

I. INTRODUCTION

Les plantes cultivées sont plus particulièrement sensibles aux maladies que leurs parents sauvages. Les ignames cultivées n'échappent pas à cette constatation et nous avons présenté dans le chapitre I de ce travail les principales maladies qui peuvent frapper les ignames dans le monde parmi lesquelles les virus tels que les Badnavirus (DBV) qui sont des virus à ADN et les Potyvirus (YMV, YMMV), les Potexvirus (DLV), et les Cucumovirus (CMV) qui sont tous des virus à ARN. Ces virus peuvent avoir ou non des manifestations extérieures au niveau des appareils végétatifs de la plante infectée notamment sur les feuilles sous forme de mosaïque, d'éclaircissement des nervures, de sévère chlorose et de déformation des feuilles en forme de lacet de chaussure, ou bien même un retard de croissance et du développement de la plante.

En ce qui concerne les ignames de Madagascar, nous n'avons pas encore observé jusqu'à présent de signes tangibles de maladie sur les ignames sauvages alors que certains pieds d'ignames cultivées porte bien des signes d'infection. D'autre part, avec la large promotion dont jouit l'igname, le Gouvernement malgache l'a déclarée comme faisant partie des cultures prioritaires en 2012, et sa culture commence à avoir sa place au sein de l'agriculture vivrière malgache car elle se pratique maintenant dans plus de 16 régions de Madagascar.

Grâce à l'appui de nombreuses ONG de développement, la diffusion de la culture d'igname se réalise à grande vitesse. Cependant, force est de constater le manque de connaissance sur les maladies qui affectent l'igname par tous les acteurs de développement de cette filière à savoir les paysans, les vulgarisateurs et les techniciens, les autorités. Il leur est encore impossible de contrôler les éventuelles maladies qui pourraient porter atteinte à la diversité des ignames malgaches. D'autre part, depuis 2 ans, la mise à l'échelle de la culture d'igname s'observe auprès de certains acteurs de la filière tels que la FAO, le SAF FJKM, le CARE international, l'ONG Feedback Madagascar, le MEN, l'ONN,.... Or, plus la culture du produit s'intensifie plus les maladies qui peuvent toucher la plante se développent et évoluent. Donc, la nécessité d'avoir une bonne connaissance des maladies de l'igname s'impose surtout au niveau des maladies virales qui sont considérées comme un des plus grands problèmes pour cette culture (LEBAS, 2002) d'où la réalisation de la présente étude.

II. OBJECTIFS

Cette étude a pour objectifs de faire l'inventaire des maladies et plus particulièrement des viroses des ignames à Madagascar, d'évaluer leur diversité et leur prévalence et enfin de proposer des stratégies de lutte afin d'éviter leur propagation. De ce fait, dans ce chapitre, nous avons émis les hypothèses suivantes :

H1 : les ignames cultivées malgaches sont infectées par diverses maladies, dont des viroses.

H2 : certaines de ces maladies, notamment les viroses, sont arrivées à Madagascar avec l'arrivée des premiers migrants qui ont apporté les variétés mises en culture et permettent donc d'émettre des assertions en ce qui concerne l'origine des ignames cultivées de Madagascar.

III. MATERIEL ET METHODES

III.1 Matériel

Les feuilles constituent le matériel analysé pour les viroses. Lors de la collecte des échantillons de feuilles pour l'analyse virale, des feuilles présentant des symptômes de maladie ont été récoltées, de préférence, comme celle de la chlorose, les mosaïques et les déformations au niveau du limbe. Mais parfois les plantes qui ne présentent pas des symptômes peuvent être infectées de virus, alors des feuilles d'ignames apparemment saines ont été également récoltées pour les tests. Les études des virus d'ignames malgaches ont porté sur les virus à ADN tel que le genre Badnavirus (DBV), et les virus à ARN comme tous les Potexvirus, tous les Potyvirus et en particulier YMV et YMMV, et le genre Cucumovirus (CMV).

Ainsi, la détection des virus à ADN (Badnavirus) a été effectuée sur:

- Cinq (5) plantes venant de Madagascar qu'on a fait germer dans la serre du Cirad à Montpellier,
- les extraits d'ADN purifié à partir des feuilles de 93 accessions d'igname collectées lors des missions de terrain à Madagascar dont 88 de *D. alata* et 6 de *D. esculenta*.

