

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	1
II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	3
II.1. Le manioc	3
II.2. La maladie de la mosaïque du manioc	4
II.3. Les virus responsables de la mosaïque du manioc	5
II.3.1. Structure du génome	5
II.3.2. Cycle viral	6
II.3.3. Classification des <i>Begomovirus</i>	7
II.3.4. L'évolution des génomes viraux	9
II.3.5. Répartition actuelle des CMGs	10
II.3.6. Effets de l'activité des CMGs au niveau de la plante	11
II.4. Le vecteur des begomovirus : l'aleurode <i>Bemisia tabaci</i>	11
II.5. Méthodes de détection des particules virales	12
II.6. Méthodes d'études de la phylogénie des virus	13
II.6.1. Le séquençage d'ADN	13
II.6.2. Introduction à la phylogénie	14
II.6.3. Les méthodes de distance	15
II.6.4. Evaluation des arbres phylogénétiques : le bootstrap	15
II.7. Les méthodes d'assainissement du matériel végétal	16
III. MATERIELS ET METHODES	18
III.1. Matériel végétal virosé	18
III.2. Extraction d'ADN et détection de l'ADN viral	19
III.2.1. Extraction d'ADN	19
III.2.2. Détection de l'ADN viral	19
III.2.3. Électrophorèse	22
III.3. Clonage	22
III.3.1. Préparation de l'insert	24
III.3.1.1. Amplification de l'ADN viral avec la polymérase Phi 29	24
III.3.1.2. Digestion Phi 29 par l'enzyme <i>Bam</i> HI	25

III.3.1.3. Purification de l'ADN	26
III.3.2. Ligation	27
III.3.3. Transformation	27
III.3.4. Tri des colonies blanches	28
III.4. Séquençage partiel ou complet des génomes viraux	29
III.4.1. Séquençage partiel	30
III.4.2. Séquençage complet	30
III.5. Analyse informatique des séquences obtenues	31
III.6. Application de la thermothérapie	31
III.6.1. Traitement des boutures à l'eau chaude	31
III.6.2. Culture sous serre	31
III.6.3. Suivi et évaluation des boutures	32
 IV. RESULTATS	33
IV.1. Diagnostic viral, séquençage partiel et répartition géographique des CMGs à Madagascar	33
IV.1.1. Séquençage partiel des produits PCR et diagnostic viral	33
IV.1.2. Etude phylogénétique des séquences obtenues	33
IV.1.3. Répartition géographique des CMGs à Madagascar	39
IV.2. La thermothérapie	39
IV.2.1. Evaluation de l'efficacité de la thermothérapie des boutures	39
IV.2.2. Caractérisation des virus présents dans les échantillons foliaires de la variété impliquée dans la thermothérapie	41
IV.2.2.1. Clonage et Séquençage complet du génome viral	41
IV.2.2.2. Analyse phylogénétique à partir des génomes complets	41
 V. DISCUSSION	45
 VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	50
 VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Structure du génome des begomovirus bipartites
- Figure 2:** Schéma résumant les principales étapes du cycle des géminivirus
- Figure 3:** Représentation schématique des zones de recombinaisons potentielles pour les composants A des *Cassava mosaic géminivirus*
- Figure 4 :** Schéma représentatif de la structure d'un arbre phylogénétique
- Figure 5 :** Schéma de la technique PCR
- Figure 6:** La position d'hybridation des amorces dégénérées sur la séquence d'ADN A viral à détecter
- Figure 7 :** Schéma montrant les bouts collants laissés par l'enzyme de restriction sur les brins d'ADN
- Figure 8 :** Représentation du vecteur pGem-3Zf+
- Figure 9 :** Schéma de l'amplification de l'ADN viral avec la polymérase Phi 29
- Figure 10 :** Représentation du séquençage avec les amorces M13F/R
- Figure 11 :** Schéma d'un électrophorégramme montrant l'alignement des nucléotides dans une séquence d'ADN viral
- Figure 12 :** Représentation du séquençage complet avec les amorces M13F/R et les amorces internes F/R.
- Figure 13:** La thermothérapie des boutures
- Figure 14 :** Arbre construit par la méthode du plus proche voisin indiquant les relations phylogénétiques entre les séquences d'ADN du corps de la Rep des CMGs
- Figure 15 :** Carte montrant la répartition géographique des CMGs à Madagascar
- Figure 16:** Histogramme montrant la relation entre le taux de plantules encore malades (%) et la sévérité du symptôme (échelle de Cours)
- Figure 17:** Histogramme montrant le taux de débourrement (%) avant la transplantation des plantules selon la classe des boutures
- Figure 18 :** Gel d'électrophorèse montrant les résultats de l'amplification de l'ADN viral des CMGs par PCR avec les amorces V537/C1345 et les amorces VD1863/C6D2391
- Figure 19 :** Gel d'électrophorèse des monomères d'ADN double brin viraux après digestion *Bam*HI de l'amplification en cercle roulant obtenue par TempliPhi
- Figure 20 :** Gel d'électrophorèse illustrant le tri des colonies blanches par PCR avec les amorces universelles M13F et M13R

Figure 21 : Arbre phylogénétique indiquant les relations phylogénétiques entre les séquences complètes des CMGs

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution des sept espèces africaines de CMGs et du variant Ougandais

Tableau 2 : Couple d'amorces utilisées pour l'amplification des fragments d'ADN viral contenus dans les feuilles de manioc

Tableau 3 : Descriptif des échantillons de feuilles de manioc virosées et diagnostic viral par similarité nucléotidique (BLASTn, NCBI) à partir des séquences partiels Rep

Tableau 4 : Résultats obtenus lors de l'application de la thermothérapie sur les boutures de la variété « Pemba »

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Echelle de la gravité du symptôme selon Cours G. (1951)

Annexe 2 : Les échantillons de feuilles de manioc virosées utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des begomovirus

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN viral: Kit DNEASY plant (Qiagen)

Annexe 4 : Kit templiphi

Annexe 5 : Protocole de purification d'ADN sur colonne : Kit GENECLEAN turbo

Annexe 6 : Protocole d'extraction plasmidique : QIA prep Spin Miniprep Kit

Annexe 7 : Préparation des milieux

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Un plant de manioc malade

Photo 2 : L'insecte vecteur *Bemisia tabaci*

Photo 3 : Plantules saines issues de la thermothérapie

Photo 4 : Plantules malades issues de la thermothérapie

GLOSSAIRE

ACMV-TZ : *African cassava mosaic virus*- Tanzania

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

Bactériophage : c'est un virus n'infectant que des bactéries.

BET : Bromure d'éthidium : c'est une molécule servant de marqueur fluorescent de l'ADN.

Biotype: type génétique

Bootstrap : c'est une technique d'inférence statistique basée sur une succession de rééchantillonnages.

