

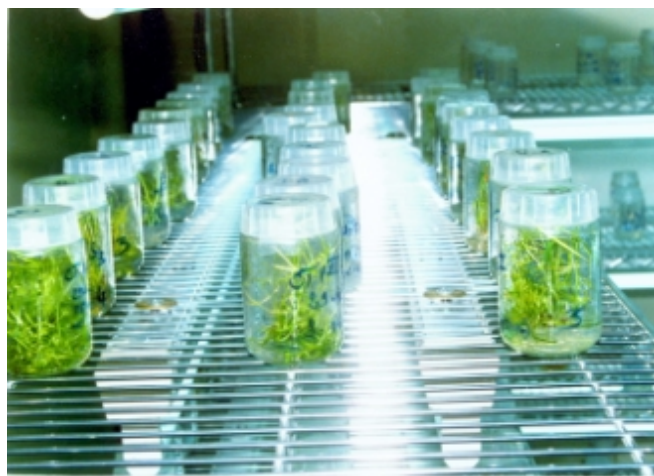
Infrastructures de biologie moléculaire à l'ADRAO

LA BIOLOGIE moléculaire est généralement considérée comme une science avancée que beaucoup de gens ne s'attendent pas à trouver dans une institution basée en Afrique de l'Ouest. Quelles sont les raisons qui ont amené l'ADRAO à mettre en place ses propres infrastructures et qu'est-ce qu'elle en fait ?

Perspective historique

Au début des années 1990, les sélectionneurs riz de l'ADRAO se sont rendu compte que tout au long des trois à quatre dernières décennies, les efforts de sélection conventionnelle n'ont permis aucun impact significatif, notamment, dans les écologies pluviales. C'est à ce moment que l'idée de créer des hybrides interspécifiques issues des riz africain (*Oryza glaberrima*) et asiatique (*O. sativa*) avait été avancée en vue d'une utilisation des gènes pour une adaptation locale dans les espèces africaines (voir « Nouveau riz pour l'Afrique... avec le coup de pouce de nos amis », dans ce même rapport annuel). Cependant, il est vite devenu clair qu'il y avait des problèmes pour « fixer » (stabiliser) la descendance de ces croisements et que quelque chose manquait.

« Au début des années 1990, nous n'avions pas pensé à adopter la biologie moléculaire à l'ADRAO », explique le sélectionneur et responsable du programme riz pluvial Monty Jones. « Mais, nous nous sommes rendu compte que l'adoption de la culture d'anthères serait une réponse à notre problème de fixation des interspécifiques. » La culture d'anthères est une technique moléculaire par laquelle on peut doubler le complément génétique des grains de pollen. Le pollen est l'équivalent du sperme pour les plantes, il ne contient donc que la moitié du complément génétique parental à combiner avec un équivalent œuf pour produire un nouvel individu. En doublant les chromosomes du pollen, nous obtenons immédiatement une lignée fixe, puisque les deux ensembles du matériel génétique sont



La culture d'anthères : là où tout a commencé à l'ADRAO

identiques. « La culture d'anthères a plusieurs avantages comparativement à la sélection conventionnelle », explique Jones, « tout d'abord, elle nous a permis de fixer des lignées en deux ans, au lieu de cinq ou six ans par la voie conventionnelle. Deuxièmement, le processus a aidé à réduire le problème de stérilité au sein de la descendance première génération des hybrides interspécifiques ; et, troisièmement, elle nous a permis de récupérer les lignées "recombinantes" c'est-à-dire les lignées combinant les caractéristiques des deux parents, en fait

l'objectif premier du projet ». L'ADRAO a eu la chance d'obtenir le plein appui de la Fondation Rockefeller pour mettre en place ses infrastructures de culture d'anthers en 1992/93 et vers 1996, plusieurs descendances interspécifiques de lignée pure étaient obtenues par le biais de cette technique.