Pour les tests des virus à ARN, la détection de YMV, YMMV, Potexvirus, Potyvirus et CMV, a été effectuée à partir de 39 autres accessions dont 24 *D. alata*, 5 *D. bulbifera* et 10 *D. esculenta* malgaches. Elles étaient disponibles en feuilles et que nous avons pu en extraire à Montpellier l'ADN et l'ARN. Notons que *D. bulbifera* a été également collecté et indexé car

c'est une espèce subspontanée et très répandue à Madagascar susceptible de contaminer les espèces d'ignames cultivées en cas d'infection.

En guise de témoins positifs, c'est-à-dire échantillons déjà vérifiés possédant le caractère testé et servant par la suite comme référence, nous avons utilisé: un échantillon de *D. trifida* (pour DBV, YMMV, YMV), un de *D. nummularia* (pour les Potexvirus), et un échantillon de bananier *Musa acuminata* (pour les CMV). Et enfin, pour le témoin négatif, c'est-à-dire un échantillon déjà vérifié indemne de maladie virale, un échantillon de *D. alata* du Cirad a été utilisé comme référence.

III.2 Méthodes

III.2.1 Collecte des données

Lors des travaux de terrain, des matériels végétaux et des informations sur les maladies infectant les ignames malgaches ont été récoltées. Ainsi, des entrevues individuelles et collectives ont été effectuées en premier lieu et diverses questions ont été formulées de façon à soutirer le maximum d'informations sur les maladies des ignames. Les personnes enquêtées sont surtout les paysans qui connaissent l'igname, mais également les personnes clés qui peuvent fournir des informations sur l'igname comme les autorités locales et les commerçants. C'est après l'entretien que nous nous sommes rendus sur terrain avec les personnes enquêtées, dans la mesure du possible, pour vérifier les informations recueillies et pour faire la collecte des matériels.

III.2.2 Traitement et analyses des données

En s'appuyant sur la méthodologie mise au point par FILLOUX et GIRARD (2006), 6 espèces ou genres de virus à savoir CMV, DBV, tous les *Potexvirus*, tous les *Potyvirus*, et en particulier, YMV et YMMV ont été recherchées et caractérisées.

III.2.2.1 Extraction de l'ADN

Pour l'analyse des virus à ADN (Badnavirus), une extraction préalable de l'ADN total est réalisée en utilisant le kit DNeasy Plant (Qiagen). Pour chaque accession à analyser, 100 mg de feuille fraîche sont prélevés et mis dans un tube à vis de 2 ml contenant 3 billes d'acier. On y ajoute 400 µl de tampon de lyse AP1 et 4 µl de RNase A (stock de solution 100mg/ml). L'échantillon est alors broyé en utilisant le broyeur Fast Prep (2 fois 20 secondes à une vitesse de 6.5m/s). Le broyat ainsi obtenu est maintenu au froid (à 4°C).

Ensuite, ce broyat passe à une filtration par colonne avec le kit QIAshredder spin column avant d'entamer l'adsorption sur colonne blanche ou DNeasy spin column. C'est sur cette column que fixent les ADN lors de l'extraction. Pour récupérer l'ADN pure, le DNeasy spin column a été élué avec du tampon AE suivi d'une centrifugation à 6000g (Photo 89).



Photo89 : Centrifugeuse SIGMA 3K15

III.2.2.2 Extraction de l'ARN

Pour l'analyse des virus à ARN, une purification simplifiée des particules virales par «direct binding» a été réalisée. Pour cela, 100 mg de feuille fraîche ont été prélevés sur la plante à analyser et mis dans un tube à vis de 2 ml contenant 3 billes d'acier. Du tampon d'extraction (1 g de "Carbonate Coating Buffer", 0,5 g de Na₂SO₃ et 50 ml de PVP 40) a été ajouté. L'échantillon a été broyé avec le broyeur Fast Prep (2 fois 20 secondes à une vitesse de 6.5 m/s) puis centrifugé à 6000 g pendant 5 mn (à 4°C). Ensuite, 25 µl de ce surnageant est pipeté et mis dans un tube PCR de 2 ml pour être incubé une nuit à une température de 4°C. L'ARN se dépose au fond du tube. Le surnageant est ensuite jeté et le tube a été rincé deux fois avec 2 ml du PBS-T 1 X stérile et une fois avec de l'eau stérile «RNase free».