Chlorose: manque de chlorophylle se traduisant par une pâleur de la coloration du feuillage

CMD : Cassava Mosaic Disease

CMG : Cassava Mosaic Geminivirus

Contig : c'est une séquence génomique continue et ordonnée générée par l'assemblage des séquences partielles qui se chevauchent.

ddNTPs : Didesoxynucléotides Triphosphates

EACMV-UG: *East African cassava mosaic virus*- Uganda

EACMV-TZ: *East African cassava mosaic virus*- Tanzania

Endonucléases : ce sont des nucléases, qui coupent au milieu de la chaîne d'un acide nucléique.

Espèces indigènes: espèces qui ont évoluées et qui continuent à exister à l'intérieur d'un écosystème original.

Exonucléases : ce sont des nucléases qui coupent aux extrémités de l'acide nucléique.

Hélicases : Les hélicases sont des protéines qui utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP ou du GTP pour catalyser l'ouverture d'acides nucléiques (ADN ou ARN) appariés sous forme double brins.

Hémolymphé : c'est l'équivalent du sang chez les Arthropodes.

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. C'est un réactif qui induit la transcription du gène codant pour la beta-galactosidase.

ICMV : *Indian cassava mosaic virus*

Mosaïque : ce terme décrit les symptômes caractérisés par une alternance de coloration de zones vert pâle ou vert foncé et de zones chlorotiques ou jaunâtres.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

PTGS (Post-Transcriptional Gene Silencing) : c'est un mécanisme naturel de défense des plantes contre les acides nucléiques invasifs tels que les génomes viraux. Il consiste à inactiver le mécanisme post-transcriptionnel pour inhiber la synthèse des protéines.

Phylogénie : c'est l'étude des relations de parenté entre les différentes espèces.

Phylogéographie : C'est l'étude de la parenté entre populations géographiques d'une même espèce.

SLCMV : *Sri Lankan cassava mosaic virus*

SYBR : révélateur fluorescent en PCR

Transactivation: c'est l'augmentation du taux de l'expression du gène déclenchée par des processus biologiques ou par des moyens artificiels.

Transition : c'est une mutation au cours de laquelle une base purique est remplacée par une autre base purique ou une base pyrimidique est remplacée par une autre base pyrimidique

Transversion : c'est une mutation au cours de laquelle une base purique est remplacée par une base pyrimidique ou vice versa.

T4 DNA ligase: c'est une enzyme codée par le bactériophage T4. Elle est capable de rabouter de façon covalente, en restaurant les liaisons phosphodiesters des extrémités de fragments de restriction à bords cohésifs ou à bords francs.

.

I. INTRODUCTION

La maladie de la mosaïque du manioc (CMD : *Cassava Mosaic Disease*) est une des préoccupations majeures des pays africaines qui cultivent et consomment principalement le manioc. Madagascar n'est pas exclu de cette situation puisque le manioc est une plante vivrière qui représente une denrée de réserve pour lutter contre la malnutrition. Aussi, il fait partie intégrante du régime alimentaire de la population paysanne malgache. Actuellement, cette maladie se répand dans toutes les régions de l'île avec une très forte incidence. L'effet néfaste le plus direct de la CMD est la diminution du rendement en tubercules. Le coût de la maladie de la mosaïque du manioc en Afrique est estimé à 1.9-2.7 milliards de dollars par an, avec un impact humain particulièrement important et la mise en place de coûteux programmes de réhabilitation de la culture (Legg et Fauquet, 2004). Cette maladie est due à une infection virale de la plante.

Les virus sont responsables de la plupart des maladies émergentes dans le monde animal et végétal. Les géminivirus et plus précisément les virus du genre begomovirus transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci* sont coupables de la grande majorité des épidémies virales actuellement dans le monde sur des cultures aussi essentielles que le manioc, le coton et la tomate. La présence de plusieurs espèces virales, les possibilités de recouvrement des aires de répartition de ces espèces virales et d'infections mixtes représentent un risque épidémiologique majeur pour la culture du manioc. En effet, cela permet les échanges de composants génomiques et la recombinaison qui jouent un rôle important dans la diversification de la population (Padidam *et al.*, 1999). Dans les années 1988, une épidémie très sévère de CMD s'est déclarée dans le nord-est de l'Ouganda, avec une progression permanente vers le sud et l'ouest du continent Africain. Les analyses moléculaires ont permis de mettre en évidence que la sévérité de la maladie était liée à deux paramètres majeurs : l'échange de matériel génétique par recombinaison entre les virus et les phénomènes de synergie liés à l'infection par plusieurs espèces virales. La recombinaison interspécifique est la stratégie qui contribue de façon significative à l'évolution des géminivirus. Elle a directement été impliquée dans de nombreuses épidémies à begomovirus avec l'émergence de variants sévères avec des propriétés biologiques nouvelles (Zhou *et al.*, 1997).

L’identification des espèces virales impliquées dans une maladie et l’étude de leur diversité dans une région particulière fournissent d’importantes et indispensables informations pour élaborer des stratégies de contrôle des maladies en général (Bull *et al.*, 2006). Des données sérologiques et moléculaires de diagnostic des agents pathogènes impliquées dans la CMD à Madagascar obtenues sur un échantillonnage réduit suggèrent la présence des trois principaux types de CMGs : l’ACMV (*African Cassava Mosaic Virus*), l’EACMV (*East African Cassava Mosaic Virus*) et le SACMV (*South African Cassava Mosaic Virus*) (Ranomenjanahary *et al.*, 2002). Face aux risques épidémiologiques encourus par la présence d’un complexe viral, le recensement global des populations virales présentes sur les cultures de manioc de Madagascar s’avère être étape indispensable. D’autre part, seul un inventaire complet de la pression parasitaire virale permettra d’initier avec clairvoyance des programmes de sélection et d’assainissement des variétés locales de manioc. Les principales approches qui ont été utilisés pour contrôler les maladies virales des plantes et la CMD en Afrique sont l’utilisation des plantes hôtes résistantes (Nichols, 1947 ; Jennings, 1957 ; Hahn *et al.*, 1980 ; Thresh *et al.*, 1998b), l’assainissement par la chaleur et la production de plantes issues de la culture *in vitro* des méristèmes (Thresh et Cooter, 2005). Néanmoins, il est important d’appliquer des méthodes qui soient simples, peu coûteuses et adaptées aux peu de moyens des cultivateurs concernés (Thresh et Cooter, 2005).

Le projet de recherche a eu pour objectifs de déterminer premièrement la diversité des agents pathogènes responsables de la CMD à Madagascar sur une large collection d’échantillons et deuxièmement d’étudier l’efficacité de la thermothérapie pour assainir les boutures virosées d’une variété locale de manioc, tout en caractérisant l’espèce virale incriminée. La première partie de ce mémoire est consacrée à la présentation des notions générales sur le manioc, la CMD et les géminivirus impliqués dans la maladie de la mosaïque du manioc (CMGs pour *Cassava mosaic geminiviruses*), et les techniques d’assainissement comme la thermothérapie notamment. Dans une deuxième partie les matériels et les méthodes utilisées seront détaillés. Enfin, les résultats obtenus seront présentés avant de les discuter et de finir par une conclusion et des perspectives de recherches.

II- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

II.1. Le manioc

Le manioc *Manihot esculenta* Crantz est un arbuste vivace appartenant à la famille des *Euphorbiaceae*. Il est cultivé surtout pour ses racines tubérisées riches en amidon. Cet arbrisseau pérenne de 2 à 5 mètres de hauteur se ramifie généralement par trichotomie (Massala, 1984). C'est une plante qui a une grande faculté d'adaptation au milieu. En effet, elle est cultivée depuis la zone soudano-sahélienne (500mm de pluie) jusqu'au cœur de la zone équatoriale (5000mm de pluie) (Massala, 1984). Il préfère cependant les sols légers, meubles, profonds, à pente faible et riches en humus et en matière minérale. Son implantation exige une température entre 25 à 30°C (Dostie *et al.*, 1999). Sa multiplication se fait majoritairement par bouturage.

Le manioc est une plante originaire d'Amérique du sud, en particulier du plateau des Guyanes (Jones, 1959). Elle a été importée par les navires Portugais du Brésil à l'île de La Réunion en 1736 puis en Afrique de l'Est par Madagascar et l'île de Zanzibar (Fauquet et Fargette, 1990). Il est parvenu dans la grande île avant 1790 (Raison, 1972). Sa culture se serait répandue sur le territoire de Madagascar au début du 20^{ème} siècle (Legg et Thresh, 2000).

Le manioc tient une place importante dans la vie des malgaches en tant que deuxième source calorique après le riz, avec une contribution moyenne d'environ 14% de la ration calorique annuelle (Dostie *et al.*, 1999). Ses racines tubérisées servent de substitut au riz lorsque les stocks alimentaires ménagers diminuent. Ses feuilles sont aussi consommées comme complément du riz, surtout dans les régions d'Imerina, d'Antandroy et de Betsimisaraka. La consommation de manioc la plus importante est observée chez les couches défavorisées de la population et dans la région du Sud où elle représente 27% des calories consommées (Dostie *et al.*, 1999). Il sert aussi de matière première pour le tapioca, la farine, l'emballage-colle, et le sirop de glucose.

La production annuelle mondiale de manioc est estimée à 200 millions de tonnes par an (FAO, 2006). Toutefois, la production de manioc demeure très faible à Madagascar, à raison de 2,4 millions de tonnes par an (FAO, 2007). Le pays se trouve au quinzième rang parmi les pays producteurs de manioc selon le classement de la FAO.

En Afrique et à Madagascar, comme la culture de manioc représente une des principales sources alimentaires, les pertes de rendement liées à des maladies provoquent des effets considérables pour la population. Depuis ces vingt dernières années, la maladie qui affecte le plus sévèrement la culture du manioc en Afrique et à Madagascar est « la maladie de la mosaïque du manioc ». Cette maladie provoque des pertes de rendement considérables et les symptômes de cette maladie ont été décrits dans toutes les régions de Madagascar.

II.2. La maladie de la mosaïque du manioc

La mosaïque du manioc ou CMD (pour *Cassava Mosaic Disease*) est une maladie virale due à l'infection par des begomovirus. Elle se manifeste principalement par l'apparition de symptômes de mosaïques sur les feuilles, accompagnés ou non de déformations et de nanismes foliaires, qui peuvent varier selon la gravité de la maladie. Pour estimer l'ampleur de la maladie, l'échelle de Cours est généralement utilisée (Cours, 1951). Elle consiste à une évaluation visuelle de l'intensité des symptômes en notant de 0 pour une plante sans symptômes, jusqu'à 5 pour une plante ayant des feuilles réduites aux nervures (Cours, 1951) (annexe1). L'incidence de la maladie correspond au nombre de plantes malades au sein d'une parcelle ou au nombre de plantes malades sur une unité de surface pendant une période donnée (OECD Publishing, 1999). L'incidence est généralement le rapport entre le nombre de plantes malades et le nombre total des plantes dans un champ donné. Elle est évaluée en pourcentage.

L'importance de la CMD a été reportée à Madagascar pour la première fois dans les années 1932 (François, 1937) et notamment lors des épidémies sévères des années 1930s et 1940s (Cours *et al.*, 1951 ; Legg et Thresh, 2000). Avant les années 1930s, la CMD était considérée comme une maladie relativement peu importante (Legg et Thresh, 2000), mais la

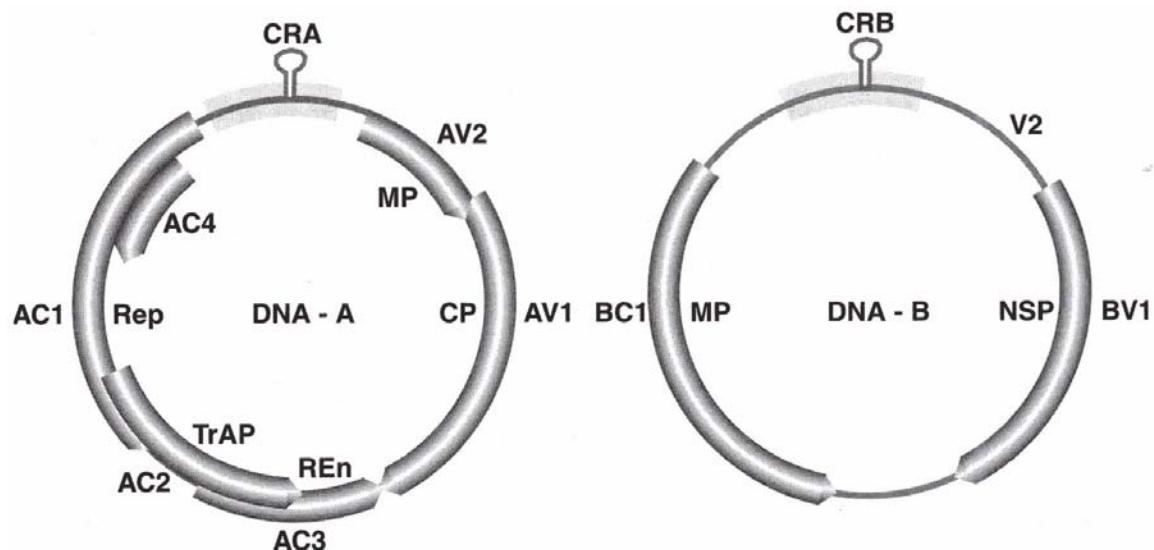


Figure1: Structure du génome des begomovirus bipartites d'après Van Regenmortel *et al.*, 2000.

ORFs (Open Reading Frames : cadres ouverts de lecture): **AV1** (protéine de capside CP), **AV2**, **AC1** (protéine de réplication Rep), **AC2** (protéine activatrice de la transcription TrAP), **AC3** (protéine activatrice de la réplication REn), **AC4**, **BC1** (protéine de mouvement MP), **BV1** (protéine de transport noyau-cytoplasme NSP).