« Les nouveaux matériels semblaient combiner les caractéristiques des deux parents comme nous l'avions espéré », poursuit Jones « y compris la vigueur de croissance précoce qui confère à *glaberrima* une capacité de suppression des adventices et les autres caractéristiques *glaberrima* de résistance ou tolérance à la sécheresse, à la pyriculariose, au virus de la panachure jaune et aux sols acides. Mais, nous devions réellement savoir ce qui a été exactement transféré de *Oryza glaberrima* vers les nouvelles descendances, où se localisaient les gènes et comment on pouvait les utiliser ». Ces questions pouvaient trouver leurs réponses dans la biologie moléculaire ; et plus précisément par le biais des marqueurs génétiques.

Dans le projet d'hybridation interspécifique, les activités de biologie moléculaire étaient dévolues à l'université Cornell des Etats-Unis et à l'Institut de recherche pour le développement (IRD, précédemment ORSTOM) en France, mais par la suite, il a été décidé de mettre en place des infrastructures à l'ADRAO, avec l'aide de nos partenaires.

Mise en place du laboratoire de biologie moléculaire

Thierry Cadalen a été le premier chercheur en biologie moléculaire de l'ADRAO en octobre 1997. « Mon premier objectif était d'installer le laboratoire de biologie moléculaire de l'ADRAO », se souvient Cadalen « Monty Jones avait déjà pris contact avec Susan McCouch à Cornell avant mon arrivée et l'orientation était que l'ADRAO devait travailler avec des marqueurs microsatellites. Bien que chercheur en biologie moléculaire, je n'avais pas de formation spécifique en microsatellites ». Cadalen devait donc se former dans les techniques appropriées à Cornell dans le laboratoire de Susan McCouch. « Mais, avant de pouvoir y aller, nous devions équiper le laboratoire. » L'équipement essentiel de biologie moléculaire générale et pour le travail par microsatellites a été commandé en début 1998 et Cadalen était ainsi libre pour aller suivre une formation de trois mois à Cornell.

Cadalen a regagné l'ADRAO en avril 1998 et un assistant de laboratoire a été recruté. Puis, le personnel du laboratoire s'est enrichi avec l'arrivée d'un assistant de recherche en mai 1998 et



L'équipe de la biologie moléculaire à l'ADRAO, en fin 1999 : à partir de la gauche, Irène Dopeu, Jeanette A. Kouakou, Thierry Cadalen, Kouamé Ipou, Marie-Noëlle Ndjiondjop et Félix B. Guela

celle d'un technicien à temps partiel en juin 1998. « La formation à Cornell n'était pas à mon seul avantage », explique Cadalen, « il était de mon devoir de former le nouveau personnel pour un bon fonctionnement du laboratoire ». Une absence forcée suite à un accident de la route a montré que Cadalen avait bien fait son travail : l'assistant de recherche, Pierre Louis Amoussou, a poursuivi le travail avec les microsatellites pendant quatre mois sur la base unique de contacts par téléphone et courrier électronique avec le monde extérieur !

Le matériel nécessaire à la méthodologie de choix (coloration au nitrate d'argent et électrophorèse sur gel polyacrylamide ou PAGE et d'autres équipements) n'étaient parvenus qu'en fin 1998 et les procédures microsatellites ne furent fonctionnelles qu'en fin février 1999.

Même après l'arrivée des matériels de coloration au nitrate d'argent et de PAGE, tout ne tournait pas encore rond. Des problèmes techniques ont continué à contrarier le travail en août/septembre 1999. C'était essentiellement la qualité de l'eau (la coloration au nitrate d'argent nécessite de l'eau exceptionnellement pure) ; une nouvelle cartouche commandée pour le purificateur d'eau en février 1999, ne fut reçue qu'en fin août. L'utilisation de l'eau impure a donné des résultats imprévisibles, inattendus et tout à fait inutiles. Un autre problème était l'obtention des produits chimiques nécessaires (en particulier les enzymes) dans un délai court. Ces problèmes ont causé d'inévitables retards dans la recherche.

Résultats de la recherche

Malgré toutes ces lacunes, la recherche s'est poursuivie dans le laboratoire de biologie moléculaire de l'ADRAO et il y a eu des progrès dans la réalisation des objectifs.

