1.10 ¹¹	1	2,7.10 ¹¹	IR64/ Tog5673
Ng161(E)	9	1,4.10 ¹¹	3	2,9.10 ¹¹	IR64/ Tog5673

*Valeurs significativement différentes des autres de la même colonne après comparaison multiple des moyennes à la LSD au seuil de 5%

** Combinaison du score visuel et de la charge virale.

Con. Concentration en ARNs (en nombre de copies)

JAI : jours après inoculation

L'interaction entre les pathotypes E et le génotype *O. sativa* a été très forte lorsqu'on a combiné les scores visuels et la quantité d'ARNs (plus de 10^{11} copies).

Par contre, le mécanisme d'adaptation des pathotypes T a été variable selon le fond génétique. Ainsi, le pathotype Ng36 (T) a fortement infesté l'espèce *O. glaberrima* (10^{12} copies d'ARN) tandis que le pathotype Ng140 (T) a faiblement réagi vis-à-vis du même génotype. Toutefois, le pathotype Ng140 s'est fortement accumulé dans l'espèce *O. sativa* (Tableau XXXII).

10. 3. Sélection du pathotype (T ou E) par le fond génétique de riz co-inoculé

L'analyse des séquences d'acides aminés de la VPg (électrophorégrammes et séquences consensus) des couples de pathotype en infection mixte a été utilisée pour identifier le pathotype sélectionné dans chaque cas, selon le fond génétique de riz co-inoculé (Tableau XXXII).

Dans le fond génétique *O. sativa*, le pathotype E a été majoritairement sélectionné (dans 10 / 15 cas) au détriment du pathotype T (Tableau XXXII). En effet, le pathotype E a été absolument sélectionné dans plus de la moitié des infections mixtes T/E de la variété IR64 alors que dans le tiers des cas, c'est l'un ou l'autre pathotype qui a été sélectionné (cas des couples Ng36 (T) /Ng40 (E) et Ng140 (T) /Ng1 à E). Cependant, dans le couple mixte Ng140/ Ng161, le pathotype T (Ng140) a été sélectionné dans 2 / 3 cas d'infections mixtes de la variété IR64.

Dans le fond génétique *O. glaberrima*, les résultats ont été variables selon les couples de pathotypes. Par exemple dans les couples Ng140 (T) /Ng1 (E), Ng140 (T) /Ng40 (E), aucun des pathotypes co-inoculé n'a pu se multiplier sur la variété Tog5673. Le pathotype Ng36 (T) a été absolument sélectionné dans toutes les infections mixtes de variété Tog5673. Cependant, dans l'interaction Ng140 (T) / Ng161 (E) / Tog5673, le pathotype Ng140 (T) a été tantôt sélectionné tantôt contre sélectionné vis-à-vis du pathotype E. Ainsi, dans 5 / 7 cas d'inefctions mixtes, le pathotype T (Ng140) a été sélectionné au détriment du pathotype E (Ng161), alors même qu'en simple inoculation cet isolat a été incapable de s'adapter à la variété Tog5673. Parallèlement, le pathotype T (Ng140) a été contre sélectionné dans 2 / 7 cas de co-inoculations, en faveur du pathotype E (Ng161).

Tableau XXXII : Sélection des pathotypes (T et E) par les génotypes de riz à 60 JAI

Couple (T/ E)	IR64 (Plants testés)		Tog5673 (Plants testés)		Sélection pathotype	
	E	T	E	T	IR64	Tog5673
Ng140/Ng1	1	2	-	-	1E vs 2T	0 pathotypes
Ng140/Ng40	2	0	-	-	E	0 pathotypes
Ng140/Ng161	1	2	2	5	1E vs 2T	2E vs 5T
Ng36/Ng1	3	0	0	2	E	T
Ng36/Ng40	1	1	0	2	1E vs 1T	T
Ng36/Ng161	2	0	0	3	E	T

NB : Les chiffres 0, 1, 2, 3 et 5 indiquent le nombre de plants testés

10. 4. Mécanisme (s) d'adaptation des pathotypes T et E aux fonds génétiques de riz

Les pathotypes T et E se différencient génétiquement au niveau de l'acide aminé 49 de leur VPg. Les pathotypes T en portent une Thréonine et les E un Acide glutamique (Tableau XXIX). L'estimation des chances de sélection d'un pathotypes (T ou E) du RYMV-Niger par l'un ou l'autre des deux fonds génétiques de riz (Tableau XXXII) a confirmé les résultats fournis par la notation des symptômes et la quantification de l'ARN viral (Figures 26, 27, 28 et 29).

En infection mixte, le comportement des pathotypes vis-à-vis des génotypes a varié en fonction du fond génétique et de la génétique du pathotype. Ainsi, tous les pathotypes E évalués (excepté l'isolat Ng161) ont été majoritairement sélectionnés dans le fond génétiques *O. sativa* au détriment des pathotypes T, tandis que dans le fond génétique *O. glaberrima*, les pathotypes E ont été quasiment tous contre sélectionnés en faveur des pathotypes T.

Dans le fond génétique *O. glaberrima*, le pathotype Ng36 (T) a été absolument sélectionné, pendant que dans le fond génétique *O. sativa* le pathotype Ng140 (T) a été sélectionné dans 5 / 7 cas d'infections mixtes au détriment du pathotype Ng161 (E). Parallèlement, le pathotype Ng140 (T) a été contre sélectionné dans 2 / 7 cas de co-inoculations de l'espèce *O. glaberrima* en faveur du pathotype Ng161 (E). Cependant, dans les interactions Ng140 (T) / Ng1 (E) / Tog5673 et Ng140 (T) / Ng40 (E) / Tog5673 aucun des pathotypes co-inoculés n'a été amplifié.

Conclusion partielle

Les résultats des infections simples et mixtes ont montré que l'adaptation du RYMV au riz est déterminée par l'acide aminé 49 de la VPg virale. Ainsi, la présence de cet acide aminé a induit l'adaptation des pathotypes T et E au fond génétique *O. glaberrima*. En effet, le fond génétique *O. glaberrima* a majoritairement sélectionné les pathotypes T au détriment des pathotypes E. Toutefois, le couple de pathotype Ng140 (T) / Ng161 (E) a présenté un comportement atypique vis-à-vis du fond génétique *O. glaberrima*.

4^e PARTIE : DISCUSSION

EPIDÉMIOLOGIE DE LA PANACHURE JAUNE DU RIZ AU SEIN DES PERIMETRES IRRIGUES DU NIGER

Fréquence des géotypes cultivés sur les périmètres prospectés

Seules quatre variétés de riz (IR1529-683-1, Bassiroumo, WITA8 et Kassoumo) sont principalement cultivées. Par conséquent, il a été confirmé une étroitesse de la base génétique du matériel vulgarisé (Sy et Séré 2001), ayant rendu la culture vulnérable à la maladie dès lors que les conditions propices (présence de réservoirs infectieux et une pullulation d'insectes vecteurs) à l'infection apparaissaient.

La présence de nombreux vecteurs et d'hôtes réservoirs ont favorisé à la fois l'augmentation de la quantité d'inoculum et sa diffusion dans l'environnement rizicole, ce qui a entraîné l'infection d'un grand nombre de parcelles. La contamination proviendrait en grande partie des repousses de riz contaminées non détruites et des hôtes alternatifs qui servaient de source d'inoculum (Fargette *et al.*, 2008). L'inoculum a été propagé lors des opérations culturales et d'irrigation (Bakker, 1974 ; Abo *et al.*, 2000 ; Nwilene *et al.* 1999) et la fréquence des épidémies de panachure jaunes a été souvent liée à la forte pression des vecteurs (Thresh *et al.* , 1991).

Distribution géographique et importance de la panachure jaune du riz au Niger

Les travaux de Reckhaus et Adamou (1986) avaient montré que la panachure jaune du riz était présente dans quelques périmètres irrigués du Niger. Notre étude a indiqué que la maladie est présente dans tous les périmètres rizicoles. La panachure jaune a été observée aussi bien sur le riz cultivé que sur le riz sauvage ainsi que chez de nombreuses Graminées adventices. L'incidence de la maladie au Niger a varié entre 5 et 90 %, avec toutefois des niveaux d'infestation variables selon les périmètres. Les variétés de riz les plus populaires, Bassiroumo et IR1529-683-1 ont été les plus infestées. Des périmètres comme Kirkissoye, Liboré, Sébéri et Yelwani ont été fortement infectés avec des incidences de 60 à 90 % alors que d'autres ont présenté des niveaux d'infestation n'ayant guère excédé 30 %. A l'exception du périmètre de N'dounga 1, les périmètres les moins infestés sont situés en zone Nord Sahélienne et les plus infestés en zone sahélienne et sud sahélienne, ce qui a indiqué d'une part que les conditions climatiques de culture pourraient influencer le développement de la

panachure jaune du riz et d'autre part que les conditions sèches ont été peu favorables à l'infection. Du reste, l'incidence de la panachure jaune a été plus importante en saison humide qu'en campagne rizicole sèche.

L'importance de la maladie en saison humide s'expliquerait d'une part par la grande pullulation des vecteurs à cette période suite à l'amélioration des conditions climatiques et alimentaires et d'autre part par la présence massive des sources d'inoculum (hôtes réservoirs et autres). Par contre, en campagne sèche, la faible présence des insectes vecteurs et des hôtes réservoirs, due à la détérioration des conditions de l'habitat, limiterait considérablement la masse d'inoculum et son transfert ainsi que la propagation de la maladie au champ. Des résultats similaires ont été discutés par N'guessan *et al.* (2001).

Les baisses de rendements dues à la panachure jaune du riz ont été très importantes (plus de 70 %), mais variables selon les sites. Le taux des pertes de récoltes enregistrées a été différent de celui rapporté par Reckhaus et Adamou (1986) qui n'excédait pas 56 %. Les pertes de récoltes ont été enregistrées en campagne humide où l'incidence de la panachure jaune du riz a été très élevée. Le taux élevé des pertes de production serait également lié à la variété cultivée, car les principales variétés emblavées ont été toutes sensibles à la maladie. Par exemple, la variété WITA 8 créée par l'ADRAO au Nigeria était connue pour avoir une tolérance à la maladie (Anonyme 3, 2001). Elle fut introduite au Niger suite aux explosions épidémiques de panachure jaune du riz des années 1990 (Sido, 1999). Cependant, en présence d'une forte infection elle a présenté des dégâts importants comme en ont témoigné nos résultats. Ainsi, les périmètres rizicoles de Kirkissoye, Saga, Liboré, Kollo, Sébéri et Yelwani emblavés avec la variété WITA 8 ont été fortement infestés.

Hôtes réservoirs du RYMV au Niger

Parmi les 10 espèces d'adventices hôtes réservoirs du RYYMV identifiées, seule *Eleusine indica* a déjà été signalée comme hôte du virus dans l'environnement du Niger (Fauquet et Thouvenel, 1977). Les autres espèces y ont été nouvellement rapportées. Elles ont toutefois été retenues dans d'autres pays endémiques d'Afrique de l'Ouest (Tchad, Burkina, Mali, Nigéria, Côte d'Ivoire) comme porteuses du virus (Konaté *et al.*, 1997 ; Abo *et al.*, 2000 ; N'guessan *et al.*, 2001 ; Sarra *et al.*, 2004).

Les adventices présentes de façon permanente sur les sites à la faveur de l'irrigation servent de réservoir potentiel au RYMV (Thresh *et al.*, 1991 ; Kouassi *et al.*, 2005). Le

schéma de contamination à partir des repousses de riz infectées a été ci-dessus expliqué. Un schéma analogue de propagation du RYMV a été aussi proposé dans différentes écologies rizicoles d'Afrique de l'Ouest, notamment, au Burkina Faso et au Mali (Sarra *et al.*, 2004 ; Traoré *et al.*, 2006 a ; Traoré *et al.*, 2009). Des études antérieures ont attesté du rôle prépondérant d'hôtes alternatifs joué par les Graminées adventices et le riz sauvage en inter campagne (Bakker, 1971 ; Allarangaye *et al.*, 2006). En effet, le RYMV se réfugiait dans les adventices en l'absence de riz cultivé. Un dispositif de lutte intégrée devrait alors s'orienter vers la réduction du réservoir infectieux d'autant plus que les travaux de Sorho *et al.*, (2005) ont indiqué que la pression virale est un des facteurs favorisant l'émergence d'isolats contournant la résistance du riz à la panachure jaune.

Structure des populations du RYMV au Niger

La caractérisation biologique préliminaire du RYMV-Niger a révélé trois grands groupes d'isolats. Cette pré-labellisation des isolats a indiqué la présence d'isolats contournant la résistance élevée de Tog5681 et/ou de Giganté (TETE) dans l'écologie rizicole du Niger. Ainsi, l'existence d'isolats de contournement de la résistance du riz a été établie. En limitant le seuil de sévérité à la note 5, environ 14,9 % des isolats identifiés ont surmonté les allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv1-3* (contre 33,9 % avec un seuil situé à la note 3). Ces résultats ont été en faveur de l'apparition de variants virulents du RYMV au Niger.

Les isolats de contournement de la résistance (isolats RB) apparaissent de plus en plus dans les écologies africaines. Leur avènement a été signalé aussi bien dans les conditions naturelles (Konaté *et al.*, 1997) qu'au laboratoire à partir d'inoculations successives d'un isolat sauvage à des variétés résistantes (Fargette *et al.*, 2002 ; Sorho *et al.*, 2005). Aussi, l'existence des isolats contournants dans divers environnements rizicoles d'Afrique de l'Ouest, du Centre et de l'Est (Traoré *et al.*, 2006b ; Rakotamalala *et al.*, 2008) constitue un nouveau défi aux programmes de lutte contre la panachure jaune du riz.

Des isolats RYMV de profils particuliers ont également été identifiés. La réaction des isolats « ELISA négatifs » mais pathogènes sur les variétés sensibles suggère que la quantité du virus n'a pas atteint un seuil sérologiquement détectable mais elle est restée infectieuse. Un tel comportement a été rapporté chez les Graminées adventices par Sorho *et al.*, (2005). Cette pathogénie particulière non révélée par ELISA pourrait aussi indiquer une

inadaptation de l'anticorps utilisé. La réaction des isolats « ELISA positifs et non pathogènes » supposerait qu'ils n'ont pas été suffisamment agressifs sur les variétés sensibles. Des résultats similaires ont été rapportés par N'guessan *et al.*, (2001) et Lecomte *et al.*, (1993). Les isolats à pathogénie particulière pourraient déclencher une propagation étendue de la panachure jaune, car ils échapperaient facilement aux contrôles prophylactiques habituels (détection des symptômes et arrachage des plants infectés etc.). Aussi, la pathogénicité sur l'une ou l'autre des variétés sensibles pourrait indiquer une différence de comportement entre Bouake 189 et IR64 vis-à-vis des isolats du RYMV-Niger.

La pathogénie du RYMV, notamment celle des isolats particuliers demeure à être élucidée, afin de mieux comprendre son déterminisme. En effet, la possibilité d'échappement lors de l'inoculation devrait être écartée dans la mesure où toutes les feuilles des plants de riz ont été inoculées par la même solution virale.

VARIABILITE GENETIQUE ET BIOLOGIQUE DU RICE YELLOW MOTTLE VIRUS (RYMV) AU NIGER

Variabilité génétique du RYMV-Niger

La caractérisation sérologique préliminaire avec les Pabs (anticorps polyclonaux) a permis de classer les isolats du virus en deux grands groupes sérologiques Sg1 et Sg2 ayant 2 à 3 sous-groupes chacun. Les 2 sérogroupes sont répartis dans tout l'espace rizicole du Niger, ce qui indique une diversité sérologique du RYMV dans les rizières du Niger. Toutefois, le virus est sérologiquement peu variable dans certains sites rizières car ils n'ont été occupés que par un seul séro groupe. L'existence de deux sérogroupes Sg1 et Sg2 a été rapportée au sahel par Séré *et al.*, 2005 et Séré *et al.*, 2007. Les Pabs ont discriminé les isolats du RYMV aux propriétés sérologiques contrastées et provenant de plusieurs écologies rizières d'Afrique (Mansours et Baillis, 1994 ; Konaté *et al.*, 1997 ; Nguessan *et al.*, 2000). Cependant, ils n'ont pas permis de préciser les sérotypes du virus.

Les anticorps monoclonaux (Mabs) très spécifiques ont été plus précis dans la détection du RYMV. Ils ont révélé les différentes souches du virus présentes dans les différentes écologies rizières d'Afrique. En effet, il existe des sites antigéniques spécifiques détectables par les Mabs sur la coque protéique du virus (Nguessan *et al.* 2000). Ces sites antigéniques ont servi à définir de véritables signatures moléculaires qui discriminent les

isolats du virus en souches : (i) S1, S2 et S3 caractéristiques de l'Afrique de l'Ouest (Nguessan *et al.*, 2000), (ii) S1-AC typique de l'Afrique Centrale (Traoré *et al.*, 2001 ; Traoré *et al.*, 2005), (iii) S4, S5 et S6 spécifiques à l'Afrique de l'Est (Fargette *et al.* 2004 ; Traoré *et al.*, 2005).

Le typage sérologique du RYMV-Niger avec les Mabs a montré qu'il est sérologiquement homogène, donc peu diversifié dans les zones rizicoles du pays, ce qui est en désaccord avec les résultats obtenus avec les Pabs. Le RYMV-Niger est de sérotype S1-AC. Ce sérotype a aussi été identifié au Burkina Faso et au Mali, en zone soudano-sahélienne (Konaté *et al.* 1997) ainsi que la zone de savane de la Côte d'Ivoire et en Afrique Centrale, notamment au Tchad et au Cameroun (Nguessan *et al.* 2000 ; Traoré *et al.*, (2005). L'existence de cette souche au Niger avait d'abord été suspectée par Traoré *et al.*, (2005) sur la base des résultats sérologiques (avec Mabs) de six isolats nigériens du virus puis par Issaka *et al.* (2006), à partir d'une vingtaine d'isolats. Nos résultats ont eu l'avantage de couvrir la diversité géographique du RYMV au Niger, car ils ont concerné tous les 30 périmètres rizicoles bordant le fleuve Niger dans l'Ouest du pays.

Les propriétés moléculaires de la protéine de capsid des isolats testés ont affiné les résultats sérologiques obtenus. Elles ont confirmé l'appartenance des isolats RYMV-Niger au sérotype S1-AC et à la lignée S1-AOC décrite par Traoré *et al.*, (2005) ; la lignée S1-AOC étant une souche qui a une large distribution en Afrique de l'Ouest et du Centre. Le RYMV-Niger présente donc une faible variabilité sérologique. Par contre, au plan génétique, il est très diversifié car représenté par trois clades distincts du virus : (i) le clade S1-AOC du Dahomey gap majoritaire et représenté par les isolats de RYMV de l'Ouest du Niger, (ii) le clade S1-AOC Afrique Centrale typique dont sont affiliés les isolats de l'Est du Niger et (iii) le clade S1-AOC Nigéria qui est parent de l'isolat Ng161 de l'Ouest du Niger.

La présence des deux premiers clades (S1-AOC Dahomey Gap et S1-AOC Afrique Centrale typique) en Afrique Ouest Centrale a été rapportée par Traoré *et al.*, (2005) ; ces auteurs ayant regroupé les isolats RYMV du Niger dans le seul clade S1-AOC Dahomey gap. Nos résultats ont montré que la souche RYMV-Niger est structurée en trois clades distincts dont deux cohabitent à l'Ouest (les clades S1-AOC Dahomey Gap et S1-AOC Nigéria) et un seul clade (le clade S1-AOC Afrique Centrale typique) est présent dans les rizières de l'Est du Niger. Ils ont révélé une grande variabilité phylogéographique du virus dans l'espace rizicole du Niger. Aussi, l'appartenance de l'isolat Ng161 de l'Ouest du Niger au clade S1-AOC Nigéria et la filiation entre les isolats de l'Est du Niger, de l'Est du Nigéria et de l'Ouest du

Cameroun ont témoigné d'une probable circulation des souches en Afrique de l'Ouest et du Centre. La circulation des souches du virus a été suggérée par Ndikumana *et al.*, (2011) qui ont observé la présence de la souche S4-Lac victoria (originnaire de la Tanzanie) au Congo et Burundi voisins. Cette circulation des souches est encore plus marquée au Rwanda où chevauchent les souches S4-Lac victoria et S4-Lac malawi (originnaire aussi de la Tanzanie).

Nos résultats ont complété l'étude de la phylogénie du virus au Niger, en rapportant la présence de deux clades nouveaux de la lignée S1-AOC non encore répertoriés dans ce pays. En effet, une étude antérieure sur la phylogénie du virus en Afrique de l'Ouest ayant inclus trois isolats du Niger (Traoré *et al.*, 2005) a souligné une faible variabilité phylogénétique chez le RYMV-Niger et a uniquement fait cas de l'existence du clade S1-AOC du « Dahomey Gap » initialement appelé lignée S1-AC Dahomey Gap.

Variabilité biologique du RYMV dans les rizières du Niger.

La population du RYMV-Niger est structuré en quatre groupes pathologiques distincts. Deux à trois pathogroupes d'isolats du virus ont initialement été signalée dans l'environnement de plusieurs pays ouest africains (Konaté *et al.*, 1997 ; Nguessan *et al.*, 2001 ; Ndjondjop *et al.* 2001, Ioanidou *et al.*, 2000). Nos résultats ont rapporté l'existence d'environ 20 % d'isolats de contournement de résistance, d'une forte proportion d'isolats non contournants à pathogénie variable (plus de 70 %) et de quelques isolats à pathogénie particulière (< 10 %). La fréquence des isolats sauvages dans l'écologie rizicole du Niger est en accord avec la plupart des travaux de pathogénie réalisés dans la sous-région (Sorho *et al.*, 2005 et 2006 ; Amancho *et al.*, 2009), ces travaux ayant fait cas de la grande dispersion des isolats non-contournants. Le taux élevé d'isolats non contournants justifierait d'ailleurs pourquoi le contrôle du RYMV pourrait se baser sur l'utilisation des sources de résistance.

Les variétés de riz Giganté et Tog5681 ont mieux résisté à la souche RYMV-Niger tandis que toutes les autres variétés de riz testées sont sensibles à hautement sensibles. Les variétés de riz Giganté et Tog5681 résistantes à la majorité des isolats RYMV du Niger pourraient donc être des candidates potentielles dans le contrôle de la virose au champ. En effet, les allèles *rymv1-2* *rymv1-3*, *rymv 1-4* et *rymv 1-5* du gène RYMV1, respectivement des variétés Giganté (TETE), Tog5681, Tog5672 et Tog5674 ainsi que le gène RYMV2 de Tog7691 (et 5472) ont été efficaces contre plusieurs souches de RYMV (Albar *et al.*, 2006 ; Rakotamalala *et al.*, 2008 ; Hébrard *et al.*, 2009 ; Thiémélé *et al.*, 2010). Ces sources de

résistance sont exploitées dans la lutte variétale et transgénique contre la panachure jaune du riz en Afrique (Ndjiondjop *et al.*, 2001 ; Sorho *et al.* 2005).

Le contournement de la résistance élevée du riz au RYMV a été initialement observé avec des isolats sauvages (Konaté *et al.*, 1997). Il a aussi été obtenu suite à des inoculations successives au laboratoire par un isolat sauvage avirulent (Fargette *et al.* 2002 ; Hébrard *et al.*, 2006). Par la suite, leur présence dans les différentes écologies rizicoles d'Afrique de l'Ouest et du Centre a été rapportée par Traoré *et al.* (2006 b). Récemment encore l'existence de ce type d'isolats a été constatée en Afrique de l'Est, à Madagascar par Rakotomalala *et al.*, (2008).

L'hypothèse de l'existence des isolats du RYMV contournant les allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* dans l'environnement rizicole du Niger précédemment avancée (Issaka *et al.* 2012) a été prouvée dans cette étude. Tous les variants d'isolats contournants y étaient présents, dans des proportions variables selon les sites. La distribution des pathotypes du virus a indiqué que les isolats contournants cohabitaient avec de nombreux autres isolats avirulents dans plusieurs périmètres (30 % des sites), ce qui a révélé une grande diversité pathologique du RYMV-Niger et a suggéré une large distribution des isolats contournants. Ces résultats corroborent aussi l'hypothèse de Issaka *et al.*, (2012). Ces auteurs suggèrent, sur la base d'un pré-cribleage de quatre variétés de riz (IR64, Bouaké 189, Giganté et Tog 5681) avec une gamme d'isolats RYMV du Niger, la variabilité biologique du virus au Niger, avec prévalence d'isolats RB. La proportion des isolats contournants obtenus dans notre étude a été relativement similaire aux taux de prévalence rapportés dans des études récentes réalisées en Afrique de l'Ouest et du Centre, ayant fait cas de 16,5 % (Traoré *et al.*, 2006 b) et 20 % (Allarangaye *et al.*, 2006) d'isolats contournants symptomatiques. Les isolats contournants pourraient par leur présence affecter l'utilisation des gènes de résistance dans les zones qu'ils colonisent. Ainsi, l'évaluation de leur distribution aidera-t-il à conseiller les utilisateurs sur le déploiement des gènes de résistance à la maladie. Nos résultats fournissent une base de données pour le screening de la collection nationale (Sow *et al.*, 2012, résultats non publiés) et sous régionale de riz, en vue de l'identification d'autres sources variétales tolérantes ou résistantes. Celles-ci serviront de modèles dans la lutte variétale et le développement de nouvelles lignées isogéniques résistantes à la maladie et ayant de grandes performances agronomiques.

En outre, l'existence d'un sous-groupe d'isolats particuliers qui n'ont infecté que certaines variétés de riz sensibles dont les plus vulgarisées au Niger suggère une tolérance des génotypes sensibles ou une incapacité des isolats à les agresser. La présence d'isolats non

pathogènes sur IR64 et leur absence sur Bouaké 189 ou vice-versa a déjà été suspectée par Issaka *et al.* (2012). Cette tolérance a été élargie aux variétés de riz hautement sensibles emblavées au Niger.

Les isolats à pathogénie particulière devraient être pris en compte, car ils pourraient être des sources passives de contamination. Leur inaptitude à l'infection ou la tolérance des génotypes de riz concernés pourrait être due à leur récent avènement dans les rizières ou à un déterminisme physiologique particulier qui caractériserait lesdits génotypes. Cette situation a indiqué que les isolats de RYMV n'ont pas développé de réactions de compatibilité avec ces variétés de riz ou que celles-ci ont présenté des aptitudes physiologiques leur ayant permis de supprimer les réactions compatibles. Si cette hypothèse est confirmée, il serait alors nécessaire de vérifier si les réactions d'incompatibilité ont été liées à la recombinaison entre pathotypes coexistant de RYMV (Pinel *et al.* 2009) ayant conduit à l'avènement d'une souche virale avirulente ou à un phénomène de suppression post-transcriptionnelle de type "silencing" (Siré *et al.*, 2008). Les phénomènes de recombinaison ont aussi été rapportés chez quelques souches de geminivirus qui infectaient le manioc (Pita *et al.*, 2001). Les résultats ont montré l'avènement d'une nouvelle souche du virus de la mosaïque du manioc, ayant une grande homologie avec les fragments d'ADN des deux souches recombinées. Les auteurs ont aussi prouvé l'existence d'une synergie entre les souches ; cette synergie ayant conduit à des symptômes plus sévères de la maladie.

DETERMINISME GENETIQUE ET MOLECULAIRE DE LA PATHOGENIE ET DU CONTOURNEMENT DES ALLELES *rymv1-2* ET *rymv1-3* AU NIGER

Déterminisme génétique de la pathogénie du RYMV-Niger et distribution des pathotypes

Les isolats sauvages de RYMV (isolats non mutés) originaires du Niger diffèrent génétiquement par l'acide aminé 49 de la VPg. En effet, l'acide aminé 49 de la VPg des isolats du RYMV les discrimine en pathotypes T et E, selon que ledit acide aminé est une Thréonine ou un acide glutamique. Il s'agit du polymorphisme T et E selon l'origine géographique de l'isolat, rapporté par Pinel *et al.*, (2007). Ce polymorphisme a indiqué que les isolats RYMV d'Afrique de l'Est sont à E (pathotype E) et ceux d'Afrique de l'Ouest à T

(pathotype T) et à E. Les isolats à E et à T sont respectivement prédisposés à contourner la résistance élevée des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* (Pinel *et al.*, 2007 ; Traoré *et al.*, 2010). Parmi les pathotypes T, il existe un sous-groupe d'isolats surnommés T' qui a l'aptitude génétique de contourner à la fois les allèles *rymv1-2* et *rymv1-3*.

La répartition géographique des pathotypes E et T de RYMV a été étroitement associée au polymorphisme de l'acide aminé 49 de la VPg qui paraissait sous sélection diversificatrice (Pinel *et al.*, 2007 ; Poulicard *et al.*, 2010). Cet acide aminé serait à la base de l'adaptation et de la diversité pathologique du virus sur le continent. Dans l'écologie rizicole de l'Ouest du Niger, les pathotypes E numériquement minoritaires (30 % des isolats) cohabitent avec les pathotypes T majoritaires (70 %). Cependant dans les rizières de l'Est du Niger, seuls les pathotypes E sont présents.

Nos résultats ont confirmé le déterminisme génétique de la pathogénie lié à l'acide aminé 49 de la VPg du RYMV (Pinel *et al.*, 2007). Ils ont révélé la présence des pathotypes E dans les rizières du Niger, ce qui est nouveau par rapport aux résultats de Traoré *et al.*, (résultats non publiés) qui ont uniquement indiqué la présence des pathotypes T dans cette écologie. Toutefois, ces résultats n'ont porté que sur la séquence de VPg des isolats de quelques sites rizières seulement. Alors que nos résultats ont couvert la diversité géographique du virus au Niger, ce qui a permis de caractériser une large gamme d'isolats représentatifs de ladite diversité.

La distribution des deux pathotypes dans l'espace rizicole du pays a montré d'une part qu'ils cohabitent dans l'écologie de l'Ouest du Niger et d'autre part que les rizières de l'Est du pays étaient exclusivement colonisées par les pathotypes E. Toutefois, notre échantillonnage à l'Est du Niger est limité alors que celui effectué à l'Ouest concerne une large gamme d'isolats. La présence exclusive des pathotypes E à l'Est du Niger montre un déterminisme génétique proche de celui des isolats d'Afrique Centrale (Tchad, Cameroun) et de l'Est (Fargette *et al.*, résultats non publiés), ce qui indique une inadaptation des souches à T dans ces environnements rizières.

Les rizières de l'Est du Niger ainsi que celles d'Afrique centrale ont été caractérisées par la culture intensive des variétés *O. sativa* qui serait favorables au maintien des pathotypes E. La grande diversité pathogénique du virus à l'Ouest avec cohabitation des deux pathotypes pourrait s'expliquer par la culture des deux variétés de riz (Traoré *et al.*, 2010). Le maintien ou le changement de l'acide aminé 49 de la VPg aurait permis à un pathotype de s'adapter préférentiellement à l'une ou l'autre des deux variétés. La connaissance de la répartition

spatiale et de l'aptitude génétique des pathotypes T et E du RYMV au contournement de la résistance du riz sera utilisée pour préparer le déploiement des allèles de résistance du gène RYMV1 dans l'écologie du Niger. L'allèle *rymv1-3* pourrait être conseillé pour l'Est du Niger, alors qu'à l'Ouest la présence des deux pathotypes imposera de procéder au cas par cas selon les sites dans l'utilisation des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3*.

Le polymorphisme T et E de l'acide aminé 49 de la VPg des isolats sauvages a toujours été accompagné par la présence de l'arginine en position 48, quel que soit le pathotype considéré. La position 50 de la VPg est occupée soit par la lysine (K) soit par l'arginine (R), respectivement pour les pathotypes T et E. Cependant, nos résultats ont révélé que l'isolat Ng84 (pathotype T) a présenté une arginine (R) à la place de la lysine (K), en position 50 de sa VPg, ce qui constitue une nouveauté dans le déterminisme génétique de la pathogénie. Toutefois, l'arginine et la lysine sont deux acides aminés aux propriétés chimiques très proches (acides aminés basiques). Le changement survenu serait alors proche d'un changement neutre. Néanmoins, le rôle de ce changement d'acide aminé dans la capacité d'adaptation et la pathogénie de l'isolat concerné mérite d'être précisé ; la présence de l'arginine (en position 50 de la VPg) chez cet isolat Ng84 pouvant lui conférer un avantage pathologique et/ou sélectif.

La présence de la thréonine ou de l'acide glutamique en 49 a influencé la fixation des mutations de contournement des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* (Pinel *et al.*, 2007 ; Hébrard *et al.*, 2008). La présence de la thréonine en 49 (T49) favorise le contournement de l'allèle *rymv1-3* par fixation de mutations spécifiques de contournement aux codons 41 et/ou 52 de la VPg. Quant à la présence de l'acide glutamique à la même position (E49), elle conditionne la fixation des mutations de contournement de l'allèle *rymv1-2* au codon 48 et rarement au codon 43 de la même protéine virale (Pinel *et al.*, 2007 ; Traoré *et al.*, 2010). Aucun isolat à E du Niger n'a surmonté l'allèle *rymv1-3*, ce qui prouve l'incapacité génétique des pathotypes E à contourner ledit allèle. Les pathotypes E ont seulement surmonté la résistance de l'allèle *rymv1-2*. Par contre les isolats à T, ont été les seuls pathotypes capables de surmonter la résistance de l'allèle *rymv1-3* et parmi eux les pathotypes T' contournent à la fois la résistance des allèles *rymv1-3* et *rymv1-2*. Des résultats semblables ont été obtenus par Traoré *et al.*, (2010).

Déterminisme génétique et moléculaire du contournement de la résistance des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* au Niger

Les mutations associées à la virulence vis-à-vis des allèles de résistance du gène RYMV1 ont été localisées sur une portion de 15 acides aminés de la polyprotéine P2a (de l'ORF2a) renfermant les séquences de la protéase et du domaine central de la VPg. Elles sont liées à 5 sites du domaine central de la VPg (Pinel *et al.*, 2007). Le contournement de la résistance du riz par le RYMV contrairement à celui des potyvirus (Robaglia et Caranta., 2006) a été lié à un rétablissement de l'interaction compatible entre la VPg de l'isolat contournant du virus et le facteur eIF (iso) 4 G de la variété résistante de riz codé par le gène RYMV1. La séquence des évènements est la suivante :

- (i) interaction compatible entre isolat sauvage avirulent et variété sensible de riz ;
- (ii) interaction incompatible entre isolat sauvage avirulent et variété résistante de riz ;
- (iii) interaction compatible entre isolat contournant et variété résistante de riz
(Hébrard *et al.*, 2010).

L'interaction entre la VPg et le facteur eIF (iso) 4 G se traduit par la relation site à site entre l'acide aminé 48 ou 52 de la VPg de l'isolat contournant et le codon 309 (acide aminé 309) du facteur eIF (iso) 4 G de la variété résistante de riz (Albar *et al.*, 2006 ; Hébrard *et al.*, 2008). En effet, les interactions E48-K309 et Y52-K309 ont permis de restaurer la compatibilité entre la VPg des isolats RB et le facteur eIF (iso) 4 G des variétés résistantes, ayant respectivement l'allèle *rymv1-2* (Giganté et Bekarossaka) et *rymv1-3* (Tog5681). Il existe aussi une interaction compatible entre l'acide aminé R48 ou H52 de la VPg des isolats sauvages et le codon E309 du facteur eIF (iso) 4 G des variétés sensibles. Le contournement implique donc une interaction compatible entre les acides aminés basiques (R48 et H52) et l'acide aminé acide (E309).

Les résultats de l'évaluation moléculaire des isolats du RYMV-Niger ont confirmé les résultats du contournement de la résistance des allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* (20 % d'isolats RB) ainsi que la proportion de sites rizicoles affectés (25 % de sites) obtenus lors du typage biologique. Ils ont montré que la quasi-totalité des isolats contournants inventoriés appartient au pathotype T. Un seul isolat à E (Ng 40) et 2 isolats à T (Ng36 et Ng69) ont été virulents vis-à-vis de l'allèle *rymv1-2*, ce qui indique une faible capacité des isolats RYMV

du Niger à infecter la variété Giganté. Ces résultats sont en accord avec ceux de Poulicard *et al.*, (2010).

Les mutations R48E, R48W et T43A de la VPg ont été les seules signatures moléculaires du contournement de l'allèle *rymvI-2* de la variété Giganté dans l'écologie du Niger. La fixation de E48 a été spécifique et déterminante dans l'aptitude de contournement de l'isolat Ng40 (E). Le contournement de l'allèle *rymvI-2* est lié d'une part, à la fixation du Tryptophane en position 48 de la VPg des pathotypes T (Ng69 et Ng101) et d'autre part à la mutation T43A (pathotypes T', Ng36). Des différences d'aptitudes de contournement de l'allèle *rymvI-2* chez les isolats de pathotypes E et T ont été observées. Les isolats à E et à T ont suivi respectivement les voies mutationnelles I (des transitions arginine (R) / glycine (G) /acide glutamique-E) et III (transversion arginine (R) /tryptophane-W) proposées par Pinel *et al.*, (2007). Aucun isolat du RYMV-Niger, même le pathotype à E (Ng40) virulent sur Giganté n'a emprunté la voie mutationnelle II (transversions R/I/V), moins fréquente. De même, les pathotypes à T n'ont pas suivi la voie I. Ces résultats renforcent l'existence de voies mutationnelles spécifiques au pathotype rapportée par Pinel *et al.*, (2007).

Dans l'écologie rizicole du Niger, l'allèle *rymvI-3* a été uniquement contourné par les isolats à T. Quelques uns de ces isolats à T ont aussi surmonté la résistance de l'allèle *rymvI-2*. Le mécanisme de contournement de ce dernier a été analogue à celui des souches S2/S3 d'Afrique de l'Ouest (Pinel *et al.*, 2007) alors même que ces souches sont absentes de l'écologie du Niger. Aussi, aucun isolat virulent de cet environnement n'a fixé de mutation caractéristique de la souche S1 (glycine, glutamate ou isoleucine en 48). Le mécanisme du contournement ne serait donc pas fonction de la phylogénie du virus.

Avec plus de 7 % d'isolats virulents RB-Giganté, la proportion des isolats contournant l'allèle *rymvI-2* est similaire à celle obtenue lors du typage biologique des souches du RYMV- Niger (Chapitre 8). Cette proportion est proche du taux de contournement du même allèle obtenu par Pinel *et al.*, (2007) faisant cas de 9 % d'isolats RB-Giganté. Des proportions de 15 % et 20 % d'isolats contournant l'allèle *rymvI-2* ont aussi été respectivement rapportées par Traoré *et al.*, (2006 b) et Allarangaye *et al.*, (2008). La présence des isolats contournants la résistance de Giganté indique une aptitude des isolats du RYMV-Niger à surmonter l'allèle *rymvI-2*. L'aptitude à contourner la résistance de l'allèle *rymvI-2* semble liée à des caractéristiques génétiques spécifiques au pathotype, puisque le polymorphisme T et E de l'acide aminé 49 de la VPg du pathotype influence la fixation des mutations de contournement dudit allèle.