III.2.2.3 Amplification par PCR et RT-PCR

a- *PCR* (Polymerase Chain Reaction)

Pour la détection des virus à ADN, la technique de PCR avec les couples d'amorces génériques Badnavirus a été utilisée: BadnaFP (ATG CCI TTY GGI ITI AAR AAY GCI CC) et BadnaRP (CCA YTT RCA IAC ISC ICC CCA ICC) (Seal et Muller, 2007). Ainsi, le mix ou mélange PCR a une concentration finale d'amorce de 0,2 µM. Le mix contient en plus des couples d'amorce la HotStarTaq et l'enzyme RNase. Ce mélange a été distribué dans chaque tube PCR 0,2 ml suivi des ADN purifiés avec le Kit DNeasy Plant (Qiagen). (Cf. III.2.2.1).

Les tubes PCR sont alors déposés dans le Thermocycler Biometra pour le lancement du PCR et la Température d'annealing est réglée à 55°C. La taille théorique du produit d'amplification était de 579 pb.

b- RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

La détection des virus à ARN a été effectuée à l'aide de la technique de RT-PCR en utilisant des couples d'amorces respectives (Tableau 26). Le mélange PCR contient la RNase, le Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix, Qiagen OneStep RT-PCR Buffer, dNTP Mix et les couples d'amorce dont la concentration finale varie suivant le type de virus testé. Cette concentration est de 1 µM pour le test de CMV et de Potexvirus; 0,4 µM pour le test de Potyvirus et 0,2 µM pour le test de l'YMV et YMMV en même temps. Il en est de même pour la température d'annealing car elle est de 51,5°C pour le test de Potexvirus et 55°C pour les autres virus.

Pour chaque test, les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 26:

Tableau 26: Liste des amorces utilisées avec leurs tailles exprimées en paires de base (bp)

Test	Amorces respectives	Taille des produits de PCR	Références
YMMV	YMMV CP 2F : GGC ACA CAT GCA AAT GAA AGC	249 bp	MUMFORD et SEAL (1997)
	YMMV UTR 1R : CAC CAG TAG AGT GAA CAT AG		
YMV	YMV CP 1F : ATC CGG GAT GTG GAC AAT GA	586 bp	MUMFORD et SEAL (1997)
	YMV UTR 1R : TGG TCC TCC GCC ACA TCA AA		
Potyvirus	Oligo 1n : ATG GTH TGG TGY ATH GAR AAY GG	327 bp	MARIE-JEANNE et al., (2000)
	Oligo 2n : TGC TGC KGC YTT CAT YTG		
Potexvirus	Potex 2RC : AGC ATR GCN SCR TCY TG	583 bp	VAN DER VLUGT et BERENDSEN (2002)
	Potex 5 : CAY CAR CAR GCM AAR GAY GA		
CMV	CMV1-F : 5'-GTA GAC ATC TGT GAC GCG A-3'	540 bp	DE BLAS C. et al., (1994)
	CMV1-R : 5'-GCG CGA AAC AAG CTT CTT ATC-3'		

Le mélange PCR est ensuite distribué dans chaque tube PCR 0,2 ml suivi des ARN purifiés (Cf. III.2.2.2). Les mélanges PCR sont déposés dans le Thermocycleur Biometra pour le lancement du PCR (Photo 90).



Photo 90 : Thermocycleur

III.2.2.4 Migration sur gel d'agarose

Une solution d'agarose à 1,2% (p/v) est préparée en mélangeant 1,2 g d'agarose et 100 ml de TAE 0,5X. La solution est portée à ébullition au four micro-ondes jusqu'à fusion totale de l'agarose. Le gel est ensuite coulé dans la plaque de migration munie de peignes. Après 20 min du coulage, le gel se solidifie et est déposé dans la cuve de migration contenant une solution de TAE 0,5X. Les marqueurs de tailles sont déposés dans les puits des extrémités du gel et les produits de PCR ou de RT-PCR, préalablement mélangés avec du bleu de migration, dans les puits au milieu du gel. La migration est réalisée sous une tension de 100 volts pendant 20 min (Photo 91).