CRA/CRB : régions communes entre les molécules A et B

situation a changé à partir de 1934 lorsqu'une épidémie sévère originaire de la partie nord-est des Hauts Plateaux s'est propagée et a affecté la plupart des zones de culture du manioc du pays (Cours, 1951). Une augmentation de la gravité des symptômes de la CMD a été décrite allant jusqu'à l'arrêt de la croissance des plantes et l'abscission des feuilles pour les cultivars les plus sensibles. Les pertes de rendement ont été particulièrement fortes dans les régions côtières de basse altitude (Legg et Thresh, 2000). Actuellement, presque tous les champs de manioc de toutes les régions du pays sont atteints par la CMD.

II.3. Les virus responsables de la mosaïque du manioc

Les CMGs (*Cassava mosaic viruses*) font partie de la famille des *Geminiviridae* genre *Begomovirus*. Cette famille comprend 3 autres genres: les *Mastrevirus*, les *Topocuvirus* et les *Curtovirus*. La grande majorité des begomovirus comporte un génome bipartite avec deux composants génomiques (A et B). Cependant il existe des begomovirus ne contenant qu'un seul composant génomique, tel que les *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCVs) et les *Tomato Leaf Curl Virus* (ToLCVs).

II.3.1. Structure du génome

Les géminivirus sont des virus à ADN simple brin circulaire de taille de l'ordre de 2,5 à 3 kilobases (kb). Leur capacité de codage est assez élevée par rapport à la taille de leur génome, grâce au chevauchement des cadres ouverts de lecture (Open Reading Frames: ORFs), et à la présence de promoteurs bidirectionnels. Ces promoteurs sont capables de contrôler l'expression des gènes portés par le brin viral sens positif (V_α) et du brin complémentaire (C_α) en orientation inverse. Les deux séries de gènes sont séparées par une région intergénique (IR: Intergenic Region) qui contient les promoteurs de la transcription et toutes les séquences nécessaires à la réPLICATION (figure1).

Ces ORFs correspondent aux séquences d'ADN qui sont transcrrites en ARN messager. Les protéines produites sont la protéine de capsidé CP (ORF AV1) responsable de l'encapsidation et qui semble être aussi impliquée dans le mouvement, la protéine de réPLICATION Rep (ORF AC1), la protéine activatrice de la transcription TrAP (ORF AC2), et la protéine Ren

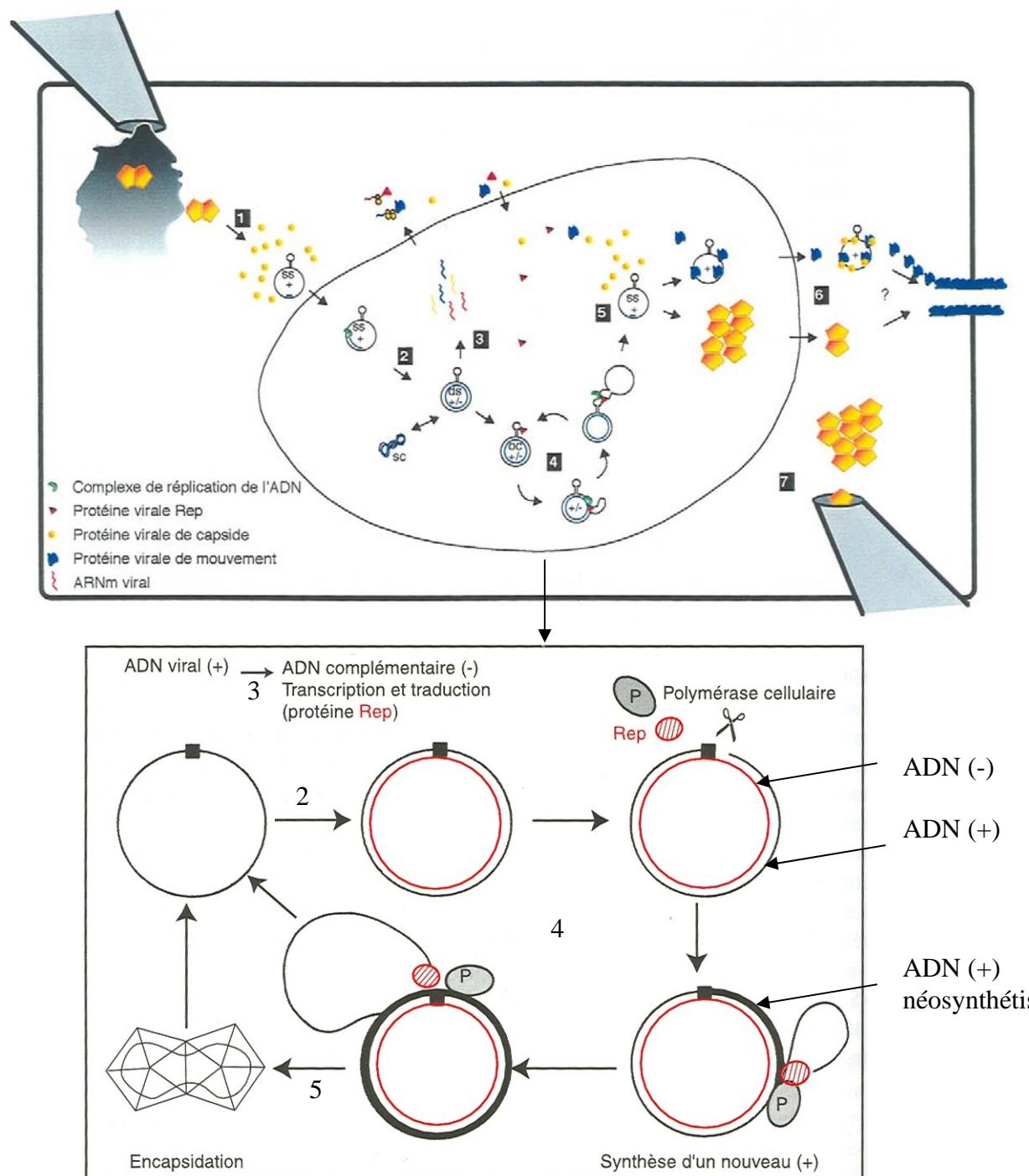


Figure 2: Schéma résumant les principales étapes du cycle des géminivirus, d'après Bisaro (1996), Bigarré (1999) et Astier *et al.* (2001). **1.** Entrée du virus dans la cellule avec la salive de l'insecte, décapsidation et entrée dans le noyau; **2.** Synthèse à partir d'une amorce virale d'un ADN double brin (+/-), matrice de la transcription des ARNm et de la formation des brins génomiques (+); **3.** Transcription des ARNm du virus et traduction des protéines virales; **4.** Formation des brins (+) suivant le mécanisme en cercle roulant. **5.** Encapsidation de l'ADN génomique. **6.** Acquisition des virions par l'insecte.

activatrice de la réPLICATION (ORF AC3). La protéine produite par l'ORF AC4 semble être un déterminant majeur de l'expression des symptômes, et un suppresseur du PTGS (Post Transcriptionnal Gene Silencing). La protéine produite par l'ORF BC1 est impliquée dans le mouvement de cellule à cellule de l'ADN viral, et celle de l'ORF BV1 dans le transport de l'ADN viral du noyau vers le cytoplasme à travers la membrane nucléaire. Par contre, le rôle de l'ORF AV2 est encore indéterminé chez les géminivirus bipartites.