Comme indiqué plus haut, la décision de travailler avec des marqueurs microsatellites a été prise assez tôt. Ceci, en raison du fait qu'un certain nombre de travaux ont déjà été menés avec d'autres marqueurs, en particulier les polymorphismes de longueur de fragments de restriction réduits (RFLP) et les microsatellites ont plusieurs avantages comparativement à ceux-ci. Peut-être le plus important c'est que les analyses RFLP sont techniquement complexes, lentes et coûteuses. En plus, les RFLP et les autres systèmes de marqueurs ont révélé très peu de diversité (polymorphisme) au sein d'*Oryza glaberrima*. A l'opposé, les microsatellites sont moins chers à analyser et ont montré un bon polymorphisme au sein d'*Oryza glaberrima*. Les premiers travaux avec des microsatellites au sein du projet PHI ont été menés à Cornell, où 94 nouveaux marqueurs avaient été cartographiés en 1997.

Depuis sa mise en place, le laboratoire de biologie moléculaire a concentré ses efforts sur deux thèmes principaux : la carte génétique de la descendance interspécifique à l'aide de microsatellites (pour l'identification des loci de caractères quantitatifs) et les études de la diversité d'*Oryza glaberrima* toujours à l'aide de marqueurs microsatellites.

En tant que gènes, les microsatellites peuvent se présenter sous une forme unique ou en deux ou plusieurs formes plus connues sous le nom d'allèles. Comme les gènes se présentent sur les deux membres de la paire de chromosomes, chaque organisme individuel « normal » a un ou deux allèles d'un gène particulier. Lorsqu'un individu est d'une sélection pure pour un gène particulier, il porte le même allèle du gène sur chaque membre de la paire de chromosomes et on l'appelle *homozygote*. Pour la résistance à une maladie, comme le virus de la panachure jaune du riz (RYMV), par exemple, dans un individu non résistant, l'allèle du gène qui confère cette résistance est remplacé par un allèle qui ne confère pas de résistance. Pour éviter une confusion de termes, la position d'un gène est appelée son locus, ainsi nous parlons de nombre d'allèles par locus, plutôt que par gène.

En vue d'exploiter les potentialités du génome *O. glaberrima* (c'est-à-dire le complément génétique entier), en particulier son adaptation aux contraintes prévalant en Afrique, nous devons identifier et localiser les marqueurs « informatifs » sur le génome. Les marqueurs « informatifs » se trouvent là où les allèles des microsatellites, à un locus particulier, présentent une différence entre *O. sativa* et *O. glaberrima*. Nous avons utilisé 132 marqueurs dans notre comparaison des parents choisis et avons trouvé un haut niveau de polymorphisme entre les espèces dans les marqueurs à travers tout le génome (Figure 1).

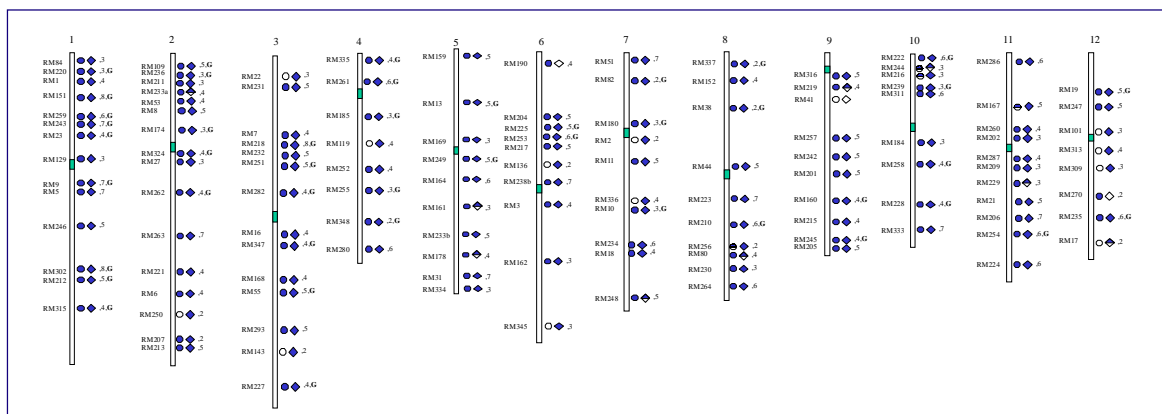


Figure 1. Carte du lien génétique entre *Oryza glaberrima* et *O. sativa* avec les sous-espèces *japonica* représentées en cercles et les sous-espèces *indica* en forme de puce telle que développée à l'Université Cornell. Le bleu représente les marqueurs de polymorphisme et le blanc ceux de monomorphisme.