Photo 91 : Migration sur gel

III.2.2.5 Révélation

Après la migration, le gel est mis à tremper dans un bain de BET (Bromure d'Ethydium) à 1 µg/ml pendant 5 mn, puis rincé dans un bain d'eau pendant 5 mn avant de

l'exposer sous les lampes ultra-violet. Les produits de PCR, marqueur de la présence de virus, apparaissent sous forme de bande fluorescente sur le gel.

III.2.2.6 Caractérisation des virus

a) Purification des produits de PCR

Les bandes de taille conforme à la théorie sont découpées et extraites du gel à l'aide d'un scalpel, et conservées à froid (4°C) dans un tube eppendorf avant purification de ces produits de PCR.

Dans le tube eppendorf de 2 ml contenant ce morceau de gel on y ajoute 3 fois volume du gel par Buffer QG et incubé à 50 °C pendant 10 mn tout en vortexant tous les 3 mn. Le gel a été dilué et purifié à l'aide du QIAquick Gel Extraction Kit. Le produit PCR ainsi purifié passe à l'étape suivante.

b) Clonage et Séquençage

Le clonage consiste en la multiplication des virus déjà déterminés par l'intermédiaire de la bactérie *Escherichia coli* qui a la faculté de se multiplier de façon exponentielle.

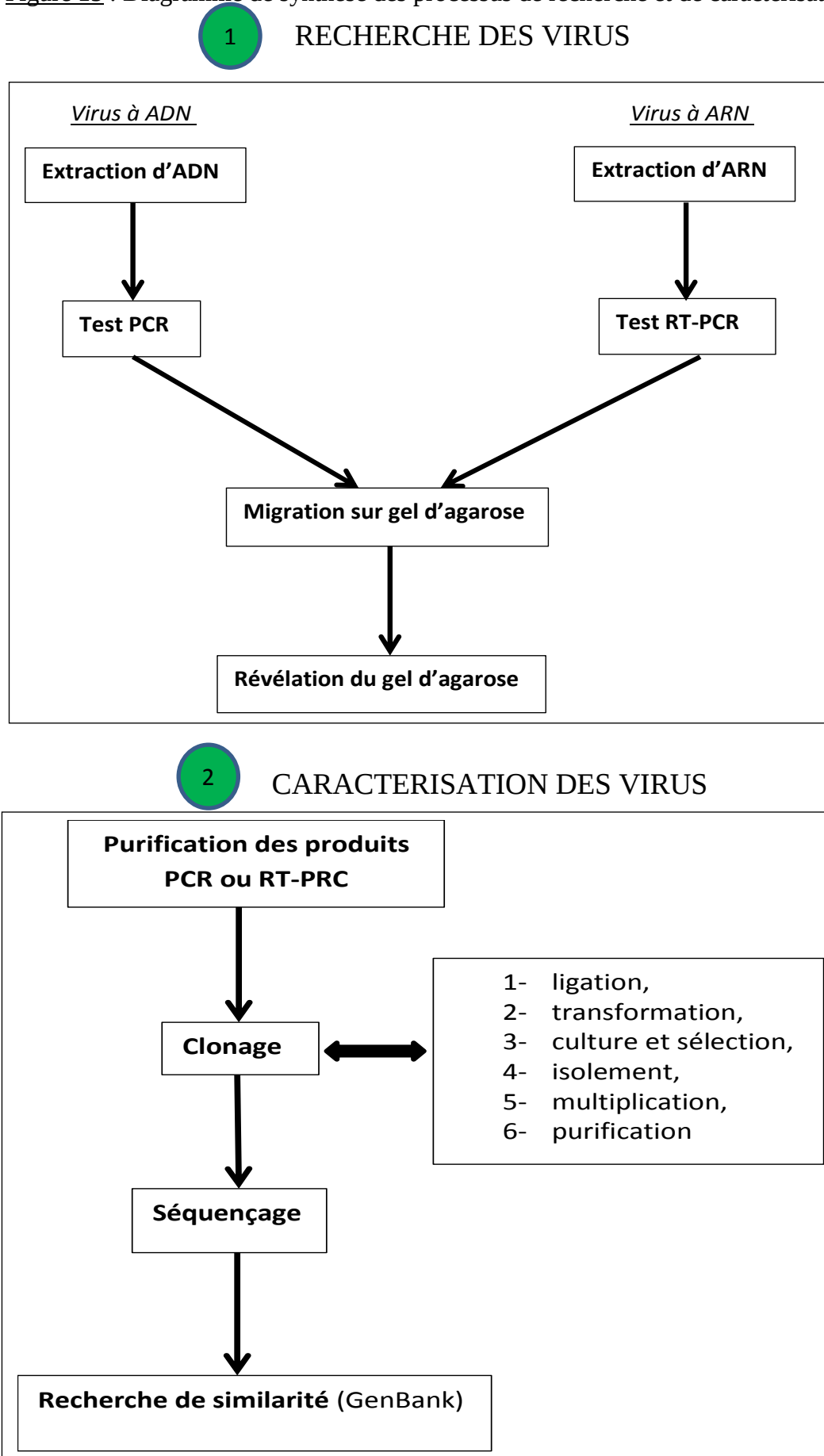
Le gel a été découpé au niveau du poids moléculaires du virus détecté c'est-à-dire là où apparaît la bande fluorescente contenant le virus sur le gel et ensuite ce produit PCR a été purifié à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Cette purification est suivie directement des étapes de clonage décrit sur les instructions du kit pGEM-T® Easy Vector System (Promega) (Annexe 5).