II.3.2. Cycle viral

Les géminivirus multiplient et accumulent leur composants génomiques dans le noyau des cellules végétales, car celui-ci est le seul compartiment cellulaire qui contient les facteurs (protéines et voies de synthèse) nécessaires à la réPLICATION de l'ADN (figure 2). En conditions naturelles, les particules virales des begomovirus sont transmises lors de l'alimentation de *Bemisia tabaci* virulifère et plus précisément lors des étapes de salivation dans le phloème des plantes. Seule la protéine de capsidé serait impliquée dans la reconnaissance moléculaire du virus par son vecteur. Quant au composant de l'ADN B, il contribue à l'efficacité de la transmission en déterminant une répartition du virus dans la plante qui facilite son acquisition par le vecteur. Ces virus sont internalisés après ingestion et ne sont pas perdus au cours des mues ; ils traversent plusieurs membranes cellulaires : celles de l'épithélium intestinal, pour se retrouver dans l'hémolymphé de l'insecte, et celle des glandes salivaires qui permet leur évacuation par salivation dans une nouvelle plante (Liu et al., 1997).

L'ADN simple brin est alors décapsidé et importé dans le noyau, où des molécules d'ADN double brin vont être produites : certaines serviront de matrice pour la transcription des gènes viraux, et d'autres pour la production de copies d'ADN simple brin. Les gènes du brin complémentaire sont vraisemblablement transcrits en premier car ils sont indispensables à la réPLICATION. La protéine Rep initie la réPLICATION en cercle roulant. Elle régule également la synthèse des brins (+) ou brins viraux à partir de la matrice double brin. De plus, elle reconnaît le composant B car les mêmes motifs de fixation sont présents dans la région intergénique et dans le composant A.

Le modèle de réPLICATION en cercle roulant est celui des bactériophages à ADN simple brin (Saunders, Lucy, and Stanley 1991) (figure 2):

- L'un des deux brins est clivé au niveau de la région commune : la conformation obtenue est dite ouverte circulaire.
- La protéine Rep aurait alors (non prouvé) une activité hélicase et elle serait ainsi capable de séparer les brins (+) et (-). Cela permet donc l'elongation du brin (+) en cours de synthèse.
- Après la synthèse complète du nouveau brin, la réplicase libère l'extrémité 5' du brin néoformé et la lie avec l'extrémité 3' en libérant la molécule complète simple brin.

L'encapsidation des formes virales ADN simple brin se fait dans le noyau. La protéine BV1 assurerait le passage de l'ADN viral simple brin du noyau vers le cytoplasme. Une fois le complexe ADN-BV1 transloqué dans le cytoplasme, il serait pris en charge par la protéine BC1 puis dirigé vers les plasmodesmes (Bigarré 1999).

II.3.3. Classification des *Begomovirus*

Historiquement les virus ont été classés en fonction de leurs propriétés biologiques, comme leur gamme d'hôtes, les symptômes engendrés, leurs insectes vecteurs, et les propriétés biophysiques, biochimiques et structurales de leur génome et de leur particule. Avec l'introduction de la microscopie électronique dans les années 50, les virus ont pu être classés en fonction de leur structure. Cependant, le développement du séquençage d'ADN initié dans les années 70 a permis de révolutionner les concepts de taxonomie. Actuellement, entre 35 et 70 nouveaux *Begomovirus* sont découverts chaque année, et les bases de données contiennent déjà plus de 300 séquences partielles. Depuis la création en 1966 du Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV), la taxonomie des virus est devenue de plus en plus complexe, mais les niveaux taxonomiques tels que le genre et la famille ont tout de même été conservés (Fauquet *et al.* 2003).

Il est fréquemment admis que les séquences nucléotidiques peuvent être utilisées comme un outil simple et performant pour identifier les liens de parenté et établir une taxonomie (Padidam, Beachy, and Fauquet 1995). Ainsi, la taxonomie des begomovirus est

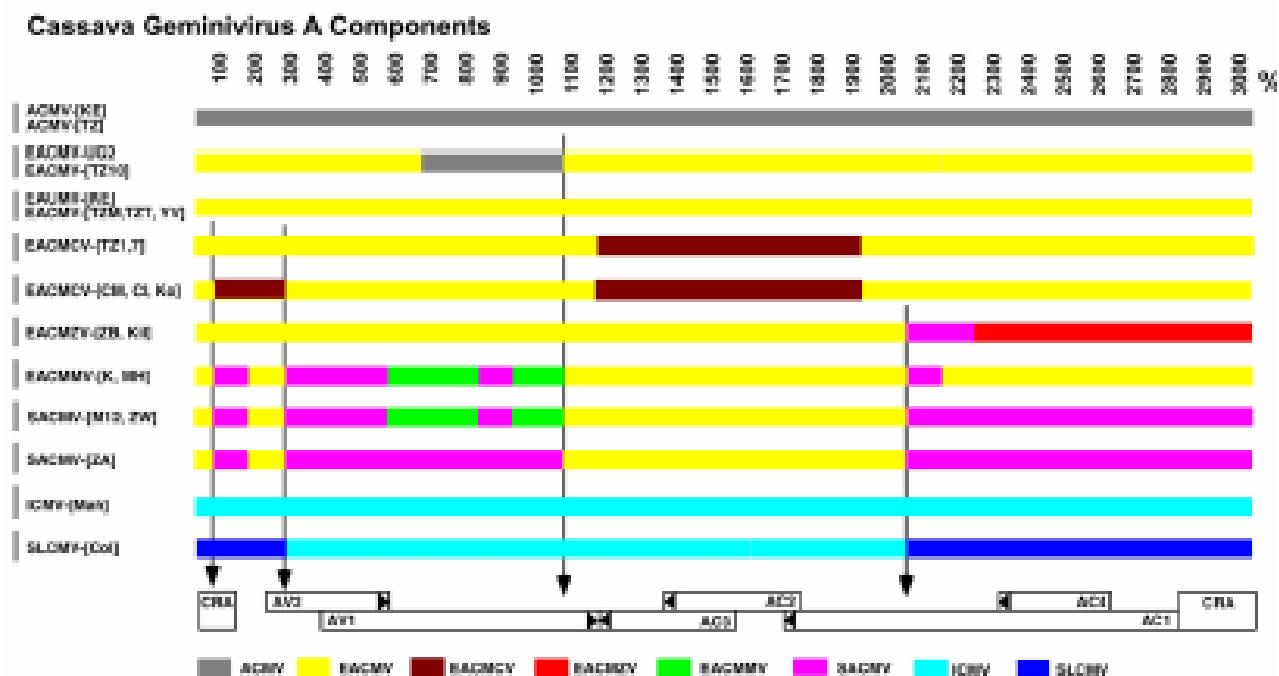


Figure 3: Représentation schématique des zones de recombinaisons potentielles pour les composants A des *Cassava mosaic géminivirus* d'après Ndunguru *et al.*, 2005. Chaque ligne horizontale représente le génotype d'un isolat et chaque barre colorée représente l'origine éventuelle des fragments recombinants potentiels. La taille des génomes est indiquée au dessus de chaque diagramme et l'organisation du génome est décrite en dessous, et les noms abrégés de chaque virus sont indiqués sur la gauche. Les flèches horizontales indiquent les hot spots de recombinaison probables.