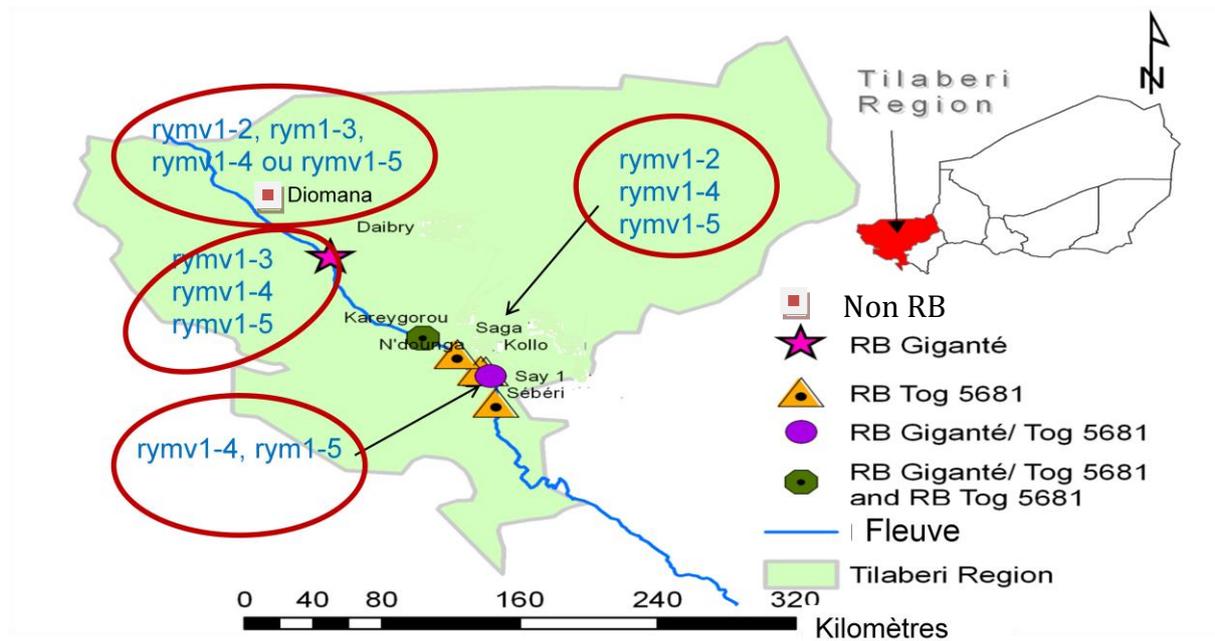
Le contournement de la résistance des accessions *O. glaberrima* notamment celui de l'allèle *rymvI-3* de Tog5681 (plus de 21 % des isolats) a été consécutif à la fixation d'une mutation dans le codon de l'acide aminé 41 ou 52 ou dans les deux codons simultanément. Par contre, le nouveau pathotype de RYMV identifié (Ng84) a contourné l'allèle *rymvI-4* de Tog5672 avec des symptômes nets mais sans mutation de contournement dans la VPg. Les mutations de contournement de l'allèle *rymvI-3* procèdent à un remplacement de la sérine en position 41 (S41) par la proline (P41) et/ou la substitution du codon H52 par Y52.

Des mutations similaires ayant les mêmes effets ont été obtenues chez des isolats du RYMV provenant des écologies rizicoles du Mali et du Burkina Faso par Traoré *et al.*, (2010). Parmi celles-ci la mutation H52Y a été le mode de contournement de l'allèle *rymvI-3* chez la majorité des isolats RYMV du Niger. Cette mutation a donc été la voie dominante du contournement dudit allèle, ce qui a indiqué un rôle prépondérant de l'acide aminé Y52 dans le rétablissement de l'interaction entre la VPg des isolats virulents et la protéine eIF (iso) 4 G des variétés résistantes de riz. Cependant, le mécanisme biochimique de cette interaction compatible ayant conduit au contournement de l'allèle *rymvI-3* est encore inconnu. Aucun isolat virulent n'a surmonté l'allèle *rymvI-3* par fixation de la mutation A41 seule. Cette mutation (A41) a toujours été associée à la mutation dominante Y52. Cependant, son rôle additif à la mutation Y52 dans le contournement de la résistance de Tog5681 demeurerait encore méconnu, étant donné que Y52 a été à priori seule virulente sur l'allèle *rymvI-3*. La mutation A41 semblait apparemment renforcer le rôle dominant de la mutation Y52.

Seuls deux isolats à T (Ng36 et Ng69), collectés dans deux sites différents distants géographiquement d'environ 50 Km, ont surmonté à la fois les deux allèles de résistance avec des signatures moléculaires précises. Ces isolats forment un nouveau variant pathologique du RYMV appelé pathotype T' dont le déterminisme est marqué par la fixation des mutations R48W et H52Y ou T43A et H52Y dans la VPg des isolats porteurs. L'existence de ce pathotype nouveau dans un tel rayon pourrait présenter un risque de propagation dudit pathotype dans les périmètres avoisinants, au cours de la circulation des souches indiquée précédemment. Jusque là, un seul variant similaire a été observé au Mali, en zone sahélienne (Traoré *et al.*, 2010). Toutefois, aucun double contournant, avec une mutation T43A, n'a encore été rapporté. L'isolat Ng36 est donc le seul pathotype du virus capable de contourner la résistance de l'allèle *rymvI-2* par la fixation d'une Alanine (A) en remplacement de la Thréonine (T) au codon 43 de la VPg.

Dans la pratique, les résultats de pathogénie serviront à conseiller le déploiement efficace des

allèles de résistance du gène *RYMV1* dans l'écologie rizicole du Niger, selon le schéma ci-dessous. Ainsi, ce schéma montre que les sites dépourvus d'isolats RB (comme Diomana) pourraient recevoir les 4 allèles de résistance du gène *RYMV1* (*rymv1-2*, *rymv1-3*, *rymv1-4* et *rymv1-5*). Sur le site de Daibéry colonisé par les RB-Giganté, les allèles *rymv1-3*, *rymv1-4* ou *rymv1-5* pourraient être efficaces et à Kollo, Saga, Say 1 et N'dounga (tous à RB-Tog5681), seuls les allèles *rymv1-2*, *rymv1-4* ou *rymv1-5* pourraient être conseillés. Quant aux sites de Kareygorou et Sébéri à doubles contournants, ils ne pourraient recevoir que les allèles *rymv1-4* ou *rymv1-5*. Ce schéma de déploiement des allèles n'est toutefois pas très exhaustif, eu égard à la proximité des sites rizicoles et à la possible circulation des souches.



ADAPTATION DES PATHOTYPES DU RYMV-NIGER AUX FONDS GENETIQUES *O. SATIVA ET O. GLABERRIMA*

Sélection du pathotype (T ou E) en fonction du fond génétique de riz

La combinaison des résultats du score moyen des symptômes induits et la quantification de l'ARN viral extrait des variétés simplement inoculées a montré une forte interaction entre le pathotype E et le fond génétique *O. sativa*. Par contre, elle a révélé des interactions variables entre les pathotypes T et les deux fonds génétiques. Ces résultats ont été confirmés par les infections mixtes des pathotypes de RYMV aux deux fonds génétiques de riz. En co-inoculation et même à concentration égale, le fond génétique *O. sativa* a plus sélectionné les pathotypes E que les pathotypes T, ce qui suggère une plus grande affinité entre les pathotypes E et la variété IR 64 (*O. sativa*). Dans le fond génétique *O. glaberrima*, les chances de sélection d'un pathotype au détriment de l'autre ont montré que l'isolat Ng36 (T) a été absolument sélectionné contre les pathotypes E dans toutes les infections mixtes de Tog5673. Par contre, la sélection de l'isolat Ng140 (T) au détriment des isolats à E dans la variété Tog5673 n'a pas été systématique (5T contre 2 E). De même, dans près de deux cas sur trois de co-inoculation de l'espèce *O. sativa* l'isolat Ng140 (T) a été sélectionné au détriment du pathotypes E (Ng161).

Nos résultats indiquent que les pathotypes E présentent un avantage sélectif vis-à-vis du fond génétique *O. sativa*. Toutefois, le pathotype E (Ng161) a été contre sélectionné dans deux sur trois d'infections mixtes sur la variété IR64. Dans le fond génétique *O. glaberrima*, les pathotypes T ont été majoritairement sélectionnés. Cependant, la sélection du pathotype T (5 / 7 cas) et sa contre sélection (2 / 7 cas) vis-à-vis du pathotype Ng161 sont des réactions atypiques par rapport au fond génétique de riz, *O. glaberrima*.

Ces résultats suggèrent que la sélection du pathotype (T ou E) par un fond génétique donné est due à un avantage sélectif ou survient de façon fortuite. En effet, si l'avantage sélectif justifie la sélection du pathotype Ng36 (T) par la variété Tog5673, il n'expliquerait pas par contre la contre-sélection du pathotype Ng140 (T) en faveur du pathotype Ng161 (E). L'avantage sélectif du pathotype n'expliquerait pas non plus la sélection du pathotype Ng140 (T) au détriment du pathotype Ng161 (E) sur *O. sativa*. Ces cas atypiques de sélection des pathotypes du RYMV par les fonds génétiques de riz constituent un fait nouveau par rapport aux résultats de Poulicard *et al.* (2010) qui ont montré d'une part que les pathotypes E et T

ont la même chance d'être sélectionnés sur *O. sativa* avec toutefois une adaptation préférentielle des pathotypes E au dit fond génétique et d'autre part, que sur l'espèce *O. glaberrima* le pathotype T a toujours été sélectionné. Des résultats additionnels (Pinel *et al.*, 2011, résultats non publiés) portant sur le même couple de pathotypes (Ng140 / Ng161) ont confirmé nos résultats avec des proportions analogues.

Mécanismes d'adaptation des pathotypes aux fonds génétiques de riz et distribution actuelle des pathotypes en Afrique

Dans les infections mixtes l'aboutissement à la sélection de l'un des deux pathotypes est systématique, ce qui constitue une aptitude intrinsèque de l'un des pathotypes (par rapport à l'autre) et selon le fond génétique. La quasi-sélection des pathotypes T de RYMV contre les pathotypes E dans le fond génétique *O. glaberrima* est donc, dans la majorité des cas d'infections mixtes, dépendante de la génétique du pathotype. En effet, la présence de la thréonine au codon 49 de la VPg est déterminante dans le processus adaptatif du pathotype T, puisque seuls les isolats porteurs de cet acide aminé ont été sélectionnés de façon presque exclusive dans le fond *O. glaberrima* : d'où la notion de valeur sélective liée à l'adaptation des pathotypes T.

Dans l'espace rizicole du Niger, les cas de non multiplication du pathotype Ng140 (T) dans certains couples mixtes suggéreraient une absence ou une faible valeur sélective des pathotypes T. La sélection du pathotype Ng140 (T) contre le pathotype Ng161 (E) en infection mixte de Tog5673 corrobore cette situation, étant donné que l'isolat Ng140 a été incapable de s'adapter au fond génétique *O. glaberrima*, en infection simple.

Ces cas atypiques d'adaptation des pathotypes pourraient aussi être dû à une synergie entre deux pathotypes faiblement pathogènes, conduisant à une pathogénicité élevée (Pita *et al.*, 2001). L'adaptation des pathotypes T en infection mixte avec les pathotype E sur *O. sativa* a montré que celui-ci est assimilable à un fond génétique neutre. Car, il n'a pas grandement influé sur la valeur sélective des pathotypes E et T.

La sélection des pathotypes T au détriment des pathotypes E dans l'espèce *O. glaberrima* et leur large distribution en Afrique de l'Ouest a été donc dépendante du fond génétique. Elle s'est faite en relation avec l'histoire évolutive du riz et du virus en Afrique (Traoré *et al.*, 2010). En effet, la dispersion de l'espèce *O. glaberrima* à travers le continent a commencé à partir de la boucle du Niger en Afrique de l'Ouest (dans l'actuel rice belt de

l'Afrique). Quant à l'espèce *O. sativa*, elle a été introduite en Afrique de l'Est par les Arabes et les Indiens vers le 10^e siècle sur les côtes de l'actuelle Tanzanie et à l'Ouest par les Portugais au 15^e siècle. Par la suite la culture du riz *O. sativa* a été intensifiée dans la seconde moitié du 19^e siècle en Afrique Centrale (Portères, 1950 ; Thiémélé *et al.*, 2010). Toutefois, avant même l'introduction de l'espèce *O. sativa* en Afrique de l'Ouest, la culture de *O. glaberrima* y était pratiquée. Cette culture s'était diversifiée dans les deltas du Niger et du Sénégal (Harlan, 1976). Le RYMV était initialement présent sur les variétés *O. sativa* et les adventices d'Afrique de l'Est et probablement du Centre avant de diffuser vers l'Ouest du continent où l'Acide glutamique (E) a muté en Thréonine pour faciliter le passage du RYMV à l'espèce *O. glaberrima* (Fargette *et al.*, 2006 ; Pinel *et al.*, 2007). Plus tard, avec l'intensification de la culture des variétés *O. sativa* en Afrique de l'Ouest, les quelques pathotypes E restés inféodés aux adventices ont commencé à coloniser de nouveau les rizières de cette zone géographique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La prospection dans les rizières du Niger et l'évaluation biologique, génétique et moléculaire des échantillons collectés prouvent l'existence de la panachure jaune du riz dans cette écologie. D'importantes informations relatives à la maladie et à son pathogène (le *Rice Yellow Mottle Virus*-RYMV) au Niger ont été obtenues.

En rapport avec l'incidence et la distribution géographique de la maladie, tous les périmètres rizicoles irrigués du Niger sont affectés par la panachure jaune du riz. L'incidence de la maladie et les pertes de récoltes enregistrées varient selon les sites. Elles avoisinent respectivement 90 % et 71 %. La maladie est plus sévère en saison humide qu'en saison sèche. De façon générale, les zones sud-sahéliennes moins sèches que les zones sahéliennes sont les plus affectées. Un petit nombre de variétés de riz sensibles à la panachure jaune sont cultivées au Niger, attestant de l'étroitesse de la base génétique des variétés vulgarisées. Au niveau épidémiologique, la panachure jaune du riz est très répandue au Niger et les variétés de riz emblavées ont été toutes sensibles à la maladie, ce qui constitue un faisceau de menaces sérieuses pour l'intensification de la riziculture.

Aussi, la promotion d'une large gamme de variétés incluant celles ayant des gènes de résistance au RYMV pourrait contribuer à contrôler efficacement la maladie. L'indexage des échantillons collectés a montré que le virus a infecté aussi bien le riz cultivé que sauvage et les adventices. Dix espèces d'adventices sont identifiées comme hôtes alternatifs du RYMV au Niger. Ces adventices appartiennent au riz sauvage *Oryza Longistaminata* et aux familles des Poacées (*Leersia hexandra*, *Paspalum emblectens*, *Echinochloa colona* et *Panicum repens*) et Cypéracées (*Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus sp* et *Kylinga sp*). Leur rôle dans la propagation de la maladie au champ a été discuté, en relation avec les conditions climatiques. Il en ressort que les espèces d'adventices et leurs familles respectives devraient faire l'objet d'une attention particulière dans tout dispositif visant à réduire le réservoir infectieux. Un inventaire exhaustif des dites espèces dans les écologies rizicoles devrait être fait dans le but de cerner davantage leur importance dans la propagation de la maladie.

Les profils sérologiques des isolats étudiés montrent que le RYMV-Niger est sérologiquement peu diversifié. Par contre, les caractéristiques moléculaires des mêmes isolats suggèrent que la population virale de RYMV-Niger est phylogénétiquement variable. Nos résultats suggèrent aussi une circulation des souches en Afrique de l'Ouest et du Centre, en témoigne la filiation de l'isolat Ng161 (de l'Ouest Niger) au clade S1-AOC Nigéria et la

parenté des isolats de l'Est du Niger avec ceux d'Afrique Centrale (S1-AOC Cameroun-Tchad). Ainsi, la population du RYMV est subdivisée en trois clades S1-AOC distribués à l'Ouest et l'Est du Niger. Les isolats de l'Ouest majoritaires sont affiliés au clade S1-AOC du Dahomey gap et à celui du Nigéria (S1-AOC Nigéria), tandis que les isolats de l'Est sont apparentés au clade S1-AOC Afrique Centrale (typique). Cependant, la zone rizicole de l'Est du Niger est peu explorée, avec seulement trois isolats étudiés et le clade S1-AOC Nigéria (typique), représenté par l'isolat Ng161, est présent sur les périmètres rizicoles de l'Ouest du Niger. La faiblesse de l'échantillonnage dans les rizières de l'Est et la présence du clade S1-AOC typique du Nigéria à l'Ouest du Niger recommandent des prospections complémentaires afin d'approfondir à la fois la phylogéographie du virus à l'Est du Niger et la circulation des souches en Afrique de l'Ouest et du Centre.

Par rapport à la pathogénie, le RYMV est biologiquement très diversifié au Niger. Plusieurs isolats contournants (simple et double contournants), ayant une large distribution dans cette écologie rizicole (30 % des périmètres), sont dénombrés. Les résultats moléculaires confirment la présence d'isolats contournants, avec des taux de prévalence de plus de 7 % d'isolats RB1 (contournant l'allèle *rymv1-2* seul), 20 % d'isolats RB2 (contournant *rymv1-3* seul) et 3 % d'isolats RB3 (contournant les deux allèles à la fois). Aussi, quatre pathogroupes d'isolats dont deux majeurs (*Path4* des contournants et *Path1* des isolats à pathogénie particulière) sont identifiés dans cette étude.

La répartition spatiale des différents variants du virus dans les rizières servira à conseiller les utilisateurs de la filière riz sur le contrôle de la panachure jaune du riz et le déploiement des gènes de résistance au Niger, afin de contribuer efficacement à la lutte intégrée contre la virose en Afrique de l'Ouest. Le contrôle de la maladie requiert donc une surveillance épidémiologique accrue, eu égard à l'émergence des isolats double contournants et à la circulation des souches. Le niveau de virulence des isolats contournants fera d'eux des candidats au screening des collections de riz, en vue de développer des variétés adaptées à chaque zone rizicole du pays voire de la région. Les profils de réaction des isolats à pathogénie particulière renseignent quant à eux sur la possible propagation asymptomatique de la panachure jaune du riz au champ.

Les zones rizicoles concernées par les isolats à pathogénie particulière doivent faire l'objet d'une surveillance épidémiologique permanente, afin de prévenir les éventuelles épidémies dues à une probable mutation de ces souches peu pathogènes en souches pathogènes

agressives voire virulentes.

En rapport avec l'étude du déterminisme de la pathogénie, l'écologie rizicole du Niger est caractérisée par la présence de trois pathotypes (T, T' et E) du virus ayant une distribution spatiale contrastée à l'Est mais coexistant à l'Ouest. L'isolat Ng84 (T) ayant exceptionnellement une arginine (R) en position 50 de la VPg est assimilé à un nouveau pathotype. Le polymorphisme E (E = acide glutamique) et T (T = thréonine) de l'acide aminé 49 de la VPg est une véritable signature moléculaire ayant permis aux isolats porteurs de fixer les mutations de contournement des allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv1-3*.

La connaissance de la distribution géographique des trois pathotypes de RYMV dans les rizières du Niger est déterminante dans la gestion efficiente de la maladie au champ. Ainsi, les allèles de résistance *rymv1-3* et *rymv1-4* du gène RYMV1 seraient efficaces à l'Est du Niger alors qu'à l'Ouest l'utilisation de l'un ou l'autre des allèles de résistance *rymv1-2*, *rymv1-3* dans le contrôle de la maladie procéderait au cas par cas, c'est-à-dire selon les périmètres ; eu égard à la présence des double contournants de RYMV et à la possible circulation des pathotypes d'un périmètre à l'autre. Un schéma de déploiement des allèles de résistance du gène RYMV1 tenant compte de la répartition des différents groupes pathologiques du virus (non RB et RB) au Niger a été suggéré. De même, l'utilisation des gènes de résistance pyramidés (avec deux ou trois ou quatre allèles de résistance du gène RYMV1) dans des fonds génétiques sensibles à grands potentiels agronomiques pourrait aussi être envisagée.

L'évaluation de la pathogénie des isolats de RYMV suivie du séquençage de la VPg des isolats contournants indiquent que près d'un quart des périmètres rizicoles du Niger sont colonisés par les isolats contournant l'un ou l'autre des 2 allèles de résistance (*rymv1-2* et *rymv1-3*), avec présence de double contournants appartenant exclusivement aux pathotypes T'. L'isolat Ng84 a contourné l'allèle de résistance *rymv1-4* de la variété de riz Tog5672, sans mutation de contournement dans la VPg. Aussi, la résistance de l'allèle *rymv1-2* a été surmontée grâce aux mutations R48E, R48W et T43A. Et, le contournement de l'allèle *rymv1-3* s'est fait *via* la fixation des mutations S41P, S41A et H52Y.

Nos résultats précisent le déterminisme de la pathogénie du RYMV-Niger, en indiquant les mutations essentielles au contournement de la résistance. Les atouts génétiques des isolats ayant surmonté les allèles *rymv1-2* et *rymv1-3* ont été mise en évidence. Le contournement de l'allèle *rymv1-4* sans mutation dans la VPg suggérerait la présence de mutation (s) de contournement hors VPg, probablement dans l'ORF2a (en C'terminal). Il convient donc

d'associer cette portion génomique à la recherche des mutations de contournement de résistance, afin d'affiner les bases moléculaires du contournement hors VPg de la résistance du riz au RYMV. A cet effet une mutagenèse dirigée serait nécessaire pour vérifier si la présence de l'acide aminé R50 dans la VPg suffirait pour induire le contournement de cet allèle, ce qui permettra de valider le rôle de cet acide aminé dans le contournement de l'allèle *rymv1-4* de Tog5672. Un séquençage entier du génome pourrait aussi être envisagé pour préciser le rôle de la partie C-terminale de l'ORF2a dans le contournement de la résistance de Tog5672.

Seuls les isolats du RYMV de pathotypes E et T' ont surmonté l'allèle de résistance *rymv1-2* de l'espèce de riz *O. sativa*. Quant à l'allèle de résistance *rymv1-3* de l'espèce de riz *O. glaberrima*, il a été surmonté que par les isolats de pathotype T. L'adaptation des pathotypes au fond génétique semble donc être liée au polymorphisme T et E de l'acide aminé 49 de la VPg. Lors des études d'infections mixtes des pathotypes de RYMV sur différents fonds génétiques de riz, les pathotypes T ont toujours été quasiment sélectionnés au détriment des pathotypes E sur la variété Tog5673 (*O. glaberrima*). Cependant, dans certains cas d'infections mixtes sur la même variété, l'isolat Ng140 (T) a été contre-sélectionné en faveur de l'isolat Ng161 (E) et, fortement sélectionné contre le même isolat sur la variété IR64.

La présence de la thréonine ou du glutamate en position 49 de la VPg desdits pathotypes leur confère un avantage sélectif d'adaptation aux deux fonds génétiques de riz (*O. sativa* et *O. glaberrima*). Le fond *O. glaberrima* discrimine les pathotypes T et E alors que le fond *O. sativa* apparaît comme un fond génétique neutre. La distribution actuelle des pathotypes du RYMV en Afrique de l'Est, du Centre et de l'Ouest a été discutée, en relation avec la répartition des variétés de riz emblavées. Néanmoins, le comportement atypique du couple de pathotypes Ng140 (T) / Ng161 (E) vis-à-vis des deux fonds génétiques de riz ne pourrait s'expliquer par l'avantage sélectif des pathotypes lié au polymorphisme de l'acide aminé 49 de la VPg.

De nouvelles infections mixtes dans les deux fonds génétiques de riz par les pathotypes T et E géographiquement proches et si possible provenant d'une même parcelle de riz demeure nécessaire, pour élucider davantage ces cas atypiques d'adaptation des pathotypes de RYMV aux deux fonds génétiques de riz. Ce qui permettra de confirmer la théorie de l'adaptation des pathotypes du virus aux deux espèces de riz cultivées en Afrique. Il est aussi nécessaire de mieux comprendre le déterminisme moléculaire de l'adaptation des pathotypes aux fonds

génétiques de riz. Ce phénomène intervient-il de façon aléatoire ou par synergie entre pathotypes, lors des infections mixtes ?

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abo M. E., SY A. et Alegbedjo D. 1998.** Rice yellow mottle virus (RYMV) in Africa: evolution, distribution, economic, significance on sustainable rice production and management strategies. *Journal of Sustainable Agriculture* Vol. **11 (1)**, 85-111.
- Abo M. E., Alegbejo M. D., Sy A. A., 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*, Vol. **17 (1)** 19-36.
- Abo M. E. et Fadhila A. H. 2001.** Epidemiology and management of rice viruses and virus diseases. In: *Plant Virology in Sub-Saharan Africa, IITA, ed* (Ibadan Nigeria), pp. 112-127.
- Abo M. E., Alegbedjo M. D., Sy A. A. et Séré. Y. 2002.** Field incidence of *Rice yellow mottle virus*, genus sobemovirus on rice and a weed species in the field in Côte d'Ivoire. *Acta Agronomica Hungarica* **50**, 85-89.
- Abubakar Z., Ali F., Pinel A., Traoré O., N'Guessan P., Notteghem J. L., Kimmins F., Konate G., Fargette D. 2003.** Phylogeography of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *J Gen Virol* **84** : 733-743.
- Afolabi S. A., Akator S. K., Abo E. M., Onasanya A. and Séré Y. 2009.** Production of polyclonal antibodies to various strains of rice yellow mottle virus (RYMV) obtained across different agro-ecological zones in West Africa. *Scientific Research and Essay*, Vol 4 (**4**), pp. 306-309.
- Ahmadi N., Albar L., Pressoir G., Pinel A., Fargette D. et Ghesquière 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.
- Albar L. M, Lorieux N. Ahamadi I. Rimbault A. Pinel A. Sy A. A., Fargette D. et Ghesquière A. 1998.** Genetic basis and mapping of the resistance to *rice yellow mottle virus*. 1. QTLs identification and relationship between resistance and plant morphology. *Theoretical and applied Genetics* **97**, 1145-1154.
- Albar L., Ndjioudjop M. N., Esshak Z., Berger A., Pinel A. Jones M., Fargette D., Ghesquière A. 2003.** Fine genetic mapping of a gene required for *Rice yellow mottle virus* cell-to-cell movement. *Theor Appl Genet* **107**:371–378.
- Albar L., Angratz-Reyser M., Hébrard E., Ndjioudjop M. N., Jone M. and Ghesquière A. 2006.** Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *Plant Journal* **47**, 417–426.

- Allarangaye M. D., Traoré O., Traoré E.V.S., Millogo R. J. and Konaté G. 2006.** Evidence of non-transmission of *Rice yellow mottle virus* through seeds of wild host species. *Journal of Plant Pathology* **88** (3), 309-315.
- Allarangaye M. 2008.** Epidémiologie de la panachure jaune du riz en zone soudano-sahélienne: interactions entre le virus et les plantes hôtes sauvages. *PhD Thesis*, University of Ouagadougou, Burkina Faso, 108 pp.
- Amancho N. A., Kouassi N. K., Diallo H. A., Bouet A., Sangaré A., Kouadio J. Y. 2009.** The Report of Highly Resistance-breaking isolates of *Rice Yellow Mottle Virus* in Côte d'Ivoire. *The African Journal of plant Science and Biotechnology* **3** (1) 44-50.
- Anonyme 1. 2009.** Perspectives de l'alimentation: *analyses des marchés mondiaux*, FAO Décembre 2009, pp 23-27.
- Anonyme 2. 2006.** Propositions pour une politique rizicole au Niger. *Rapport final PAFRIZ/IRAM*, mars 2006. 193 p.
- Anonyme 3. 2001.** Rice yellow mottle virus. In: *Annual report 2000 ADARAO* (Association pour le Développement de la Riziculture en Afrique de l'Ouest), Bouaké-Côte d'Ivoire. pp 27-37.
- Anonyme 4. 2004.** Viruses and virus diseases of *Poaceae* (*Gramineae*). INERA 2004 *Edition* 147. pp 20-21.
- Anonyme 5, 2006.** Détermination des surfaces et estimation de la production du riz hors aménagement hydro-agricole (RHA). *Rapport d'étude PAFRIZ/ AGRHYMET*, mars 2006. 41 p.
- Anonyme 6. 2011.** Commons wikimedia.org /wiki/file: Niger_river_mapfr.pnp?uselang:fr (consulté le 28 /01 /2011).
- Anonyme 7. 1998.** Standard Evaluation System for rice. *IRRI et INGER, eds.*
- Astier S., Albouy J., Maury Y. et Lecoq, H. 2001.** Principes de Virologie Végétale : Génome, Pouvoir pathogène, Ecologie des virus, *INRA edn.*, Paris, pp. 444.
- Awoderu V. A. 1991.** *Rice yellow mottle virus* in West Africa. *Tropical Pest Management* **37**, 356-362.
- Bakker W. 1970.** *Rice yellow mottle*, a mechanically transmissible virus disease of rice in Kenya. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **76**: 53-63.
- Bakker W. 1971.** Three new beetle vectors of rice yellow mottle virus in Kenya. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **77**, 201-206.

- Bakker W. 1974.** Characterization and ecological aspects of *rice yellow mottle virus* in Kenya. *Agric. Res. Rep.* (Wageningen) **829**:1-152.
- Banwo O. O., Makundi R. H., Abdallah R. S., Mbapila C. J. 2001.** Newly recorded species of *Chaetocnema*, vector of *rice yellow mottle virus* in Tanzania. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* **29** : 61-65.
- Basso A., Onasanya A., Issaka S., Sido A.Y., Haougui A., Adam T., Séré Y. et Saadou M. 2011.** Le flétrissement bactérien du riz au Niger: diversité pathologique d'isolats collectés sur les périmètres irrigués. *Journal of Applied Biosciences* **38** : 2551 – 2563. ISSN 1997–5902
- Basso A., Issaka S., Haougui A., Séré Y. et Halidou A. 2010.** Caractérisation biologique d'isolats du virus de la panachure jaune du riz au Niger. *Annales de l'Université Abdou Moumouni, Tome XI-A*, pp 112-119.
- Bonneau C., Brugidou C., Chen L., Beachy R. N. et Fauquet C. 1998.** Expression of the Rice Yellow Mottle Virus P1 Protein in Vitro and in Vivo and Its Involvement in Virus Spread. *Virology* **244**:79-86.
- Borgstrom B. and Elisabeth Johansen J. 2001.** Mutations in *Pea seedborne mosaic virus* Genome-Linked Protein VPg Alter Pathotype-Specific Virulence in *Pisum sativum* *MPMI Vol. 14 (6)*, pp. 707–714.
- Brugidou C., Holt C., Yassi M. N., Zhang S., Beachy R. and Fauquet C. 1995.** Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of *Rice yellow mottle virus* and mutagenesis of the coat protein. *Virology*, **206**, 108–115.
- Brugidou C., Brugidou C., Opalka N., Yeager M., Beachy R. N. and Fauquet C. 2002.** Stability of *Rice yellow mottle virus* and Cellular Compartmentalization during the Infection Process in *Oryza sativa* (L.). *Virology* **297**, 98–108.
- Calvert L. A., Koganezawa H., Fargette D., Konaté G., 2003.** Rice. Pages 269-294 In: Loebenstein G., Thottappilly G. (eds). *Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.*
- Caranta C., Palloix A., Gebre-Selassie K., Lefebvre V., Moury B. and Daubeze A. M. 1996.** A complementation of two genes originating from susceptible *Capsicum annum* lines confers a new and complete resistance to *pepper veinal mottle virus*. *Phytopathology* **86**:739–743.
- Caranta C., Ruffel S. et Dussault M. H. 2003.** Gènes naturels de résistance aux virus chez les plantes: relations entre structure et fonction. *Virologie* **7**, 165-175.

- Chalak L., Elbitar A., Chehade T., El Zammar¹ S., Jreijiri F., Choueiri E., 2007.** Assainissement de variétés de *Prunus* infectées par *Prunus necrotic ringspot virus*. *Lebanese Science Journal*, **8** (2), pp 175-180.
- Chang T. T. 1976.** The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices. *Euphytica*, **25**: 435-441.
- Charron C. 2007.** Caractérisation fonctionnelle et evolution moléculaire des genes codant pour les facteurs d'initiation à la traduction eIF4E: des facteurs clés dans la résistance des plantes aux potyvirus. *Thèse de doctorat* de l'Université Aix-Marseille II, 249 p.
- Charron C., Nicolai M., Gallois J. L., Robaglia C., Moury M., Palloix A. and Caranta C. 2008.** Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant Journal* 54, 56–68
- Clément G., Ghesquière A. et Riou C. 1993.** Génétique, une grande richesse variétale. Dans : Riz, du débouché à la culture. *Perspectives Agricoles* **183**. pp 9-10.
- Clément G. 1987.** L'amélioration du riz pluvial par hybridation. Analyse diallèle de huit caractères quantitatifs dans l'ensemble *Japonica* au sens large ; application à la sélection. Docteur-Ingénieur, *Institut Polytechnique de Toulouse*. P. 161.
- Cochran et Cochran W. G. 1977.** Samples techniques 3rd Ed. Wiley New york 428p.
- Darlu P., Tassy, P. 2004.** La Reconstruction phylogénétique. *Concepts et Méthodes*. 2nd édition (Masson, 1993), ISBN : 2-225-84229-9.
- Robert D. et Vian, B. 2004.** Éléments de biologie cellulaire. *Editions Doin* (3è édition). ISBN : 207040-1169-9.
- Diaz-Pendon J. A., Truniger V., Nieto C., Garcia-Mas J., Bendahmane A., and Aranda M. A. 2004.** Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant pathol.* **5**:223–233.
- Dodds P. N., Lawrence G.J., Catanzariti A. M., Teh T., Wang C. I., Ayliffe M. A., Kobe B. and Ellis J. G. 2006.** Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 8888–8893.
- Fargette D., Pinel A., Traoré O., Ghesquière A., Konaté G., 2002a.** Emergence of resistance-breaking isolates of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 585-591.
- yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *Journal of Virology* **78**: 3252-3261.

- Fargette D, Pinel A., Halimi H., Brugidou C., Fauquet C., Van-Regenmortel M. 2002b.** Comparison of molecular and immunological typing of isolates of *Rice yellow mottle virus*. *Arch Virol* **147** (3) : 5863-5896.
- Fargette D., Pinel A., Abubakar Z., Traoré O., Brugidou C., Sorho F., Hébrard E., Choisy M., Séré Y., Fauquet C., Konaté G., 2004.** Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *Journal of Virology* **78**: 3252-3261.
- Fargette D., Konaté G., Fauquet C., Muller E., Petershmitt M., Thresh J., 2006.** Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Annu. Rev. Phytopath.* **44**, 235–260.
- Fargette D., Pinel A., Rakotomalala M., Sangu E., Traoré O., Sérémé D., Sorho F., Issaka S., Hébrard E., Séré Y., Kanyeka Z. and Konaté G. 2008a.** *Rice yellow mottle virus*, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *J Virol* **82**: 3584–3589.
- Fargette D., Pinel-Galzi A., Sérémé D., Lacombe L., Hébrard E., Traoré O. et Konaté G 2008b.** Diversification of *Rice Yellow Mottle Virus* and Related Viruses Spans the History of Agriculture from the Neolithic to the Present. *PLoS Pathogens* Vol. **4** (8) e1000125.
- Fauquet C., Thouvenel J. C. 1977.** Isolation of the *Rice yellow mottle virus* in Ivory Coast. *Plant Disease Reporter* **61**: 443-446.
- Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. 2005.** Sobemovirus (Eds.), Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academic Press, New York, pp. 885–890.
- Feng L. and Shou-Wei D. 2006.** Virus Counterdefense Diverse Strategies for Evading the RNA-Silencing Immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 503–31
- Fininsa. C. 2003.** Relationship between common bacterial blight severity and bean yield loss in pure stand and bean-maize intercropping. *Int. J. Pest Manage*, 49: 177-185.
- Fraser R. S. S. 1985.** Genes for resistance to plant viruses. *Critical Review of Plant Science.* **3**, 257-294.
- Fraser R. S. S. 1990.** The genetics of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28** : 179–200.
- Fraser R. S. S. 1992.** The genetics of plant virus-interaction: implications for plant breeding. *Euphytica* **63**, 175-185.

- Flor H. H. 1971.** Current status of the gene for gene concept. *Phytopathology* 9, 275-296.
- Fomba S. N. 1988.** Screening for seedling resistance to rice yellow virus in some rice cultivars in Sierra Leone. *Plant disease* 72, 641-642.
- Ghesquière A., Albar L., Lorieux M., Ahmadi N., Fargette D., Huang N., McCouch S. R. and 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* 87:1243-1249
- Harlan J. R., De West J. M., Stemler A. B. (eds). 1976.** Origin of African plant domestication. *Mouton publishers*, La Hayes.
- Harrison B. D. 2002.** Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* 124, 181-192.
- Hébrard E., Froissart R., Luis C. et Blanc S. 1999.** Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteur. *Virologie* 3, 35-48.
- Hébrard E., Pinel-Galzi A., Bersoult A., Siré C. et Fargette D. 2006.** Emergence of a resistance-breaking isolate of *Rice yellow mottle virus* during serail inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *Journal of General Virology* 87, 1369–1373
- Hébrard E., Pinel-Galzi A. and Fargette D. 2008.** Virulence domain of the RYMV genome-linked viral protein VPg towards rice *rymv 1–2*-mediated resistance. *Arch. Virol.* 153:1161–1164.
- Hébrard E., Poulicard N., Gérard C., Traoré O., Chen-Wu H., Albar L., Fargette D., Bessin Y., Vignols V. 2010.** Direct interaction between the *Rice yellow mottle virus* VPg and the central domain of the rice eIF(iso)4G1 factor correlates with rice susceptibility and RYMV virulence *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Volume 0, (ja), doi: 10.1094/MPMI-03-10-0073.
- Hillis D. M. et Moritz C. 1996.** *Molecular systematics*. 2nd ed. *Sinauer Associates Incorporated*. ISBN 0-87893-282-8
- Hull R. 1998.** The sobemovirus group. Pages 113-146, In: Koenig R. (eds). *The plant viruses 3: Polyhedral virions with monopartite genomes*. *Plenum Press*, New York.
- Ioannidou D., Lett J., Pinel A., Assigbetse K., Brugidou C., Ghesquière A., Nicole M. and Fargette D. 2000.** Responses of *Oryza sativa japonica* sub-species to infection with *Rice yellow mottle virus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:177-188.