Après clonage, les bactéries transformées et porteuses du produit de PCR ont été sélectionnées par la méthode PCR et ensuite les plasmides ont été extraits des colonies bactériennes et purifiés avec le kit Quicklyse Miniprep (Qiagen) pour être séquencés chez Beckman Coulter Genomics (Royaume-uni).

c) Recherche de similarités

Les résultats obtenus après séquençage, c'est-à-dire les séquences d'ADN virales, vont être comparées avec les données déjà existantes en ligne dans les Genbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) par BlastN afin de déterminer la famille, le genre et l'espèce de virus auxquels appartiennent ces séquences. Avec ces comparaisons on pourrait même arriver à déterminer l'origine de la plante infectée par ces virus.

Figure 15 : Diagramme de synthèse des processus de recherche et de caractérisation des virus



IV. RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

IV.1 Les observations sur terrain

Plusieurs missions de terrain ont été organisées lors de cette étude au cours desquelles la détection des pieds d'ignames malades constituait un de nos objectifs. Il est à noter que la caractérisation de la plante malade s'est faite d'une manière visuelle au champ. Ainsi, la grande majorité des plantes malades rencontrées sur terrain sont atteintes d'anthracnoses (supérieures à 50%). Les symptômes d'anthracnose rencontrés se présentent sous forme de tâche noirâtre au niveau du limbe et de la tige et qui entraîne la mort de la plante (Photo 92 et 93). Les endroits où les cas d'Anthracnose ont été rencontrés sont à Brickaville (Lohariandava, Anivorano, Fandrasana), Antongobato, Ambohimiarina, Ilaka Est, Fénérive Est, Vavatenina, Ambohimahaso, Ikongo, Fianarantsoa, Manakara et Morondava.

On note que du côté de Brickaville, la maladie nommée localement « *vatanalina* » signalée par les paysans attaque la tige et entraîne la pourriture du tubercule des ignames cultivées, semble être le cas de l'anthracnose car selon les dires des paysans, elle est causée par un champignon dans le sol.

D'autre part, les symptômes viraux rencontrés sont rares (environ 10%) et apparaissent comme une tâche jaune sur la face supérieure du limbe, une distorsion du limbe suivi d'une modification de la forme des feuilles en lacet de chaussure ou sous forme rétracté (c'est « *la mosaïque* »), une dégradation de la couleur de la feuille qui est devenue jaunâtre (c'est « *la chlorose* ») qui se manifeste soit au niveau du limbe soit des nervures, et enfin la dessiccation de la feuille (c'est « *la nécrose* ») (Photo 95 et 96). Les plantes présentant ces symptômes viraux ont été rencontrées à Antongobato, Université d'Antananarivo et à Fianarantsoa.