basée sur les pourcentages d'identité nucléotidique de leur ADN A. Le seuil de démarcation taxonomique actuellement admis par l'ICTV pour les begomovirus est que deux espèces sont considérées comme distinctes si les séquences nucléotidiques complètes de leur ADN A présentent moins de 89% d'identité (Fauquet *et al.*, 2008).

Cependant, les études phylogénétiques de ces dernières années ont montré que les begomovirus sont le fruit de nombreux événements de recombinaison qui ne sont pas distribués aléatoirement sur le génome des virus et qui rendent difficile l'estimation des liens de parenté entre les séquences nucléotiques virales (Padidam, Sawyer, and Fauquet, 1999 ; Lefeuvre *et al.*, 2007) (Conférer paragraphe suivant). Pour cette raison, force est de constater que les séquences nucléotidiques représentent un critère nécessaire, mais insuffisant pour établir une taxonomie définitive. Afin d'améliorer la détermination taxonomique des begomovirus, l'ICTV a mis au point un protocole permettant d'établir un statut pour chaque isolat, sur la base de nombreux caractères moléculaires et biologiques: nombre de composants génomiques, organisation du génome, pourcentage d'identité nucléotidique du composant A, caractéristiques nucléotidiques de la protéine de capsid, gamme d'hôtes naturelle, et symptomatologie.

Malgré l'importance de la recombinaison et des biais qu'elle peut générer dans la description de la diversité et la reconstruction des liens phylogénétiques, il est communément admis que la réalisation d'une étude de diversité taxonomique provisoire des begomovirus peut être effectuée grâce à l'analyse de séquences nucléotidiques partielles de certaine portion du génome des begomovirus. La région centrale de l'ORF de la CP qui est extrêmement conservée chez tous les begomovirus et peu sujette à la recombinaison (*cold spot*) a été largement utilisée (Brown *et al.*, 2001 ; Lefeuvre *et al.*, 2007). Néanmoins, ce travail préliminaire de caractérisation de la diversité des begomovirus impliqués dans la mosaïque du manioc à Madagascar a porté sur une portion de l'ORF AC1 (protéine associée à la réplication ou Rep). La particularité de cet ORF, c'est qu'il est à cheval sur un *hot spot* de recombinaison et qu'il décrit en grande partie la diversité taxonomique actuelle des CMGs (Figure 3).

II.3.4. L'évolution des génomes viraux

Les génomes des virus sont soumis à des variations continues générant une diversité génétique. Les mécanismes de création de variants sont les mutations ponctuelles par insertion, délétion ou substitution de nucléotides, les recombinaisons, et les pseudorecombinaisons (échange de certaines molécules d'ADN ou d'ARN pour les virus à génome segmenté) (Bigarré 1999).

La recombinaison entre virus semble être la principale force évolutive des géminivirus (Legg and Fauquet, 2004). En effet, les virus responsables de l'épidémie de CMD qui a débutée dans les années 90 en Ouganda serait le résultat de la recombinaison entre deux espèces différentes : l'*East African Cassava Mosaic Virus* (EACMV) et l'*African Cassava Mosaic Virus* (ACMV). Ce variant nommé variant ougandais a donc été associé à la forme sévère de la maladie (Zhou *et al.* 1997).

L'étude de recombinaison réalisée par Ndunguru *et al.* en 2005 a permis de montrer que les composants génomiques A et B des CMGs actuels sont des mosaïques d'ADN recombinant (Figure 3). Cependant, certaines régions présentent une plus grande capacité à échanger du matériel génétique que d'autres. Ces régions sont appelées points chauds ou "*hot spots*" de recombinaison. D'autres régions sont au contraire moins propices à la recombinaison et sont appelées points froids ou « *cold spots* » de recombinaison. Chez les CMGs, ces points chauds seraient situés en amont et en aval de l'ORF de la protéine de capsid (AV1), à l'extrémité C-terminale de l'ORF de la protéine de réplication (AC1) et sur la région intergénique (IR) du composant A. Etant donné le faible nombre de séquences connues du composant B, il est plus difficile de déterminer ces régions, mais il semble qu'elles soient aussi présentes. L'existence des "*hot spots*" de recombinaison pourrait provenir de contraintes aussi bien physiques que fonctionnelles de l'ADN viral et des protéines virales (Lefevre *et al.* 2007).

II.3.5. Répartition actuelle des CMGs

A l'heure actuelle, deux espèces asiatiques (*Indian cassava mosaic virus* et *Sri Lankan cassava mosaic virus*) et sept espèces africaines ont été identifiées (Tableau 1).

Tableau 1 : Distribution des sept espèces africaines de CMGs et du variant Ougandais d'après Legg et Tresh (2000), Berry et Rey (2001), Jones (2003), Ndunguru *et al.* (2005).

Virus	Distribution
<i>African Cassava Mosaic Virus</i> (ACMV)	Senegal, Côte d'Ivoire, Ghana, Nigeria, Cameroun, Gabon, Congo, Tchad, Ouganda, Burundi, Kenya, Tanzanie, Mozambique, Madagascar.
<i>East African Cassava Mosaic Cameroon Virus</i> (EACMCV)	Côte d'Ivoire, Ghana, Nigeria, Cameroun, Tanzanie, Mozambique.
<i>East African Cassava Mosaic Malawi Virus</i> (EACMMV)	Malawi, Mozambique.
<i>East African Cassava Mosaic Virus</i> (EACMV)	Gabon, Congo, République Démocratique du Congo (RDC), Kenya, Tanzanie, Zambie, Malawi, Zimbabwe, Mozambique, Madagascar.
<i>East African Cassava Mosaic Virus</i> , variant ougandais (EACMV-UG2Svr)	Ouganda, RDC, Kenya, Rwanda, Soudan, Tanzanie, Burkina Faso, Afrique du Sud, Mozambique.
<i>East African Cassava Mosaic Zanzibar Virus</i> (EACMZV)	Zanzibar, Kenya.
<i>East African Cassava Mosaic Kenya Virus</i> (EACMKV)	Kenya
<i>South African Cassava Mosaic Virus</i> (SACMV)	Afrique du Sud, Zimbabwe, Madagascar.