- Issaka S., Fargette D., Séré Y., Aké S., Pinel A., Sido A., Adamou B. 2006.** Variabilité sérologique et moléculaire du virus de la panachure jaune du riz (RYMV). *Communication au Congrès du riz en Afrique* tenu à Dars-Salam, Tanzanie (Afrique de l'Est) du 31/07/2006 au 04/08/2006.
- Issaka S., Basso A., Sorho F., Onasanya A., Haougui A., Sido A.Y., Aké S., Fargette D. et Séré, Y. 2012.** Diagnosis and Importance of Rice Yellow Mottle Disease Epidemics in Niger Republic. *Journal of Applied Biosciences* **50**: 3501– 3511. ISSN 1997–5902.
- Jacquot M., Clément G., Guiderdoni E. et Pons B. 1992.** Amélioration des Espèces cultivées: Objectifs et Critères de Sélection, *INRA edn.*, Paris, pp. 56.
- Jacquot M., Clément G., Ghesquière A., Glaszmann E. et Tharreau D. 1997.** Les Riz. in *L'Amélioration des Plantes Tropicales*, Cirad-Orstom, ed, pp. 533-565.
- Jennings P. R. 1963.** Estimating yield loss in rice caused by *hoja blanca*. *Phytopathology*. **53** : 492.
- John V. T., Thottappilly G. et Awoderu V. A. 1984.** Occurrence of rice yellow mottle virus in some sahelian countries in West Africa. *FAO Plant Protection Bulletin* **32**, 86-87.
- Konaté G., Traoré O., and Goulibaly M. M. 1997.** Characterization of *rice yellow mottle virus* isolates in Sudano-Sahelian areas. *Arch. Virol.* **142**:1117-1124.
- Konaté G., Sarra S. and Traoré O. 2001.** *Rice yellow mottle* is seed-borne but not seed transmitted in rice seeds. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**:361–364.
- Kouassi N., N'Guessan P., Albar L., Fauquet C. et Brugidou C. 2005.** Distribution and characterization of *Rice yellow mottle virus*: a threat to African farmers. *Plant Dis* **89**: 124–133.
- Kouassi K. N., Chen L., Siré C., Bangratz-Reyser M., Beachy R. N., Fauquet C. M. et Brugidou, C. 2006.** Expression of rice yellow mottle virus coat protein enhances virus infection in transgenic plants. *Arch Virol.* **151** : 2111-2122.
- Kummert J. et Lepoivre P. 2003.** Les virus et viroïdes phytopathogènes.: *In* :Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. *Presses agronomiques de Gembloux*; De Boeck, Bruxelles, Belgique, pp 41-78.
- Lecomte N. 1993.** Study on the pathogenicity of certain rice yellow mottle virus (RYMV) strains and resistance of a number of rice cultivars (*Oryza sativa*) to RYMV. *CIRAD-ORSTOM*, Montpellier.

- Lecoq H., Moury B., Desbiez C., Palloix A. et Pitrat A. 2004.** Durable virus resistance in plants through conventional approaches : a challenge. *Virus Research* 100, 31-39.
- Lellis A. D., Kasschau K. D., Whitham S. A. and Carrington J. C. 2002.** Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* **12**:1046–1051.
- Mansour A. N. et Baillis K. W. 1994.** Serological relationships among *Rice Yellow Mottle Virus* isolates. *Annals of Applied Biology* **125**, 133-140.
- Maule A., Leh V. and Lederer C. 2002.** The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 4279–4284.
- Maule A., Caranta C. and Boulton M. 2007.** Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 223–231.
- Moury B., Morel C., Johansen E., Guilbaud L., Souche S., Ayme V., Caranta C., Palloix A. and Jacquemond M. 2004.** Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **17**:322–329.
- Ndikumana I., Gasoré R., Issaka S., Pinel-Galzi G., Onasanya A., Hassani-Mehraban A., Fargette D., Peters D. and Séré Y. 2011.** *Rice yellow mottle virus* in rice in Rwanda: first report and evidence of strain circulation. *New Disease Reports* **23**, 18. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.023.018]
- Ndjondjop M. N., Albar L., Fargette D., Fauquet C. M. and Ghesquière A. 1999.** The genetic basis of high resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivars of two cultivated rice species. *Plant Dis.* **83**:931-935.
- Ndjondjop M. N., Brugidou C., Shipping Z., Fargette D., Ghesquière A. and Fauquet C. M. 2001.** High resistance to *rice yellow mottle virus* in two cultivated rice cultivars is correlated with the failure of cell-to-cell movement. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **59**:309-316.
- Ngon-A-Yassi M., Ritzenthaler C., Brugidou C., Fauquet C. and Beachy R. N. 1994.** Nucleotide sequence and genome characterization of *rice yellow mottle virus*. *J. Gen. Virol.* **75**, 249–257.
- N'guessan P. 1999.** Diversité moléculaire et sérologique du virus de la panachure jaune du riz en Afrique et aspects épidémiologiques en Côte d'Ivoire. Doctorat, ENSAM- UM 2 Montpellier pp. 145.
- N'Guessan P., Pinel A., Caruana M., Frutos R., Sy A., Ghesquière A. and Fargette D. 2000.** Evidence of the presence of two serotypes of rice yellow mottle sobemovirus in Côte

d'Ivoire. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**:167–178.

N'Guessan P., Pinel A., Sy A., Ghesquière A. et Fargette D., 2001. Distribution, pathogenicity and interactions of two strains of *Rice yellow mottle virus* in forested and savannah zones of West-Africa. *Plant Disease* **85**: 59-64.

Nicaise V., German-Retana S., Sanjuan R., Dubrana M. P., Mazier M., Maisonneuve B., Candresse T., Caranta C. and Le Gall O. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* **132**:1272–1282.

Nicolas O., Dunnington S. W., Gotow L. F., Pirone T. P. and Hellmann G. M. 1997. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology*, **237**, 452– 459.

Nieto C., Morales M., Orjeda G., Clepet C., Monfort A., Sturbois B., Puigdomenech P., Pitrat M., Caboche M., Dogimont C., Garcia-Mas J., Aranda M. A. and Bendahmane A. 2006. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *Plant J.* **48** : 452–462.

Nieto C., Piron F., Dalmais M., Marco C., Moriones E., Gomez-Guillamon M. L., Truniger V., Gomez P., Garcia-Mas J., Aranda M. and Bendahmane A. 2007. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol.* **7** : 34.

Nwilene F. E. 1999. Current status and management of insect vectors of *Rice yellow mottle virus* (RYMV) in Africa. *Insect Sci. and Appl.*, **19(2/3)** : 179-185.

Ochola, D. and Tusiime, G. 2011. Survey on Incidences and Severity of *Rice Yellow Mottle Virus* Disease in Eastern Uganda. *International Journal of Plant Pathology*, **2**: 15-25.

Onasanya A., Séré Y. Akator K., Coulibaly M. M. and Hamadoun H. 2006. Existence of two pathotypes of rice yellow mottle virus, Genus Sobemovirus, in Mali. *Plant pathology journal* **5 (3)**: 368-372.

Opalka N., Brugidou C., Bonneau C., Nicole M., Beachy R. N., Yeager M. et Fauquet C. 1998. Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:3323-3328.

Opalka N., Tihova M., Brugidou C., Kumar A., Beachy R. N., Fauquet C. and Yeager M. 2000. Comparative analysis of two sobemovirus by electron cryo-microscopy, image reconstruction and molecular modeling. *J. Mol. Biol.* **303**, 197–211.

- Ou S. H. 1985.** Rice diseases (2nd Edition). CAB, Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Pages R. D. M. et Holmes E. C. 1998.** Molecular evolution: a practical approach. Blackwell Science, Oxford.
- Philippe L., Didier C. et Hervé P. 2002.** Phylogénie et évolution moléculaire. *Médecine / Sciences* **12**: 1146-1154.
- Pinel A., N'Guessan P., Bousalem M. & Fargette D. 2000.** Molecular variability of geographically distinct isolates of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *Archives of Virology*, **145**, 1621–1638.
- Pinel-Galzi A., Fargette D., Hull R. 2006.** First Report of *Rice yellow mottle virus* in Rice in Uganda. *Disease notes. Vol 90 (5)*, P 683.
- Pinel A., Rakotomalala M., Sangu E., Sorho F., Kanyeka Z., Traoreb O., Séréme D., Poulicard N., Rabenantoandro Y., Séré Y. et Konaté G. 2007.** Theme and Variations in the Evolutionary Pathways to Virulence of an RNA Plant Virus species. *PLoS Pathog* **3(11)**: e180. doi:10.1371/journal.ppat.0030180
- Pinel-Galzi A., Mpunami A., Sangu E., Rakotomalala M., Traoré O., Séréme D., Sorho F., Séré Y., Kanyeka Z., Konaté G., Fargette D. 2009.** Recombination, selection and clock-like evolution of *Rice yellow mottle virus*. *Virology* **394** : 164–172.
- Pinto Y., Rossan A. and Baulcombe, D. 1999.** Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nat. Biotechnol.* **17**:702- 707.
- Pita, J. S., Fondong, V. N., Sangaré, A., Otin-Napé, G. W., Ogwal, S. and Fauquet, C. M. 2001.** Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinant keys to epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *Journal of General virology* (**82**) 655-665.
- Porteres R. 1950.** Vieilles agricultures de l'Afrique subtropicale. *Agronomie tropicale* **5**: 489-507.
- Porteres R. 1976.** African cereals. Pages 409-452 in Harlan J. R., De West J. M., Stemler A. B. (eds). Origin of African plant domestication. Mouton publishers, La Hayes.
- Poulicard N., Pinel-Galzi A., Hébrard E. and Fargette D. 2010.** Why *Rice yellow mottle virus*, a rapidly evolving RNA plant virus, is not efficient at breaking *rymv1-2* resistance. *Molecular plant pathology* **11(1)**, 145–154.

- Qu C., Liljas L., Opalka N., Brugidou C., Yeager M., Beachy R. N., Fauquet C. M., Johnson J. E. et Lin T. 2000.** 3D domain swapping modulates the stability of members of an icosahedral virus group. *Structure* **8** :1095-1103.
- Rakotamalala M., Pinel-Galzi A., Albar L., Ghesquière A., Rabenantoandro Y., Ramavovololona P. and Fargette D. 2008.** Resistance to *Rice yellow mottle virus* in germplasm in Madagascar. *Eur.J. Plant Pathol.* **122**, 277–286.
- Raymundo S. A. et Buddenhagen I. W. 1976.** A rice virus disease in West Africa *International Rice Commission Newsletter* **25** : 1-2.
- Reckhaus P. M. et Adamou I. 1986.** Rice diseases and their economic importance in Niger. *FAO plant protection bulletin* 34: 77-82.
- Reckhaus P. M. et Andriamasintseho H. F. 1995.** Developpement of an Integrated Pest Management Strategy to fight RYMV and constraints to implementation in Madagascar. In: *Rice Yellow Mottle Virus (RYMV): Economic Importance, Diagnosis and Management Strategies/ La panachure jaune du riz: Importance économique, diagnostic et stratégies de gestion*, A. A. Sy, J. Hughes, et A. Diallo, eds (Bouaké, Côte d'Ivoire: WARDA/ADRAO), pp. 232-236.
- Robaglia C. and Caranta C. 2006.** Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* 11:40–45.
- Rossel H. W., Thottapily C. et Buddenhagen I. W. 1982:** Occurrence of rice yellow mottle virus in two important rice-growing areas of Nigeria. *FAO Plant Protection Bulletin* **30**: 137-139.
- Rossel H. W. 1986.** Rice yellow mottle and African soybean dwarf, Newly Discovered Virus Disease of economic importance in West Africa. *Tropical Agricultural Research* **19**,146 - 148.
- Ruffel S., Dussault M. H., Palloix A., Moury B., Bendahmane A., Robaglia C. and Caranta C. 2002.** A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* **32**:1067–1075.
- Ruffel S., Dussault M.H., Palloix A., Moury B., Revers F., Bendahmane A., Robaglia C. and Caranta C. 2004.** The key role of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) in plant–potyvirus interactions. In *Biology of Plant–Microbe Interactions, Vol. 4, Molecular Plant–Microbe Interaction : New Bridges Between Past And Future* (Tikhonovich, I., Lugtenberg, B. and Provorov, N., eds). St Paul, MN: International Society for Molecular Plant– Microbe Interactions, pp. 81–83.

- Ruffel S., Gallois J., Lesage M. and Caranta C. 2005.** The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Mol. Genet. Genomics* **274**:346–353.
- Ruffel S., Gallois J. L., Moury B., Robaglia C., Palloix A. and Caranta C. 2006.** Simultaneous mutations in translation initiation factors *eIF4E* and *eIF (iso) 4E* are required to prevent *pepper veinal mottle virus* infection of pepper. *J. Gen. Virol.* **87**:2089–2098.
- Saitou N. et Nei M. 1987.** The neighbour-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* **4**, 406-425.
- Sanger F., Nicklen S. and Chase A. R. 1977.** DNA Sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74(12)**, 5463 – 5468.
- Sarra S. 1998.** Quelques aspects écologiques du virus de la panachure du riz en zone soudano-sahélienne. *Mémoire de DEA*, Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
- Sarra S. and 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.
- Shaner G., Stromberg E., Lacy G., Barker K. and Pirone T. 1992.** Nomenclature and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 47–66.
- Scofield S. R., Tobias C. M., Rathjen J. P., Chang J. H., Lavelle D. T., Michelmore R. W. et Staskawicz B. J. 1996.** Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. *Science Vol (274)*: 2063-2065.
- Second G. 1991.** Molecular markers in rice systematics and the evaluation of genetic resources. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 14*, Rice (Bajaj, Y.P., ed.). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 468–494.
- Séré Y., Onasanya A., Afolabi A. S. et Abo E. M. 2005.** Evaluation and potential of double immunodiffusion gel assay for serological characterization of *rice yellow mottle virus* isolates in West Africa. *African Journal of Biotechnology Vol 4 (2)*, pp 197-205.
- Séré Y., Onasanya A., Akator K. and Abo E. 2007.** Serological differentiation indices and phylogenetic analysis of *rice yellow mottle virus* isolates in Côte d’Ivoire. *Journal of Biological Sciences* **7 (7)**: 1147-1154
- Séré Y., Sorho F., Onasanya A. et al. 2008a.** First report of *rice yellow mottle virus* in rice in the Gambia. *Plant diseases* **92 (2)**: 316.

- Séré Y., Onasanya A., Nwilene F. E., Abo E. M. and Akator K. 2008b.** Potential of insect vector screening method for development of durable resistant cultivars to *Rice yellow mottle virus* disease *International Journal of Virology* **4(2)** : 41-47.
- Sido A. Y. 1999.** Activities and Results from the Component from Niger. Report presented at the Review and Activity Planning Meeting for the DFID Holdback project “Coordinated Regional In-Situ Screening to Identify Varieties with Durable Resistance to *Rice Yellow Mottle Virus*” held at Niamey, Niger, 16 to 19 November 1999
- Sido A. Y. 2010.** Etat des lieux de la riziculture : Cas du Niger. Rapport FAO/RECA Niger, 57 p.
- Siré C. et Brugidou C. 2002.** Rices viruses : current knowledge, agronomic impact and control methods. *Virology* (2002), Vol. **6 (6)**, pp, 431-443.
- Siré C., Bangratz-Reyser M., Fargette D. and Christophe Brugidou C. 2008.** Genetic diversity and silencing suppression effects of *Rice yellowmottle virus* and the P1 protein. *virology Journal*, **5:55** doi:10.1186/1743-422X-5-55
- Sorho F., Pinel A., Traoré O., Bersoult A., Ghesquière A., Hébrard E., Konaté G., Séré Y. et Fargette D., 2005.** Durability of natural and transgenic resistances in rice. *Rice Sustainable Agriculture* **17**: 19-36.
- Sorho F. 2006.** La panachure jaune du riz (RYMV) en Afrique de l’Ouest : phylogéographie pathogénie et durabilité des résistances naturelles. *Thèse de l’Université de Cocody-Abidjan* (Côte d’Ivoire), 162 p.
- Sy A. A. et Séré Y. 2001.** Variétés majeures sous écosystème rizicole sahélien : Profil de résistance au virus de la marbrure jaune (RYMV) et réajustement stratégique. In *Rice Yellow Mottle Virus (RYMV): Economic Importance, Diagnosis and Management Strategies/La panachure jaune du riz : Importance économique, diagnostic et stratégies de gestion*. Bouaké, Côte d’Ivoire: West Africa Rice Development Association/Association pour le développement de la riziculture en Afrique de l’Ouest p 55-59, Proceedings of the First International Symposium on *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV) vii + 252p.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.
- Thiémélé D. 2012.** Diversité des gènes de résistance au virus de la panachure jaune du riz (RYMV) chez l’espèce africaine de riz cultivé, *Oryza glaberrima* Steud. Thèse de l’Université Félix Houphout Boigny (Côte d’Ivoire). 111p

- Thiémiélé D., Boissnard A., Ndjioudjop M., Chéron S., Séré Y., Aké S., Ghesquière A. et Albar L., 2010.** Identification of a second major resistance gene to *Rice yellow mottle virus*, RYMV2, in the African cultivated rice species, *O. glaberrima*. *Theor. Appl. Genet.* **121**, 169-179.
- Thibaud B. et Brondeau F. 2001.** Une perspective de développement regional autour de l'office du riz est-elle envisageable? *Sécheresse* **12** : 71-85.
- Thompson J., Higgins D. et Gibson T. 1994.** CLUSTRAL W. Improving the sensitivity of the perspective multiple sequence alignment though sequence weighting positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22** : 4673-4680.
- Thottappilly G. et Rossel H. W. 1993.** Evaluation of resistance to rice yellow mottle virus in *Oryza* species. *Indian J Virol* **9**: 65D73.
- Thresh J. M. 1991.** The ecology of tropical plant viruses. *Plant Pathology* **40**, 324-339.
- Traoré M. D., Traoré V. S. E., Pinel-Galzi A., Fargette D., Konaté G., Traoré A. S. et Traoré O. 2008.** Abiotic transmission of *Rice yellow mottle virus* through soil and contact between plants. *Pakistan journal of Biological Sciences Vol* **11 (6)** : 900-904.
- Traoré O. 2006.** Ecologie, pathogénie et evolution du virus de la panachure jaune du riz en zone Soudano-Sahélienne. *Thèse d'Etat*. Université de Ouagadougou, Burkina Faso. 310 p.
- Traoré O., Pinel A., Fargette D. and Konaté G. 2001.** First report and characterization of *Rice yellow mottle virus* in Central Africa. *Plant Diseases* **85** : 920.
- Traoré O., Sorho F., Pinel A., Abubakar Z., Banwo O., Maley J., Hébrard E., Winter S., Séré Y., Konaté G. et Fargette D., 2005.** Processes of diversification and dispersion of Rice yellow mottle virus inferred from large-scale and high-resolution phylogeographical studies. *Molecular Ecology* **14**:20 97-2110.
- Traoré O., Traoré M. D., Fargette D. et Konaté G. 2006a.** Rice seedbeds as a source of primary infection by *Rice yellow mottle virus*. *European Journal of Plant Pathology* **115 (2)**, p. 181-186.
- Traoré O., Pinel A., Hébrard E., Gumedzoé Y. D., Fargette D., Traoré A. S. et Konaté G. 2006b.** Occurrence of Resistance-Breaking Isolates of *Rice yellow mottle virus* in West and Central Africa. *Plant Disease* **90**: 259-263.
- Traoré O., Pinel-Galzi A., Sorho F., Sarra S., Rakotomalala M., Sangu E., Kanyeka Z., Séré Y., Konaté G. et Fargette D. 2009.** A reassessment of the epidemiology of Rice yellow mottle virus following recent advances in field and molecular studies. *Virus Research* **141** 258-267.

Traoré O., Pinel-Galzi A., Issaka S., Poulicard N., Aribi J. Aké S., Ghesquière A., Séré Y., Konaté G., Hébrard E. et Fargette D. 2010. The adaptation of *Rice yellow mottle virus* to the eIF(iso) 4G-mediated rice resistance. *Virology Virology* (**408**) : 103-108.

Vanderplank J. E. 1968. *Disease resistance in plants*, Academic Press edn., New York, pp. 216.

Vaughan DA, Morishima H, Kadowaki K. 2003. Diversity in the *Oryza* genus. Current Opinion. *Plant Biology* (**6**): 139-146

ANNEXES

ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES

Annexe 1. 1. Isolats issus de la caractérisation biologique préliminaire

S/N	N°échant.	Hôte	Localité	Zone agricole	Elisa	Bké 189	IR 64	Giganté	Tog5681	Code
1	1	riz cultivé	Tara	Nord sahélienne	+	5	7	1	3	Ng-1
2	2	riz cultivé	Tara	Nord sahélienne	+	5	7	5	3	Ng-2
3	3	riz cultivé	Tara	Nord sahélienne	+	5	7	3	5	Ng-3
4	4	riz cultivé	Tara	Nord sahélienne	+	5	7	3	3	Ng-4
5	1	riz cultivé	Saga	Sud-sahélienne	+	5	7	3	3	Ng-5
6	2	riz cultivé	Saga	Sud-sahélienne	+	5	7	1	3	Ng-6
7	3	riz cultivé	Saga	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng-7
8	4	riz cultivé	Saga	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng-8
9	5	riz cultivé	Saga	Sud-sahélienne	+	5	7	3	5	Ng-9
10	6	riz cultivé	Saga	Sud-sahélienne	+	5	7	3	3	Ng-10
11	1	riz cultivé	Liboré	Sud-sahélienne	+	5	7	3	1	Ng-11
12	2	riz cultivé	Liboré	Sud-sahélienne	+	5	7	1	3	Ng-12
13	1	riz cultivé	N'Dounga	Sud-sahélienne	+	5	7	3	3	Ng-13
14	2	riz cultivé	N'Dounga	Sud-sahélienne	+	5	7	3	3	Ng-14
15	3	riz cultivé	N'Dounga	Sud-sahélienne	+	5	7	1	3	Ng-15
16	4	riz cultivé	N'Dounga	Sud-sahélienne	+	5	7	3	3	Ng-16
17	1	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng-17
18	2	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	7	7	3	3	Ng-18
19	1	riz cultivé	Say-1	Sud-sahélienne	+	7	7	3	3	Ng-19
20	2	riz cultivé	Say-1	Sud-sahélienne	++	5	7	1	1	Ng-20
21	3	riz cultivé	Say-1	Sud-sahélienne	+	5	7	3	3	Ng-21
22	4	riz cultivé	Say-1	Sud-sahélienne	++	5	5	5	3	Ng-22
23	5	riz cultivé	Say-1	Sud-sahélienne	+	5	7	3	1	Ng-23
24	1	riz cultivé	Saadia	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng-24
25	2	riz cultivé	Saadia	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng-25
26	3	riz cultivé	Saadia	Sud-sahélienne	+	3	3	1	1	Ng-26
27	6	riz cultivé	Saadia	Sud-sahélienne	+	3	3	1	1	Ng-27
28	7	riz cultivé	Saadia	Sud-sahélienne	+	3	3	1	1	Ng-28
29	2	riz cultivé	Namardé	Sud-sahélienne	+	7	7	1	1	Ng-29
30	3	riz cultivé	Namardé	Sud-sahélienne	+	7	7	1	1	Ng-30
31	4	riz cultivé	Namardé	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng-31
32	5	riz cultivé	Namardé	Sud-sahélienne	-	5	3	1	1	Ng-32
33	1	riz cultivé	Karegorou	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng-33
34	2	riz cultivé	Karegorou	Sud-sahélienne	++	5	5	3	1	Ng-34
35	3	riz cultivé	Karegorou	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng-35
36	4	riz cultivé	Karegorou	Sud-sahélienne	+	5	5	3	1	Ng-36
37	5	riz cultivé	Karegorou	Sud-sahélienne	+	5	7	3	1	Ng-37
38	6	riz cultivé	Karegorou	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng-38

+ positif ; - négatif à l'ELISA

Annexe 1. 1. Isolats issus de la caractérisation biologique préliminaire (suite)

S/N	N°échant.	Hôte	Localité	Zone agricole	Elisa	Bké 189	IR 64	Giganté	Tog5681	Code
39	1	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	5	7	1	1	Ng-39
40	2	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	5	7	3	1	Ng-40
41	3	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	7	7	1	3	Ng-41
42	4	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	7	7	1	1	Ng-42
43	5	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	7	7	1	1	Ng-43
44	6	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	5	7	1	1	Ng-44
45	7	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	7	7	1	1	Ng-45
46	8	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	7	7	1	1	Ng-46
47	9	riz cultivé	Daibéri	Sahélienne typique	+	7	7	1	1	Ng-47
48	1	riz cultivé	Daikaina	Sahélienne typique	+	5	5	1	5	Ng-48
49	2	riz cultivé	Daikaina	Sahélienne typique	+	5	7	3	1	Ng-49
50	3	riz cultivé	Daikaina	Sahélienne typique	+	3	5	3	1	Ng-50
51	4	riz cultivé	Daikaina	Sahélienne typique	+	5	5	1	3	Ng-51
52	5	riz cultivé	Daikaina	Sahélienne typique	+	5	5	1	1	Ng-52
53	6	riz cultivé	Daikaina	Sahélienne typique	-	5	5	1	1	Ng-53
54	7	riz cultivé	Daikaina	Sahélienne typique	+	5	5	3	1	Ng-54
55	1	riz cultivé	Toula	Sahélienne typique	+	5	7	1	1	Ng55
56	2	riz cultivé	Toula	Sahélienne typique	+	5	9	1	1	Ng56
57	3	riz cultivé	Toula	Sahélienne typique	+	5	7	3	1	Ng57
58	4	riz cultivé	Toula	Sahélienne typique	+	7	9	7	3	Ng58
59	5	riz cultivé	Toula	Sahélienne typique	+	5	9	5	3	Ng59
60	1	riz cultivé	N`dounga1	Sud-sahélienne	+	3	9	7	1	Ng60
61	2	riz cultivé	N`dounga1	Sud-sahélienne	+	5	9	5	1	Ng61
62	3	riz cultivé	N`dounga1	Sud-sahélienne	+	5	7	5	1	Ng62
63	4	riz cultivé	N`dounga1	Sud-sahélienne	+	5	7	3	1	Ng63
64	1	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng64
65	2	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	5	7	7	1	Ng65
66	3	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	3	7	5	1	Ng66
67	4	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	7	7	3	1	Ng67
68	5	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	7	7	1	3	Ng68
69	6	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	5	7	7	1	Ng69
70	7	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	5	7	5	1	Ng70
71	1	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	7	7	1	1	Ng71
72	2	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	7	7	5	1	Ng72
73	3	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	7	7	7	1	Ng73
74	4	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	5	7	7	1	Ng74
75	5	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng75

+ positif ; - négatif à l'ELISA

Annexe 1. 1. Isolats issus de la caractérisation biologique préliminaire (suite)

S/N	N°échant.	Hôte	Localité	Zone agricole	Elisa	Bké 189	IR 64	Giganté	Tog5681	Code
76	6	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	5	7	7	1	Ng76
77	7	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	5	7	1	3	Ng77
78	8	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng78
79	9	riz cultivé	N`dounga3	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng79
80	2	riz cultivé	Karma	Sud-sahélienne	+	7	3	1	3	Ng80
81	3	riz cultivé	Karma	Sud-sahélienne	-	3	3	1	1	Ng81
82	1	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	7	7	1	1	Ng82
83	2	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	5	5	1	1	Ng83
84	3	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	1	7	1	3	Ng84
85	4	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	3	7	1	1	Ng103
86	5	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	3	1	1	1	Ng104
87	6	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	3	5	1	1	Ng105
88	7	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	1	5	1	1	Ng85
89	8	riz cultivé	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	1	5	1	1	Ng106
90	1	riz cultivé	Yelwani	Sahélienne typique	+	3	5	3	1	Ng107
91	2	riz cultivé	Yelwani	Sahélienne typique	+	3	3	1	1	Ng86
92	3	riz cultivé	Yelwani	Sahélienne typique	+	1	3	1	1	Ng87
93	6	riz cultivé	Yelwani	Sahélienne typique	+	1	3	1	1	Ng88
94	10	riz cultivé	Yelwani	Sahélienne typique	-	1	3	1	1	Ng89
95	1	riz cultivé	Diomana	Nord soudanienne	-	3	3	1	1	Ng90
96	3	riz cultivé	Diomana	Nord soudanienne	-	3	3	1	1	Ng91
97	5	riz cultivé	Diomana	Nord soudanienne	-	1	3	1	1	Ng108
98	1	riz cultivé	Diambala	Nord soudanienne	+	1	3	1	1	Ng92
99	3	riz cultivé	Diambala	Nord soudanienne	+	1	3	1	1	Ng99
100	3	riz cultivé	Bonfeba	Nord soudanienne	+	3	3	1	1	Ng93
101	2	riz cultivé	Daibery	Sud-sahélienne	+	1	7	1	1	Ng94
102	3	riz cultivé	Daibery	Sud-sahélienne	-	1	3	1	1	Ng100
103	4	riz cultivé	Daibery	Sud-sahélienne	+	1	5	3	1	Ng101
104	2	riz cultivé	Toula	Sud-sahélienne	+	1	5	1	1	Ng95
105	4	riz cultivé	Lata	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng96
106	2	riz cultivé	Say	Sud-sahélienne	+	1	3	1	1	Ng102
107	1	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	1	3	1	1	Ng97
108	3	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng98
109	3	riz cultivé	Diffa	Sahélienne typique	+	3	3	3	1	Ng213
110	6	<i>Echinochloa colona</i>	Diffa	Sahélienne typique	+	3	3	3	1	Ng214
111	1	<i>Echinochloa colona</i>	Say-2	Sud-sahélienne	+	5	7	3	1	Ng109
112	2	<i>Laersia hexandra</i>	Say-2	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng110

+ positif ; - négatif à l'ELISA

Annexe 1. 1. Isolats issus de la caractérisation biologique préliminaire (suite)

S/N	N°échant.	Hôte	Localité	Zone agricole	Bké 189	IR 64	Giganté	Tog5681	Code
113	5	<i>Cyperus rotundus</i>	Say-2	Sud-sahélienne	5	7	1	1	Ng111
114	6	<i>Cynodon dactylon</i>	Say-2	Sud-sahélienne	1	3	1	1	Ng112
115	11	<i>Laersia hexandra</i>	Say-2	Sud-sahélienne	7	7	1	1	Ng113
116	12	<i>Eleusine indica</i>	Say-2	Sud-sahélienne	5	5	3	3	Ng114
117	1	riz cultivé	Say-2	Sud-sahélienne	7	7	3	5	Ng115
118	3	riz cultivé	Say-2	Sud-sahélienne	mort	7	3	1	Ng116
119	5	riz cultivé	Say-2	Sud-sahélienne	5	7	3	3	Ng117
120	3	<i>Cyperus rotundus</i>	Lossa	Sahélienne typique	3	5	3	1	Ng117b
121	5	<i>Cyperus rotundus</i>	Lossa	Sahélienne typique	5	7	1	1	Ng118
122	6	<i>Cynodon dactylon</i>	Lossa	Sahélienne typique	3	7	3	1	Ng119
123	13	<i>Laersia hexandra</i>	Lossa	Sahélienne typique	3	3	1	1	Ng120
124	14	<i>Laersia hexandra</i>	Lossa	Sahélienne typique	9	9	3	1	Ng121
125	15	<i>Eleusine indica</i>	Lossa	Sahélienne typique	5	7	1	1	Ng122
126	1	<i>Laersia hexandra</i>	Lossa	Sahélienne typique	3	5	1	3	Ng123
127	2	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	3	3	1	1	Ng124
128	4	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	5	5	1	1	Ng125
129	5	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	5	5	1	1	Ng126
130	6	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	5	5	1	1	Ng127
131	7	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	5	5	5	5	Ng128
132	9	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	5	5	1	1	Ng129
133	10	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	7	7	5	1	Ng130
134	11	riz cultivé	Sona	Sahélienne typique	7	7	1	1	Ng131
135	6	riz cultivé	Kokomani	Sahélienne typique	7	7	5	1	Ng132
136	7	<i>Laersia hexandra</i>	Kokomani	Sahélienne typique	7	5	mort	1	Ng133
137	1	<i>Laersia hexandra</i>	Kokomani	Sahélienne typique	7	7	5	1	Ng134
138	5	riz cultivé	Kokomani	Sahélienne typique	7	7	1	1	Ng136
139	1	riz cultivé	Namari	Sahélienne typique	7	7	1	1	Ng137
140	2	riz cultivé	Namari	Sahélienne typique	7	7	1	1	Ng138
141	1	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	7	7	1	1	Ng139
142	2	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	7	7	1	1	Ng140
143	3	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	7	7	1	1	Ng141
144	4	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	7	7	1	1	Ng142
145	5	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	7	7	1	1	Ng143
146	6	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	mort	7	5	7	Ng144
147	7	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	5	3	1	1	Ng145
148	4	riz cultivé	Kollo	Sud-sahélienne	5	3	1	1	Ng146
149	8	<i>Paspalum emplectens</i>	Kollo	Sud-sahélienne	5	3	1	1	Ng147
150	9	<i>Paspalum emplectens</i>	Kollo	Sud-sahélienne	7	5	1	1	Ng148

+ positif ; - négatif à l'ELISA

Annexe 1. 1. Isolats issus de la caractérisation biologique préliminaire (suite)

S/N	N°échant.	Hôte	Localité	Zone agricole	Elisa	Bké 189	IR 64	Giganté	Tog5681	Code
151	10	<i>Panicum repens</i>	Kollo	Sud-sahélienne	+	7	5	1	1	Ng149
152	1	<i>Paspalum emblectens</i>	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	7	7	3	1	Ng150
153	2	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	7	7	5	3	Ng151
154	3	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	7	7	1	1	Ng152
155	4	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	7	7	1	1	Ng153
156	5	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	7	5	1	1	Ng154
157	6	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng155
158	7	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	7	5	1	1	Ng156
159	8	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng157
160	9	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng158
161	1	riz cultivé	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng159
162	6	<i>Laersia hexandra</i>	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	7	7	1	1	Ng160
163	7	<i>Echinochloa colona</i>	Kirkissoye	Sud-sahélienne	+	3	5	5	1	Ng161
164	3	<i>Cynodon dactylo</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	5	3	1	1	Ng162
165	6	<i>Oryza longistaminata</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng163
166	7	<i>Eulesine indica</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	5	3	1	1	Ng164
167	8	<i>Kylinga squamulata</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng165
168	9	<i>Laersia hexandra</i>	Gaya	Nord soudanienne	-	3	7	3	1	Ng166
169	10	<i>Laersia hexandra</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng167
170	12	<i>Laersia hexandra</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng168
171	13	<i>Paspalum emblectens</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng169
172	1	<i>Oryza longistaminata</i>	Gaya	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng170
173	2	riz cultivé	Gaya	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng171
174	3	riz cultivé	Gaya	Nord soudanienne	+	7	5	1	1	Ng172
175	6	riz cultivé	Sébéri	Sud-sahélienne	+	3	5	3	1	Ng173
176	14	<i>Cynodon dactylon</i>	Sébéri	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng174
177	11	<i>Laersia hexandra</i>	N'Dounga3	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng175
178	1	<i>Laersia hexandra</i>	Liboré	Sud-sahélienne	+	3	5	3	0	Ng176
179	13	<i>Cyperus sp.</i>	Liboré	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng177
180	14	<i>Paspalum emblectens</i>	Liboré	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng178
181	1	<i>Laersia hexandra</i>	Liboré	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng179
182	2	riz cultivé	Liboré	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng180
183	3	riz cultivé	Liboré	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng181
184	9	riz cultivé	Bonféba	Nord soudanienne	+	5	5	1	1	Ng182
185	10	<i>Laersia hexandra</i>	Bonféba	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng183
186	12	<i>Cynodon dactylon</i>	Bonféba	Nord soudanienne	+	7	7	1	mort	Ng184
187	1	<i>Cynodon dactylon</i>	Bonféba	Nord soudanienne	+	7	7	1	1	Ng185
188	6	riz cultivé	Toula	Sahélienne typique	+	1	5	mort	1	Ng186

+ positif ; - négatif à l'ELISA

Annexe 1. 1. Isolats issus de la caractérisation biologique préliminaire (suite & fin)

S/N	N°échant.	Hôte	Localité	Zone agricole	Elisa	Bké189	IR64	Giganté	Tog5681	Code
189	7	<i>Cyperus rotundus</i>	Toula	Sahélienne typique	+	1	7	mort	1	Ng187
190	11	<i>Cynodon dactylon</i>	Toula	Sahélienne typique	+	7	mort	mort	1	Ng188
191	13	<i>Eleusine indica</i>	Toula	Sahélienne typique	+	5	7	mort	1	Ng189
192	8	<i>Cyperus sp.</i>	Daikaina	Sahélienne typique	+	5	5	1	1	Ng190
193	11	<i>Eulesine indica</i>	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	5	5	1	1	Ng191
194	13	<i>Laersia hexandra</i>	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	5	3	1	1	Ng192
195	14	<i>Laersia hexandra</i>	Koutoukalé	Sahélienne typique	+	5	5	1	1	Ng193
196	3	<i>Laersia hexandra</i>	Karma	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng194
197	5	<i>Paspalum empletens</i>	Karma	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng195
198	6	<i>Eleusine indica</i>	Karma	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng196
199	2	<i>Eleusine indica</i>	Say-1	Sud-sahélienne	+	3	5	1	1	Ng197
200	7	<i>Laersia hexandra</i>	Say-1	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng198
201	8	<i>Laersia hexandra</i>	Say-1	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng199
202	1	<i>Oryza longistaminata</i>	Say-1	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng200
203	2	Riz cultivé	Say-1	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng201
204	3	Riz cultivé	Say-1	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng202
205	1	Riz cultivé	Namardé	Sud-sahélienne	+	3	3	3	1	Ng215
206	3	<i>Eleusine indica</i>	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	7	3	1	Ng203
207	4	<i>Laersia hexandra</i>	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	5	3	1	Ng204
208	5	<i>Laersia hexandra</i>	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	5	3	1	Ng205
209	6	<i>Oryza longistaminata</i>	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng206
210	7	<i>Eulesine indica</i>	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	7	1	1	Ng207
211	8	<i>Laersia hexandra</i>	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng208
212	1	<i>Laersia hexandra</i>	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng209
213	2	riz cultivé	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	5	3	1	Ng210
214	3	riz cultivé	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	7	7	3	1	Ng211
215	4	riz cultivé	Kareygorou	Sud-sahélienne	+	5	5	1	1	Ng212

+ positif ; - négatif à l'ELISA

Annexe 1. 2. Inventaire des adventices testés positifs et leurs statuts

S/N	Echant.	Localité	Nom Adventices	Famille	isolat	Score visuel propagation				Statut
						Bké 189	IR 64	Giganté	Tog5681	
1	6	Diffa	<i>Echinochloa colona</i>	Poacée	Ng214	3	3	3	1	RB1
2	1	Say-2	<i>Echinochloa colona</i>	Poacée	Ng109	5	7	3	1	RB1
3	2	Say-2	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng110	5	5	1	1	N
4	5	Say-2	<i>Cyperus rotundus</i>	Cypéracée	Ng111	5	7	1	1	N
5	6	Say-2	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéracée	Ng112	1	3	1	1	N2
6	11	Say-2	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng113	7	7	1	1	N
7	12	Say-2	<i>Eleusine indica</i>	Poacée	Ng114	5	5	3	3	RB2
é	3	Lossa	<i>Cyperus rotundus</i>	Cypéracée	Ng217	3	5	3	1	RB1
9	5	Lossa	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéracée	Ng118	5	7	1	1	N
10	6	Lossa	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng119	3	7	3	1	RB1
11	13	Lossa	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng120	3	3	1	1	N
12	14	Lossa	<i>Eleusine indica</i>	Poacée	Ng121	9	9	3	1	RB1
13	15	Lossa	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng122	5	7	1	1	N
14	6	Kokomani	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng132	7	7	5	1	RB1
15	7	Kokomani	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng133	7	5		1	N
16	4	Kollo	<i>Paspalum emblectens</i>	Poacée	Ng146	5	3	1	1	N
17	8	Kollo	<i>Paspalum emblectens</i>	Poacée	Ng147	5	3	1	1	N
18	9	Kollo	<i>Panicum repens</i>	Poacée	Ng148	7	5	1	1	N
19	10	Kollo	<i>Paspalum emblectens</i>	Poacée	Ng149	7	5	1	1	N
20	1	Kirkissoye	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng159	5	5	1	1	N
21	6	Kirkissoye	<i>Echinochloa colona</i>	Poacée	Ng160	7	7	1	1	N
22	7	Kirkissoye	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéracée	Ng161	3	5	5	1	RB1
23	3	Gaya	<i>Oryza longistaminata</i>	Poacée	Ng162	5	3	1	1	N
24	6	Gaya	<i>Euleusine indica</i>	Poacée	Ng163	7	7	1	1	N
25	7	Gaya	<i>Kylinga squamulata</i>	Cypéracée	Ng164	5	3	1	1	N
26	8	Gaya	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng165	7	7	1	1	N
27	9	Gaya	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng166	3	7	3	1	RB1
28	10	Gaya	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng167	7	7	1	1	N
29	12	Gaya	<i>Paspalum emblectens</i>	Poacée	Ng168	7	7	1	1	N