C'est une bonne nouvelle : elle peut permettre de trouver des marqueurs « informatifs » associés aux caractéristiques qui nous intéressent sur le génome *O. glaberrima* (par exemple, la capacité de suppression des adventices, la résistance au RYMV, la tolérance à la sécheresse. Et ceci, à son tour offre la possibilité d'utiliser les microsatellites dans la sélection assistée par marqueurs. Dans ce type de sélection, une procédure simple peut déterminer la présence ou l'absence du gène souhaité dans une petite quantité d'ADN extrait d'un matériel végétal jeune ou de première génération, sans avoir à faire un criblage à grande échelle au champ, qui serait extensif et coûteux pour voir quels sont les plants qui héritent des caractéristiques requises. Ce test précoce minimise aussi l'effet environnemental non désiré qui pourrait résulter du criblage au champ.

La première étude sur la diversité des allèles de *O. glaberrima* a été menée sur des croisements entre quatre variétés. Des combinaisons en paires ont montré de faibles niveaux de polymorphisme (entre 15 et 28 %), mais une comparaison entre les quatre variétés a montré que 46 % des 77 microsatellites étudiés étaient en fait polymorphiques (avec au moins un parent montrant un allèle différent par rapport aux 3 autres). Ceci a confirmé que les microsatellites constituaient un bon choix de marqueurs pour l'étude de la diversité au sein de *O. glaberrima*.

Le travail détaillé sur la diversité des allèles au sein de *O. glaberrima* a été le thème de recherche PhD de Sémon Mandé

(ancien agent de l'ADRAO) à l'université Cornell. Entre temps, des études préliminaires ont été menées par Cadalen sur un sous-ensemble de 83 des 200 *O. glaberrima* de Mandé, au cours d'une seconde visite à Cornell, de mars à mai 1999. Cadalen a identifié 155 allèles sur 30 marqueurs microsatellites, ce qui donnait une moyenne de 6,13 allèles par locus – chiffre similaire à celui d'un ensemble de 13 *O. sativa* (6,63 allèles par locus). Mais, *les glaberrima* ont fait montre d'une variation plus large au sein des loci par rapport au nombre d'allèles, comme l'illustrent six marqueurs ayant 11-25 allèles, alors qu'à l'autre extrémité, 11 marqueurs avaient entre 1 et 3 allèles. Une fois encore, les microsatellites montrent beaucoup plus de polymorphisme au sein des *glaberrima* que toute autre étude antérieure par marqueurs.

Partenariats

Comme pour beaucoup d'activités de l'ADRAO, la clé du succès du travail de biologie moléculaire est le partenariat institué et maintenu avec les autres institutions. Nous avons déjà mis en exergue le rôle crucial du laboratoire de Susan McCouch à l'université Cornell dans la formation du personnel, l'octroi d'expertise technique sous la forme de conseil pour la mise en place initiale des infrastructures à l'ADRAO et l'accueil de l'étude sur la diversité des allèles *O. glaberrima* (thèse de recherche de Sémon Mandé).