Photo 92: Symptôme d'anthracnose sur *D. alata*



Photo 93 : Noircissement de la tige dû à l'anthracnose sur *D. alata*



Photo 94 : Feuilles en lacet de chaussure sur *D.alata*



Photo 95 : Chlorose sur *D. alata*

Dans tous les cas, seule l'espèce *D. alata* présentait des symptômes de maladie lors des explorations mais les autres espèces d'ignames cultivées n'en ont pas. Des petits animaux et insectes peuvent être des vecteurs de maladies ont été également vus sur terrain à savoir les sauterelles, les chenilles défoliatrices, les Chrysomèles tels que *Crioceris livida* et *Lema armata*, les escargots et enfin les cochenilles.

IV.2 Facteurs susceptibles de propager les virus à Madagascar

IV.2.1 Système de culture

A Madagascar le système de culture traditionnelle est un facteur qui permet l'expansion des maladies pour l'igname. Ce système cultural consiste à planter l'igname à partir de la tête du tubercule, sans tenir compte du fait qu'il provient d'une plante saine ou malade, au même endroit où on l'a déterré. Cette pratique se poursuit pendant plusieurs années successives et souvent sans apport d'engrais pour le sol et sans test viral et/ou fongique pour les semences. Ce système de culture réduit la fertilité du sol qui se répercute sur la susceptibilité de la plante aux différentes maladies telles que les viroses et l'anthracnose. En effet, plus le sol est pauvre moins la plante est vigoureuse et ne résiste pas aux différentes maladies.

IV.2.2 Promotion de la culture d'igname

Depuis 2006, la diffusion de la culture d'igname s'effectue rapidement grâce à l'appui des ONG. Pourtant, les semences utilisées proviennent de la collecte des tubercules auprès des paysans et elles n'ont aucun contrôle phytosanitaire. Ces tubercules peuvent être un porteur de

maladie virale ou fongique alors qu'ils vont être acheminés vers d'autres endroits où d'autres paysans les utilisent comme semences. Dans ce cas ces tubercules peuvent transmettre les maladies à d'autres ignames saines.

IV.2.3 Vente de tubercules-semences

Les tubercules vendus au bord de la route, au marché ou bien même collectés par des collecteurs pour être cultivés dans un autre endroit ne sont pas indemnes des virus ou de maladies car on ne connaît pas la source de ces semences ni l'état phytosanitaire de la plante avant le déterrage. Il se peut qu'ils présentent des symptômes de maladie lors de leur développement végétatif et qui sont invisible à l'œil nu au niveau du tubercule vendu. Ainsi, ce tubercule pourrait être une source de propagation des maladies vers un autre endroit.

IV.2.4 Vecteurs de virus

La transmission des virus peut se faire soit par le biais des activités humaines soit par les insectes vecteurs des virus.

- L'Homme peut transmettre des virus à une plante d'igname saine en se mettant en contact avec une plante infectée, d'une manière intentionnelle ou non, et puis manipuler ou toucher la plante saine tout de suite après. L'utilisation par les paysans d'un petit matériel «non propre» comme le couteau, par exemple, au moment de la préparation de la multiplication des semences en est un cas que nous avons rencontré sur terrain à part l'utilisation d'un tubercule-semence pas connu sur le plan phytosanitaire.

- La présence des cochenilles sur l'igname, observée chez les paysans, surtout pendant la période de stockage et des pucerons pendant la période de développement végétatif montre que les insectes vecteurs des virus existent et présentent un risque pour la propagation des virus (Photo 96).

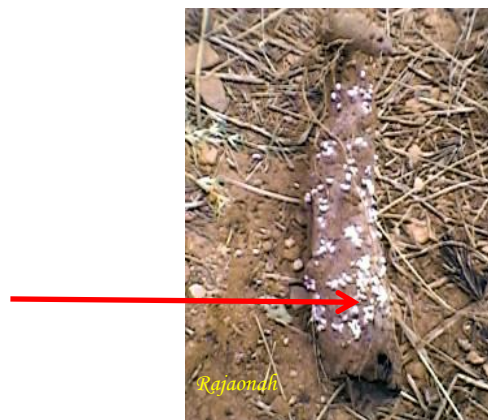


Photo 96 : Cochenille sur un tubercule de *D. alata*