N : isolat sauvage, RB1 : isolat RB Giganté et RB2 : isolat RB Tog5681

Annexe 1. 2. Inventaire des adventices testés positifs et leurs statuts (suite et fin)

S/N	Echant.	Localité	Nom Adventices	Famille	isolat	Score visuel propagation				Statut
						Bké 189	IR 64	Giganté	Tog5681	
30	13	Gaya	<i>Oryza longistaminata</i>	Poacée	Ng169	7	7	1	1	N
31	6	Sébéri	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéracée	Ng173	3	5	3	1	RB1
32	14	Sébéri	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng174	3	5	1	1	N
33	11	N'Dounga3	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng175	3	5	1	1	N
34	1	Liboré	<i>Cyperus sp.</i>	Cypéracée	Ng176	3	5	3	0	RB1
35	13	Liboré	<i>Paspalum emblectens</i>	Poacée	Ng177	3	5	1	1	N
36	14	Liboré	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng178	3	5	1	1	N
37	9	Bonféba	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng182	5	5	1	1	N
38	10	Bonféba	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéracée	Ng183	7	7	1	1	N
39	12	Bonféba	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéracée	Ng184	7	7	1		N
40	6	Toula	<i>Cyperus rotundus</i>	Cypéracée	Ng186	1	5	mort	1	N2
41	7	Toula	<i>Cynodon dactylon</i>	Cypéracée	Ng187	1	7	mort	1	N2
42	11	Toula	<i>Eleusine indica</i>	Poacée	Ng188	7		mort	1	N1
43	13	Toula	<i>Cyperus sp.</i>	Cypéracée	Ng189	5	7	mort	1	N
44	8	Daikaina	<i>Eulesine indica</i>	Poacée	Ng190	5	5	1	1	N
45	11	Koutoukalé	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng191	5	5	1	1	N
46	13	Koutoukalé	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng192	5	3	1	1	N
47	14	Koutoukalé	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng193	5	5	1	1	N
48	3	Karma	<i>Paspalum emblectens</i>	Poacée	Ng194	5	5	1	1	N
49	5	Karma	<i>Eleusine indica</i>	Poacée	Ng195	5	5	1	1	N
50	6	Karma	<i>Eulesine indica</i>	Poacée	Ng196	3	5	1	1	N
51	2	Say-1	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng197	3	5	1	1	N
52	7	Say-1	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng198	5	5	1	1	N
53	8	Say-1	<i>Oryza longistaminata</i>	Oryzae	Ng199	5	5	1	1	N
54	1	Namardé	<i>Eleusine indica</i>	Poacée	Ng215	3	3	3	1	RB1
55	3	Kareygorou	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng203	5	7	3	1	RB1
56	4	Kareygorou	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng204	5	5	3	1	RB1
57	5	Kareygorou	<i>Oryza longistaminata</i>	Oryzae	Ng205	5	5	3	1	RB1
58	6	Kareygorou	<i>Eleusine indica</i>	Poacée	Ng206	5	7	1	1	N
59	7	Kareygorou	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng207	5	7	1	1	N
60	8	Kareygorou	<i>Laersia hexandra</i>	Poacée	Ng208	5	5	1	1	N

N : isolat sauvage, RB1 : isolat RB Giganté et RB2 : isolat RB Tog5681

Annexe 1. 3. Comparaison des moyennes VxI pour la sévérité à 42 JAI

Variété (V)	Isolat (I)									
	I1	I2	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10
V1	11.4 d	21.4 c	19.6 bc	30.7 c	18.3 c	11.4 c	24.7 b	21.4 c	15.2 c	13.6 c
V2	13.2 d	24.5 c	15.0 c	15.5 c	14.8 c	12.4 c	22.4 b	29.2 bc	19.0 bc	19.8 c
V3	19.3 cd	44.4 b	33.6 b	47.9 b	36.4 b	39.6 b	32.1 b	41.7 b	31.8 b	49.1 b
V4	35.4 abc	71.0 a	78.2 a	73.1 ab	72.1 a	80.6 a	83.5 a	83.1 a	82.7 a	83.1 a
V5	31.6 bc	80.9 a	87.8 a	84.7 a	86.2 a	88.9 a	87.1 a	90.2 a	90.1 a	87.2 a
V6	55.9 a	75.8 a	86.8 a	78.4 a	90.1 a	85.0 a	84.4 a	88.9 a	88.7 a	92.6 a
V7	27.2 bcd	69.4 a	70.6 a	74.2 ab	77.4 a	67.6 a	80.5 a	87.5 a	82.6 a	88.0 a
V8	47.7 ab	75.3 a	83.3 a	80.0 a	78.1 a	85.4 a	88.6 a	88.7 a	79.8 a	89.9 a
V9	23.8 bcd	71.6 a	72.3 a	73.9 ab	71.6 a	81.4 a	83.9 a	84.2 a	77.9 a	86.3 a
I-Mean	29.5	59.4	60.8	62.1	60.6	61.4	65.2	68.3	63.1	67.7

Annexe 1. 3. Comparaison des moyennes VxI pour la sévérité à 42 JAI (Suite)

Variété (V)	Isolat (I)									
	I11	I12	I13	I14	I15	I16	I17	I18	I19	I20
V1	49.5 c	15.1 c	36.0 c	40.9 b	21.9 c	68.2 a	41.0 b	55.0 c	78.5 a	76.4 ab
V2	30.6 d	47.9 b	52.1 bc	62.5 a	42.9 b	40.1 b	46.8 b	89.8 a	87.0 a	85.3 a
V3	57.1 bc	72.0 ab	75.5 ab	81.7 a	80.2 a	67.9 a	75.0 a	63.7 bc	73.5 a	59.8 bc
V4	80.7 ab	89.5 a	89.9 a	89.5 a	85.3 a	75.0 a	77.6 a	14.3 d	21.0 b	34.7 d
V5	88.9 a	89.3 a	87.9 a	88.6 a	89.8 a	88.7 a	86.0 a	32.7 d	30.2 b	44.4 cd
V6	87.7 a	88.2 a	89.2 a	93.2 a	90.3 a	85.6 a	88.5 a	66.7 abc	66.7 a	73.5 ab
V7	79.4 ab	87.1 a	87.4 a	90.2 a	81.6 a	78.3 a	74.7 a	85.7 ab	80.2 a	85.9 a
V8	86.6 a	90.0 a	89.2 a	89.6 a	90.6 a	79.7 a	84.2 a	88.3 a	91.1 a	90.3 a
V9	80.4 ab	88.9 a	87.6 a	87.2 a	89.2 a	78.3 a	87.3 a	88.2 a	82.1 a	82.0 ab
I-Mean	71.2	74.2	77.2	80.4	74.6	73.5	73.5	64.9	67.8	70.3

Annexe 1. 3. Comparaison des moyennes VxI pour la sévérité à 42 JAI (Suite)

Variété (V)	Isolat (I)									
	I21	I22	I23	I24	I25	I26	I27	I28	I29	I30
V1	82.7 ab	68.6 ab	71.6 a	86.3 a	76.6 ab	82.6 a	78.5 a	78.9 a	80.4 a	18.8 c
V2	91.2 a	87.5 a	90.0 a	88.1 a	87.7 a	89.5 a	85.1 a	87.8 a	91.2 a	13.8 c
V3	63.3 b	54.1 b	64.3 a	88.3 a	89.8 a	90.7 a	92.0 a	90.5 a	89.6 a	52.9 b
V4	17.9 c	13.6 c	34.5 b	87.4 a	77.4 ab	88.4 a	79.9 a	78.1 a	84.6 a	82.6 a
V5	36.3 c	21.5 c	32.7 b	91.3 a	88.7 a	82.3 a	81.9 a	87.1 a	82.1 a	91.5 a
V6	69.1 ab	65.3 ab	64.2 a	89.9 a	88.8 a	85.0 a	79.2 a	91.8 a	90.1 a	90.9 a
V7	81.1 ab	76.7 ab	80.6 a	40.7 b	56.1 bc	51.4 bc	44.0 b	42.7 b	65.3 a	86.0 a
V8	89.3 a	90.2 a	29.4 b	28.1 b	39.4 c	33.2 c	12.4 c	19.2 c	80.1 a	88.9 a
V9	91.7 a	86.1 a	67.0 a	65.7 a	68.2 ab	66.8 ab	49.8 b	48.1 b	74.4 a	88.1 a
I-Mean	69.2	62.6	59.4	74	74.7	74.4	67	69.3	82	68.2

Dans une colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à 5% au seuil de DMRT.

Annexe 1. 3. Comparaison des moyennes VxI pour la sévérité à 42 JAI (Suite)

Variété (V)	Isolat (I)									
	I31	I32	I33	I34	I35	I36	I37	I38	I39	I40
V1	19.6 b	18.2 c	12.6 b	12.6 b	13.4 b	16.1 c	41.8 b	11.4 c	29.1 b	12.3 c
V2	26.0 b	14.6 c	12.1 b	17.0 b	19.3 b	12.7 c	11.4 c	16.4 c	12.0 c	13.0 c
V3	73.1 a	54.8 b	60.6 a	63.3 a	71.5 a	64.3 ab	72.1 a	57.7 b	58.3 a	17.4 bc
V4	77.5 a	63.8 ab	66.5 a	70.7 a	79.7 a	76.5 ab	80.2 a	73.7 ab	80.4 a	31.7 b
V5	86.4 a	89.5 a	81.4 a	86.0 a	87.3 a	89.2 a	90.1 a	85.3 ab	88.4 a	67.5 a
V6	71.0 a	83.1 ab	85.4 a	80.6 a	81.3 a	91.1 a	90.4 a	89.4 a	88.3 a	70.6 a
V7	68.1 a	67.1 ab	74.0 a	62.4 a	62.9 a	55.1 b	69.6 a	61.5 ab	74.0 a	25.8 bc
V8	85.4 a	86.3 a	86.5 a	78.4 a	87.4 a	82.0 a	80.7 a	89.5 a	85.0 a	66.1 a
V9	83.6 a	89.7 a	83.7 a	77.2 a	89.6 a	85.2 a	87.0 a	85.8 ab	83.0 a	61.6 a
I-Mean	65.6	63	62.5	60.9	65.8	63.6	69.3	63.4	66.5	40.7

Annexe 1. 3. Comparaison des moyennes VxI pour la sévérité à 42 JAI (Suite)

Variété (V)	Isolat (I)									
	I41	I42	I43	I44	I45	I46	I47	I48	I49	I50
V1	23.0 b	24.6 bc	30.8 b	11.8 e	34.1 bc	19.0 bc	11.8 e	14.0 d	11.4 c	11.8 b
V2	11.9 b	11.6 c	11.9 c	22.7 de	22.9 c	11.4 c	13.2 e	11.4 d	11.8 c	11.4 b
V3	21.7 b	30.1 b	29.1 b	34.1 cd	29.5 c	34.5 b	40.3 cd	35.7 c	11.4 c	11.8 b
V4	52.4 a	61.8 a	67.4 a	50.6 bc	51.4 ab	60.5 a	72.2 ab	57.3 abc	36.3 ab	11.4 b
V5	54.1 a	79.3 a	60.7 a	75.8 ab	70.2 a	64.5 a	88.5 a	77.7 a	41.1 a	20.8 ab
V6	54.8 a	74.4 a	64.1 a	70.8 ab	67.4 a	54.2 a	80.6 a	67.8 ab	49.2 a	34.2 a
V7	55.8 a	57.5 a	82.2 a	82.9 a	60.1 a	11.4 c	25.1 de	45.3 bc	13.6 c	11.8 b
V8	70.9 a	73.7 a	65.0 a	52.5 bc	66.4 a	66.7 a	57.5 bc	69.4 ab	20.5 bc	11.4 b
V9	55.3 a	64.5 a	55.6 a	64.3 ab	71.8 a	58.5 a	82.3 a	61.5 ab	57.5 a	13.9 ab
I-Mean	44.4	53	51.9	51.7	52.6	42.3	52.4	48.9	28.1	15.4

Annexe 1. 3. Comparaison des moyennes VxI pour la sévérité à 42 JAI (suite et fin)

Variété (V)	Isolat (I)										V-Mean
	I51	I52	I53	I54	I55	I56	I57	I58	I59	I60	
V1	11.8 b	11.4 c	11.8 d	11.4 c	19.1 de	11.4 e	14.8 d	11.4 a	11.8 c	11.4 e	31.7
V2	11.4 b	11.8 c	11.4 d	11.8 c	11.4 e	13.6 de	11.8 d	11.8 a	11.4 c	11.8 e	33.3
V3	11.4 b	11.8 c	24.5 cd	11.4 c	32.0 cd	27.2 cd	12.1 d	11.4 a	11.8 c	21.0 de	48.4
V4	16.2 b	27.4 abc	54.1 a	22.2 c	55.4 ab	63.3 ab	47.3 bc	28.3 a	35.7 ab	39.6 bcd	60.9
V5	11.8 b	38.5 a	70.1 a	51.2 b	65.9 ab	75.0 a	74.5 a	28.3 a	47.6 a	72.8 a	70.9
V6	47.0 a	17.0 bc	59.0 a	52.5 b	61.3 ab	65.1 ab	80.0 a	12.2 a	26.6 abc	42.2 bcd	73
V7	12.1 b	33.3 ab	31.9 bc	72.0 ab	40.2 bc	45.1 bc	42.5 c	11.8 a	22.1 bc	29.5 cd	59.8
V8	11.9 b	13.5 c	47.9 ab	79.8 a	62.8 ab	63.0 ab	60.1 abc	26.9 a	41.5 ab	57.0 ab	67.2
V9	23.1 b	39.5 a	49.6 ab	73.0 ab	70.2 a	61.6 ab	64.3 ab	12.2 a	29.4 abc	44.1 bc	69.4
I-Mean	17.4	22.7	40	42.8	46.5	47.3	45.3	17.1	26.4	36.6	57.2

Dans une colonne, les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes à 5% au seuil de DMRT.

Annexe 1. 4. Protocole dr l'ACP-ELISA

La technique ACP-Elisa a consisté à :

- fixer l'antigène dans les puits de microtitration avec 200 µl de broyat d'échantillon de feuilles suspectées (1/10 dans du tampon coating), incuber à 37 °c pendant 2-4 heures ou une nuit et laver 3 fois au PBS-T puis sécher
- ajouter 200 µl de sérum albumine bovine (à 1/100), incuber à 37 °c pendant 1 heure, laver 3 fois au PBS-T puis sécher
- ajouter l'anticorps polyclonal (pool d'anticorps du Niger), dilué dans du PBS (1%), laver 3 fois au PBS-T puis sécher
- additionner le sérum anti-RYMV de souris dilué dans du tampon conjugué (à 1/1000), laver 3 fois au PBS-T puis sécher
- ajouter le Pnpp (para-Nitro-Phényl Phosphate) dissout dans du tampon substrat, incuber à la température ambiante ou à l'obscurité pendant 30 minutes à 1heure puis lire la DO (Densité Optique) à 405 nm.

Annexe 1. 5. Protocole d'extraction des ARNs totaux.

Le procédé d'extraction des ARNs consiste à :

- (i) peser 0,05 g de chaque isolat dans un tube stérile avec bille ;
- (ii) laisser séjourner le tube dans de l'azote liquide et broyer, à l'aide d'un broyeur à bille (Restsch Tissuelyser II Qiagen), dans 500 µl de tampon de lyse (10 µl B-mercaptoéthanol / 1ml tampon RTL), vortexer, incuber 1 à 3 mn à 56 °C et centrifuger à 7000 tours / minute pendant 7 mn ;
- (iii) transférer le surnageant dans la colonne lilas (violette) et centrifuger 2 mn à 14000 tours
- (iv) transférer la phase aqueuse dans un tube de 1.5 ml, ajouter 225 µl d'éthanol 100 % et mélanger, transférer dans la colonne rose et centrifuger 1 mn à 10000 tours (v) jeter le surnageant et ajouter 700 µl de tampon de lavage RW1 dans la colonne, centrifuger 1 mn à 10000 tours et jeter le surnageant avec le tube ;
- (v) laver la colonne avec 500 µl de tampon de lavage RPE, centrifuger 1mn à 10000 tours et jeter le surnageant ;
- (vi) laver à nouveau avec 500 µl de RPE, centrifuger 2 mn à 13000 tours (viii) transférer la colonne dans un tube de 1.5 ml du Kit, éluer l'ARN avec 30 µl d'eau du Kit, centrifuger 1mn à 10000 tours et mettre tout de suite dans la glace.

Annexe 1. 6. Protocole de la transcription reverse (RT)

Le procédé de transcription reverse consiste à :

- (i) mélanger, selon la portion du génôme à transcrire : 7.5 µl d'ARNs totaux extraits sur échantillon ou isolat du virus avec 1µl d'amorce (soit RYMVII ou R1 SNP ou leurs équivalents) à 100 µM et 1.5 µl d'eau ;
- (ii) dénaturer dans le thermo-cycler pendant 5 mn à 70 °C ;
- (iii) ajouter au premier mélange réactionnel : 6µl d'eau, 2 µl de DNTPs (dATP, dGTP, dTTP et dCTP) 5 mM, 1 µl de Rnase inhibitor 20 U/ µl (promega), 5 µl de tampon RTx5 (promega) et 1 µl d'enzyme M-MLV-RT (promega) 200 U/ µl
- (iv) incuber 60 mn à 42 °C dans le thermo-cycler, pour obtenir la transcription inverse de la portion d'ADN viral codant soit pour la PC soit pour la VPg.

Annexe 1. 7. Protocole PCR

La technique PCR comporte 2 étapes :

- (i) préparation du mélange réactionnel qui a consisté à mélanger dans un tube de 2 ml :
 - ✓ 5 µl de tampon PCRx10, 2 µl de dNTPs (dATP, dGTP, dTTP et dCTP) 5 mM, 1 µl d'amorce antisens 5' R1 SNP ou RYMVII ou leurs équivalents 10 µM, 3 µl d'amorce sens 3' F1/SNP 10 µM ou RYMVIII (ou son équivalent M), 35.5 µl d'eau et 1 µl de dynazyme
 - ✓ additionner 2.5 µl d'ADNc cible (produit RT) et mixer
- (ii) incubation dans le thermocycler pour, selon la portion du génôme (VPg ou CP) :
 - ✓ dénaturer 3 ou 5 mn à 94 ° C ;
 - ✓ amplifier en 30 cycles par dénaturation (30 s à 94 ° C), hybridation (30 s à 55 ° C ou 45 ° C) et élongation à 1mn à 72 ° C ;
 - ✓ élonger enfin 10 mn à 72 ° C et stocker à 15 ° C.

Annexe 1. 8. Protocole qRT-PCR

La technique qPCR consiste à :

- (i) préparer le mélange réactionnel (mix) par addition de 12.5 µl de Brilliant II Master Mix 2X, 0.075 µl d'amorces F-qPCR 100 µM, 0.075 µl d'amorces R-qPCR 100 µM et 7.35 µl H₂O ;
- (ii) mettre les tubes dans le bloc froid, garder le mix à l'abri de la lumière ; distribuer le mix, sans vortexer, dans la plaque avec une pipette distributrice et y déposer 5 µl de chaque ADNc dilué 1/1250ème, selon le plan établi;
- (iii) sceller la plaque qPCR à l'aide d'un film avec un thermo-colleur ;
- (iv) incuber la plaque dans le thermocycler MX3005 Stratagene version 2.01, pour :
 - ✓ dénaturer (10 mn à 95 °C) ;
 - ✓ amplifier en 40 cycles (dénaturation 30 secondes à 95 °C, hybridation 1mn à 60 °C et élonger 3 fois (1mn à 95 °C, 30 secondes à 60 °C puis 30 secondes à 95 °C)
- (v) sauvegarder les données sur PowerPoint (graphes) et sur Excel (tableau des valeurs).

Annexe 1. 9. Test Elisa Sandwich Direct

1- Coating des plaques

Diluer l'Ac dans le tampon coating (carbonate) pH9,6, déposer 100µl par puits (dans les 60 puits du milieu); *dans notre cas l'Ac = IgGs anti RYMV Mg purifiées au 1/1000*

Incuber 2 heures à 37°C dans un environnement humide.

2- Lavages

Laver que le milieu de la plaque.

Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 minutes avec du PBST.

Sécher les plaques.

3- Blocage des sites non occupés

Déposer 200 µl de lait écrémé à 3% dans du PBST par puits dans toute la plaque.

Incuber 1heure à 37°C.

4- Lavages

Laver toute la plaque.

Faire un lavage de 3 min avec du PBST.

Sécher les plaques.

5- Dépôt des antigènes

Déposer 100 µl par puits (dans les 60 puits du milieu). *dans notre cas les antigènes sont les broyats de riz dans du PBST au 1/100 et au 1/1000*

Incuber 2 heures à 37°C ou 1 nuit à 4°C.

6- Lavages

Laver que les puits du milieu.

Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 minutes avec du PBST.

Sécher les plaques.

7- Dépôt de l'anticorps conjugué

Déposer 100 µl d'anticorps conjugué dilué dans du PBST par puits (dans les 60 puits du milieu).

dans notre cas, l'ac conjugué =ac RYMV Mg conjugué à la phosphatase alcaline dilué au 1/1000.

Incuber 2heures à 37°C ou 1 nuit à 4°C.

8- Lavages

Laver les puits du milieu plus la ligne du haut.

Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 minutes avec du PBST.

Sécher les plaques.

9- Dépôt du substrat

Dissoudre les tablettes de pNPP dans du tampon diéthanolamine pH9,8 (1 tablette pour 5 ml de tampon).

Déposer 100 µl par puits dans les 60 puits du milieu et la ligne entière du haut.

Incuber à l'obscurité et à température ambiante pendant 1heure.

Lire la DO à 405 nm.

Annexe 1. 10. Test Elisa Sandwich Indirect*1- Coating des plaques*

Diluer l'Ac dans le tampon coating (carbonate) pH9,6, déposer 100µl par puits sur les 60 puits du milieu; *dans notre cas l'Ac = IgGs anti RYMV Mg purifiées au 1/1000*

Incuber 2 heures à 37°C dans un environnement humide.

2- Lavages

Laver les puits du milieu.

Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 minutes avec du PBST.

Sécher les plaques.

3- Blocage des sites non occupés

Déposer 200 µl de lait écrémé à 3% dans du PBST par puits dans toute la plaque.

Incuber 1heure à 37°C.

4- Lavages

Laver toute la plaque.

Faire un lavage de 3 min avec du PBST.

Sécher les plaques.

5- Dépôt des antigènes

Déposer 100 µl par puits dans les 60 puits du milieu (*dans notre cas les antigènes sont les broyats de riz dans du PBST au 1/1000*)

Incuber 2 heures à 37°C ou 1 nuit à 4°C.

6- Lavages

Laver les puits du milieu.

Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 minutes avec du PBST.

Sécher les plaques.

7- Dépôt de l'anticorps

Déposer 100 µl d'anticorps (surnageant) dilué dans du PBST par puits.

dans notre cas, les anticorps =ac RYMV monoclonal Mg différents dilués à différentes dilutions.

Incuber 2heures à 37°C ou 1 nuit à 4°C.

8- Lavages

Laver les puits du milieu.

Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 minutes avec du PBST.

Sécher les plaques.

9-Dépot du conjugué

Déposer 100 µl d'anticorps conjugué dilué dans du PBST par puits dans les 60 puits du milieu. (*dans notre cas l'ac conjugué = IgGs anti souris diluées au 1/8000*).

10- Lavages

Laver les puits du milieu et la ligne du haut.

Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 minutes avec du PBST.

Sécher les plaques.

11- Dépôt du substrat

Dissoudre les tablettes de pNPP dans du tampon diéthanolamine pH 9,8 (1 tablette pour 5 ml de tampon).

Déposer 100 µl par puits dans les puits du milieu et la ligne du haut (elle sert de blanc).

Incuber à l'obscurité et à température ambiante pendant 1 heure.

Lire la DO à 405 nm.

Annexe 1. 11. Inventaire des échantillons de RYMV collectés au Niger

Localité	Ecologie	Coordonnées GPS	Répartition échantillons		
			Riz cultivé	Adventice	Total Echant.
Bonfeba	Irriguée	N 14° 22.286'; E 1° 12.318'	9	12	21
Daiberi	Irriguée	N 14° 9.353'; E 1° 30.252'	15	9	24
Daikaina	Irriguée	N 14° 1°.976'; E 1° 28.809'	9	11	20
Diambala	Irriguée	N 14° 19.457'; E 1° 16.767'	6	13	19
Diomana	Irriguée	N 14° 27.193'; E 1° 6.134'	8	12	20
Karegorou	Irriguée	N 13° 34.176'; E 1° 59.036'	1	8	9
Karma	Irriguée	N 13° 39.8°7'; E 1° 49.483'	8	14	22
Koutoukale	Irriguée	N 13° 41.41°; E 1° 43.611'	16	16	32
Lata	Irriguée	non relevées	6	-	6
Libore	Irriguée	N 13° 23.192'; E 2° 12.029'	7	14	21
Lossa	Irriguée	N 13° 55.169'; E 1° 34.172'	5	16	21
Namarde	Irriguée	N 13° 37.328'; E 1° 52.635'	5	13	18
N'Dounga	Irriguée	N 13° 20.191'; E 2° 16.338'	4	12	16
N'dounga 1	Irriguée	N 13° 20.191'; E 2° 16.338'	4	-	4
N'dounga 3	Irriguée	N 13° 20.191'; E 2° 16.338'	9	-	9
Saadia	Irriguée	N 13° 27.448'; E 2° 7.357'	9	15	24
Saga	Irriguée	N 13° 27.104'; E 2° 8.979'	6	9	15
Say-2	Irriguée	N 13° 4.232'; E 2° 21.212'	5	13	18
Say-1	Irriguée	N 13° 6.626'; E 2° 21.177'	8	12	20
Seberi	Irriguée	N 13° 18.032'; E 2° 20.193'	16	14	30
Tara	Irriguée	non relevées	4	-	4
Toula	Irriguée	N 14° 11.490'; E 1° 27.602'	12	17	29
Yelwani	Irriguée	non relevées	1	-	1
Gaya	Irriguée	N 11° 53.468' ; E 3° 29.155'	5	13	18
Kirkisoye	Irriguée	N 13° 29.155'; E 2° 6.935'	9	7	16
Kollo	Irriguée	N 13° 2°.108'; E 2° 17.849'	8	1	9
Namari	Irriguée	N 14° 21.597'; E 1° 14.396'	2	5	7
Kokomani	Irriguée	N 13° 59.636'; E 1° 31.939'	7	7	14
Sona	Irriguée	N 13° 58.812'; E 1° 32.764'	12	9	21
Diffa	Irriguée	N 13° 29.155' ; E 3° 21.279'	5	2	7
TOTAL			244	283	527

ANNEXE 2: PUBLICATIONS SUR LE RYMV

Article 1

Issaka S., Basso A., Sorho F., Onasanya A., Haougui A., Sido A.Y., Aké S., Fargette D. et Séré, Y. **2012 a.** Diagnosis and Importance of Rice Yellow Mottle Disease Epidemics in Niger Republic. *Journal of Applied Biosciences* **50**: 3501– 3511. **ISSN 1997–5902.**



Diagnosis and importance of rice yellow mottle disease epidemics in Niger republic.

Issaka S.^{1,2,3}, Basso A.^{1,2}, Sorho F.³, Onasanya A.⁴, Haougui A.¹, Sido A.Y.¹, Aké S.³, Fargette D.⁵ and Séré Y^{2*}.

¹ National Institute for Agronomic research of Niger (INRAN), BP. 60 Kollo (Niger),

² Pathology Unit of Africa rice center, 01 Bp. 2031 Cotonou (Bénin),

³ University of Cocody-Abidjan, 22 BP. 582 Abidjan 22 (Côte d'ivoire)

⁴ Plant Pathology Unit, Africa Rice Center (AfricaRice), P.O. Box 33581, Dares-Salaam, Tanzania

⁵ IRD, BP6450, 34394 Montpellier Cedex5 (France)

*Correspondence author: Y. Séré, Tel: +229 21 35 01 88 Fax: +229 21 35 05 56. E-mail: y.sere@cgiar.org

Originally Submitted on 23rd September 2011. Published online at www.m.elewa.org on February 27, 2012.

ABSTRACT

Objectives: To diagnosis *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV) disease and evaluate its importance (geographical distribution, incidence, yields losses and virus population structure) in Niger Republic.

Methodology and Results: A phytosanitary survey of all irrigated perimeters indicated that *Rice Yellow Mottle Virus* was present in most rice fields of Niger Republic with an average incidence of 5 to 90 %. In some fields, the incidence was very high (60 to 90 %) but in others, it was less than 30 %. The yield losses calculated in 4 rice sites under severe attack were between 35 and 71 %. The pre-characterization of isolates collected during the survey revealed diversity at both serological and pathological levels, and most importantly a significant proportion of resistance breaking (RB) isolates. A study on (Poacea and Cyperaceous) suggested that the species *Laersia hexandra*, *Paspalum emplectens*, *Echinochloa colona*, *Panicum repens*, *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Kylinga sp.* and *Cyperus sp.* were hosts reservoirs of *Rice Yellow Mottle Virus* in Niger environment. Their role in disease propagation was discussed.

Conclusion and application: These results reporting the importance of the disease and the presence of RB isolates make necessary complementary studies with a large set of Niger-RYMV isolates and varieties.

Key words: *Niger-RYMV*, *disease incidence*, *yields losses*, *hosts reservoirs*, *Resistance breaking isolates*.

INTRODUCTION

In Niger republic, rice is the main source of calories for the urban populations bordering the Niger River. It is the most cultivated cereal after millet and sorghum (PAFRIZ, 2006). Its annual production is 110,000 tons of paddy (approximately 66.000 tons of white rice), which represents a third of the national consumption (PAFRIZ, 2006; PAFRIZ/AGRHYMET, 2006). Therefore, the national production does not meet the requirements of rice consumption. Efforts are thus made to increase its production. However, the

rice cultivation is seriously affected by limiting factors such as rice yellow mottle disease (Kouassi *et al.* 2005). This disease caused by *Rice yellow Mottle virus* (RYMV), Genus *Sobemovirus*, is specific and emergent to the African continent (Sere *et al.* 2008). It was first discovered in year 1966 in Kenya by Bakker 1974 and thereafter observed in most Africa rice growing environments (Traore *et al.* 2001; Kouassi *et al.* 2005, Sere *et al.* 2008; Ndikumana *et al.* 2011). It is transmitted by insects-vectors and by contact during the cultural

practices (Abo *et al.* 2000; Traore *et al.* 2006 a). The rice yellow mottle disease was first observed in Niger republic by Rechkaus and Adamou twenty five years ago (Kouassi *et al.* 2005). As in many other countries of West Africa, the disease incidence increased dramatically in the early nineties following rice growing intensification (Traore *et al.* 2009). Since then however, its economic importance in Niger remains unknown. No systematic surveys have been conducted to assess the geographical distribution of the disease, the extent of the yield losses and the virus

variability. Similarly, no information is available on environmental factors which modulate the epidemics in Niger Republic. Therefore it was essential to undertake a comprehensive survey of RYMV incidence in the rice ecologies of Niger Republic in order to answer of the following key questions: What is the importance of rice yellow mottle disease in Niger Republic? Which species weeds are likely to play a role in the epidemiology of the virus disease? What are the serological and biological characteristics of its pathogenic agent?

MATERIALS AND METHODS

Zone of study: The zone of study included the two borders of the Niger River as well as the modern rice cultivation around the Lake Chad (Figure 1). It

approximately covers 40.000 ha, distributed in thirty five (35) rice perimeters or sites

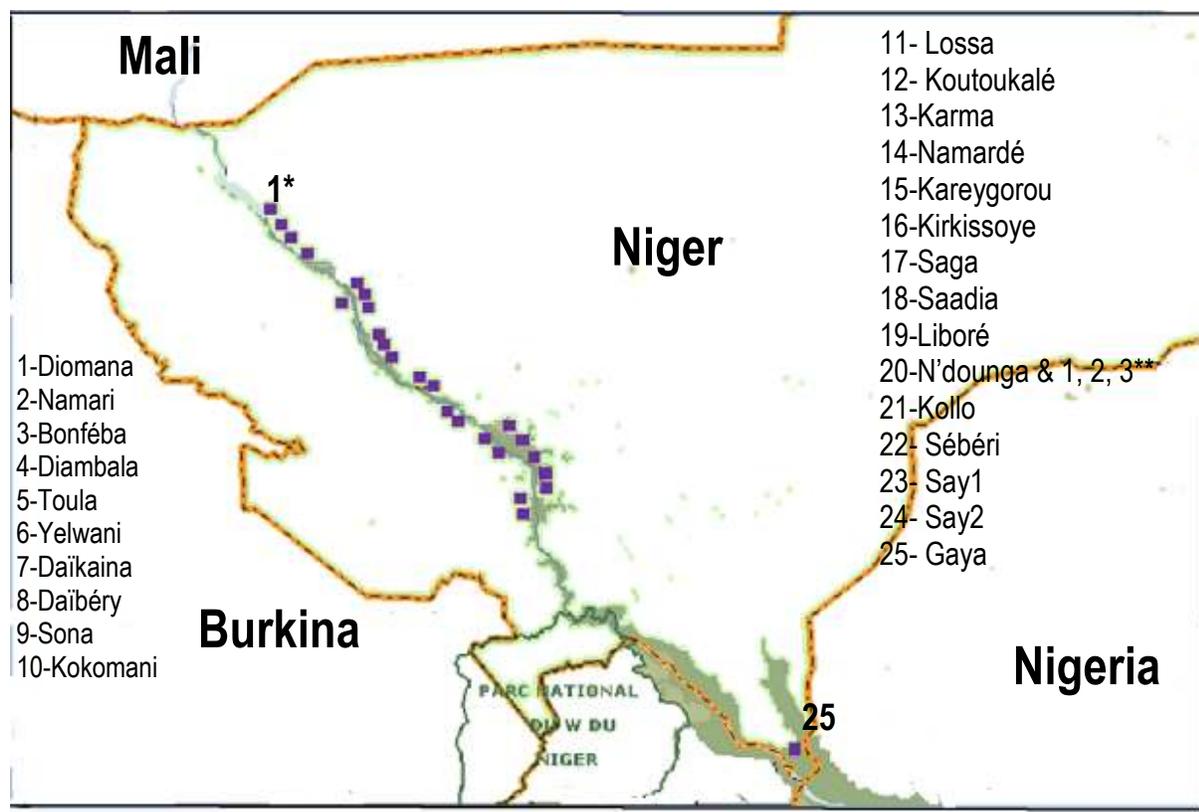


Figure 1: Rice perimeters prospected in Niger

*Sites names in order (1 to 25) without site of Diffa (Eastern Niger); **4 sites of N'dounga (5 Km around)

Evaluation of disease importance: The assessment of the disease incidence was made during surveys of

all irrigated rice perimeters. The incidence was estimated by counting the total numbers of plants and

the number of infected ones on three lines taken randomly in each field. Plots of one square meter (1 m²) were defined in healthy and infected patches in the sites under strong attack at Sébéri, Kollo, Liboré and Kirkissoye, in order to calculate yield losses due to the disease. The yield loss (Pd) was calculated by applying the formula

$Pd = (Pt \times I)/100$, where (I) represents the percentage of disease incidence, (Pt) the potential loss representing the percentage of yield reduction deduced

from the production of healthy and infected square meters.

Samples collection and analysis: Samples of rice and *Graminaceous adventitious* (Poacea and Cyperaceous) showing typical yellowing and mottling symptoms (Figure 2) were collected, taking care to avoid any contact between leaves. These samples were then set in an icebox and transferred to the AfricaRice Plant Pathology laboratory where they were analyzed in containment conditions to comply with the biosecurity rules.

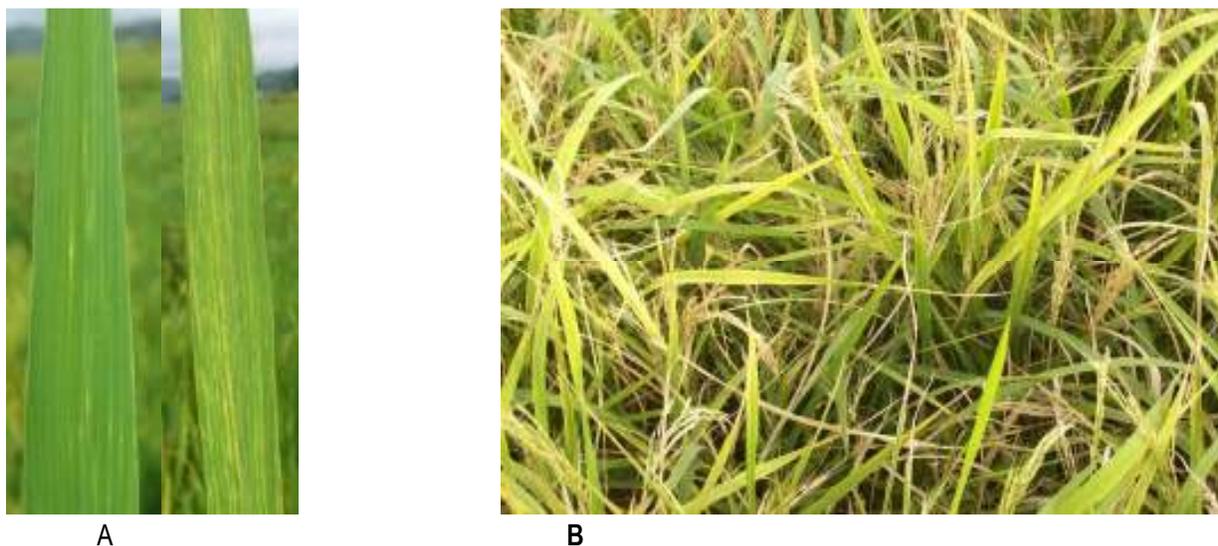


Figure 2: Symptoms of Rice Yellow Mottle Disease, A = detail of symptoms (Photo Y. Sere), B = Symptoms in a rice field at Saga in Niger (Photo S. Issaka)

To test the presence of RYMV in the samples, the ACP-ELISA (Antigen Coating Plate -Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay) test was first carried out using polyclonal antibodies manufactured by AfricaRice (Sere *et al.* 2007; Afolabi *et al.* 2009). The samples were also propagated by mechanical inoculation of 21 days old seedling of two resistant varieties (Gigante and Tog 5681) and two susceptible ones (IR64 and Bouake 189). The 21 days old seedlings were inoculated by rubbing their leaves with inoculums prepared by grounding leaves showing the typical RYMV symptoms

in a phosphate buffer (rate: 1 g of leave for 10 ml of buffer solution). Carborundum was added to the inoculums, as abrasive. (N'Guessan *et al.* 2001; Onasanya *et al.* 2006). The symptoms were evaluated 14 and 21 days after inoculation (JAI) using the scale severity 1-9 (Konaté *et al.* 1997) (where 1 means the lack of symptoms and 9 leave necrosis). Ten polyclonal antibodies products by Africa rice center were used to assess the serological diversity of 66 isolates according to the method described by Sere *et al.* (2007).