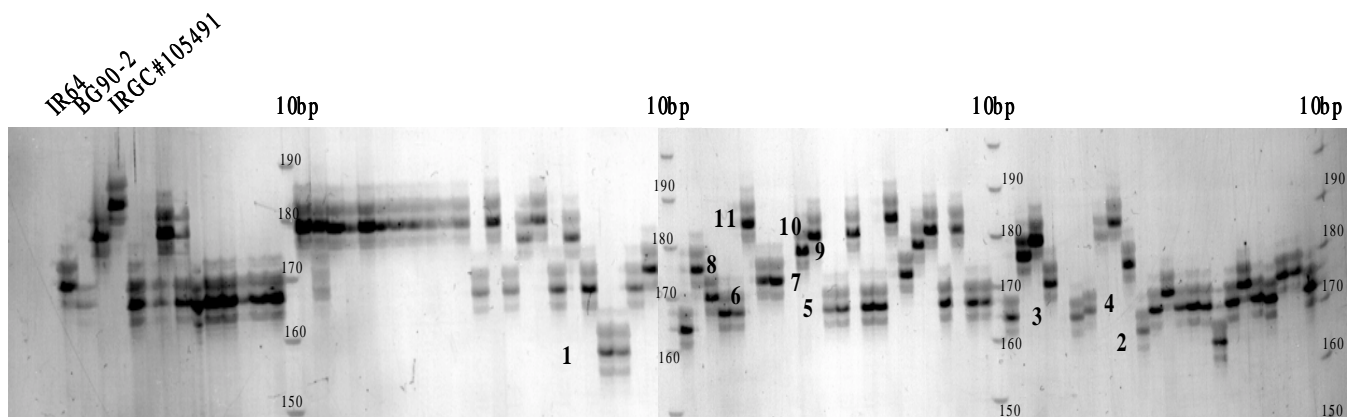


Figure 2. Profil de la diversité allélique du microsatellite RM 333 : 11 allèles détectés sur 83 accessions d'*Oryza glaberrima*.

Le Centre japonais de recherche internationale pour les sciences agricoles (JIRCAS) a détaché le physiologiste Satoshi Tobita auprès du laboratoire de biologie moléculaire de l'ADRAO, dans le cadre du projet PHI, en janvier 1998. Il doit examiner les aspects physiologiques de la carte génétique. Il explique : « Nous avons besoin de toute une équipe pour enclencher le travail de sélection à l'aide de marqueurs : le chercheur en biologie moléculaire, le sélectionneur, et un physiologiste. Lorsque nous avons commencé à identifier des marqueurs pour la résistance aux maladies, nous avons aussi eu besoin d'un phytopathologiste. » Dans la sélection assistée par marqueurs, nous identifions des marqueurs étroitement associés au gène d'une caractéristique qui nous intéresse, cette identification est appelée : « l'étiquetage des gènes. » Dans le projet IHP, ce sont des microsatellites qui sont utilisés en vue d'étiqueter des gènes pour des caractéristiques telles que la tolérance à la sécheresse, la résistance au RYMV et la croissance de la plante. On pense que chacune de ces caractéristiques ciblées est gouvernée par plusieurs gènes qui ont un effet additif au sein de la plante. Ainsi, les allèles concernés sont quantitatifs – c'est à dire chacun d'eux fournit un certain niveau de la caractéristique – ce sont des loci de caractères quantitatifs (QTL). Les microsatellites associés à ces QTL forment donc la base de l'outil de sélection.

L'autre partenaire principal dans la recherche en biologie moléculaire au sein du projet PHI est l'Institut de recherche pour le développement (IRD), France. Marie-Noëlle Ndjiondjop a fait sa recherche de PhD à l'IRD, en mettant l'accent sur la résistance au virus du RYMV. On a trouvé une forte résistance au RYMV conférée par un gène unique aussi bien dans *O. glaberrima* que *O. sativa*. Les marqueurs moléculaires associés à cette résistance ont été identifiés et localisés sur le chromosome n° 4. Ces marqueurs vont maintenant être utilisés dans un programme de sélection assistée par marqueurs pour transférer cette résistance dans des variétés populaires de riz de bas-fonds d'Afrique de l'Ouest. Un autre travail à l'IRD a permis de produire, en 1999, une carte de lien génétique d'un croisement interspécifique. Elle montre une très bonne compatibilité avec les cartes existantes réalisées sur *O. sativa*. Une contribution importante de cette nouvelle carte a été la localisation d'un gène majeur de stérilité au sein d'*O. glaberrima* sur le chromosome 6 dont on connaissait l'existence mais pas la localisation.

Le laboratoire de l'ADRAO tire un bénéfice direct du travail réalisé à l'IRD, puisque c'est Marie-Noëlle Ndjiondjop qui assume présentement les fonctions de spécialiste en biologie moléculaire à l'ADRAO.