La répartition actuelle des différents groupes reflèterait l'histoire de l'introduction du manioc dans l'Ancien Monde (Swanson and Harrison, 1994; Fauquet and Fargette, 1990) :

- Au 16-17ème siècle sur la côte ouest africaine, point de départ pour la dispersion du manioc vers l'intérieur du continent.

- Au début du 18^{ème} siècle, autour du Cap de Bonne Espérance, puis en Afrique de l'Est par l'île de La Réunion en 1736, Madagascar et l'île de Zanzibar (Fauquet and Fargette, 1990).
- Puis plus tard vers l'Inde et le Sri Lanka via Maurice ou La Réunion.

II.3.6. Effets de l'activité des CMGs au niveau de la plante

Les virus provoquent le développement anormal de la plante en détournant ses substances organiques synthétisées. En effet, les faisceaux criblovasculaires sont réduits en taille et leur différentiation est perturbée (Chant et Beck, 1959; Dubern, 1976). En plus, son activité a un effet sur les fonctions chloroplastiques et métaboliques des cellules. Cela entraîne un dérèglement général de la plante malade, avec une diminution des métabolites essentiels comme le carbone et l'azote (Beck & Chant, 1958; Chant *et al.*, 1971). Evidemment, toute perturbation de l'activité photosynthétique entraîne des effets néfastes sur la capacité productive de la plante et donc sur le rendement. Aussi, les virus provoquent des modifications de structures chez la plante notamment sur les feuilles et sur le port de la plante.

II.4. Le vecteur des begomovirus : l'aleurode *Bemisia tabaci*

Les begomovirus sont transmis naturellement par l'insecte vecteur *Bemisia tabaci* (*Aleyrodidae*) qui est une mouche blanche, mais aussi artificiellement par l'utilisation des boutures ou par des greffes virosées. La transmission de virus s'effectue au moment où l'insecte se nourrit de sève en émettant son stylet (Corbaz R., 1990). *B. tabaci* a été décrit pour la première fois en 1889 par Gennadius et reporté pour la première fois comme une peste en 1919 en Inde (Husain et Trehan, 1933). Approximativement 60 géminivirus différents ont été reportés comme transmis par ce vecteur (Markam *et al.*, 1994). Dans les années 1930s, la première transmission de geminivirus par la mouche blanche a été démontrée chez le tabac et chez le manioc (ACMV) (Storey et Nichols, 1938).

Des populations de *B. tabaci* morphologiquement difficiles à distinguer et manifestant des traits biologiques différents comme la gamme de plante hôte, ont été décrites et sont considérées comme des biotypes (Bird et Maramorosch, 1978). Les études effectuées par

Delatte *et al.*, en 2005 ont montré la présence d'un biotype Ms indigène des îles du Sud Ouest de l'Océan Indien. Ce biotype a été détecté à Maurice, aux Seychelles et à Madagascar. Il fait partie d'un groupe génotypique nommé « groupe de Méditerranée/Péninsule d'Arabie/Afrique » qui contient deux autres biotypes nommés Q et B. Mais pour les raisons qui suivent, il peut être considéré comme un nouveau biotype : (i) le type génétique Ms a été détecté dans une région géographique spécifique et isolé du monde, (ii) la distance génétique entre Ms et les deux autres biotypes B et Q est plus grande que la distance génétique entre B et Q, (iii) Ms provoque des symptômes différents de ceux de B et Q.

II.5. Méthodes de détection des particules virales

Pour détecter la présence des virus dans les plantes, plusieurs méthodes peuvent être utilisées: les tests sérologiques avec des anticorps polyclonaux ou monoclonaux (Mabs), les tests d'hybridation ADN – ADN et le séquençage des acides nucléiques viraux (Astier S. *et al.*, 2001).

Les tests sérologiques permettent de détecter la présence d'une protéine virale ou très généralement la protéine capsidiale (Astier S. *et al.*, 2001). Le test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Dans la technique de dosage dite "en sandwich", un « anticorps de capture » se lie spécifiquement à l'antigène recherché. Un deuxième anticorps dit « anticorps traceur » se lie à l'antigène capturé. L'anticorps traceur est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. La réaction peut ainsi être quantifiée par colorimétrie à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des concentrations connues d'antigène, puisque le nombre de molécules d'anticorps traceur fixées dépend du nombre de molécules d'antigène immobilisées par l'anticorps de capture. Néanmoins, ces anticorps possèdent un faible pouvoir discriminant.

Les tests d'hybridation des acides nucléiques permettent de détecter n'importe quelle région du génome viral. Le principe est basé sur la formation d'une molécule d'acide nucléique double brin (duplex ou hybride) obtenue par hybridation entre une molécule cible représentée par un fragment de la séquence du génome viral et la sonde constituée par un

acide nucléique complémentaire de cette séquence. La révélation de l'hybridation est faite par le marquage de la sonde : elle est dite «chaude» lorsque le marqueur correspond à un isotope radioactif (^{32}P par exemple) et «froide» lorsqu'il s'agit d'une enzyme luminescente. La sensibilité de la sonde est plus grande par rapport à celle des anticorps monoclonaux du test ELISA. Toutefois, elle est moins grande par rapport à celle des techniques d'amplification moléculaire comme la PCR.

Par conséquent, l'analyse de la diversité génétique par la technique d'amplification, de clonage et de séquençage, ou de séquençage direct permet de réaliser une caractérisation moléculaire exhaustive des agents pathogènes impliqués dans les maladies virales des plantes comme la CMD.

II.6. Méthodes d'études de la phylogénie des virus

II.6.1. Le séquençage d'ADN

La phylogénie des virus est basée sur les différences de séquence nucléotidique ou protéique établie par séquençage ou profil de restriction.

Le séquençage d'ADN est basé sur l'utilisation de didésoxyribonucléotides (ddNTPs) (méthode de Sanger), qui inhibent les réactions de polymérisation. L'ADN à séquencer est polymérisé avec des dNTPs en grand nombre, et une faible proportion de didésoxyribonucléotides. De façon aléatoire, un ddNTP sera ajouté à la chaîne polynucléotidique en cours de synthèse, stoppant ainsi l'elongation. On répète la même opération pour chaque dNTP.

Tous les fragments obtenus sont migrés sur gel, afin de les séparer selon leur taille. Pour lire les quatre nucléotides de l'ADN, les fragments issus des quatre mélanges réactionnels (avec ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) sont migrés séparément. Chaque ligne du gel correspondra à l'emplacement d'un nucléotide de la séquence d'ADN. La très grande majorité des séquences réalisées et publiées aujourd'hui sont réalisées sur des séquenceurs automatiques, qui sont plus rapides, plus puissants et moins chers que la méthode manuelle.