RESULTS

Distribution and importance of rice yellow mottle disease in Niger Republic: Investigations and compilations of ONAHA's (Rice perimeters management office) statistical data made it possible to describe characteristics of the 30 perimeters visited

(Table 1). It appeared that 6 rice varieties were cultivated in the 30 irrigated perimeters out of which IR 1529-680-1, WITA8 and Guiza are the most popular. IR1529-683-1 was the most widespread cultivar since it was found on all the sites. Bassiroumo, a variety

derived from IR1529-683-1, occupied nearly 80 % of the emblazed perimeters of Tillabéry's area (Western of Niger), the principal producing rice zone. The RYMV

disease was present on cultivated rice, wild rice and many Gramineous adventitious (Table 2).

Table 1: Profile of rice perimeters prospected in Niger

S/N	Sites	Farm ²¹	GC ²	Agro-ecology	Creation	Varieties cultivated					
1	Diomana	716	2	Northern-sahelian	1991	IR1529	Kass.*	Bass.**			
2	Bonfeba	673	2	Northern-sahelian	1991	IR1529	Kass.*		WITA8		
3	Namari	1774	2	Northern-sahelian	1980	IR1529	Kass.*	Bass.*			
4	Diambala	1580	2	Northern-sahelian	1983	IR1529	Kass.*	Bass.*			
5	Yelwani	297	2	Typical-sahelian	1984	IR1529		Bass.*	WITA8		
6	Toula	720	2	Typical-sahelian	1974	IR1529	Kass.*	Bass.*			
7	Daikaina	325	2	Typical-sahelian	1964	IR1529	Kass.*				
8	Daiberi	572	2	Typical-sahelian	1985	IR1529	Kass.*				
9	Kokomani	150	2	Typical-sahelian	1970	IR1529	Kass.*				
10	Sona	346	2	Typical-sahelian	1974	IR1529	Kass.*				
11	Lossa	433	2	Typical-sahelian	1970	IR1529			WITA8 GUIZA		
12	Koutoukale	720	2	Typical-sahelian	1934	IR1529	Kass.*				
13	Lata	449	2	Typical-sahelian	1990	IR1529			WITA8 GUIZA		
14	Karma	413	2	Southern-sahelian	1971	IR1529	Kass.*				
15	Namarde	484	2	Southern-sahelian	1984	IR1529			WITA8 GUIZA		
16	Karegorou	437	2	Southern-sahelian	1964	IR1529			WITA8		
17	Kirkisoye	334	2	Southern-sahelian	1966	IR1529			WITA8		
18	Saadia	332	2	Southern-sahelian	1973	IR1529			WITA8 local		
19	Saga	1081	2	Southern-sahelian	1966	IR1529			WITA8 GUIZA		
20	Libore	900	2	Southern-sahelian	1973	IR1529			WITA8 GUIZA		
21	N'Dounga 1	775	2	Southern-sahelian	1973	IR1529			WITA8 GUIZA		
22	N'Dounga 3	1047	2	Southern-sahelian	1975	IR1529			WITA8 GUIZA		
23	N'Dounga	?	2	Southern-sahelian	1991	IR1529			WITA8 GUIZA		
24	Kollo	?	2	Southern-sahelian	1984	IR1529			WITA8 GUIZA		
25	Say-2	330	2	Southern-sahelian	1989	IR1529			WITA8 GUIZA		
26	Say-1	350	2	Southern-sahelian	1945	IR1529			WITA8 GUIZA		
27	Seberi	1100	2	Southern-sahelian	1979	IR1529			WITA8 GUIZA		
28	Tara	275	2	Northern-sudanian	1978	IR1529			WITA8 local		
29	Gaya	325	2	Northern-sudanian	1990	IR1529			WITA8 local		
30	Diffa	?	1	Typical-sahelian	1974	IR1529			local		
Number of perimeters						30	11	5	19	12	4
Frequency (in percent)						100	37	17	63	40	13

¹ number of farmers; ²number of growing cycles per year; * Kassoummo; ** Bassiroumo

Table 2: Inventory of RYMV samples collected in Niger

Agro-ecology	Site number	Samples number		
		Rice	Gramineous	Total samples
Northern-sahelian	4	25	42	67
Typical-sahelian	9	81	71	152
Southern-sahelian	15	124	157	281
Northern-sudanian	2	9	13	22
Total	30	239	283	522

Table 3: Incidence of RYMV in Niger rice perimeters

S/N	Locality	Agro-ecology	Incidence (%)		Isolates obtained		
			Humid season	Dry season*	Rice	Graminaceous	Total
1	Bonfeba	Northern-sahelian	10-55	-	2	3	5
2	Diomana	Northern-sahelian	10-30	-	3	0	3
3	Diambala	Northern-sahelian	10-20	-	2	0	2
4	Namari	Northern-sahelian	10-45	-	2	0	2
5	Yelwani	Typical-sahelian	5-60	-	5	0	5
6	Toula	Typical-sahelian	10-35	-	6	4	10
7	Daiberi	Typical-sahelian	10-30	5-20	12	0	12
8	Daikaina	Typical-sahelian	10-35	5-15	7	1	8
9	Kokomani	Typical-sahelian	10-45	-	2	3	5
10	Sona	Typical-sahelian	5-20	-	8	0	8
11	Lossa	Typical-sahelian	5-15	-	1	6	7
12	Lata	Typical-sahelian	5-30	-	1	0	1
13	Koutoukale	Typical-sahelian	5-40	-	8	3	11
14	Karma	Southern-sahelian	5-25	-	2	3	5
15	Karegorou	Southern-sahelian	10-50	5-20	12	4	16
16	Namarde	Southern-sahelian	5-20	5-15	4	1	5
17	Kirkisoye	Southern-sahelian	20-70	-	9	3	12
18	Saga	Southern-sahelian	20-65	5-10	6	0	6
19	Libore	Southern-sahelian	20-90	5-10	5	3	8
20	Saadia	Southern-sahelian	5-20	5-20	2	0	2
21	N'Dounga	Southern-sahelian	15-25	5-15	4	1	5
22	N'dounga 1	Southern-sahelian	10-40	-	4	0	4
23	N'dounga 3	Southern-sahelian	10-50	-	9	1	10
24	Kollo	Southern-sahelian	20-80	-	7	4	11
25	Say-2	Southern-sahelian	5-20	-	3	6	9
26	Say-1	Southern-sahelian	5-25	5-15	9	3	12
27	Seberi	Southern-sahelian	10-60	5-15	9	2	11
28	Tara	Northern-sudanian	15- 50	-	4	0	4
29	Gaya	Northern-sudanian	10-40	5-15	3	8	11
30	Diffa	Typical-sahelian	5-20	-	1	1	2
Total					155	60	215

*non taken

Its incidence was between 5 and 90% (Table 3). The most popular varieties, Bassiroumo and IR1529-683-1 were the most infected ones. Perimeters such as Kirkisoye, Saga, Liboré, Kollo, Sébéri and Yelwani were under strong attack with incidences reaching 60 – 90 %. Others perimeters had infestation levels hardly exceeding 30 % (Table 3). Except N'Dounga1 perimeters, the least attacked perimeters were located in Northern-sahelian zone (dry zone) and the most attacked in sahelian and southern-sahelian areas (more humid). Moreover, the incidence of rice yellow mottle

disease was more important in wet season than in dry country side (Table 3). The average yield losses calculated at Sébéri, Kollo, Liboré and Kirkisoye varied between 35 and 71% (Table 4).

The lowest losses of production were recorded in Sébéri where they do not exceed 35% whereas in all the other studied localities, yield losses exceed 45%, and even reached 71% in Kollo.

Table 4: Importance of yields losses in very infected rice sites of Niger

Locality	Incidence (%)	Productions losses (%)	Unregistered losses (%)
Sébéri	60	57.18	34.31
Kollo	80	82.39	65.91
Liboré	90	77.86	70.08
Kirkissoye	70	65.00	45.50

Hosts reservoirs of RYMV in Niger Republic rice ecology: Out of 215 isolates recorded, 60 came from different weeds (Table 5).

Table 5: Structure of RYMV populations in Niger as revealed by propagation on two susceptible and two resistant varieties

Localities	Total isolates	Types				
		Wild type ¹	RB1 ²	RB2 ³	RB3 ⁴	Particulars ⁵
Bonfeba	5	5				
Daiberi	12	7	1	1		3
Daikaina	8	4	3	1		
Diambala	2	2				
Diomana	3	2				1
Karegorou	16	8	8			
Karma	5	5				
Koutoukale	11	7				4
Lata	1	1				
Libore	8	5	2	1		
Lossa	7	4	3			
Namarde	5	4	1			
N'Dounga	5	1		1	3	
N'dounga 1	4		4			
N'dounga 3	10	5	4	1		
Saadia	2	2				
Saga	6	2		1	3	
Say-2	9	3	2		3	1
Say-1	12	7	1		3	1
Seberi	11	3	6	1		1
Tara	4			1	3	
Toula	10	4	1		2	3
Yelwani	5	1	1			3
Gaya	11	10	1			
Kirkissoye	12	9	2		1	
Kollo	11	10			1	
Namari	2	2				
Kokomani	5	3	2			
Sona	8	6	1		1	
Diffa	2		2			
Total	215	125	45	8	20	17
Total RB (%)			33.9			

¹virulent on sensible varieties; ²virulent on Gigante; ³virulent on Tog5681; ⁴virulent on Gigante/Tog5681; ⁵particulars profiles

These hosts included 10 species which belong to wild rice *Oryza longistaminata* and to the families of Poacea and Cyperaceous (Table 6). Among Poacea, the species *Laersia hexandra*, *Paspalum emplectens*,

Eulesine indica, *Echinochloa colona* and *Panicum repens* were purposed as RYMV hosts reservoirs. Among the Cyperaceous family, *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus sp.* and *Kilinga sp.* were

species harboring RYMV. *Laersia hexandra* proved to be the most infected weed in Niger rice environment, followed by *Eleusine indica* and *Cytodon dactylon*

Table 6: Species of RYMV hosts reservoirs identified in Niger rice ecology

S/N	Species	Family	Number of site	Number of isolate
1	<i>Echinocloacolona</i>	<i>Poacea</i>	3	3
2	<i>Leersiahexandra</i>	<i>Poacea</i>	12	25
3	<i>Cyperusrotundus</i>	<i>Cyperacea</i>	3	3
4	<i>Cynodondactylon</i>	<i>Cyperacea</i>	6	7
5	<i>Paspalumempletens</i>	<i>Poacea</i>	4	6
6	<i>Panicum repens</i>	<i>Poacea</i>	1	1
7	<i>Oryzalongistaminata</i>	<i>Poacea</i>	3	4
8	<i>Kylingasquamulata</i>	<i>Cyperacea</i>	1	1
9	<i>Cyperussp.</i>	<i>Cyperacea</i>	2	2
10	<i>Eleusine indica</i>	<i>Poacea</i>	7	8
Total				60

Pathogenicity of Niger-RYMV isolates: More than 500 samples of rice and *Graminaceous adventitious* leaves were collected in the Niger rice plantations, between years 2005 and 2008 (Table 2). Serological and pathological tests carried out on these samples made it possible to attest presence of the virus responsible on the entire sites. Two hundred and fifteen (215) RYMV isolates were obtained. The biological profiles of these isolates indicated 3 main types in Niger rice ecology (Table 5):

1. The wild isolates (S) caused symptoms on the two susceptible varieties but not on the two resistant ones (Gigante and Tog 5681);
2. The resistance breaking isolates (RB) attacked one or the other of the two resistant varieties (RB1 and RB2 isolates respectively) or both the two (RB3 isolates);
3. The isolates with particular pathogenic behavior included:
 - isolates positive in ELISA test but not producing any symptoms the susceptible varieties;
 - isolates negative in ELISA test but infecting one of the susceptible varieties and
 - isolates pathogenic on one of the susceptible variety but not on the other.

The results of the propagation of RYMV isolates on four varieties (Table 5) indicated an occurrence of about one third of isolates overcoming the high resistance of Tog5681 and / or Gigante. There was no RB isolate in Bonféba and Gaya rice perimeters; whereas all the isolates collected at Diffa, N'Dounga 1 and Tara were resistant breaking. More than half of the isolates of Diomana, Saga, Say 2 and Sébéri perimeters were resistance breaking (RB).

Serotyping of Niger RYMV isolates RYMV: Serological profiles of RYMV isolates tested with polyclonal antibodies classified them in two main groups Sg1 and Sg2. The Sg1 was subdivided in 3 sub-groups (Sg1a, Sg1b and Sg1c) whereas the Sg2 contained 2 sub-groups, Sg2a and Sg2b (Table 7). This suggested a serological diversity in Niger rice ecology. The serogroup Sg1 was more frequent that the Sg2 one. Among the serogroup Sg1, the sub-group Sg1b seemed to be the most cultivated. The 2 serogroups were distributed in all rice area of Niger republic. However, in some perimeters only one serogroup was found. For example, only the serogroup Sg1 was found in the sites of N'Dounga and Liboré whereas only Sg2 one was detected at Namardé.

Table 7: Serogroups (Sg) repartition in Niger rice ecology

Site	SerogroupSg 1			SerogroupSg 2		Total
	Sg1a	Sg1b	Sg1c	Sg2a	Sg2b	
Bonfeba (BON)			1			1
Daiberi (DAB)		2	1		2	5
Daikaina (DAK)	2	1	1		2	6
Diambala (DIA)		1				1
Diomana (DIO)		1				1
Karegorou (CAR)	3			1	1	5
Karma (KAR)			1		1	2
Koutoukale (KOU)		1		1	1	3
Lata (LAT)		1				1
Libore (LIB)		1	1			2
Namarde (NAM)				2		2
Lossa (LOS)		1				1
N'Dounga (NDO)	2		1			3
N'dounga 1 (NDO1)		1		1	1	3
N'dounga 3 (NDO3)		1			1	2
Saadia (SAD)	1		1		1	3
Saga (SAG)	2		2		1	5
Say-1 (SAY1)		2	1	2	1	6
Seberi (SEB)		1		2	1	4
Tara (TAR)	1		1		1	3
Toula (TOU)		3		1		4
Yelwani (YEL)		1	1	1		3
Total	11	18	12	11	14	66

DISCUSSIONS

The current results confirmed the narrowness of the genetic basis of the cultivated material (Sy and Séré, 2001) making the rice culture vulnerable to the disease, as soon as favorable conditions to disease propagation are met. This includes the presence of virus reservoirs and the multiplication of insect vectors because the first infections are initiated from infected wild rice, graminaceous and volunteer rice present in the surrounding area. Thereafter the disease is spread to the nearby cultivated rice by insects-vectors and / or during cultural practices. This pattern of RYMV propagation was reported in various rice ecologies of West Africa, in particular, in Mali and Burkina Faso (Sarra *et al.* 2004; Traore *et al.*, 2006 a; Traore *et al.*, 2009). Among the wild species identified in this study, only *Eleusine indica* had already been described as alternate host of RYMV in Niger rice environment (Konaté *et al.* 1997). The other species were reported here for the first time. However, they were reported in other countries of West Africa where RYMV is endemic (Abo *et al.* 2000; N'Guessan *et al.* 2001; Sarra *et al.* 2004). The presence of these weeds in irrigated zones constitutes potential sources of the inoculum (Kouassi

et al. 2005). Studies showed the role played by alternate hosts (*Graminaceous adventitious*) and wild rice in inter growing cycles (Allarangaye *et al.* 2006). Indeed, RYMV survived in the wild plants when rice is not cultivated. Moreover, such viral pressure favored the emergence of resistance breaking isolates of RYMV (Sorho *et al.* 2005). Thus, an integrated control of RYMV disease should be based on a strong reduction of infectious reservoirs.

The current work indicated that the disease colonized all Niger irrigated rice perimeters. Yield losses due to rice yellow mottle disease were quite important for rice production in Niger Republic. An earlier study of Rechkaus and Adamou in 1986 indicated the presence of RYMV in a few country rice perimeters only with losses from 58 to 68 % reported (Kouassi *et al.* 2005). Dry conditions appeared less favorable to the infection as compared to wet condition. Since 1991, Thresh and collaborators reported that the frequency of viral epidemics was related to vector pressure (Nwilene, 1999). The importance of the disease in wet season could be explained by vectors outbreak at this period, due to more favorable climatic and food conditions. The

presence of many vectors would then increase the spread of RYMV to a large number of rice fields. By contrast, in the dry country side, the low number of insects due to poor habitat conditions decreases considerably virus propagation in the fields. WITA 8 is a variety created by AfricaRice in Nigeria and known to be tolerant to RYMV disease (Unpublished). It was introduced in Niger after the epidemic burst of the early nineties (Sido, 1999). However, rice perimeters of Kirkissoye, Saga, Liboré, Kollo, Sébéri and Yelwani grown with WITA 8 were strongly infected.

The resistance breaking isolates appeared more and more in African rice ecologies. Their emergence under natural conditions in various rice environments of Africa (Traore *et al.* 2006 b; Rakotomalala *et al.* 2008; Amancho *et al.* 2009) and from successive inoculations of wild isolate to resistant varieties (Fargette *et al.* 2002, Sorho *et al.* 2005) constituted a new challenge for genetic control of the rice yellow mottle disease.

The pathogenicity of ELISA negative isolates might indicate that, in these samples, virus quantity did not reach a threshold serologically detectable but remains infectious. Such a response was reported on Gramineous adventitious by Sorho *et al.* (2005). The reaction of ELISA positive but non-pathogenic isolates suggest that they are not sufficiently aggressive on the

varieties tested. Similar results were reported by N'Guessan *et al.* (2001).

Last, pathogenicity of some isolates only on one or other of the susceptible varieties could indicate a difference in response between Bouake 189 and IR64 which should be elucidated. Indeed, one can reasonably draw aside a possibility of escape during the inoculation because all the leaves were inoculated by the same viral solution. The presence of two serogroups Sg1 and Sg2 have already been reported in the Sahel by Sere *et al.* 2005 and 2007. Moreover, molecular analysis and serological studies using monoclonal antibodies conducted in African isolates described six major strains: (i) S1, S2 and S3 located in West Africa (N'Guessan *et al.* 2000), (ii) typical S1-AC of Central Africa (Traore *et al.* 2001; Traore *et al.* 2005); (iii) S4, S5 and S6 specific to East Africa (Fargette *et al.* 2004; Traore *et al.* 2005)

It would be interesting to investigate the distribution of RYMV serotypes in Niger republic using such methods in order to know at which group Niger strains are related. A preliminary study on some RYMV samples reported that Niger-RYMV belonged to the strain S1-AC (Traore *et al.* 2005). Molecular analysis on RYMV isolates collected in practically all perimeters and on various hosts would make it possible to better characterize Niger RYMV strains.

CONCLUSION AND PROSPECTS

Rice yellow mottle disease was found in all Niger irrigated rice perimeters. Its incidence varied between 5 and 90%, depending on the sites. Yield loss various according the perimeters and up to 71 % was reported. The disease is more severe in wet season than in dry season and, in general, the southern-sahelian zones, less dry than the sahelian ones, were more affected. The narrow genetic basis of widely grown varieties and their susceptibility to the disease as well as the presence of a strong proportion of resistance breaking isolates constituted a serious threat to rice growing

intensification in Niger republic. The species *Leersia hexandra*, *Paspalum emblectens*, *Echinochloa colona*, *Panicum repens*, *Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus sp.* and *Kylinga sp.* were purposed as hosts reservoirs of RYMV in this environment. The pathological properties of the isolates and particularly the resistance breaking ones need further investigation by studying the interaction between a large range of Niger RYMV isolates and rice varieties.

ACKNOWLEDGEMENTS

The International Foundation of Science (IFS) and the government of Japan had supported financially the researches. We thank them for their contributions. We

thank also M. George SOTON (support staff at AfricaRice) and M. Bizo MAHAMADOU (support staff at INRAN-Niger) for their technical assistance

REFERENCES

Abo ME, Alegbejo MD, Sy AA, Misari SM. 2000. An Overview of the Mode of Transmission, Host Plants and Methods of Detection of Rice

Yellow Mottle Virus. Journal of Sustainable Agriculture, Vol. 17(1): 19-36.

Afolabi SA, Akator SK, Abo ME, Onasanya A, Sere Y. 2009. Production of polyclonal antibodies to

- various strains of rice yellow mottle virus (RYMV) obtained across different agro-ecological zones in West Africa. *Sci. Res. Essay*, 4: 306-309.
- Allarangaye MD, Traore O, Traore EVS, Millogo RJ, Konate G. 2006. Evidence of non-transmission of Rice yellow mottle virus through seeds of wild host species. *Journal of Plant Pathology* 88(3), 309-315.
- Amancho NA, Kouassi NK, Diallo HA, Bouet A, Sangare A, Kouadio JY. 2009. The Report of Highly Resistance-breaking isolates of Rice yellow mottle virus in Cote d'ivoire. *Afr. J. Plant Sci. Biotechnol.*, 3 (1) 44-50.
- Fargette D, Pinel A, Traore O, Ghesquiere A, Konate G. 2002. Emergence of a resistance breaking isolates of Rice yellow mottle virus during serial inoculations. *Eur. J. Plant Pathol.*, 108: 585-591.
- Fargette D, Pinel A, Abubakar Z, Traore OZ, Brugidou C *et al.*, 2004. Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic and phylogeographic studies. *Journal of Virology* 78: 3252-3261.
- Konaté G, Traoré O, Goulibaly MM. 1997. Characterization of *rice yellow mottle virus* isolates in Sudano-Sahelian areas. *Arch. Virol.* 142:1117-1124.
- Kouassi N, N'Guessan P, Albar L, Fauquet C, Brugidou C. 2005 Distribution and characterization of Rice yellow mottle virus: a threat to African farmers. *Plant Dis* 89: 124–133.
- Ndikumana I, Gasore R, Issaka S, Pinel-Galzi G, Onasanya A *et al.* 2011. Rice yellow mottle virus in rice in Rwanda: First report and evidence of strain circulation. *New Dis. Rep.*, 23: 18-18.
- Ndjiondjop MN., Brugidou C, Shipping Z, Fargette D, Ghesquiere A, Fauquet CM. 2001. High resistance to rice yellow mottle virus in two cultivated rice cultivars is correlated with the failure of cell-to-cell movement. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:309-316.
- N'Guessan P, Pinel A, Caruana M, Frutos R, Sy A, Ghesquiere A, Fargette D. 2000. Evidence of the presence of two serotypes of rice yellow mottle sobemovirus in Côte d'Ivoire. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:167–178.
- N'Guessan P, Pinel A, Sy A, Ghesquiere A, Fargette D. 2001. Distribution, pathogenicity and interactions of two strains of Rice yellow mottle virus in forested and savannah zones of West-Africa. *Plant Dis* 85: 59-64.
- Nwilene FE, 1999. Current status and management of insect vectors of Rice yellow mottle virus (RYMV) in Africa. *Insect Sci. and Appl.*, 19 (2/3): 179-185
- Onasanya A, Sere Y, Sie M, Akator K, Coulibaly MM, Hamadoun A. 2006. Existence of two pathotypes of rice yellow mottle virus, Genus Sobemovirus, in Mali. *Plant pathology journal* 5 (3): 368-372.
- PAFRIZ, 2006. Propositions for a rice cultivation policy in Niger. Final report PAFRIZ / IRAM, March 2006. 193 p.
- PAFRIZ / AGRHYMET, 2006. Determination of surfaces and estimation of the Niger rice production except hydro-agricultural arrangement. Study report PAFRIZ / AGRHYMET, March, 2006. 41 p.
- Rakotomalala M, Pinel-Galzi A, Albar L, Ghesquiere A, Rabenantoandro Y, Ramavovololona P, Fargette D. 2008. Resistance to Rice yellow mottle virus in rice germplasm in Madagascar. *Eur J Plant Pathol* 122:277–286
- Sarra, S, Oevering P, Guindo S, Peters D. 2004. Wind-mediated spread of Rice yellow mottle virus (RYMV) in irrigated rice crops. *Plant Pathology* 53, 148-153.
- Sere Y, Onasanya A, Afolabi AS, Abo ME. 2005. Evaluation and potential of double immune-diffusion gel assay for serological characterization of rice yellow mottle virus isolates in West Africa. *African Journal of Biotechnology* Vol 4 (2), pp 197-205.
- Sere Y, Onasanya A, Akator K, Abo ME. 2007. Serological differentiation indices and phylogenetic analysis of rice yellow mottle virus isolates in Côte d'ivoire. *Journal of Biological Sci.* 7 (7): 1147-1154
- Sere Y, Sorho F, Onasanya A, Jobe L, Darboe S *et al.* 2008. First report of rice yellow mottle virus in rice in the Gambia. *Plant diseases* 92 (2): 316.
- Sido AY, 1999. Activities and results from the component from Niger. Report Presented at the Review and Activity Planning Meeting for the DFID Holdback Project "Coordinated Regional <In-Situ> Screening to Identify Varieties with Durable Resistance to Rice Yellow Mottle Virus" held at Niamey, Niger, 16 to 19 November 1999.

- Sorho F, Pinel A, Traoré O, Bersoult A, Ghesquière A *et al.*, 2005. Durability of natural and transgenic resistances in rice to rice yellow mottle virus. *Eur. J. Plant Pathol.*, 112: 349 - 359
- Sy AA. and Séré Y. 2001. Major varieties under sahelian rice cultivation ecosystem: Resistance profile to rice yellow mottle virus (RYMV) and strategic re-adjustment. In *Rice Yellow Mottle Virus (RYMV): Economic Importance, Diagnosis and Management Strategies*, Bouake, Cote d'Ivoire: West Africa Rice Development Association. p 55-59, *Proceedings of the First International Symposium on Rice Yellow Mottle Virus (RYMV)* vii + 252 p.
- Traore O, Pinel A, Fargette D, Konate G. 2001. First report and characterization of Rice yellow mottle virus in Central Africa. *Plant Dis.*, 85: 920.1-920.1.
- Traore O, Sorho F, Pinel A, Abubakar Z, Banwo O *et al.*, 2005. Processes of diversification and dispersion of Rice yellow mottle virus inferred from large-scale and high-resolution phylogeographical studies. *Molecular Ecology* 14: 2097-2110.
- Traore O, Traore M, Fargette D, Konate G. 2006 a. Rice seedbeds as a source of primary infection by Rice yellow mottle virus. *European Journal of Plant Pathology* 115 (2), p. 181-186.
- Traore O, Pinel A, Hebrard E, Gumedzoe MYD, Fargette D, Traore AS, Konate G. 2006 b. Occurrence of Resistance-Breaking Isolates of Rice yellow mottle virus in West and Central Africa. *Plant Disease* 90: 259-263.
- Traore O, Pinel-Galzi A, Sorho F, Sarra S, Rakotomalala M *et al.*, 2009. A reassessment of the epidemiology of Rice yellow mottle virus following recent advances in field and molecular studies. *Virus Research* 141, 258–267

Article 2

Issaka S., Onasanya A., Basso A., Sorho, F., Haougui A., Sido A.Y, Ake S., Fargette D. and Sere Y.
2012 b. Existence of several pathotypes among *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV) isolates collected in Niger republic. *Trends in Applied Sciences Research* **7** (1): 32-45. **ISSN 1819-3579**.

Existence of Several Pathotypes among Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) Isolates Collected in Niger Republic

^{1,2,3}S. Issaka, ⁴A. Onasanya, ^{1,2}A. Basso, ³F. Sorho, ¹A. Haougui, ¹A.Y. Sido, ³S. Aké, ⁵D. Fargette and ²Y. Séré

¹National Institute for Agronomic Research of Niger (INRAN), BP. 60 Kollo Niger

²Pathology Unit of Africa Rice Center (Africa Rice), 01 BP. 2031 Cotonou, Benin

³University of Cocody-Abidjan, 22 BP. 582, Abidjan 22, Cote d'Ivoire

⁴Plant Pathology Unit, Africa Rice Center (AfricaRice), P.O. Box 33581, Dares-Salaam, Tanzania

⁵IRD, BP 6450, 34394 Montpellier Cedex 5, France

*Corresponding Author: Y. Séré, Plant Pathology Unit, Africa Rice Center (AfricaRice), 01 BP 2031, Cotonou, Benin
Tel: +22921350188 Fax: +22921350556*

ABSTRACT

This study has been conducted in screen house with an aim to assess the Rice yellow mottle virus pathogenic diversity and the level of resistance of released varieties in Niger republic. Sixty RYMV isolates from 23 Niger rice perimeters were inoculated mechanically to nine rice cultivars. The disease symptoms were scored at 42 days after inoculation. Analysis of Variance (ANOVA) and Additive Main effect and Multiplicative Interaction (AMMI) analysis were performed on the percentage of severity. The reaction of the rice cultivars to the virus isolates was significantly different. The interaction between isolates and rice cultivars was also significant. AMMI cluster analysis revealed the existence of four major pathotypes (Path 1 to 4) of Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) in Niger republic. Path 4 pathotype included 12 resistance breaking isolates (20%). Path 3 and Path 2 pathotypes consist of 15 and 26 isolates respectively and were typical of wild type isolates with moderate level of pathogeny, including none aggressive (path 3 = MP) and aggressive isolates (Path 2 = MPA). The fourth pathotype Path 1 was made of 7 isolates and typical of particular isolates which have a moderate pathogenic level (FP). Resistance Breaking (RB) isolates occupied 30% of Niger rice ecologies in variable proportion. The rice varieties (Bassiroumo, IR15-29-690-3-1 and Kassoumo) released in Niger were highly susceptible to RYMV and therefore constituted a favorable condition for the rice yellow mottle disease propagation. This information is useful in rice breeding programs in the development and deployment of RYMV resistant cultivars to different rice perimeters in Niger Republic.

Key words: RYMV, disease severity, pathotype, resistance breaking isolates, rice cultivar, Niger republic

INTRODUCTION

Rice Yellow Mottle Virus (RYMV), genus *Sobemovirus*, is the major constraint to rice production in Africa (Kouassi *et al.*, 2005), causing yield losses comprised between 17-100% (Onwughalu *et al.*, 2011). The virus colonizes all Africa rice ecosystems (Séré *et al.*, 2008). The host

range was restricted to *Gramineous* species, mainly *Oryzae* and *Eragrostida* genus. The RYMV is mechanically transmissible by insects, genus *Chrysomelidea* (Abo *et al.*, 2000; Nwilene *et al.*, 2009). These insects play a major role in the virus transmission. An abiotic transmission (by soil, seedbed, cultural practices etc.) of the RYMV is also reported (Traore *et al.*, 2008, 2006a). The disease is characterized by mottle and yellowing symptoms of varying intensities depending on genotype and time after infection. These symptoms could therefore be mistaken for iron or nitrogen deficiency (Onasanya *et al.*, 2006; Gnanamanickam, 2009). Others symptoms observed on infected plants are pale yellow mottle leaves, stunted, reduced tillering, non-synchronous flowering, poor panicle exertion and grains discoloration (Gnanamanickam, 2009).

The Rice yellow mottle disease was first described in Niger Republic in 1986 by Reckhaus and Adamou (Kouassi *et al.*, 2005). However, no significant research has been undertaken to understand the interaction between RMYV strains and rice varieties in the country. In other African countries, major progress had been made in knowledge of the virus population's structure and diversity (N'Guessan *et al.*, 2000; Fargette *et al.*, 2004; Sorho *et al.*, 2005; Onasanya *et al.*, 2006; Rakotomalala *et al.*, 2008). Several strains of the virus with different geographical distribution were described (Abubakar *et al.*, 2003; Traore *et al.*, 2005). Natural and transgenic sources of resistance were reported (Sorho *et al.*, 2005) and two (2) to three (3) different pathogroups of *rymv1* had been defined in different rice spaces (N'Guessan *et al.*, 2001; Onasanya *et al.*, 2006; Amancho *et al.*, 2009). Moreover many resistance genes were described. The major gene of resistance against *rymv*, *rymv1*, identified in the *O. sativa* resistant variety Gigante. The gene *rymv1* encodes a translation initiation factor called eIF (iso) 4G (Albar *et al.*, 2006). This factor is also responsible of the resistance of resistant cultivars *O. glaberrima*, accessions Tog5681 and Tog5672 linked respectively to the alleles *rymv1-3* and *rymv1-4*. These 2 alleles are distinct from the Gigante resistance allele *rymv1-2* (Albar *et al.*, 2006). A new resistance gene was recently reported as *RYMV2* in Tog5672 and Tog5691 (Thiemele *et al.*, 2010). However, the emergence of Resistance-breaking (RB) isolates (Fargette *et al.*, 2002; Traore *et al.*, 2006b; Amancho *et al.*, 2009) is a matter of concern. The existence of this kind of RYMV isolate has been proved in most rice ecologies (Ochola and Tusiime, 2011). Therefore the deployment of resistant varieties in a rice growing environment requires a good knowledge of the virus diversity.

The current study investigated the existence and distribution of different pathotype of Rice yellow mottle virus isolates in Niger republic. A preliminary propagation of the collected samples (Unpublished) revealed the existence of different types of isolates including some RB isolates. The current work aimed to clarify the effective presence and proportion of RB isolates in Niger RYMV's populations. Their implications in rice improvement in Niger are also discussed.

MATERIALS AND METHODS

Rice cultivars: Nine rice cultivars (Table 1) were used for this study.

Virus isolates and inoculation procedure: Sixty RYMV isolates (Table 2) used for this study were collected from rice and weeds in 23 different localities in Niger republic. Before use, each isolate was first propagated in the susceptible rice variety IR 64, by mechanical inoculation of 21 old plants in the screen house. Four weeks after inoculation, leaves from each RYMV isolate with typical symptoms of RYMV disease were harvested and ground with 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 at the ratio of 1:10 (w/v). By this way, the inoculum of the isolates was standardised. The resulting homogenate filtered through cheesecloth. Carborundum powder (600 mesh) was added

Table 1: Identity of varieties used for this study

Code	Genotype	Variety	Resistance allele	Origin
V1	Gigante	Indica	rymv1-2	AfricaRice *
V2	Tog 5681	Glaberrima	rymv1-3	AfricaRice*
V3	Moroberekan	Japonica	Partial resistance Allele	AfricaRice*
V4	PNA 647F4-56	Japonica		AfricaRice*
V5	Bouake 189	indica	rym1-1	AfricaRice*
V6	IR 64	Indica	rym1-1	AfricaRice*
V7	Bassirou Moa	Indica		INRAN**
V8	IR 1529-680-3	Indica		INRAN**
V9	Kassoum Moa	Indica		INRAN**

* Varieties obtained from Plant Pathology Unit, Africa Rice Center. ** Varieties obtained from National Institute of Agricultural Research of Niger (INRAN)

Table 2: List of isolates used for the study

Code	Isolate	Locality	Ecology	Collection date
I1	Ng28	Saadia	Irrigated	13/04/2008
I2	Ng7	Saga	Irrigated	12/04/2008
I3	Ng17	Seberi	Irrigated	12/04/2008
I4	Ng20	Say-1	Irrigated	13/04/2008
I5	Ng24	Saadia	Irrigated	13/04/2008
I6	Ng26	Saadia	Irrigated	13/04/2008
I7	Ng29	Namarde	Irrigated	14/04/2008
I8	Ng31	Namarde	Irrigated	14/04/2008
I9	Ng33	Karegorou	Irrigated	14/04/2008
I10	Ng35	Karegorou	Irrigated	14/04/2008
I11	Ng39	Daiberi	Irrigated	15/04/2008
I12	Ng45	Daiberi	Irrigated	15/04/2008
I13	Ng47	Daiberi	Irrigated	15/04/2008
I14	Ng53	Daikaina	Irrigated	15/04/2008
I15	Ng11	Libore	Irrigated	12/04/2008
I16	Ng23	Say-1	Irrigated	13/04/2008
I17	Ng34	Karegorou	Irrigated	14/04/2008
I18	Ng36	Karegorou	Irrigated	14/04/2008
I19	Ng37	Karegorou	Irrigated	15/04/2008
I20	Ng40	Daiberi	Irrigated	15/04/2008
I21	Ng50	Daikaina	Irrigated	15/04/2008
I22	Ng54	Daikaina	Irrigated	15/04/2008
I23	Ng1	Tara	Irrigated	11/04/2008
I24	Ng6	Saga	Irrigated	12/04/2008
I25	Ng12	Libore	Irrigated	12/04/2008
I26	Ng15	N'Dounga	Irrigated	12/04/2008
I27	Ng41	Daiberi	Irrigated	15/04/2008
I28	Ng48	Daikaina	Irrigated	15/04/2008
I29	Ng51	Daikaina	Irrigated	15/04/2008
I30	Ng2	Tara	Irrigated	11/04/2008
I31	Ng5	Saga	Irrigated	12/04/2008
I32	Ng9	Saga	Irrigated	12/04/2008
I33	Ng10	Saga	Irrigated	12/04/2008
I34	Ng13	N'Dounga	Irrigated	12/04/2008

Table 2: Continued

Code	Isolate	Locality	Ecology	Collection date
I35	Ng14	N'Dounga	Irrigated	12/04/2008
I36	Ng16	N'Dounga	Irrigated	12/04/2008
I37	Ng18	Seberi	Irrigated	12/04/2008
I38	Ng19	Say-1	Irrigated	13/04/2008
I39	Ng22	Say-1	Irrigated	13/04/2008
I40	Ng104	Koutoukale	Irrigated	7/12/2007
I41	Ng107	Yelwani	Irrigated	6/12/2007
I42	Ng55	Toula	Irrigated	15/04/2008
I43	Ng63	N` dounga 1	Irrigated	7/07/2008
I44	Ng65	Seberi	Irrigated	7/07/2008
I45	Ng77	N` dounga 3	Irrigated	7/07/2008
I46	Ng80	Karma	Irrigated	5/12/2007
I47	Ng83	Koutoukale	Irrigated	5/12/2007
I48	Ng59	Toula	Irrigated	15/04/2008
I49	Ng91	Diomana	Irrigated	6/12/2007
I50	Ng99	Diambala	Irrigated	6/12/2007
I51	Ng100	Daibery	Irrigated	7/12/2007
I52	Ng96	Lata	Irrigated	7/12/2007
I53	Ng102	Say	Irrigated	8/12/2007
I54	Ng98	Seberi	Irrigated	8/12/2007
I55	Ng81	Karma	Irrigated	5/12/2007
I56	Ng85	Koutoukale	Irrigated	5/12/2007
I57	Ng86	Yelwani	Irrigated	6/12/2007
I58	Ng93	Bonfeba	Irrigated	6/12/2007
I59	Ng95	Toula	Irrigated	7/12/2007
I60	Ng109	Say-2	Irrigated	8/12/2007

to the inoculum to aid the penetration of the virus into leaf tissues. The 21 days old seedlings of the 9 rice cultivars were mechanically inoculated in the screen house with the inoculum of the 60 isolates.