L'avenir

Ainsi, qu'en est-il de l'avenir ? Et, Ndjiondjop prend le relais : « Le travail de cartographie génétique se poursuit avec la génération "d'une population cartographique" issue d'un croisement interspécifique. Ceci est essentiel pour l'identification des marqueurs associés aux QTL. La stérilité des hybrides de première génération constitue un problème majeur : elle nous laisse très peu de graines pour travailler. Beaucoup de rétrocroisements sont nécessaires pour relever la fertilité à un seuil utile. Donc, nous travaillons encore sur un programme de croisements interspécifiques de base (bien entendu, en utilisant les mêmes variétés parentales) et de rétrocroisements, car il nous faut générer environ 300 descendances à partir de la première génération de rétrocroisements, d'ici la fin de l'an 2000 ». La culture d'anthères sera appliquée pour fixer les lignées après le second rétrocroisement. C'est ces plants à générer par culture d'anthères qui seront utilisés pour le travail de cartographie.

« Présentement, nous utilisons les meilleures lignées NERICA sélectionnées et caractérisées par les chercheurs de l'ADRAO pour une "classification graphique des génotypes" », continue Ndjiondjop. Des microsatellites sont utilisés pour déterminer la fréquence des allèles *O. glaberrima* au sein des lignées NERICA. « Des collègues de l'IRD nous ont spécialement demandé de faire une rapide "classification graphique des génotypes" d'une lignée NERICA particulière qui est résistante aux nématodes. » Sachant que la résistance aux nématodes vient du parent *glaberrima*, les chercheurs de l'IRD essaient de rétrécir le champ de recherche du gène de résistance en effectuant seulement des recherches sur les parties du génome NERICA provenant du parent *glaberrima*.

Le phytopathologiste de l'ADRAO, Yacouba Séré est enthousiaste à l'idée d'un progrès dans la lutte génétique contre la panachure jaune (RYMV). « Avec le marqueur moléculaire identifié à l'IRD, nous sommes sur la voie de générer du "matériel de jonction" », il poursuit en expliquant « le matériel de jonction » c'est des descendances interspécifiques portant le gène de résistance à RYMV à partir du parent *glaberrima*. Elles

sont utilisées simplement parce que la fertilité des croisements entre elles et les variétés cibles sera beaucoup plus importante que celle des croisements directs entre le donneur *glaberrima* et la variété cible. « Une fois que ces “matériels de jonction” seront disponibles », continue Séré, « nous commencerons à les croiser avec des variétés de bas-fonds bien appréciées dans la région, particulièrement Bouaké 189 ». Beaucoup de variétés appréciées des paysans en Afrique de l’Ouest et du Centre sont limitées dans leurs potentialités par la sensibilité au RYMV. Nous pensons qu’en introduisant ce gène unique de résistance, nous pourrions multiplier la valeur de ces variétés. En plus, l’équipe de sélection examine comment elle peut transférer le « gène IRD » dans des NERICA qui ont déjà une résistance QTL au RYMV. Cette « exploitation pyramidale » des gènes de résistance a pour but de s’assurer que la résistance ne s’estomperait pas dans un avenir proche. Les lignées nouvellement développées seront ensuite testées, en conditions isolées (serres), contre tout le spectre d’isolats RYMV disponibles, avant leur test dans les champs de l’ADRAO contre l’isolat local ivoirien.

Ainsi, malgré différents aléas tout au long de son cheminement, le laboratoire de biologie de l’ADRAO est fonctionnel et apporte une contribution précieuse au programme de sélection. « C’est avec fierté que nous parlons souvent de nos partenariats », note le Directeur général de l’ADRAO Kanayo F. Nwanze. « Il y a dix ans, beaucoup de gens auraient demandé que nous nous contentions de nos seuls partenaires pour le travail de biologie moléculaire. Mais nous avons perçu



Comparaison entre l’espèce *glaberrima* résistante au RYMV (à gauche), l’espèce *sativa* sensible (à droite) et la lignée NERICA (au milieu)

l’intérêt d’avoir une certaine capacité et un certain niveau d’infrastructures sur place et aujourd’hui, nous récoltons les fruits de cette décision. Cependant, nous n’aurions pas pu faire ce travail tout seul et nous sommes sincèrement reconnaissants aux partenaires et collègues qui l’ont rendu possible ».