Experimental design: For each isolate, the experimental design was a randomized complete block with 3 replications. A fourth replicate was inoculated with 0.01 M phosphate buffer pH 7.0 and used as control. All the young rice plants were inoculated by the same way.

Data collection: Each leave was scored 42 days after inoculation according to a standard evaluation system where 1 characterized a lack of symptom and 9 a destroyed leave (Sorho *et al.*, 2005) Disease severity was then evaluated as :

$$S = \{(n1*1 + n3*3 + n5*5 + n7*7 + n9*9)*100\} / \{(n1 + n3 + n5 + n7 + n9)*9\}$$

where, n1, n3, n5, n7 and n9 represented the number of plants scored 1, 3, 5, 7 and 9, respectively (Fininsa, 2003).

Data analysis: Analysis of Variance (ANOVA) and mean comparison of percentage disease severity were performed, using IRRISTAT version 4.3 statistical software. Genotype (cultivar) by

environment (isolate) interaction effects on percentage disease incidence was carried out using additive main effect and Multiplicative Interaction (AMMI) analysis (Ebdon and Gauch, 2002b; Onasanya *et al.*, 2006).

RESULTS

The ANOVA performed on disease severity indicated a significant difference between the 60 RYMV isolates collected in Niger Republic and the nine rice varieties (Table 3). Moreover, a significant interaction was found between the varieties and the isolates.

The mean comparison (full data not showed) allowed describing the interaction between the RYMV isolates and the rice varieties. An average severity of 25% is a threshold under which the response reflected the non-pathogenicity of the isolates and the resistance of the varieties. An example of a qualitative description of the relationship between virus isolates and rice varieties was given in the Table 4a and b. The mean comparison (Table 4a) allowed identifying the severity value that was statistically under or above the threshold of 25%. Therefore, the rice cultivars were described either Resistant (R) or Susceptible (S) to the RYMV isolate (Table 4b). A highly compatible interaction was found on almost all susceptible and partial resistant genotypes, as the majority of isolates (80%) were pathogenic on them. Then the resistant varieties showed a fairly compatible interaction (38.3%) with only few isolates (Table 5).

Cultivars Gigante and Tog 5681 are characterized by their resistance to more RYMV strains than the other varieties (Fig. 1; Table 5). Indeed, their resistance alleles (*rymv1-2* and

Table 3: ANOVA for Severity (SEV), at 42 days after inoculation

Source de variance	DF	F SEV	Significance*
Repetition (R)	2	<1	
Treatment (T)	539	13.93	HS
Variety (V)	8	274.76	HS
Isolate (I)	59	43.72	HS
VxI	472	5.78	HS
Erreur	1078		
Total	1619		
CV		10.4%	

*HS = Highly significant at 1%

Table 4a: Example of a qualitative description of the relationship between RYMV isolates and rice varieties 4a: Mean comparison

Variety (V)	Isolate (I)								
	Ng 28	Ng 7	Ng 17	Ng 20	Ng 24	Ng 26	Ng 29	Ng 31	Ng 33
Gigante	11.4d	21.4c	19.6bc	30.7c	18.3c	11.4c	24.7b	21.4c	15.2c
Tog 5681	13.2d	24.5c	15.0c	15.5c	14.8c	12.4c	22.4b	29.2bc	19.0bc
Moroberekan	19.3cd	44.4b	33.6b	47.9b	36.4b	39.6b	32.1b	41.7b	31.8b
PNA647F4-56	35.4abc	71.0a	78.2a	73.1ab	72.1a	80.6a	83.5a	83.1a	82.7a
Bouake 189	31.6bc	80.9a	87.8a	84.7a	86.2a	88.9a	87.1a	90.2a	90.1a
IR 64	55.9a	75.8a	86.8a	78.4a	90.1a	85.0a	84.4a	88.9a	88.7a
Bassirou Moa	27.2bcd	69.4a	70.6a	74.2ab	77.4a	67.6a	80.5a	87.5a	82.6a
IR 1529-680-3-1	47.7ab	75.3a	83.3a	80.0a	78.1a	85.4a	88.6a	88.7a	79.8a
Kassoum Moa	23.8bcd	71.6a	72.3a	73.9ab	71.6a	81.4a	83.9a	84.2a	77.9a

In the same column, means followed by the same letter are not significantly different at 5% level

Table 4b: Qualitative description

Variety (V)	Isolate (I)								
	Ng 28	Ng 7	Ng 17	Ng 20	Ng 24	Ng 26	Ng 29	Ng 31	Ng 33
Gigante	R	R	R	S	R	R	S	R	R
Tog 5681	R	R	R	S	R	R	S	S	R
Moroberekan	R	S	S	S	S	S	S	S	S
PNA647F4-56	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bouake 189	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 64	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Bassirou Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IR 1529-680-3-1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kassoum Moa	S	S	S	S	S	S	S	S	S

R: resistant; S: susceptible

Table 5: Compatible reaction between 9 rice genotypes and 60 Niger RYMV isolates

Varieties	Number of compatible reactions	Proportion (%)
Gigante	23	38.3
Tog 5681	23	38.3
Moroberekan	48	80.0
PNA 647F4-56	56	93.3
Bouake 189	57	95.0
IR 64	58	96.7
Bassirou Moa	54	90.0
IR 1529-680-3	54	90.0
Kassoum Moa	57	95.0

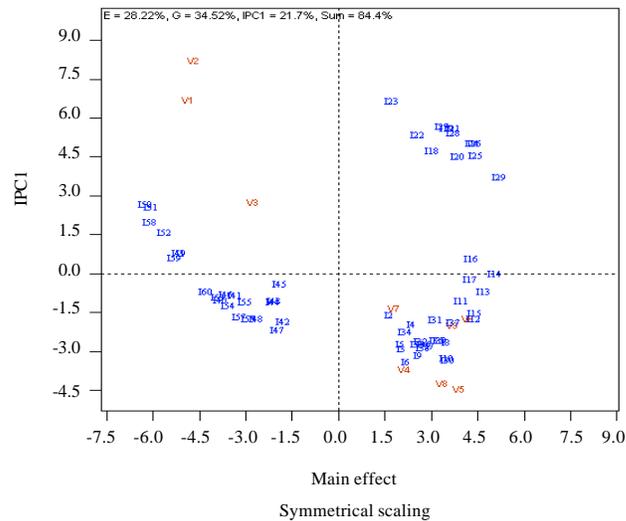


Fig. 1: Main effects genotype (cultivar) by environment (isolate) interaction on percentage RYMV disease severity using additive main effects and multiplicative interaction (AMMI) analysis V1: Gigante, V2: Tog5681, V3: Moroberekan, V4: PNA647F4-56, V5: Bouake 189, V6: IR64, V7: IR1529-680-1, V8: Bassiroumo, V9: Kassoumo, I1, I2.....I60: Isolate 1, 2....60 (Completed Table 2)

rymv1-3, respectively) are broken by 38.3% of the Niger RYMV isolates (Table 5). However, according to the principal component analysis and pathotypes distribution (Fig. 1 and Table 6), the resistance breaking isolates (RB)'s proportion in Niger rice ecologies did not exceed 20%. Moreover, some isolates showed a particular pathogenicity but represented only 8% of the pathogen population (Table 6).

Table 6: Distribution of RYMV pathotypes in the irrigated rice ecologies of Niger Republic revealed by AMMI

Code	Isolate	Locality	Pathotype	Pathotype proportion (%)	Site proportion (%)
I24	Ng6	Saga			
I26	Ng15	N'Dounga			
I25	Ng12	Libore			
I27	Ng41	Daiberi	Path 4 RB isolates		
I28	Ng48	Daikaina		20	31
I29	Ng51	Daikaina			
I18	Ng36	Karegorou			
I22	Ng54	Daikaina			
I19	Ng37	Karegorou			
I21	Ng50	Daikaina			
I20	Ng40	Daiberi			
I23	Ng1	Tara			
I40	Ng104	Koutoukale			
I57	Ng86	Yelwani			
I41	Ng107	Yelwani			
I42	Ng55	Toula			
I45	Ng77	N' dounga 3	Path 3 Wild type isolates	25	39
I48	Ng59	Toula			
I56	Ng85	Koutoukale			
I55	Ng81	Karma			
I46	Ng80	Karma			
I53	Ng102	Say			
I60	Ng109	Say-2			
I47	Ng83	Koutoukale			
I43	Ng63	N' dounga 1			
I44	Ng65	Seberi			
I54	Ng98	Seberi			
I2	Ng7	Saga			
I4	Ng20	Say-1			
I3	Ng17	Seberi			
I5	Ng24	Saadia			
I9	Ng33	Karegorou			
I6	Ng26	Saadia			
I7	Ng29	Namarde			
I8	Ng31	Namarde			
I10	Ng35	Karegorou			
I30	Ng2	Tara	Path 2 Aggressive Wild type isolates	44	48
I31	Ng5	Saga			
I35	Ng14	N'Dounga			

Table 6: Continued

Code	Isolate	Locality	Pathotype	Pathotype proportion (%)	Site proportion (%)
I32	Ng9	Saga			
I33	Ng10	Saga			
I34	Ng13	N'Dounga			
I36	Ng16	N'Dounga			
I38	Ng19	Say-1			
I37	Ng18	Seberi			
I39	Ng22	Say-1			
I11	Ng39	Daiberi			
I16	Ng23	Say-1			
I12	Ng45	Daiberi			
I15	Ng11	Libore			
I13	Ng47	Daiberi			
I14	Ng53	Daikaina			
I17	Ng34	Karegorou			
I1	Ng28	Saadia			
I49	Ng91	Diomana	Path 1 Particular isolates	11	31
I50	Ng99	Diambala			
I51	Ng100	Daibery			
I52	Ng96	Lata			
I58	Ng93	Bonfeba			
I59	Ng95	Toula			

Genotypes x Environment interactions (environment represented by various isolates) were examined through the AMMI model. This model combines the additive model of ANOVA and the interaction displayed by the principal component analysis. This analysis (Fig. 2) showed that severity is more correlated with PC1 axis (52.8%), showing the aggressiveness of RYMV isolates and the susceptibility of rice cultivars. PC2 axis (25.3%) expressed the virulence of RYMV isolates and the resistance level of rice varieties. Finally, 4 types of interaction could be described (Fig. 2).

The AMMI cluster analysis (Fig. 3) classified the RYMV isolates in four major pathotypes, Path 1 to Path 4 (Table 6). Moreover the rice varieties were categorized into three groups (Fig. 4). Path 4 pathotype was made of 12 RYMV isolates with typical virulent isolates (20%) called resistance breaking isolates (HP). Path 3 and Path 2 pathotypes consisted of 15 and 26 RYMV isolates respectively and were typical of wild type isolates with moderate level of pathogeny including non-aggressive (path 3 = MP) and aggressive isolates (path 2 = MPA). The fourth pathotype was made of 7 RYMV isolates and was typical of particular isolates with average pathogenic level (FP).

RB isolates occupied 30% of irrigated perimeter of Niger in variable proportions according to locations. In some perimeters like Daibery, Daikaina and Kareygorou, they coexisted with wild type isolates characterized by variable pathogenic level (Table 6). According to AMMI analysis, Path 2 pathotype isolates were responsible mainly for favourable interactive conditions, leading to significant increase in percentage disease severity in all the rice cultivars used (Fig. 2).

Variety resistant group (R) was made up of two highly resistant cultivars (V1 = Gigante and V2 = Tog 5681) and one moderately resistant cultivar (V3 = Moroberekan). Two susceptible cultivars (V4 = PNA 647F4-56 and V5 = Bouake 189) made up the S group while HS group included four highly susceptible cultivars (V6 = IR 64, V7 = Bassiroumo, V8 = IR15-29-690-3-1 and V9= Kassomumo). These results have shown that the three widely cultivated genotypes in Niger republic (Bassiroumo, IR15-29-690-3-1 and Kassomumo) were highly susceptible to RYMV.

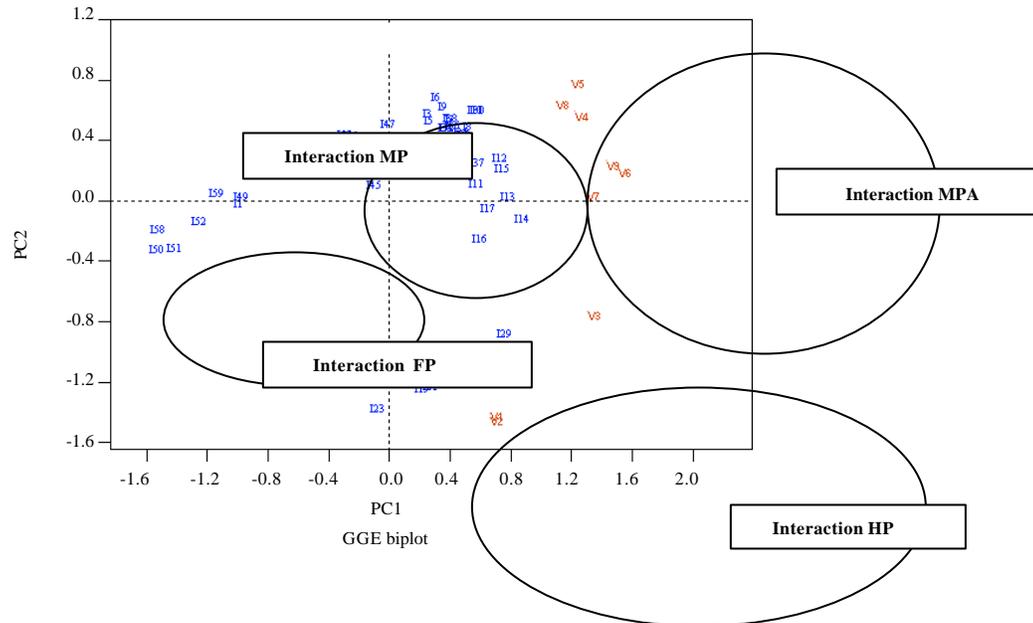


Fig. 2: Relationship among rice variety and RYMV isolate as revealed by genotype (cultivar) by environment (isolates) interaction effects on percentage RYMV disease severity using additive main effects and Multiplicate Interaction (AMMI) analysis. HP: Highly pathogenic (virulent); MP: Moderately pathogenic; MPA: Aggressive and moderately pathogenic and FP: Fairly pathogenic

DISCUSSION

This study revealed the pathogenic diversity of RYMV population in Niger. The existence of interaction indicated that varieties were different by their vertical and complete resistance (Adugna, 2004) and therefore, the isolates by their virulence.

This diversity can be described both by the isolates ability to develop compatible reaction (virulence) with the rice cultivars and the intensity of disease (aggressiveness). The four pathotypes revealed by statistical analysis consist of one resistance breaking isolates group (Path 4), two wild types isolates groups with variable aggressiveness level (Path 3 and Path 2) and a particular pathogenic isolate group (Path 1). In earlier studies, the existence of 2 to 3 pathotypes in different rice environments of Africa has been observed (N'Guessan *et al.*, 2001; Ndjiondjop *et al.*, 2001; Onasanya *et al.*, 2006). The present results reported, for the first time, the presence of RB isolates (20%) in Niger republic. They are coexisting with a high proportion of wild type isolates non RB but aggressive. Such a high proportion of avirulent RYMV isolates in Niger rice ecology has already been reported elsewhere in Africa (Sorho *et al.*, 2005; Onasanya *et al.*, 2006; Amancho *et al.*, 2009; Ochola and Tusiime, 2011). This information underlines the risk of a control of RYMV based only on the use of resistant genes.

The additive main effect and Multiplicative Interaction (AMMI) analysis appeared to be very effective in understanding and explaining complex genotype by environment (GxE) interactions between the rice genotypes and RYMV isolates (Ebdon and Gauch, 2002a; Onasanya *et al.*, 2004, 2006). Previous studies revealed that such interactions could generate complex data difficult to

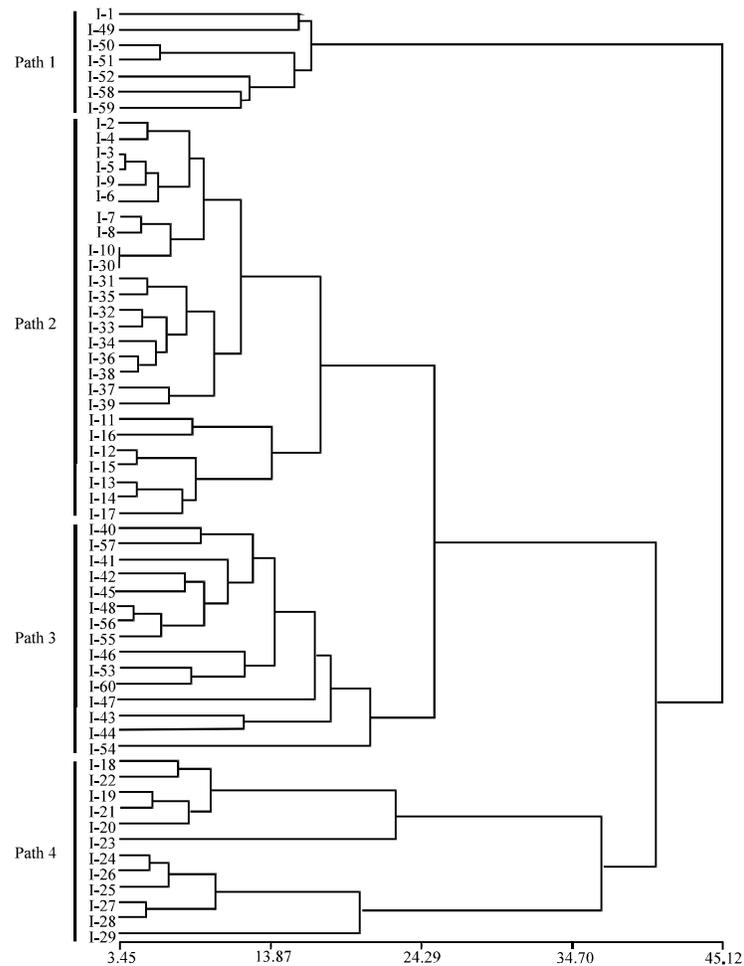


Fig. 3: RYMV isolate pathotype as revealed by Additive Main effects and Multiplicate Interaction (AMMI) cluster analysis. Path 1: particular isolates pathotype, Path 2: aggressive wild isolates pathotype, Path 3: Wild type isolates pathotype and Path 4 = resistance breaking isolates pathotype

understand with ordinary analysis of variance (Onasanya *et al.*, 2004, 2006). In the current study, the 60 RYMV isolates used covered major rice ecologies from different localities in Niger republic leading to very high RYMV interactions among rice cultivars. The existence of four pathotypes obtained in this study (Path 1 to Path 4) has led to differential reactions among genotypes with heavy implications on the cultivar resistance stability (Onasanya *et al.*, 2004, 2006; N'Guessan *et al.*, 2000). The presence of different Niger RYMV pathotypes in all rice areas indicated a high RYMV pathogenic variability in fields. Infestation of more than 30% perimeters by RB isolates suggested their wide distribution.

The cultivars Gigante and Tog 5681 has showed fair compatibility with Niger RYMV strain while the other cultivars present high compatibility. In fact, the resistance genes *rymv1-2* (of Gigante) and *rym1-3* (of Tog 5681) were useful against several RYMV pathotypes (Albar *et al.*, 2006; Rakotomalala *et al.*, 2008; Thiemele *et al.*, 2010). These resistance sources are exploitable for varietal control of Rice yellow mottle disease (Ndjiondjop *et al.*, 2001; Sorho *et al.*, 2005). However,

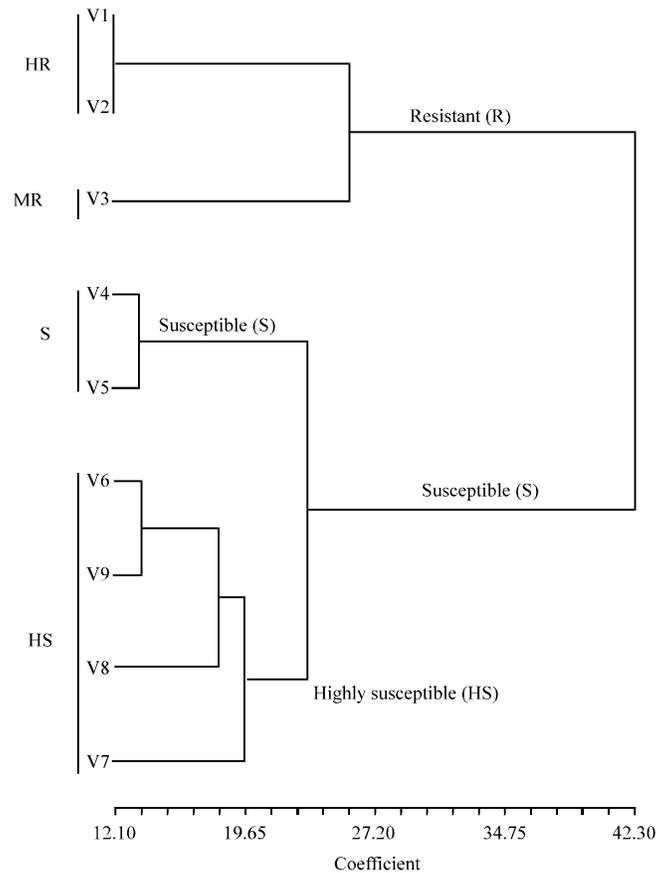


Fig. 4: Resistance status of nine rice varieties to RYMV isolates from Niger Republic as revealed by Additive Main effects and Multiplicate Interaction (AMMI) cluster analysis. MR: moderately resistant; HR: Highly resistant; S: Susceptible; HS: Highly susceptible

the presence of a new virulent pathotype (Path 4) in different rice ecologies of Niger Republic constitutes major obstacles for rice cultivar resistance stability. Indeed, this pathotype can overcome the high resistance of the two resistance allele *rymv1-2* and *rymv1-3*. The rate of RB prevalence (20%) obtained in the present study is relatively similar to the prevalence rates previously observed in South and Central Africa. These studies have reported 16.4% (Traore *et al.*, 2006b) and 20% (Allarangaye *et al.*, 2006) of symptomatic Resistance Breaking isolates. The high resistance of rice cultivars was first overcome by wild types isolates (Konate *et al.*, 1997). Then their emergence was confirmed in laboratory studies, during serial inoculations of wild type avirulent isolate to resistant genotypes (Fargette *et al.*, 2002). Besides, the occurrence of RYMV RB isolates is reported in African rice fields with contrasted ecologies (Traore *et al.*, 2006b; Rakotomalala *et al.*, 2008).

With the current RYMV isolates pathogenic population structure in Niger Republic and the high susceptibility of cultivars widely cultivated, proportion of wild type RYMV aggressive isolates can increase in the future. There is a probability that Path 3 and Path 2 pathotype prevalence become high, if Niger's farmers continue to use susceptible varieties. Path 4 pathotype isolates can also increase during its possible interactions with other pathotypes. The possible interactions between different pathogenic RYMV strains could lead to emergence of new virulent strains (Pinel-Galzi *et al.*, 2009). The use of highly resistant cultivars (Gigante and Tog5681) will

potentially reduce Path 3, Path 2 and Path 1 pathotypes population and their interactions. There is a probability that the highly resistant cultivars (Gigante and Tog5681) will survive through combinations of gene present in the cultivars population. Indeed, the population resistance is enhanced by genes polymorphism that may result in short-term selection of more tolerant cultivars in stressful viral environments (Ebdon and Gauch, 2002a; Onasanya *et al.*, 2006). This information could be useful in rice breeding programs in the development and deployment of RYMV resistant cultivars in different rice perimeters in Niger Republic.

The compatible relation among rice cultivars and RYMV strains is due to gene to gene interaction between rice eIF(iso) 4G protein coded by gene *rymv1* and RYMV viral protein genomic (VPg) (Albar *et al.*, 2003; Hebrard *et al.*, 2008). The resistance breakdown is associated to mutations of certain amino acid (48, 52 etc.) of the RYMV's VPg (Hebrard *et al.*, 2006; Pinel-Galzi *et al.*, 2007; Poulicard *et al.*, 2010; Traore *et al.*, 2010). Thus, the VPg of RYMV RB isolates identified here must be sequenced to assess the molecular basis of their genetic and pathogenic determinism. Last, the presence of particular isolates (Path 1 isolates) which affect less susceptible cultivars indicate either genotype tolerance or negative interaction with the isolates. The susceptibility of these cultivars against ELISA negative RYMV isolates was also reported, indicating that the biological diagnosis is more sensitive than serological tests (Traore *et al.*, 2008). Molecular studies on the VPg of Path 1 pathotype isolates could help to understand the determinism of their particular pathogeny.

CONCLUSION

The high genotypes by environment interactions in the reactions of rice cultivars to RYMV revealed the existence of four pathotypes of RYMV and three cultivar groups in Niger republic. A new RYMV pathotype (Path 4) able to break down the highly rice resistance is now reported in this country. Two rice cultivars (Gigante and Tog5681) identified in this study possess heterogeneous viral resistance characteristics that made them more stable, adaptable and resistant to stress induced by RYMV pathotypes from different localities. This information is useful in rice breeding programs for the development and deployment of RYMV resistant cultivars in different rice ecologies and localities in Niger Republic and over all sub-tropical Africa countries. As the impact of the inoculum in resistance breaking mechanism is preponderant, it is critical to support the deployment of resistant cultivars with sanitation measures. These measures involving isolation of nurseries and removal of infected weeds and rice ratoons could reduce the risk of resistance breaking isolates emergence.

ACKNOWLEDGMENTS

The International Foundation of Science (IFS) and the government of Japan had supported financially the researches. We thank them for their contribution. We thank also M. George SOTON, support staff at AfricaRice, for his technical aid.

REFERENCES

- Abo, M.E., M.D. Alegbejo and A.A. Sy, 2000. The insect vectors of rice yellow mottle virus: Their mode of transmission and feeding effect on rice. ESN Occasional Publ., 32: 83-90.
- Abubakar, Z., F. Ali, A. Pinel, O. Traore and P. N'Guessan *et al.*, 2003. Phylogeography of Rice yellow mottle virus in Africa. J. Gen. Virol., 84: 733-743.
- Adugna, A., 2004. Alternate approaches in deploying genes for disease resistance in crop plants. Asian J. Plant Sci., 3: 618-623.

- Albar, L., M. Angratz-Reyser, E. Hebrard, M.N. Ndjiondjop, M. Jone and Ghesquiere, 2006. Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. *Plant J.*, 47: 417-426.
- Albar, L., M. Ndjiondjop, Z. Esshak, A. Berger and A. Pinel *et al.*, 2003. Fine genetic mapping of a gene required for rice yellow mottle virus cell-to-cell movement. *Theor. Applied Genet.*, 107: 371-378.
- Allarangaye, M.D., O. Traore, E.V.S. Traore, R.J. Millogo and G. Konate, 2006. Evidence of non-transmission of Rice yellow mottle virus through seeds of wild host species. *J. Plant Pathol.*, 88: 309-315.
- Amancho, N.A., N.K. Kouassi, H.A. Diallo, A. Bouet, A. Sangare and J.Y. Kouadio, 2009. The report of highly resistance-breaking isolates of Rice yellow mottle virus in Cote d'Ivoire. *Afr. J. Plant Sci. Biotechnol.*, 3: 44-50.
- Ebdon, J.S. and H.G. Gauch, 2002a. Additive main effect and multiplicative interaction analysis of national turfgrass performance trials: I. Interpretation of genotype x environment interaction. *Crop Sci.*, 42: 489-496.
- Ebdon, J.S. and H.G. Gauch, 2002b. Additive main effect and multiplicative interaction analysis of national turfgrass performance trials: II. Cultivar recommendations. *Crop Sci.*, 42: 497-506.
- Fargette, D., A. Pinel, N. Halimi, C. Brugidou, C.M. Fauquet and M.H.V. Van Regenmortel, 2002. Comparison of molecular and immunological typing of isolates of Rice yellow mottle virus. *Arch. Virol.*, 147: 583-596.
- Fargette, D., A. Pinel, Z. Abubakar, O.Z. Traore and C. Brugidou *et al.*, 2004. Inferring the evolutionary history of Rice yellow mottle virus from genomic, phylogenetic and phylogeographic studies. *J. Virol.*, 78: 3252-3261.
- Fininsa, C., 2003. Relationship between common bacterial blight severity and bean yield loss in pure stand and bean-maize intercropping systems. *Int. J. Pest Manage.*, 49: 177-185.
- Gnanamanickam, S.S., 2009. *Biological Control of Rice Diseases*. Vol. 8, Springer, The Netherlands, pp: 13-42.
- Hebrard, E., A. Pinel-Galzi and D. Fargette, 2008. Virulence domain of the RYMV genome-linked viral protein VPg towards rice RYMV1-2-mediated resistance. *Arch. Virol.*, 153: 1161-1164.
- Hebrard, E., A. Pinel-Galzi, A. Bersoult, C. Sire and D. Fargette, 2006. Emergence of a resistance-breaking isolate of Rice yellow mottle virus during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein Vpg. *J. Gen. Virol.*, 87: 1369-1373.
- Konate, G., O. Traore and M. Coulibaly, 1997. Characterization of rice yellow mottle virus isolates in Sudano-Sahalian areas. *Arch. Virol.*, 142: 1117-1124.
- Kouassi, N.K., P. N'Guessan, L. Albar, C.M. Fauquet and C. Brugidou, 2005. Distribution and characterization of Rice yellow mottle virus: A threat to African farmers. *Plant Dis.*, 89: 124-132.
- N'Guessan, P., A. Pinel, M. Caruana, R. Frutos, A. Sy, A. Ghesquiere and D. Fargette, 2000. Evidence of the presence of two serotypes of rice yellow mottle *Sobemovirus* in Cote d'Ivoire. *Eur. J. Plant Pathol.*, 106: 167-178.
- N'Guessan, P., A. Pinel, A.A. Sy, A. Ghesquiere and D. Fargette, 2001. Distribution, pathogenicity and interactions of two strains of Rice yellow mottle virus in forested and Savannah zones of West Africa. *Plant Dis.*, 85: 59-64.
- Ndjiondjop, M.N., C. Brugidou, S. Zang, D. Fargette, A. Ghesquiere and C. Fauquet, 2001. High resistance to Rice yellow mottle virus in two cultivated rice cultivars is correlated with failure of cell to cell movement. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 59: 309-316.

- Nwilene, F.E., A.K. Traore, A.N. Asidi, Y. Sere, A. Onasanya and M.E. Abo, 2009. New records of insect vectors of Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) in Cote d'Ivoire, West Africa. *J. Entomol.*, 6: 198-206.
- Ochola, D. and G. Tusiime, 2011. Pathogenicity of rice yellow mottle virus and the potential sources of resistance against the disease in Eastern Uganda. *Asian J. Plant Pathol.*, 5: 1-15.
- Onasanya, A., Y. Sere, F. Nwilene, M.E. Abo and K. Akator, 2004. Reactions and resistance status of differential rice genotypes to Rice yellow mottle virus, genus *Sobemovirus* in Cote d'Ivoire. *Asian J. Plant Sci.*, 3: 718-723.
- Onasanya, A., Y. Sere, M. Sie, K. Akator, M. M. Coulibaly and A. Hamadoun, 2006. Existence of two pathotypes of Rice yellow mottle virus, genus *Sobemovirus*, in Mali. *Plant Pathol. J.*, 5: 368-372.
- Onwughalu, J.T., M.E. Abo, J.K. Okoro, A. Onasanya and Y. Sere, 2011. Rice yellow mottle virus infection and reproductive losses in rice (*Oryza sativa* L.). *Trends Applied Sci. Res.*, 6: 182-189.
- Pinel-Galzi, A., A. Mpunami, E. Sangu, M. Rakotomalala and O. Traore *et al.*, 2009. Recombination, selection and clock-like evolution of Rice yellow mottle virus. *Virology*, 394: 164-172.
- Pinel-Galzi, A., M. Rakotomalala, E. Sangu, F. Sorho and Z. Kanyeka *et al.*, 2007. Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species. *PLoS Pathogen*, 3: e180-e180.
- Poulicard, N., A. Pinel-Galzi, E. Hebrard and D. Fargette, 2010. Why Rice yellow mottle virus, a rapidly evolving RNA plant virus, is not efficient at breaking RYMV1-2 resistance. *Mol. Plant Pathol.*, 11: 145-154.
- Rakotomalala, M., A. Pinel-Galzi, L. Albar, A. Ghesquiere, Y. Rabenantoandro, P. Ramavovololona and D. Fargette, 2008. Resistance to Rice yellow mottle virus in rice germplasm in Madagascar. *Eur. J. Plant Pathol.*, 122: 277-286.
- Séré, Y., A. Onasanya, F.E. Nwilene, M.E. Abo and K. Akator, 2008. Potential of insect vector screening method for development of durable resistant cultivars to Rice yellow mottle virus disease. *Int. J. Virol.*, 4: 41-47.
- Sorho, F., A. Pinel, O. Traore, A. Bersoult and A. Guesquiere *et al.*, 2005. Durability of natural and transgenic resistances in rice to rice yellow mottle virus. *Eur. J. Plant Pathol.*, 112: 349-359.
- Thiemele, D., A. Boissard, M.N. Ndjiondjop, S. Cheron and Y. Sere *et al.*, 2010. Identification of a second major resistance gene to Rice yellow mottle virus, *RYMV2*, in the African cultivated rice species, *O. glaberrima*. *Theor. Applied Genet.*, 121: 169-179.
- Traore, O., F. Sorho, A. Pinel, Z. Abubakar and O. Banwo *et al.*, 2005. Processes of diversification and dispersion of Rice yellow mottle virus inferred from large-scale and high-resolution phylogeographical studies. *Mol. Ecol.*, 14: 2097-2110.
- Traore, O., A. Pinel, E. Hebrard, M.Y.D. Gumedzoe, D. Fargette, A.S. Traore and G. Konate, 2006a. Occurrence of resistance-breaking isolates of Rice yellow mottle virus in West and central Africa. *Plant Dis.*, 90: 259-263.
- Traore, O., M. Traore D. Fargette, and G. Konate, 2006b. Rice seedbeds as a source of primary infection by Rice yellow mottle virus. *Eur. J. Plant Pathol.*, 115: 181-186.
- Traore, M.D., V.S.E. Traore, A. Galzi-Pinel, D. Fargette, G. Konate, A.S. Traore and O. Traore, 2008. Abiotic transmission of Rice yellow mottle virus through soil and contact between plants. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11: 900-904.
- Traore, O., A. Pinel-Galzi, S. Issaka, N. Poulicard and J. Aribi *et al.*, 2010. The adaptation of Rice yellow mottle virus to the eIF(iso)4G-mediated rice resistance. *Virology*, 408: 103-108.

Article 3

Ndikumana I., Gasoré R., **Issaka S.**, Pinel-Galzi G., Onasanya A., Hassani-Mehraban A., Fargette D., Peters D. and Séré Y. **2011.** *Rice Yellow Mottle Virus* in rice in Rwanda: first report and evidence of strain circulation. *New Disease Reports* **23**, 18. **ISSN 2044-0588.**



Rice yellow mottle virus in rice in Rwanda: first report and evidence of strain circulation

I. Ndikumana¹, R. Gasoré¹, S. Issaka², A. Pinel-Galzi³, A. Onasanya², A. Hassani-Mehraban⁴, D. Fargette^{3*}, D. Peters⁴ and Y. Séré²

¹ Institut des Sciences Agronomiques du Rwanda (ISAR), BP 138 Butare, Rwanda

² Africa Rice Center (AfricaRice), 01 BP 2031, Cotonou, Bénin

³ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

⁴ Laboratory of Virology, Department of Plant Sciences, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands

*denis.fargette@ird.fr

Received: 20 Dec 2010; Published: 04 Apr 2011

Keywords: beetle-transmission, virus epidemiology, sobemovirus

Rice yellow mottle virus (RYMV), of the genus *Sobemovirus*, has a narrow host range restricted to wild and cultivated rice (*Oryza sativa* and *O. glaberrima*) and a few other poaceous species (Bakker, 1974). RYMV is transmitted by beetles (Bakker, 1974), by various mammals (Sarra & Peters, 2003) but not by seeds (Bakker, 1974). It is also transmitted by man during cultural practices (Traoré *et al.*, 2006). First reported in Kenya in 1966, RYMV was later found in many rice-producing countries in Africa, but not in most parts of Central Africa (Traoré *et al.*, 2009). Rwanda is a mountainous country at the eastern part of Central Africa bordered by the Democratic Republic of Congo in the west, Burundi in the south, Uganda in the north, and Tanzania in the east. Recently, a joint survey by the Africa Rice Center (AfricaRice) and the Institut des Sciences Agronomiques du Rwanda (ISAR) reported a high incidence of plants with yellowing and mottling symptoms ending in complete crop failure at Cyabayaga in northern Rwanda and at Cyili in the southeast (Fig. 1). In 2009, plants with these symptoms (Fig. 2) were collected from local (Gakire) and improved (WAT 543-45-2, WAT 1395-B-24-2) rice varieties in three major rice-producing regions of Rwanda (Bugarama, Cyili, Cyabyaga). Mechanical inoculation of leaf extracts on the susceptible rice varieties BG90-2, Bouaké 189 and IR64 reproduced the typical RYMV symptoms.

A 1008-nt product obtained from fourteen isolates from the three rice-producing regions of Rwanda (including the 720-nt long coat protein gene which was subsequently used for phylogenetic analysis) was amplified by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and sequenced (Pinel *et al.*, 2000). The primer set consisted of 5'-CAAAGATGGCCAGGAA-3' (forward primer) and 5'-CTCCCCACCCATCCCGAGAATT-3' (reverse primer). Sequencing thus permits the presence of RYMV in Rwanda to be confirmed for the first time, although symptoms of RYMV have been observed for several years (Fig. 1). The sequences were compared to a set of 39 isolates from Tanzania, Uganda and Kenya (Pinel-Galzi *et al.*, 2009). Isolates from Rwanda belonged to two different strains (Fig. 3). One strain consisted of isolates from southern Uganda, western Kenya and northern Tanzania collected around Lake Victoria and accordingly referred to as "Lake Victoria" strain (S4-lv) (Pinel-Galzi *et al.*, 2009). The other strain consisted of isolates mostly found in southwest Tanzania along Lake Malawi and, accordingly, referred to as "Lake Malawi" strain (S4-lm) (Pinel-Galzi *et al.*, 2009). The two strains differed by approximately 7% in nucleotide sequence. Within each strain, the isolates of Rwanda formed a monophyletic clade with a high branch support (>0.9) and shared over 97% nucleotide identity. Year-round growth of wild and cultivated rice around Lake Victoria ensures host continuity in time and space that facilitates spread and accounts for the presence of S4-lv strain in Rwanda. Presence of the S4-lm strain in rice-growing regions, mostly near the Congo and Burundi borders, suggests the spread of RYMV over long distances, possibly along the rice growing regions of eastern Tanzania bordering Lake Tanganyika. Rwanda is the only country with a geographical overlap of the S4-lv and S4-lm strains, suggesting the current spread of these strains despite intervening hills and mountains.



Figure 1: High incidence of RYMV in a rice field with local cultivars near Cyabayaga in the north of Rwanda in 2009. According to farmers, such high incidence leading to full crop failure has often been observed over the past few years



Figure 2: Typical leaf symptoms of local varieties infected by RYMV. Infected rice plants are seen in the background

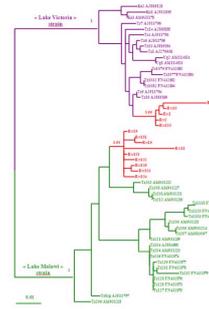


Figure 3: Maximum-likelihood tree based on the 720 nt long sequences included in the 1008 nt product (coding for the coat protein gene) of isolates from Rwanda (Rw), Tanzania (Tz), Uganda (Ug) and Kenya (Ke) with their accession numbers. The numbers at the nodes indicate the bootstrap supports of the clades with isolates from Rwanda (in red).

Acknowledgements

The support of the Bill & Melinda Gates Foundation and of the Government of Japan (Ministry of Foreign Affairs) is acknowledged.

References

- Bakker W, 1974. Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya. *Agricultural Research Report* **829**, 1-152.
- Pinel A, N'Guessan P, Bousalem M, Fargette D, 2000. Molecular variability of geographically distinct isolates of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *Archives of Virology* **145**, 1621-1638. [doi:10.1007/s007050070080]
- Pinel-Galzi A, Mpunami A, Sangu E, Rakotomalala M, Traoré O, Séré D, Sorho F, Séré Y, Kanyeka Z, Konaté G, Fargette D, 2009. Recombination, selection and clock-like evolution of *Rice yellow mottle virus*. *Virology* **394**, 164-172. [doi:10.1016/j.virol.2009.08.008]
- Sarra S, Peters D, 2003. *Rice yellow mottle virus* is transmitted by cows, donkeys, and grass rats in irrigated rice crop plants. *Plant Disease* **87**, 804-808. [doi:10.1094/PDIS.2003.87.7.804]
- Traoré O, Pinel-Galzi A, Sorho F, Sarra S, Rakotomalala M, Sangu E, Kanyeka Z, Séré Y, Konaté G, Fargette D, 2009. A reassessment of the epidemiology of *Rice yellow mottle virus* following recent advances in field and molecular studies. *Virus Research* **141**, 258-267. [doi:10.1016/j.virusres.2009.01.011]
- Traoré O, Traoré M, Fargette D, Konaté G, 2006. Rice seedbed as a source of primary infection by *Rice yellow mottle virus*. *European Journal of Plant Pathology* **115**, 181-186. [doi:10.1007/s10658-006-9004-9]

To cite this report:

Ndikumana I, Gasoré R, Issaka S, Pinel-Galzi A, Onasanya A, Hassani-Mehraban A, Fargette D, Peters D, Séré Y, 2011. *Rice yellow mottle virus* in rice in Rwanda: first report and evidence of strain circulation. *New Disease Reports* **23**, 18. [doi:10.5197/j.2044-0588.2011.023.018]

©2011 The Authors

Article 4

Basso A., **Issaka S.**, Haougui A., Séré Y. et Halidou A. **2010**. Caractérisation biologique d'isolats du virus de la panachure jaune du riz au Niger. *Annales de l'Université Abdou Moumouni*, **Tome XI-A**, pp 112-119.

**ANNALES DE L'UNIVERSITÉ
ABDOU MOUMOUNI
DE NIAMEY**



Série A
**Sciences exactes, naturelles,
agronomiques et de la santé**

Tome XI

2010

Annales de l'Université Abdou Moumouni de Niamey, Tome XI, 2010
Série A : Sciences exactes, naturelles, agronomiques et de la santé

Comité de lecture

Pr Abarchi Habibou	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Pr Nouhou Hasane	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Pr Touré Ali	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Dr Barry Sadio	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Dr Toudou Adam	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Dr Da Kouhété Philippe	Laboratoire de botanique, UFR Biosciences Université de Cocody, Abidjan.
Pr Alain Couté	Muséum National d'histoire naturelle, Paris (France).
Pr Philippe Sankara	Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
Dr Ali Mahamane	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Dr Gandou Zakara	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Dr Balla Abdourahamane	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Pr Dominique Rossi	Service Urologie, Hopital Nord-Marseille (France).
Pr Saadou Mahaman	Université de Abdou Moumouni, Niamey.
Dr Amadou Bocar Bal	Centre regional Agrhyment, Niamey.

Secrétaire administratif des annales de l'Université Abdou Moumouni et Responsable de la série A : Sciences exactes, naturelles, agronomiques et de la santé : Pr. Mahamane SAADOU.

Co-responsable des annales de l'Université Abdou Moumouni et responsable de la série B : Lettres et sciences humaines : Dr Antoinette TIDJANI ALOU.

Responsable de la maquette : Dr Adamou OUSMANE MANGA.

Caractérisation biologique d'isolats du virus de la panachure jaune du riz au Niger

Biologic characterization of the rice Yellow Mottle Virus isolates in Niger

Adamou BASSO^{*,1}, Issaka Souley^{**}, Haougui Adamou^{*},
Yacouba SERE^{***}, Aboubakar HALIDOU^{*}

*Institut national de recherche agronomique du Niger, BP 429 Niamey, Niger.

**CERRA Kollo, Bp 60, Niger

***Centre du riz pour l'Afrique (ADRAO)

¹ Correspondance : Adamou BASSO, pathologiste à l'institut national de recherche agronomique du Niger, BP 429 Niamey, Niger. e.mail: adamoubasso@yahoo.fr

Résumé : La panachure jaune du riz est l'une des principales contraintes à la production du riz au Niger. Les variétés tolérantes introduites, en vue de solutionner le problème, ne donnent pas entière satisfaction car les souches du virus ont des comportements différents d'une zone à une autre. Pour élucider ce problème, une étude de caractérisation de la variabilité biologique du RYMV a été entreprise sous serre. Dix souches du virus ont été testées sur douze variétés dont huit variétés différentielles. Les dix isolats étudiés se répartissent en trois groupes différents bien que dans les conditions d'étude, certains facteurs comme le taux de stérilité ne discriminent pas les isolats. Le profil de réponse des variétés utilisées, respecte, toutes conditions égales par ailleurs, le potentiel intrinsèque à chaque variété.

Mots clé : Riz, isolats, caractérisation, variabilité biologique, Niger

Summary: The rice Yellow Mottle Virus (RYMV) is one of the major constraint to rice production in Niger. Due to high variability, introduced tolerant varieties were not able to solve the problem because the virus behaviour varies from one production area to another. In order to understand this problem, the study of the biologic variability characterization of RYMV isolates was undertaken in screen house. In this study, ten isolates of virus were tested on twelve rice varieties. Eight of the twelve varieties were commonly used as differential varieties. All ten isolates studied were then classified in three different groups even though in this study conditions, some factors such as sterility level did not show any difference among the isolates. The study indicated that varieties responses to this virus depend on genotypic potential of each variety, what ever the growing condition.

Keywords: Rice, isolates, characterization, biologic variability, Niger

I. Introduction

Depuis une dizaine d'années le virus de la panachure jaune du riz (*Rice Yellow Mottle Virus*) est une préoccupation majeure dans la plupart des pays de l'Afrique de l'Ouest (Kouassi et al. 2005, Fargette et al. 2008, Séré et al, 2008). Des pertes de l'ordre de 19,6 à 95,8% ont été enregistrées à Rkopr (Fomba, 1986), 57,3 à 81% à Mbé et 81,3 à 92,7% à Gagnoa en Cote d'Ivoire (Sy et al., 1995). Au Mali, des incidences financières de 160 000 000 FCFA ont été enregistrées à l'office du Niger (Hamadoun et al., 1995). Le RYMV demeure encore problème majeur malgré les efforts déployés pour le renforcement de la base génétique avec des génotypes résistants ou tolérants.

Au Niger, le virus se rencontre sur l'ensemble des périmètres irrigués (12.000ha environ) situés le long du fleuve. Des pertes de 58 à 68% ont été signalées (Reckhauss *et al.*, 1986). Toujours selon les mêmes auteurs, les variétés cultivées (IR1529-680-3 et BG90-2) sont très sensibles au virus. Les variétés récemment introduites (Wita 8 et Wita 9), pour solutionner le problème, s'avèrent être seulement tolérantes.

Le virus de la panachure jaune est doté d'une très forte variabilité. Ainsi, très peu de

génotypes s'avèrent hautement résistants hormis quelques accessions de *Oryza glaberrima* notamment Tog 5672 et Tog 5681 (Konaté et al., 1997, Ndjiondjop *et al.* 1999). Certaines variétés comme lac 23, résistante à Ibadan, s'est avérée sensible en Sierr Léone (Taylor 1989). Ainsi, plusieurs pathotypes du virus existent et diffèrent d'un pays à un autre. Fauquet et Thouvenel (1977), indiquent que les isolats de la Côte d'Ivoire sont différents de ceux du Kenya ; tout comme les isolats du Niger diffèrent de ceux du Nigeria. Il est donc important de caractériser la structure des populations pathogènes si l'on souhaite bâtir une stratégie de lutte basée sur la résistance variétale.

La présente étude a pour but d'identifier les pathotypes les plus virulents qui existent au Niger afin de les utiliser dans un programme de criblage conséquent.

II. Matériels et méthodes

Matériel végétal

Tableau 1 : Les variétés utilisées et leurs caractéristiques

Nom de la variété	Origine	Statut/RYMV	Observations
IR47-686-15-1-1	ADRAO	Résistant	
Moroberekan	ADRAO	Résistant	riz de plateau
FKR 48	Burkina Faso	?	Précoce
Gigante (Tete)	ADRAO	Très résistant	Donneur
Bouaké189	ADRAO	Très sensible	
Faro 11	ADRAO	Résistant	riz de plateau
PNA 64F4-56	ADRAO	Résistant	Donneur
Lac 23	ADRAO	Résistant	riz de plateau
Nino 2	ADRAO	-	-
H232-44-1-1	ADRAO	Variable	-
ITA 235	ADRAO	Sensible	-
Chianning sen Yu	ADRAO	-	-

Douze variétés ont été testées dont huit variétés différentielles développées par l'ADRAO et quatre en prévalgarisation au Niger (FKR 48, NINO 2, Chiannug sen yu et IR47-686-15-1-1)

Les isolats du virus

Tableau 2 : Les isolats du virus et leur provenance

Nom isolats	Localité	Ecologie
Say I	Say	Irrigué
Say II	Say	Irrigué
Diomana I	Diomana	Irrigué
Diomana II	Diomana	Irrigué
Bonféba I	Bonféba	Irrigué
Bonféba II	Bonféba	Irrigué
Liboré	Liboré	Irrigué
Kirkissoye	Kirkissoye	Irrigué
Toula	Toula	Irrigué
Sébéri	Srebéri	Irrigué

Dispositif expérimental

Le dispositif est un split plot à deux répétitions avec les isolats comme facteur principal et les variétés comme facteur secondaire. Les variétés ont été repiquées dans des pots de cinq litres de contenance (4 pots par variété/isolat, 4 plants /pot) Pour chaque variété testée, 4 pots non inoculés servent de témoin.

Itinéraire technique

Les plants ont été repiqués deux semaines après germination. La fumure minérale appliquée est de 1g/pot de NPK (15-15-15) au repiquage, 0.2 g/pot d'urée à la reprise et 0.2 g d'urée à l'initiation paniculaire.

Collecte et inoculation des isolats

Les isolats ont été collectés sur certains périmètres situés le long du fleuve Niger. Des plants entiers sont arrachés, mis en pot et ramenés sous serre. Les isolats ainsi collectés ont été propagés sur la variété BG90-2, afin d'uniformiser la quantité du virus et de disposer d'une quantité suffisante d'inoculum. Trois semaines après transplantation, des feuilles ont été collectées et broyées à raison de 0.2 g de feuilles fraîches pour 5ml d'eau distillée. L'inoculation consiste à tremper le pouce et l'index dans l'extrait et à lisser la dernière feuille dégagee de bas vers le haut. Cette opération est répétée deux fois.

Les paramètres mesurés

Les observations ont porté sur les paramètres suivants :

Les symptômes visuels ont été relevés selon l'échelle 1-9 (Thottappilly, 1993) au 14^{ème}, 28^{ème} et 42^{ème} jours après inoculation. Les feuilles des variétés sans symptômes apparents au 42^{ème} jour après inoculation ont été prélevées et soumises au test ACP-ELISA selon la technique décrite par Jaegle and Van Regenmortel (1985). Le nombre de panicules, le taux de stérilité et le rendement paddy ont été estimés.

Test ELISA

Quarante deux jours après inoculation, des échantillons de feuilles ont été collectés afin d'évaluer la charge virale pour chaque variété. La méthode utilisée est ACP-ELISA (Antibody-coating-plate-Enzyme-linked-immuno-sorbent assay) qui consiste à : Bloquer les puits de microtitration avec 200µl de broyat d'échantillon de feuilles (à 1/10 avec du tampon coating) et à incuber à 37 °c pendant 2-4 heures ou une nuit. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois à l'aide du PBS-T puis sécher. Après le séchage, on ajoute 200µl de sérum albumine bovine (à 1/100) et on incube à 37 °c pendant 1 heure puis on lave 3 fois au PBS-T avant de sécher. Alors on ajoute l'anticorps polyclonal dilué dans du PBS (à 1/100) et on procède au lavage 3 fois au PBS-T puis on sèche. Après cette étape on additionne le sérum anti-RYMV de souris dilué dans du tampon conjugué (à 1/1000), on lave 3 fois au PBS-T puis on sèche. L'avant dernière étape consiste à l'ajout du phosphate polyvinyl (PVP) dissout dans du tampon substrat et à incuber à la température ambiante ou à l'obscurité pendant 30 minutes à 1heure. Après incubation on mesure la densité optique(DO) à 405 nm.

Les variétés dont la note de sévérité est supérieure ou égale à 5 sont notées sensibles. Il en est de même de celles dont la note est égale à 3 mais qui se montrent positives au test ELISA. En revanche toute variété dont la note de sévérité est égale ou inférieure à 3 et qui se montre négative au test ELISA est considérée comme résistante.

III. Résultats et discussion

Le tableau 3 donne le profil de réponse des variétés aux isolats.

Tableau 3 : Réponses des variétés vis à vis des isolats auxquels elles sont confrontées

Isolats	Variétés											
	IR47686-15-1-1	Morobe-rekan	FKR 48	GIGAN-TE	Bouaké 189	FARO11	PNA64F4-56	Lac 23	NINO 2	H232-44-1-1	ITA 235	Chian-nung senYu
Diomana I	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Bonféba II	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Toula	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Liboré	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Kirkissoye	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Bonféba I	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Say I	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Diomana I	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sébéri	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Say II	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

(-) = note de sévérité inférieure ou égale à trois

(+) = note de sévérité supérieure ou égale à cinq

La réponse est variable d'un isolat à un autre. Ainsi le profil de réponse fait apparaître quatre

(4) groupes variétaux :

- Groupe 1 : IR47686-15-1-1 et GIGANTE ;

- Groupe 2 : Moroberekan ;

- Groupe 3 : Lac23 ;

Groupe 4 : FKR 48, Bouaké 189, FARO 11, PNA64F4-56, NINO 2, H232-44-1-1, ITA 235 et Chiannung sen yu

Le groupe 1 est constitué de variétés résistantes comme la GIGANTE qui est le témoin de résistance. Le groupe 2 et le groupe 3 sont constitués par des variétés ayant un comportement intermédiaire, c'est-à-dire qu'elles sont sensibles à certains isolats et résistantes à d'autres. Le groupe 4 se caractérise par la forte sensibilité des variétés qui le composent. En effet, ces variétés développent des symptômes caractéristiques quel que soit l'isolat considéré. Ces résultats semblent indiquer l'existence d'une interaction différentielle entre les isolats et les variétés ce qui caractériserait des relations de type vertical au sens de Van Der Plank (1968). On sait au moins que la résistance de Gigante est due à un système monogénique (Ndjondjop et al, 1999)

Le récapitulatif de la réponse des variétés révèle trois (3) groupes d'isolats (tableau 4)

Tableau 4 : Répartition des isolats en fonction des réponses des groupes variétaux

Groupe isolats	Isolats	Groupes variétaux			
		1	2	3	4
1	Diomana II	-	-	+	+
	Bonféba II	-	-	+	+
	Toula	-	-	+	+
	Say I	-	-	+	+
	Say II	-	-	+	+
	Liboré	-	+	+	+
	Kirkissoye	-	+	+	+
2	Diomana I	-	+	+	+
	Sébéri	-	+	+	+
3	Bonféba I	-	-	-	+

(-) = note de sévérité inférieure ou égale à trois

(+) = note de sévérité supérieure ou égale à cinq

Groupes variétaux :

Groupe 1 : IR47686-15-1-1 et GIGANTE ; **Groupe 2** : Moroberekan ; **Groupe 3** : Lac23 ; **Groupe 4** : FKR 48, Bouaké 189, FARO 11, PNA64F4-56, NINO 2, H232-44-1-1, ITA 235 et Chiannung sen yu

Groupes des isolats :

Groupe 1 : Diomana II, Bonféba II, Toula, SayI et Say II ; **Groupe 2** : Liboré, Kirkissoye, Diomana I et Sébéri ; **Groupe 3** : Bonféba I

On note des similarités entre Diomana II, Bonféba II, Toula, SayI et Say II (groupe 1 des isolats) d'une part et entre Liboré, Kirkissoye, Diomana I et Sébéri (groupe 2 des isolats) d'autre part. Le groupe 2 a la particularité d'être agressif car il attaque trois des quatre groupes variétaux identifiés. Le groupe 3 constitué de Bonféba I n'attaque que les variétés très sensibles.

Les isolats étudiés ont des degrés de virulence variables d'un périmètre à un autre et au sein d'un même périmètre. Ces résultats sont en accord avec ceux de Fargette et al. (2001) qui indiquent aussi une nette différence de virulence des isolats provenant de diverses aires géographiques du continent.

Les analyses statistiques montrent les mêmes tendances observées. Toutefois, elles ne permettent pas de mettre en évidence des interactions différentielles comme le laissent supposer les résultats des symptômes foliaires (tableaux 5 et 6).

On observe une différence significative entre les isolats par rapport au nombre de panicules. Quatre groupes d'isolats se dégagent, avec Sébéri, Bonféba I, Toula, Say I et Say II qui ne diffèrent pas du témoin. Par contre, si les isolats de Kirkissoye et Diomana II ne semblent pas influencer le tallage, ceux de Liboré et Bonféba II le réduisent fortement (Tableau 8).

La variable stérilité ne discrimine pas isolats. Il n'y a pas de différence significative entre les isolats. Par contre, la différence est significative avec le témoin quel que soit l'isolat considéré. De même, quel que soit l'isolat considéré, le taux de stérilité est élevé et les rendements sont fortement affectés. En effet, la différence est significative entre le témoin et les différents isolats. Trois groupes d'isolats se dégagent. Les isolats Toula, Bonféba I, Kirkissoye, Diomana I et Sébéri semblent être moins sévères et Bonféba II, Liboré et Say II réduisent fortement les rendements

Tableau 5 : Analyse de variance de la variable "panicule"

Source de variation	Ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Rép.	1	4802,56	4802,56	7,01	0,0091
Isolat	10	11386,17	1138,62	1,66	0,0965
Variété	11	275892,85	25081,17	36,6	0,0001
Isolat *variété	110	53058,65	486,44	0,71	0,9679

Tableau 6 : Analyse de variance de la variable "Stérilité"

Source de variation	Ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Rép.	1	1,83	1,83	0,01	0,9387
Isolat	10	21356,95	2135,69	6,91	0,0001
Variété	11	38685,17	3516,83	11,38	0,0001
Isolat *variété	110	34004,5	309,13	1,00	0,4972

Tableau 7: Analyse de variance de la variable "Rendement"

Source de variation	Ddl	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Rép.	1	0,0030	0,0030	0,01	0,9122
Isolat	10	26,979	2,6979	10,97	0,0001
Variété	11	91,690	8,3353	33,89	0,0001
Isolat *variété	110	37,950	0,3450	1,40	0,0317

Tableau 8 : Séparation des moyennes des panicules, du taux de stérilité et du rendement des variétés par rapport aux isolats

Isolat	Panicules	Taux stérilité	Rendement(t/ha)
Kirkissoye	56,875a	60,792a	1,0846b
Diomana II	53,167ab	62,833a	1,0760b
Diomana I	50,50abc	60,333a	0,9704bc
Say I	49,50abc	67,417a	0,9625bc
Sébéri	49,375abc	62,375a	0,9967bc
Bonféba I	46,75abc	65,000a	1,0946b
Toula	44,00abc	69,917a	1,1858b
Témoin	41,375bcd	35,292b	1,9596a
Say II	40,667bcd	60,875a	0,9254bcd
Liboré	37,708 cd	69,583a	0,7475cd
Bonféba II	34,25 d	67,167a	0,6604d
	= 0,05 LSD =14,95 CV = 57,116	LSD =10,039 CV = 28,412	LSD = 0,2832 CV = 46,769

Les variétés testées se différencient par rapport à tous les paramètres mesurés (tableau9).Ainsi, les variétés résistantes comme Gigante, IR47686-15-1-1 et Moroberekan sont elles moins affectées par la stérilité et présentent les plus grands nombres de panicules et les meilleurs rendements. Par contre, les variétés sensibles PNA64F4-56, H232-44-1-1, NINO 2 et FKR 48, sont les plus affectées par la stérilité et les baisses de rendement. La variété chiannung sen yu, bien que sensible, semble avoir des capacités de récupération par une émission massive de talles tertiaires.

Tableau 9 : Séparation des moyennes du nombre de panicules, du taux de stérilité et du rendement par variété

Isolat	Panicules	Taux stérilité	Rendement(t/ha)
Chiannung sen yu	103,13a	70,591b	1,1682d
PNA64F4-56	100,63a	87,13a	0,473ef
Gigante	94,364a	61,273cd	1,8882b
IR47686-1-1	46,318b	47,191e	2,289a
ITA 235	39,727bc	55,726de	1,1559d
FKR48	34,182bc	74,909b	0,5486e
Moroberekan	29,773cd	44,061e	1,5464c
Faro 11	27,727cd	59,818cd	1,0941d
Bouaké 189	24,818 cde	53,787de	0,7177e
Lac 23	24,455cde	53,54e	1,1015d
Nino 2	14,591de	60,091ed	0,5100ef
H232-44-1-1	10,273e	74,455b	0,2318f
	= 0,05 LSD =14,116 CV = 57,116	LSD =10,039 CV = 28,412	LSD = 0,2832 CV = 46,769

Les variétés Chiannung sen yu, PNA64F4-56 et GIGANTE se caractérisent par une profusion de panicules à l'opposé des variétés comme Lac23, NINO2 et H232-44-1-1. Ces dernières produisent peu de panicules. Ainsi, la différence est significative entre les variétés par rapport au nombre de panicules. Cette même différence s'observe au niveau du paramètre stérilité. Ainsi les variétés Chiannung sen yu et PNA64F4-56 émettent beaucoup de panicules mais présentent un fort taux de stérilité. Par contre, les géotypes dotés d'une certaine résistance telle que Moroberekan ; Lac23 et IR47686-1-1 sont les moins affectées par la stérilité. Du point de vue rendement, la différence est également significative. Le potentiel génétique de chaque variété s'est clairement exprimé. Les variétés connues résistantes (Gigante, IR47686-1-1 et Moroberekan) se distinguent des variétés sensibles Bouaké 189, Nino 2 et PNA64F4-56.

Conclusion

Les dix isolats du virus de la panachure jaune du riz testés sont différents les uns des autres de part leurs effets sur les variétés testées. De même les variétés testées présentent des profils de réponse différents.

Trois groupes d'isolats sont identifiés. Un groupe virulent qui attaque trois des quatre groupes variétaux identifiés, un groupe hypovirulent (Bonféba I) qui n'attaque que les variétés sensibles et un groupe qui présente un spectre de virulence intermédiaire.

Cette discrimination des isolats est très importante pour les essais de criblage variétal. Toutefois, les variétés résistantes à Bonféba I pourraient s'avérer en réalité dotées d'une résistance non durable. La recherche d'une résistance durable devrait donc nécessiter l'utilisation d'isolats virulents. Pour ce faire, une large gamme d'isolats devra être caractérisée afin de cerner toute l'étendue de la variabilité biologique du virus au niger.

Références bibliographiques

- Fargette, D., Pinel, A., Rakotomalala, M., Sangu, E., Traoré, O., Sérémé ; D., Sorho, F., Issaka, S., Hébrard, E., Séré, Y., Kanyeka, Z., et Konaté, G.** 2008. Rice Yellow Mottle Virus, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *Journal of virology*, vol. 82, n°7. P. 3584-3589.
- Fargette, D., Pinel, A., Albar, L., Sadiky, R., N'Guessan, P., Cotgier, S., Frutos, R., Notteghem, S.L., and Ghesquiere, A.** 2001. Assesment of biological, serological and molecular variability of a range of Rice Yellow Mottle Virus isolates from diferent geographical aereas. In WARDA proceeding Series n°1 p : 91.
- Fauquet, C., Thouvenel, J-C.** 1977. Isolation of the rice yellow mottle virus in the Ivoiry Coast. *Plant Disease Reporter* 61 : 443-446
- FOMBA, S. N.,** 1986. Crop loss and effects of attack by rice yellow mottle virus on rice varieties ROK₅ and Angkatta at Rokupr, Sierra Leone. *West Africa Rice Development Technical Newsletter*, 25 : 58.
- Hamadoun, A., coulibaly, M1, coulibaly, M2 et ahamadi, N.,** 1995. Statut de la marbrure jaune du riz au Mali, cas de l'office du Niger. Premier symposium international sur la marbrure 5RYMV), Mbé/Bouaké, Côte d'Ivoire (18-22 Septembre 1995). *West Africa Rice Development Association*, 46pp.
- 32 (3) : 86-87.
- Jaegle, M, Van Regenmortel, M H V.** 1985. Use of ELISA for measuring the extent of serological cross-reactivity between plant viruses. *Journal of Virological Methods* 11: 189-198

- Konate, G., Traore, O. and Coulibaly, M.M.** 1997. Characterization of rice yellow Virus isolats. In sudano-sahelian areas. Arch. Virol. 142 : 1117-1124
- KOUASSI, N.K., N'Guessa, P., Albar, L., Fauquet, C., BRUGUIDOU, C.** 2005. distrubution and characterization of rice yellow mottle virus : a threat for african farmers. plant ddissease 89 : 124-132.
- Ndjonjob, M.N., Alabar, L., Fargette, D., Fauquet, C., Ghesquère, A.** 1999. The genetic basis of high resistance to rice yellow mottle virus(RYMV) in cultivars of two cultivated rice species. Plant disease 83 : 931-935.
- Reckhauss, H.W. and Adamou I.** 1986. Rice deseases and their economic importance in Niger. FAO Plant Protection Bulletin. 34, 77-82
- Séré, Y., Sorho, F., Onasanya, A., Jobe, L., Ojang, Y., Touray, M.L., Pinel-Galzi, A. et Fargette, D.** 2008. First report of rice yellow mottle virus in rice in the Gambia. Plant disease 92 : Number 2.
- SY, A.A., AKATOR, K., KAMELAN, Z.,** 1995 b. Estimation des pertes de rendement inductibles par le virus de la marbrure (RYMV) sous conditions semi-artificielles : Analyse corrélative de l'impact du RYMV sur différents organes végétatifs de Bouaké 189 et de Moroberekan. Premier symposium international sur la marbrure (RYMV), Mbé/Bouaké, Côte d'Ivoire (18-22 Septembre 1995). West Africa Rice Development Association, 46pp.
- Taylor, D. R.** 1989. Resistance of upland rice varieties to pale yellow mottle virus disease In Sierra Leone. International Rice Research Newsletter. 14, 11
- Thottappilly, G. and Rossel, H.V.** 1993. Evaluation of resistance to Rice Yellow Mottle Virus in Oryza species. Indian journal of Virology 9(1),65-73

Article 5

Traoré O., Pinel-Galzi A., **Issaka S.**, Poulicard N., Aribi J. Aké S., Ghesquière A., Séré Y., Konaté G., Hébrard E. et Fargette D. **2010**. The adaptation of *Rice Yellow Mottle Virus* to the eIF (iso) 4G mediated rice resistance. *Virology* **408** : 103-108. **ISSN 0042-6822**

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

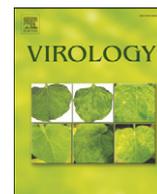
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

The adaptation of *Rice yellow mottle virus* to the eIF(iso)4G-mediated rice resistance

Oumar Traoré^{a,1}, Agnès Pinel-Galzi^{b,1}, Souley Issaka^{b,c,d}, Nils Poulicard^b, Jamel Aribi^b, Séverin Aké^d, Alain Ghesquière^b, Yacouba Séré^c, Gnissa Konaté^a, Eugénie Hébrard^b, Denis Fargette^{b,*}

^a Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), 01 BP 476, Ouagadougou, Burkina Faso

^b Institut de Recherche pour le Développement (IRD), BP 64501, 34394 Montpellier cedex 5, France

^c Africa Rice Center (WARDA), 01 BP 2031, Cotonou, Benin

^d UFR Biosciences, Université de Cocody, 22 BP 582, Abidjan 22, Cote d'Ivoire

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2010

Returned to author for revision

11 August 2010

Accepted 3 September 2010

Keywords:

Plant resistance

Resistance breakdown

Virus adaptation

Virus evolution

ABSTRACT

The *rymv1-3* allele of the eIF(iso)4G-mediated resistance to *Rice yellow mottle virus* (RYMV) is found in a few *Oryza glaberrima* cultivars. The same resistance-breaking (RB) mutations emerged in the central domain of the VPg after inoculation of isolates of different strains. The RB mutations were fixed, often sequentially, at codons 41 and 52 which paralleled an increase in virus accumulation. RB mutations also emerged after inoculation of an avirulent infectious clone, indicating that they were generated *de novo* in resistant plants. Only virus isolates with a threonine at codon 49 of the VPg broke *rymv1-3* resistance, those with a glutamic acid did not. A small subset of these isolates overcame *rymv1-2* resistance, but following a specific pathway. Comparison with the RB process of *rymv1-2*, a resistance allele found in a few *Oryza sativa* cultivars, showed similarities in the mode of adaptation but revealed converse virulence specificity of the isolates.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Plant viruses are comparatively easy to handle and, consequently, are increasingly used to investigate virus adaptation to new hosts (Elena et al., 2008; Ohshima et al., 2010; Roossinck, 2008; Van der Walt et al., 2009). Studies of the breakdown of resistance, initially motivated by the search for durable resistances (Garcia-Arenal and McDonald, 2003; Gomez et al., 2009; Harrison, 2002), proved to be particularly useful in this respect because, in several instances, both virulence and resistance factors are identified. This is exemplified by recessive resistances mediated by eukaryotic translation initiation factors. Mutations in the VPg (viral protein, genome-linked) of several potyviruses confer the ability to overcome these resistances (Robaglia and Caranta, 2006). This is also true of *Rice yellow mottle virus* (RYMV), of the genus *Sobemovirus*, which causes a major rice disease in Africa (Kouassi et al., 2005). Only one gene for high resistance to RYMV, named *rymv1*, has been found in rice. This resistance is recessive and mediated by an eIF(iso)4G gene (Albar et al., 2006). Four resistance alleles have been identified, one in the Asiatic rice *Oryza sativa*, three in the African rice *Oryza glaberrima* (Thiémmélé et al., 2010). After inoculation of *rymv1*-resistant plants, irrespective of the resistance allele, the impact on yield is negligible, no symptoms are visible and the virus is not detected in ELISA tests (Ndjiondjop et al., 1999; N'Guessan et al., 2001). However, *rymv1* resistance is not expressed as

immunity as RYMV was detected in *rymv1-2* resistant plants by quantitative PCR (Poulicard et al., 2010).

The resistance allele *rymv1-2*, identified in the Asiatic rice *O. sativa* cvs. Gigante and Bekarosaka, is due to a point mutation leading to the replacement of a glutamic acid by a lysine at codon 309 in the central domain of eIF(iso)4G (Albar et al., 2006; Rakotomalala et al., 2008). The adaptation of RYMV to the *rymv1-2* allele resistance in rice has been studied in detail (Fargette et al., 2002; Hébrard et al., 2006, 2008; Pinel-Galzi et al., 2007; Poulicard et al., 2010; Traoré et al., 2006). The *rymv1-2* resistance is most frequently overcome by the substitution at codon 48 of the VPg of an arginine by a glycine, and then a glycine by a glutamic acid. Another two-step mutational pathway at codon 48 is the substitution of an arginine by an isoleucine, and then an isoleucine by a valine. At codon 52, a histidine is replaced by a tyrosine.

The objective of this study is to distinguish the general from the allele-specific features of the *rymv1* resistance-breaking process. The analysis was then extended to the *rymv1-3* allele found in the cultivar Tog5681 and a few other *O. glaberrima* cultivars (Thottappilly and Rossel, 1993). Resistance of *rymv1-3* is caused by a deletion of codons 322–324 in the same domain of eIF(iso)4G (Albar et al., 2006). An approach similar to that followed for *rymv1-2* was adopted. A large range of isolates representative of the geographic distribution and of the genetic diversity of RYMV was inoculated to *rymv1-3*-resistant plants. Resistance-breaking mutations were determined by comparison of the sequences of the VPg before and after resistance-breakdown. Major resistance-breaking (RB) mutations were validated by mutagenesis of an infectious clone. The fixation of mutations over time was followed, the mutational pathways to *rymv1-3* virulence

* Corresponding author. Fax: +33 467 41 63 30.

E-mail address: denis.fargette@ird.fr (D. Fargette).

¹ These authors contributed equally to this work.

were reconstructed, and the virus multiplication of the mutants was assessed by quantitative PCR. The ability of an avirulent infectious clone to fix *rymv1-3* RB mutations after direct inoculation of resistant plants was also tested. Finally, a molecular signature of the differences among isolates in their ability to overcome *rymv1-3* resistance was sought in the VPg. Comparison of the *rymv1-2* and *rymv1-3* RB processes showed marked similarities in the mode of viral adaptation to *rymv1*. Yet it revealed opposite virulence specificity of the isolates as genotypes breaking *rymv1-3* resistance hardly broke *rymv1-2* and vice versa.

Results

The rymv1-3 RB mutations

Overall, *rymv1-3* resistance was overcome by 21 out of the 84 isolates tested (i.e. 25%) (Fig. 1). The 21 *rymv1-3* RB isolates

originated exclusively in West Africa and belonged to three phylogenetic groups. Sixteen *rymv1-3* RB isolates came from the West of Niger and were collected in two independent surveys along the Niger River. They belonged to a variant of the S1-ca strain which is found exclusively in eastern countries of West Africa (Bénin, Niger, Togo). Three isolates were of the S2-S3 strain which is most prevalent in the forested part of West Africa. Two other *rymv1-3* RB isolates belonged to the S1 strain found in savannah zones of West Africa. Interestingly, only four of these 21 *rymv1-3* RB isolates could also overcome *rymv1-2*. Three came from the West of Niger and clustered in the S1-ca strain, whereas one of them originated from Mali (Ma203) and belonged to strain S2-S3.

A total of 50 mutants was obtained from the 21 *rymv1-3* RB isolates. Mutations associated with the RB phenotype occurred between codons 37 and 52 of the VPg, mostly at codons 41 and 52 (Fig. 2). Most mutations were transitions and resulted in amino-acids with biochemical properties different from those of the avirulent

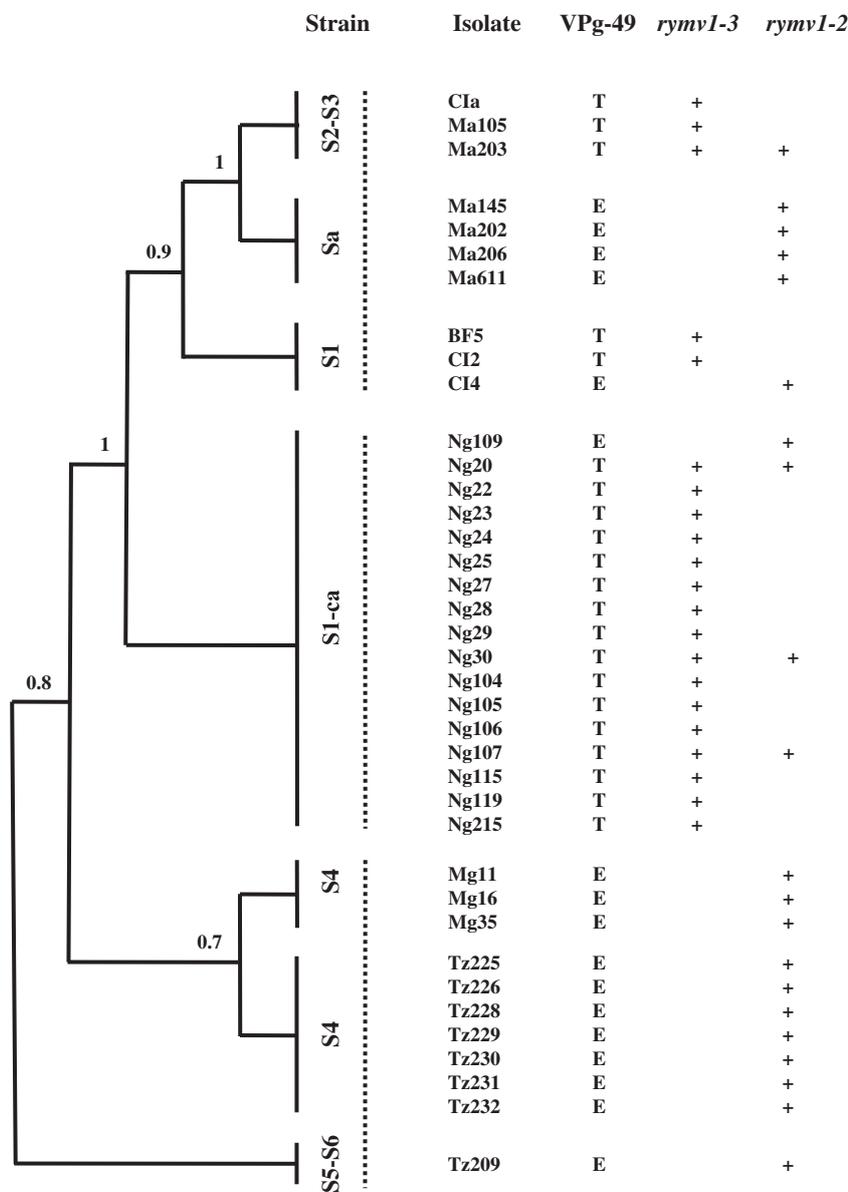


Fig. 1. Origin of the resistance-breaking isolates. The cladogram was reconstructed from the full sequence of reference isolates by maximum likelihood methods with bootstrap support of their nodes indicated. Each isolate was assigned to a particular strain after phylogenetic analysis of its coat protein gene. The strain and the geographic origin are indicated: strains S1, S2-S3 and Sa (West Africa), strain S1-ca (Central Africa and neighboring countries of West Africa), strains S4 and S5-S6 (East Africa). The amino acid at codon 49 of the VPg is abbreviated by an 'E' for glutamic acid and by a 'T' for threonine. Resistance-breakdown of *rymv1-3* and *rymv1-2* is marked by a '+'. Resistance-breakdown of *rymv1-2* was first established in earlier studies with a lower number of isolates (Pinel-Galzi et al., 2007).

<i>rymv1-3</i> RB mutations																
I	R	A	S	S	N	T	W	V	R	E	R	T	K	Y	H	Avirulent
37				41		43						49			52	
.	.	.	.	P	[11]
.	.	.	.	A	[3]
.	Y	.	[17]
.	.	.	.	P	Y	.	[9]
.	.	.	.	A	Y	.	[7]
.	A	[1]
.	.	.	.	P	.	A	Y	.	[1]
V	.	.	.	P	Y	.	[1]
<i>rymv1-2</i> RB mutations																
I	R	A	S	S	N	T	W	V	R	E	R	T	K	Y	H	Avirulent
			39								48	49				
.	W	[3]
.	.	T	W	[1]
I	R	A	S	S	N	T	W	V	R	E	R	E	R	Y	H	Avirulent
			38			42	43					48	49		52	
.	G/E	[38]
.	Q	G	[1]
.	I/V	[5]
.	Y	.	[4]
.	Y	[3]
.	A	Y	.	[1]

Fig. 2. Resistance-breaking mutations. Amino-acid changes associated with *rymv1-3* and *rymv1-2* resistance-breakdown were deduced from comparison of the VPg sequences of the wild avirulent and of the evolved forms of each isolate. The sequences of the avirulent-type are at the top lines. The isolates with a threonine and a glutamic acid at codon 49 are distinguished (see text for explanation). The class of the amino-acids is indicated with colors: acidic (red), basic (blue), hydrophobic (green), polar (orange), and small (purple). For each amino acid change (or combination of changes), the number of RB mutants is shown in brackets at the right of the sequence. The *rymv1-2* RB mutations were first established in earlier studies with a lower number of mutants (Pinel-Galzi et al., 2007).

isolates. Both codons 41 and 52 were monomorphic in avirulent isolates. Moreover, codon 41 was under a conservative selection pressure with a significant *P* value ($P=9 \times 10^{-7}$). At codon 52, a histidine was substituted by a tyrosine. At codon 41, serine was most often substituted by a proline and sometimes by an alanine. The amino-acid replacement at position 41 was not dependent on codon usage. Proline derived from serine which was coded by TCC and TCA; alanine derived from serine which was coded by TCC, TCG and TCT (Fig. 3). The amino-acid replacement was not strain-dependent either, as isolates of S1-ca variant from West Niger broke resistance by fixation of a proline or an alanine. The causal role of mutations 52Y, 41P and 41A in *rymv1-3* resistance breakdown was validated by directed mutagenesis of an infectious clone. The resistance was readily overcome after inoculation of the transcripts. Mutations at each of position 41 or 52 in the VPg induced resistance breakdown. The infectious clone mutated at these two positions also broke the *rymv1-3* resistance.

The four isolates which broke both resistance alleles overcame *rymv1-3* resistance by following the mutational pathways of any other *rymv1-3* RB isolate, a proline at codon 41 and/or a tyrosine at codon 52. By contrast, they broke *rymv1-2* resistance by a specific substitution; the replacement of the arginine by a tryptophan at codon 48 (Fig. 2). Interestingly, when mutation 48W was introduced into the infectious clone of isolate Cla, the mutated clone infected neither resistant nor susceptible plants. Then, mutation 48W fixed in three isolates of strain S1-ca and in one isolate of the S2-S3 strain (isolate Ma203) was lethal in the infectious clone Cla of the S2-S3 strain.

The *rymv1-3* RB mutational pathways

The *rymv1-3* resistance was overcome after direct inoculation of transcripts of the avirulent infectious clone; systemic symptoms

developed and the mutation 41P was fixed. This is the first report of adaptation of an infectious clone to the *rymv1* resistance. In avirulent isolates, RB mutations at codons 41 and 52 emerged at a similar frequency. A first mutation either at codon 41 or 52—there was no order of appearance—was often followed by the fixation of the other one, as revealed when following the course of infection (Fig. 3). Consistently, mutation 52Y was fixed after inoculation of the infectious clone mutated with 41P. In no instance was a mutant displaced by the alternate one during the *rymv1-3* RB process.

The quantitative RT-PCR technique (qRT-PCR) was applied to assess the viral accumulation in *rymv1-3* resistant plants after inoculation of the avirulent isolate, of the single RB mutants, and of the double RB mutants. The following trends were apparent (Fig. 4). After inoculation of the avirulent isolate, the sensitive qRT-PCR technique detected a low but consistent viral RNA accumulation, above the threshold level set with test of non-inoculated leaves. When a single RB mutation was fixed, be it 52Y, 41P or 41A, the virus accumulation of the single mutant was significantly higher than the avirulent isolate ($P=0.003$ in one-sided Student test with unequal variance), i.e. 10 to 10^2 -fold greater than the WT. When both mutations were fixed together, be it 41P and 52Y or 41A and 52Y, the virus accumulation of the double mutants was significantly higher than the single mutants ($P=0.002$ in one-sided Student test with unequal variance), i.e. c. 10^5 greater than the avirulent isolate. After this stepwise RB accumulation, the virus content in resistant plants reached c. 10^{12} viral RNA copies per milligram of leaf.

The ability to break the *rymv1-3* resistance

The 21 isolates which broke *rymv1-3* resistance had a threonine at codon 49 of the VPg (Fig. 1, Table 1). By contrast, none of the 49 isolates with a glutamic acid at this position became virulent when inoculated to *rymv1-3*. Increasing the number of plants challenged

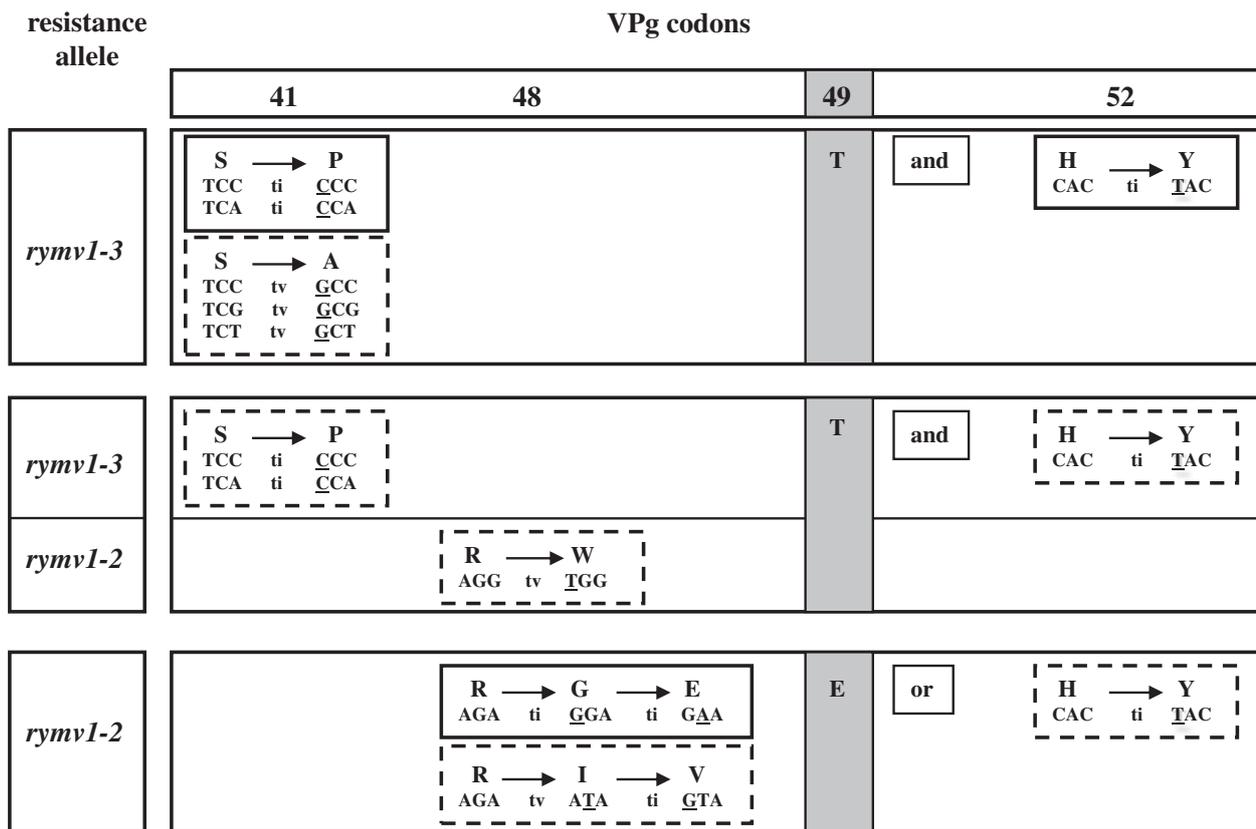


Fig. 3. Resistance-breaking mutational pathways. The mutational pathways to virulence against *rymv1-3* and *rymv1-2* are illustrated. The amino-acid and the nucleotide changes, and the type of nucleotide substitution are shown (ti for transition and tv for transversion). Plain and broken boxes symbolize frequent and rare mutations, respectively. The boxed words 'and' vs. 'or' indicate accumulation and displacement of RB mutations, respectively. The amino acid at codon 49 of the VPg is abbreviated by an 'E' for glutamic acid and by a 'T' for threonine and shaded. The *rymv1-2* mutational pathways were first established in earlier studies with a lower number of mutants (Pinel-Galzi et al., 2007).

with isolates with a glutamic acid did not result in a successful infection. The link between the ability to break *rymv1-3* resistance and the amino-acid at codon 49 was highly significant ($\chi^2 = 37.9$, $P < 0.001$).

There was a converse relationship between the ability to break *rymv1-2* resistance and the amino-acid at codon 49 ($\chi^2 = 18.9$,

$P < 0.001$). Seventeen of the 21 *rymv1-2* RB isolates had a glutamic acid at this position. The other four were isolates with a threonine (Fig. 2). They overcame *rymv1-2* by fixation of a specific mutation, a tryptophan at codon 48. They were the only isolates that broke both *rymv1-2* and *rymv1-3* resistances.

Discussion

The adaptation process of RYMV to *rymv1-2* and *rymv1-3* resistance alleles showed striking similarities despite different genetic determinants (point mutation vs. deletion) and host species (*O. sativa* vs. *O. glaberrima*). RB mutations were never found in field isolates. Most *rymv1-3* RB mutations occurred between codons 37 and 52 in the central domain of the VPg. The substitutions were most often transitions, always coding, and resulted in amino-acids with biochemical properties different from those of the avirulent isolates. These results are consistent with those obtained with *rymv1-2* (Pinel-Galzi et al., 2007).

Table 1

Response of rice cultivars with *rymv1-3* or *rymv1-2* alleles of resistance to inoculation of RYMV isolates representative of the different strains in Africa with either a glutamic acid (E) or a threonine (T) at codon 49 of the VPg.

Viral isolates	Allele of resistance ^a			
	aa at codon 49			
	<i>rymv1-3</i>		<i>rymv1-2</i>	
E	49	0	40	17
T	14	21	88	4

^a A '+' indicates resistance-breakdown.

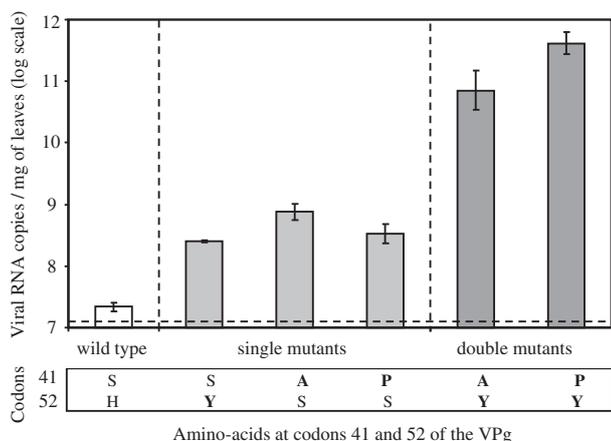


Fig. 4. Viral accumulation of RB mutants. Viral accumulation in *rymv1-3* resistant plants of the avirulent isolate Cla (41S, 52H in the VPg), of the single mutants (52Y, 41A, 41P) and of the double mutants (41A and 52Y, 41P and 52Y). The amino acids of the avirulent isolate are in plain letters, the mutated codons in bold letters. The number of viral RNA copies per milligram of fresh leaf was estimated by qRT-PCR at 30 days post-inoculation. Three plants were inoculated with each viral genotype. The vertical bars show the standard error of the means. The broken lines indicate the detection threshold.

The phylogeny of RYMV was initially based on the coat protein gene, but trees inferred from the other ORFs of the genome (including ORF2a which contain the VPg gene) and from the full genome are congruent (Pinel-Galzi et al., 2009). So the same *rymv1–3* RB mutations were fixed whatever the phylogenetic origin of the isolates, a trait also observed with *rymv1–2*. It showed that parallel evolution is a general feature of *rymv1* resistance breakdown. It indicates that the number of mutational pathways for adaptation to *rymv1* resistance is low. It likely reflects the high specificity of the interactions between the VPg and eIF(iso)4G domains.

Both resistance alleles *rymv1–3* in *O. glaberrima* and *rymv1–2* in *O. sativa* were overcome by the H52Y substitution. A single amino-acid, at codon 303, close to the resistance mutations and deletions, differentiates *O. sativa* from *O. glaberrima* in the central domain of eIF(iso)4G (alanine vs. aspartic acid, respectively) (Albar et al., 2006; Thiémélé et al., 2010; C. Lirette and E. Hébrard, unpublished results). Then, H52Y substitution in the VPg of RYMV restored a compatible interaction with *rymv1–2* (309K) in *O. sativa* (303A) and with *rymv1–3* (deletion of codons 322–324) in *O. glaberrima* (303D) in the central domain of eIF(iso)4G. The *rymv1–3* resistance-breakdown often involved a sequential accumulation of RB mutations at codons 41 and 52 which paralleled an increase in the accumulation rate. An amount of 10^{12} viral RNA copies per milligram of leaves was reached. A similar amount was estimated after resistance breakdown of *rymv1–2*, and in susceptible cultivars infected by WT isolates. Sequential fixation of RB mutations was also observed with *rymv1–2* (Pinel-Galzi et al., 2007). However, the stepwise breakdown process in *rymv1–2* progressed by the ordered replacement of RB mutations at the single codon 48, whereas with *rymv1–3* it consisted of the unordered accumulation of RB mutations at codons 41 and 52.

RB isolates are often assumed to pre-exist in the virus population prior to inoculation of the resistant plants. Alternatively, with RYMV, the stepwise mutational pathways (Pinel-Galzi et al., 2007) and the residual multiplication of the avirulent isolates on *rymv1–2*-resistant plants (Poulicard et al., 2010) suggested that RB mutations were generated *de novo* in resistant plants. Similarly, the *rymv1–3* RB process was characterized by a sequential accumulation of mutations at codons 41 and 52 and a residual multiplication of avirulent isolates in resistant plants. However, the only direct evidence of the production of RB variants during multiplication of avirulent isolates in resistant plants was the fixation of mutation 41P, a typical *rymv1–3* RB mutation, after inoculation of an avirulent infectious clone to *rymv1–3*-resistant plants. This validated the hypothesis that *rymv1–3* RB mutations are generated *de novo* in resistant plants rather than selected in susceptible plants from viral quasispecies.

Comparison of the *rymv1–2* and *rymv1–3* RB processes showed striking similarities which suggest a common mode of viral adaptation of RYMV to *rymv1* resistance. However, they also revealed converse virulence specificity of the isolates. No isolates from East Africa and hardly any from the savannah part of West Africa overcame *rymv1–3* resistance. Inversely, very few isolates from the forested part of West Africa broke *rymv1–2* resistance (Pinel-Galzi et al., 2007). The amino-acid at codon 49 of the VPg was a molecular signature of this converse virulence specificity. Strains with a glutamic acid at this position did not overcome *rymv1–3* whereas those with a threonine hardly broke *rymv1–2*. The exception was the small subset of isolates, mostly from West Niger, with a threonine at codon 49 of the VPg which overcome both alleles of resistance. They differed from any other isolates in breaking *rymv1–2* by the fixation of a tryptophan at codon 48. They also differed from the infectious clone Cla, and possibly from other isolates with a threonine at codon 49 unable to overcome *rymv1–2*, for which tryptophan at codon 48 was lethal.

Overall, the conditional emergence of RB mutation on the E/T polymorphism at codon 49 was the most salient difference in the adaptation processes to *rymv1–2* and *rymv1–3* resistances. Codon 49

is the only site of the VPg under positive selection (Pinel-Galzi et al., 2007), indicating that changes between a glutamic acid and a threonine at this position conferred a selective advantage during RYMV evolution. There is a striking correspondence between the geographical distribution of the two *Oryza* species and that of RYMV isolates. *O. sativa* is grown all over Africa, whereas *O. glaberrima* has been cultivated in West Africa only (Porterès, 1970; Semon et al., 2005; Thiémélé et al., 2010). Similarly, virus isolates with a glutamic acid at codon 49 of the VPg are spread all over Africa, whereas those with a threonine are restricted to West Africa (A. Pinel-Galzi, O. Traoré, D. Fargette, unpublished results). Our working hypothesis is that the amino acid at codon 49 reflects past adaptations to rice species and modulates the present ability to overcome the *rymv1* resistance alleles. Under this hypothesis, the isolates with a glutamic acid cannot overcome the *rymv1–3* resistance present in *O. glaberrima* cultivars because they are preferentially adapted to *O. sativa*. Conversely, the isolates with a threonine hardly break the *rymv1–2* resistance present in *O. sativa* because they are preferentially adapted to *O. glaberrima*. This would illustrate the principle that limitations upon present possibilities are consequences of past adaptations (Gould, 2002).

Materials and methods

Plant material and virus isolates

The cv. Tog5681 used in the experiments is one of the few *O. glaberrima* cultivars with the *rymv1–3* resistance. The plants were kept in a growth chamber under a 12-h illumination at $120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ at 28°C and 60% humidity. Isolates representative of the strains of RYMV and originating from most rice-growing regions of Africa were collected from susceptible plants in the fields. They displayed a high genetic diversity with up to 17% uncorrected pairwise nucleotide differences in the coat protein gene. Strains S1 (savannah region), S2/S3 (mainly forest), and Sa (sahelian regions) originated from West Africa. Strain S1-ca was found in Central Africa and in neighboring countries of West Africa and accordingly referred to as the West-Central African strain. Strain S4 originated from continental East Africa and Madagascar, and S5/S6 exclusively from continental East Africa. Altogether, 84 isolates were inoculated to *rymv1–3*-resistant cultivars. A total of 50 RB genotypes was obtained from 21 RB isolates. Complementarily, the number of *rymv1–2* RB mutants was increased—from 41 derived from 10 isolates (Pinel-Galzi et al., 2007) to 56 from 21 isolates—in search of isolates able to break both alleles of resistance.

Inoculum was prepared by grinding infected frozen leaves in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) (0.1 g/ml). Extracts were mixed with 600-mesh carborundum and rubbed on leaves of 11-day-old rice seedlings. In each experiment, the isolate was inoculated to 10–20 plants. Larger scale experiments with 50 plants were also conducted to obtain several RB mutants from the same isolate or to generate a RB mutant from a recalcitrant strain (Table S1). In several instances, samples were collected up to 6 months after inoculation of resistant plants to follow the course of fixation of RB mutations. Such a length of time is biologically realistic even for annually cultivated rice having a growing season of c. 3 months, as regrowth of infected rice stubble occurs frequently after harvest.

Sequencing and qRT-PCR tests

Isolates that induced generalized symptoms in resistant plants and/or high virus content as estimated by ELISA were collected. The VPg and the 5' and 3' neighboring regions were sequenced and compared to the sequence before inoculation. For phylogenetic purposes, the coat protein gene of the isolates was also sequenced. The cladogram derived from the phylogenetic tree which was reconstructed by maximum likelihood methods from the full sequence

of reference isolates (Pinel-Galzi et al., 2009). The VPg and CP genes and the full genome were sequenced as reported earlier (Fargette et al., 2004). Selection pressure expressed on codons involved in *rymv1-3* resistance breakdown was estimated on a corpus of 150 VPg sequences of isolates representative of the genetic diversity of RYMV and calculated as reported in Pinel-Galzi et al. (2007). Directed mutagenesis of the infectious clone Cla was performed as described elsewhere (Brugidou et al., 1995; Hébrard et al., 2006). Transcripts of the non-mutated infectious clone were also used to challenge plants having *rymv1-3* resistance. To assess the virus accumulation of the RB mutants on resistant plants, qRT-PCR assays were performed on plants that had been inoculated with c. 10^{11} copies of each viral genotype. Three plants were inoculated with each viral genotype. The last expanded leaf of each plant was collected 30 days after inoculation. The total RNA from 0.05 g of leaves was purified (RNeasy Plant Mini Kit, Quiagen, Hilden, Germany). Two replicates of a two-step reverse transcription of a region overlapping the VPg cistron were performed for each RNA extract under the conditions described in Poulicard et al. (2010). All reactions were performed in duplicate, including the negative controls.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.virol.2010.09.007.

Acknowledgments

We are grateful to E. Truve and L. Albar for helpful discussions, and to J. M. Thresh and B. D. Harrison for critical review of the manuscript. We thank C. Brugidou for the gift of the infectious clone of the isolate Cla.

References

- Albar, L., Bangratz-Reyser, M., Hébrard, E., Ndjiondjop, M., Jones, M., Ghesquière, A., 2006. Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *Plant J.* 47, 417–426.
- Brugidou, C., Holt, C., Yassi, M.N., Zhang, S., Beachy, R., Fauquet, C., 1995. Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of *Rice yellow mottle virus* and mutagenesis of the coat protein. *Virology* 206, 108–115.
- Elena, S., Agudelo-Romero, P., Carrasco, P., Codoner, F., Martin, S., Torres-Barcelo, C., Sanjuan, R., 2008. Experimental evolution of plant RNA viruses. *Heredity* 100, 478–483.
- Fargette, D., Pinel, A., Traoré, O., Ghesquière, A., Konaté, G., 2002. Emergence of resistance-breaking isolates of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations. *Eur. J. Plant Pathol.* 108, 585–591.
- Fargette, D., Pinel, A., Abubakar, Z., Traoré, O., Brugidou, C., Fatogoma, S., Hébrard, E., Choisy, M., Séré, Y., Fauquet, C., Konaté, G., 2004. Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *J. Virol.* 78, 3252–3261.
- García-Arenal, F., McDonald, B.A., 2003. An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology* 93, 941–952.
- Gomez, P., Rodriguez-Hernandez, A., Moury, B., Aranda, M., 2009. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 1–22.
- Gould, S.J., 2002. *The Structure of Evolutionary Theory*. Harvard University Press, London.
- Harrison, B.D., 2002. Virus variation in relation to resistance breaking in plants. *Euphytica* 124, 181–192.
- Hébrard, E., Pinel-Galzi, A., Bersoult, A., Siré, C., Fargette, D., 2006. Emergence of a resistance-breaking isolate of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *J. Gen. Virol.* 87, 1369–1373.
- Hébrard, E., Pinel-Galzi, A., Fargette, D., 2008. Virulence domain of the RYMV genome-linked viral protein VPg towards rice *rymv1-2*-mediated resistance. *Arch. Virol.* 153, 1161–1164.
- Kouassi, N., N'Guessan, P., Albar, L., Fauquet, C., Brugidou, C., 2005. Distribution and characterization of *Rice yellow mottle virus*: a threat to African farmers. *Plant Dis.* 89, 124–133.
- N'Guessan, P., Pinel, A., Sy, A.A., Ghesquière, A., Fargette, D., 2001. Distribution, pathogenicity, and interactions of two strains of *Rice yellow mottle virus* in forested and savannah zones of West Africa. *Plant Dis.* 85, 59–64.
- Ndjiondjop, M.N., Albar, L., Fargette, D., Fauquet, C., Ghesquière, A., 1999. The genetic basis of high resistance to *Rice yellow mottle virus* (RYMV) in cultivars of two cultivated rice species. *Plant Dis.* 83, 931–935.
- Ohshima, K., Akaishi, S., Kajiyama, H., Koga, R., Gibbs, A., 2010. Evolutionary trajectory of turnip mosaic virus populations adapting to a new host. *J. Gen. Virol.* 91, 788–801.
- Pinel-Galzi, A., Rakotomala, M., Sangu, E., Sorho, F., Kanyeka, Z., Traoré, O., Séré, D., Poulicard, N., Rabenantoandro, Y., Séré, Y., Konaté, G., Ghesquière, A., Hébrard, E., Fargette, D., 2007. Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species. *PLoS Pathog.* 3, e180.
- Pinel-Galzi, A., Mpunami, A., Sangu, E., Rakotomalala, M., Traoré, O., Séré, D., Sorho, F., Séré, Y., Kanyeka, Z., Konaté, G., Fargette, D., 2009. Recombination, selection and clock-like evolution of *Rice yellow mottle virus*. *Virology* 394, 164–172.
- Porterès, R., 1970. In: Fage, J.D., Oliver, R.A. (Eds.), *Primary cradles of agriculture in the African continent*. Papers in African Prehistory. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 43–58.
- Poulicard, N., Pinel-Galzi, A., Hébrard, E., Fargette, D., 2010. Why *Rice yellow mottle virus*, a rapidly evolving RNA plant virus, is not efficient at breaking *rymv1-2* resistance. *Mol. Plant Pathol.* 11, 145–154.
- Rakotomalala, M., Pinel-Galzi, A., Albar, L., Ghesquière, A., Rabenantoandro, Y., Ramavovololona, P., Fargette, D., 2008. Resistance to *Rice yellow mottle virus* in germplasm in Madagascar. *Eur. J. Plant Pathol.* 122, 277–286.
- Robaglia, C., Caranta, C., 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* 11, 40–45.
- Roossinck, M.J., 2008. *Plant Virus Evolution*. Springer, Berlin.
- Semon, M., Nielsen, R., Jones, M., McCouch, S., 2005. The population structure of African cultivated rice *Oryza glaberrima* Steud.: evidence for elevated levels of LD caused by admixture with *O. sativa* and ecological adaptation. *Genetics* 169, 1639–1647.
- Thiémmé, D., Boissnard, A., Ndjiondjop, M., Chéron, S., Séré, Y., Aké, S., Ghesquière, A., Albar, L., 2010. Identification of a second major resistance gene to *Rice yellow mottle virus*, RYMV2, in the African cultivated rice species, *O. glaberrima*. *Theor. Appl. Genet.* 121, 169–179.
- Thottappilly, G., Rossel, H., 1993. Evaluation of resistance to rice yellow mottle virus in *Oryza* species. *Indian J. Virol.* 9, 65–73.
- Traoré, O., Pinel, A., Hébrard, E., Gumedzoé, M., Fargette, D., Traoré, A., Konaté, G., 2006. Occurrence of resistance-breaking isolates of *Rice yellow mottle virus* in West and Central Africa. *Plant Dis.* 90, 259–263.
- van der Walt, E., Rybicki, E., Varsani, A., Polston, J., Billharz, R., Donaldson, L., Monjane, A., Martin, D., 2009. Rapid host adaptation by extensive recombination. *J. Gen. Virol.* 90, 734–746.

ANNEXE 3 : INDEX DES TAXONS

LISTE ALPHABÉTIQUE DES TAXONS CITÉS

Légende :

- *Espèces animales
- **Autres espèces végétales
- ***Espèces virales
- ***¹Espèces bactériennes
- ****Espèces de riz
- *****Espèces d'adventices
- *****Nom de famille/Tribu/Genre

- ****African cereal streak virus*, p 7
- ***Arabidopsis thaliana*, p 13, 147
- ****Barley yellow mottle virus*, p 15
- ****Blueberry shoestring virus*, BSSV, p 27
- ******Bymovirus*, p 15
- ***Capsicum annuum*, p 15, 143, 148
- ***Capsicum spp.*, p 14
- **Chaetocnema pulla* Chapuis, p 24
- **Chaetocnema sp. nov. prope varicornis* Jacoy, p 24
- ****Cocksfoot mild mosaic virus*, CMMV, p 27
- ****Cocksfoot mottle virus*, CoMV, p 27
- ******Cynodon dactylon*, p 76, 77, 136, annexes 1. 1 et 1. 2
- ****Cynosurus mottle virus*, CnMoV, p 27
- *****Cypéracée, p 76, 77
- ******Cyperus rotundus*, p 81, 82, 142, annexes 1. 1 et 1. 2
- ******Cyperus sp.*, p 76, 77, 136, annexes 1. 1 et 1. 2
- **Dicladispa gestroi* Chapuis, p 24
- **Dicladispa viridicyana*, p 24
- ******Dinebra retroflexa*, p 20
- ******Echinochloa colona*, p 20, 76, 136, Annexes 1. 1 et 1. 2
- ******Echinochloa crus-galli*, p 20
- ******Eleusine indica*, p 20, 76, 77, 120, Annexes 1. 1 et 1. 2
- ******Eragrostis atrovirens*, p 20

- ******Eragrostis tenuifolia*, p 20
- ****Ginger chlorotic fleck virus, GCFV*, p 27
- **Gonocephalus merimontanus*, p 24
- ***G. longipennis*, p 24
- ****Hoja Blanca Virus*, p 1, 8
- ******Kilinga sp.*, p 76, Annexes 1. 1 et 1. 2
- ***L. esculentum*, p15
- ***Lucerne transient streak virus, LTCV*, p 27
- ****Lycopersicum hirsutum*, p 12
- ******O. brevigulata*, p 4
- ******O. granulata*, p 4
- ******O. officinalis*, p 4
- ******O. ridleyi*, p 4
- ******O. rufipogon*, p 4
- ******O. sativa indica*, p 4, 46
- ******O. sativa japonica*, p 4, 46
- ******O. sativa javanica*, p 4
- ******Oryza barthii*, p 20
- ******Oryza glaberrima*, p X, 3, 20, 46, 110, 111, 113
- ******Oryza longistaminata*, p 20, 76, 77, 136, Annexes 1. 1 et 1. 2
- ******Oryza sativa*, p VI, X, 3, 46, 110, 111, 113
- ******Oryza sp.*, p VI, 1, 4
- **Oxya spp.*, p 24
- ******Panicum maximum*, p 20
- ******Panicum repens*, p 20, 76, 77, 136, Annexes 1. 1, et 1. 2
- ******Paspalum emblectens*, p 76, 77, 136, Annexes 1. 1 et 1. 2
- ******Pepper veinal mottle virus*, p 143, 152
- ******Pisum sativum*, p 15, 143
- **Poacée, p 4, 77
- ***Potato lettuce mosaic virus Y*, p 148
- ****Potato Virus Y*, p 9, 12, 14, 147
- ***¹*Pseudomonas syringae*, p 13
- ****Rice black streaked dwarf virus, RBSDV*, p 8

- ****Rice brunchy stunt virus*, RBSV, p 8
- ****Rice crinkle disease Maize streak virus*, p 7
- ****Rice dwarf virus*, RDV, p 8
- ****Rice Galldwarf virus*, RGDV, p 8
- ****Rice giallume viru*, RYDV-RGV, p 8
- ****Rice grassy stunt virus*, RGSV, p 8
- ****Rice hoja blanca virus*, RHBV, p 8
- ****Rice ragged stunt virus*, RRSV, p 8
- ****Rice stripe necrosis virus*, p 7, 8, 9
- ****Rice stripe virus*, RSV, p 8
- ****Rice transitory yellowing virus*, RTYV, p 8
- ****Rice Tungro Bacilliform Virus*, p 1, 7, 8
- ****Rice tungro spheral virus*, RTSV, p 8
- ****Rice yellow mottle virus*, p II, XI, XII, XIII, 1, 2, 8, 14, 27, 28, 29, 80, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154
- ****Ryegrass mottle virus*, RGMoV, p 27
- ****Sesbania mosaic virus*, SeMV, p 27
- **Sessilia pusilla*, p 24
- **Sobemovirus*, p XV, 15, 25, 27, 145, 149, 151, 153
- ****Solanum nodiflorum mottle viru*, SNMoV, p 27
- ****Southern bean mosaic virus*, SBMV, p 25, 27
- ****Southern cowpea mosaic virus*, SCPMV, p 27
- ****Sowbane mosaic virus*, SoMV, p 27
- ****Subterranean clover mottle virus*, SCMoV, p 27
- ****Tobacco etch virus*, p 14
- **Trichispa sericea*, p 24
- **Trichispa sericea* Guerin-Meneville, p 24
- ****Turnip rosette virus*, TRoV, p 27
- ****Velvet tobacco mottle virus*, VTMoV, p 27

La panachure jaune du riz en Afrique de l'Ouest : épidémiologie, distribution, variabilité et pathogénie du Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) au Niger.

La panachure jaune, causée par le *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV), est la principale maladie virale du riz en Afrique. Elle a été observée dans les rizières du Niger, mais son épidémiologie et la diversité du virus responsable ont été très peu évaluées. Dans la présente étude tous les sites rizicoles irrigués ont été caractérisés et les échantillons collectés testés au plan biologique et moléculaire. Les portions du génome viral codant pour la CP (Protéine de capsid) et la VPg (Protéine Virale liée au génome) des isolats sauvages et virulents (RB) du virus ont été extraites, transcrites et amplifiées par RT-PCR, puis séquencées. Cinq pathotypes E (3) et T (2) du RYMV-Niger ont été co-inoculés par couple T/E aux variétés sensibles de riz IR64 (*Oryza sativa*) et Tog5673 (*Oryza glaberrima*). Les résultats obtenus ont attesté que la panachure jaune du riz affecte tous les sites rizicoles du Niger, avec une incidence et des pertes de récoltes variables selon les sites et atteignant respectivement 90 % et 71 %. Les variétés vulgarisées au Niger ont toutes été sensibles à la maladie. Des adventices des familles des Poacées (*Oryza Longistaminata*, *Paspalum emblectens*, *Echinochloa colona* et *Panicum repens*) et des Cypéracées (*Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Cyperus sp* et *Kylinga sp*) ont été identifiées comme hôtes réservoirs du virus et leur rôle dans la propagation de la maladie a été discuté. Les propriétés pathologiques, sérologiques et moléculaires des isolats du RYMV-Niger les ont classés en 4 groupes pathologiques distincts, un seul sérotype (Ser1-AC) et 3 clades différents de la souche S1-AOC, ce qui indique une grande variabilité biologique et génétique du RYMV-Niger. Deux nouveaux clades du virus (S1-AOC Afrique Centrale & S1-AOC Nigéria) ont été observés au Niger ; illustrant à la fois la circulation des souches en Afrique de l'Ouest et du Centre et la parenté entre les souches RYMV du Niger, de l'Est du Nigeria, du Tchad et du Cameroun. La présence d'isolats RB virulents sur l'un et/ou l'autre des allèles de résistance *rymv1-2* et *rymv1-3* vient d'être rapportée au Niger. Les isolats RB occupent près de 31 % des sites rizicoles. L'étude du déterminisme de la pathogénie a révélé 3 pathotypes distincts du RYMV (T, T' et E), coexistant dans l'Ouest et ayant une répartition contrastée à l'Est du Niger. Le polymorphisme E et T influe sur la fixation des mutations de contournement ; les pathotypes E étant uniquement virulents sur l'allèle *rymv1-2*, grâce à la mutation de l'acide aminé 48 de la VPg, et seuls les pathotypes T ont contourné la résistance de l'allèle *rymv1-3* via la mutation des acides aminés 41 et/ou 52. Les pathotypes T' ont surmonté les 2 allèles à la fois par des mutations indépendantes des acides aminés 41 (ou 43) et 52, ce qui fait du Niger la seule écologie rizicole hébergeant 2 double contournants. L'infection mixte des variétés IR64 et Tog5673 a montré que le fond génétique *O. glaberrima* discrimine les pathotypes. L'acide aminé T49 (Thréonine en 49) de la VPg confère un avantage sélectif strict aux pathotypes T vis-à-vis des pathotypes E sur *O. glaberrima*. Cependant, l'adaptation aléatoire du couple Ng140 (T)/ Ng161 (E) sur *O. glaberrima* n'exprime pas l'avantage sélectif strict des pathotypes T vs E. La répartition actuelle des pathotypes viraux en Afrique a été discutée, en relation avec le déterminisme de l'adaptation. Ces résultats seront utilisés pour développer et déployer des variétés dotées de résistance durable au RYMV.

Mots clés : RYMV-Niger, épidémiologie, pathogénie, isolat contournant(RB), variabilité, déterminisme pathogénie & adaptation du RYMV

Rice yellow mottle disease in western Africa: epidemiology, distribution, variability and pathogeny of Rice Yellow Mottle Virus (RYMV) in Niger Republic.

The rice yellow mottle disease caused by the *Rice Yellow Mottle Virus* (RYMV) is the main rice viral disease in Africa. It was observed in Niger's rice sites but its epidemiology and the responsible virus diversity were little estimated. In this study, all rice sites were characterized and the collected samples were biologically and molecularly evaluated. The genome portions coding for wild and resistance breaking (RB) isolates CP (protein capsid) and VPg (viral genome linked protein) were transcribed and amplified by RT-PCR, then sequenced. Five Niger's RYMV pathotypes E (3) and T (2) were co-inoculated by couple T/E to sensitive rice varieties IR64 (*Oryza sativa*) and Tog5673 (*Oryza glaberrima*). The results obtained showed that the disease affects all Niger's rice perimeters, with incidence and yield losses various according to locations and reaching respectively 90 % and 71 %. All the widely practiced varieties in Niger were quite sensitive to the disease. Adventitious of Poacea (*Oryza Longistaminata*, *Paspalum emblectens*, *Echinochloa colona* and *Panicum repens*) and Cyperacea (*Cynodon dactylon*, *Cyperus rotundus*, *Cypérus sp.* and *Kylinga sp.*) families were identified as virus reservoirs hosts and their roles in the disease dispersion were discussed. The pathological, serological and molecular properties of the Niger's RYMV isolates classified them in 4 different pathological groups, only one serotype (Ser1-AC) and three S1-AOC different clads, what indicates high biological and genetic variability of the virus in Niger. Two RYMV new clads (S1-AOC Center Africa and S1-AOC Nigeria) were observed in Niger; illustrating at once the RYMV's strains circulation in Western and Center Africa and the relationship between East-Niger, East-Nigeria, Chad and Cameroon RYMV strains. The presence of RB-isolates which overcame allele *rymv1-2* and/or *rymv1-3* resistance, has just been reported in Niger Republic. This isolates occupy about 31 % of rice locations. The pathogenic determinism study has reveal 3 different RYMV pathotypes (T, T' and E), coexisting in the West-Niger and having a contrasted distribution in the East. The polymorphism E and T influences the breaking down mutations fixation; pathotypes E were only virulent on *rymv1-2* allele, thanks to VPg amino acid 48 mutation and only pathotypes T broke down *rymv1-3* allele resistance via amino acids 41 and/or 52 mutations. Pathotypes T' surmounted the 2 resistance alleles at once by independent mutations of amino acids 41 (or 43) and 52, indicating that Niger Republic is the only african rice ecology with 2 double RB isolates. Varieties IR64 and Tog5673 mixed infections showed that the genetic bottom *O. glaberrima* discriminates RYMV pathotypes. The VPg amino acid T49 (Thréonine in 49) confers a strict selective advantage to pathotypes T vs pathotypes E on *O. glaberrima*. However, the couple Ng140 (T) / Ng161 (E) random adaptation on the same genetic bottom doesn't express the pathotypes T strict selective advantage. The current distribution of the RYMV pathotypes in Africa was discussed based on the adaptation determinism. These results will be used to develop and deploy varieties having a sustainable resistance to the disease.

Keywords: RYMV-Niger, epidemiology, pathogeny, Resistance breaking isolates, variability, RYMV pathogenic & adaptation determinism