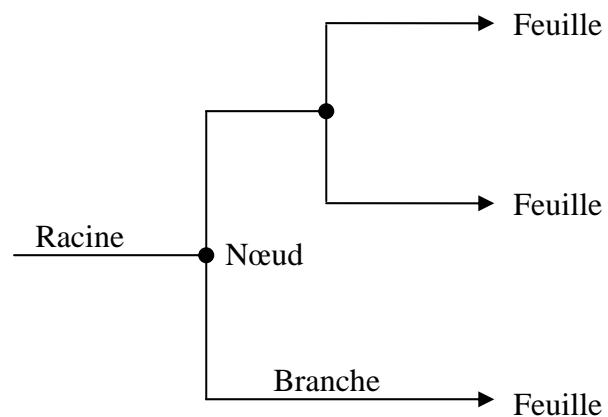


Figure 4: Schéma représentatif de la structure d'un arbre phylogénétique.
Chaque feuille représente une unité évolutive.

II.6.2. Introduction à la phylogénie

Zuckerland et Pauling ont formulé en 1962 la théorie de l'horloge moléculaire : "Les mutations dans le génome d'organismes différents sont du même ordre de grandeur dans des régions homologues et s'accumulent en fonction du temps". Basée sur cette théorie, la phylogénie moléculaire a pour objectif la reconstruction de l'histoire évolutive des espèces par comparaison des séquences de leurs gènes ou de leurs protéines.

Une phylogénie renseigne sur l'histoire des unités évolutives décrites et doit donc présenter une racine, point de départ de l'évolution et un sens de lecture de l'arbre (Darlu and Tassy, 1993). Les arbres comprennent des sommets internes ou noeuds et des sommets externes, ou feuilles. La relation entre deux sommets est appelée lien ou branche (Figure 4).

En virologie, le sens d'un processus éolutif permettant d'établir l'antériorité d'une séquence par rapport à une autre n'est pas toujours connu. Des arbres sans racines, où l'élément le plus extérieur au groupe (virus génétiquement éloigné) remplace la racine sont alors tracés. Deux grands types de méthodes ont été développés pour permettre de reconstruire des arbres phylogénétiques :

- des méthodes phénétiques basées sur les mesures de distances entre séquences prises 2 à 2 (soit le nombre de substitutions de nucléotides ou d'acide aminé entre ces 2 séquences),
- des méthodes cladistiques (*parcimonie* et *probabiliste*) basées sur les caractères qui s'intéressent aux nombres de mutations (substitution, insertion, ou délétion) qui affectent chacune des positions de la séquence.

II.6.3. Les méthodes de distance

La méthode du plus proche voisin ou *Neighbor Joining* développée par Saitou et Nei (1987) est la plus couramment utilisée. Elle autorise un taux de mutation différent sur les branches de l'arbre. L'alignement des séquences prises 2 à 2 permet de construire une matrice de distance génétique, qui représente la divergence moyenne de chacune des séquences avec les autres. L'arbre phylogénétique est alors construit en reliant les séquences les plus proches.

Le simple comptage des différences entre deux séquences n'est pas le reflet exact de la réalité mais sous-estime le nombre d'événements mutationnels. La convergence évolutive (la convergence est la présence chez deux espèces, de caractères analogues, d'une même adaptation, mais qui n'a pas été hérité d'un ancêtre commun. Elle résulte de deux évolutions indépendantes dans un même type d'environnement) et la réversion évolutive (c'est le retour au caractère ancestral par mutation inverse) communément appelées homoplasies sont le plus souvent cachées à l'observation. Ce biais est corrigé en faisant des hypothèses sur la façon dont les bases ou acides aminés se sont substitués à un locus donné.

La correction de Jukes et Cantor (1969) est une des plus fréquemment trouvée dans les logiciels de phylogénie. Elle fait l'hypothèse que les 4 bases ont les mêmes fréquences et que les substitutions sont équiprobables (la probabilité de transition est égale à la probabilité de transversion).

II.6.4. Evaluation des arbres phylogénétiques : le bootstrap

Quand l'arbre est obtenu, il faut ensuite évaluer la confiance que l'on peut avoir dans cet arbre. Pour cela plusieurs méthodes sont disponibles. La méthode du bootstrap est la plus souvent utilisée pour tester la fiabilité des branches internes. Le bootstrap consiste à effectuer un tirage des sites au hasard avec remise, donc dans chaque réplication de bootstrap, certains sites peuvent être présents plusieurs fois, tandis que les autres peuvent être absents. Chaque réplication produit un nouvel alignement "artificiel" qui est utilisé pour construire un arbre "artificiel". Pour chaque branche interne, le pourcentage des arbres "artificiels" contenant

cette branche est calculé. Généralement, les branches définies par une valeur de bootstrap inférieure à 95% sont considérées comme fiables. Il faut 1000 réplications de bootstrap pour que cette méthode soit statistiquement valable.

II.7. Les méthodes d'assainissement du matériel végétal

Constatant l'émergence des CMGs dans les cultures de manioc à Madagascar, l'essai d'une technique d'assainissement doit être appliquée rapidement pour prévenir les épidémies qui pourront en résulter. L'élimination des virus se fait essentiellement par culture de méristème et/ou par thermothérapie. La culture de méristème consiste à prélever des méristèmes et à les cultiver *in vitro*. En principe, comme le méristème est indemne de virus, sa culture en milieu aseptique permet d'obtenir des plants indemnes de virus. En outre, la thermothérapie est par définition, la thérapie par la chaleur. Cette technique est généralement utilisée pour les plantes à multiplication végétative. Elle consiste à appliquer une température létale pour le virus mais qui ne l'est pas pour la plante hôte. Aussi, la température peut induire des vitesses différentes de croissance entre l'hôte et le parasite (Rapilly, 1994). L'efficacité des traitements par thermothérapie semble liée à une importante réduction voire à un arrêt complet de la multiplication virale aux températures avoisinant 40°C (Dawson, 1976). Ces effets seraient liés entre autres à une déstabilisation des particules virales et à l'inactivation de la replicase virale (Mink *et al.*, 1997). La thermothérapie a pour but :

- d'obtenir des boutures saines en grande quantité,
- d'essayer une méthode de lutte contre la maladie,
- de déterminer ses effets sur la physiologie de la plante,
- d'améliorer le rendement de culture.

L'utilisation des températures élevées s'est développée depuis le travail de Kunkel en 1935 qui cherchait à éliminer chez le pêcher des maladies bactériennes (Astier S. *et al.*, 2001). La thermothérapie a été initiée à Madagascar en 1992 par Ranomenjanahary. Ensuite, les études effectuées par Vohizy (2001) ont montré que la thermothérapie appliquée avant la plantation stimule le débourrement de boutures, et qu'elle entraîne généralement l'augmentation du diamètre des tiges et du collet, ce qui implique (1) un accroissement du

volume cellulaire du bois et des vaisseaux au niveau de la tige et du collet, (2) une augmentation de la capacité d'assimilation des sèves et enfin (3) un meilleur développement des organes.

III- MATERIELS ET METHODES

L'étude de la diversité génétique des bégomovirus impliqués dans la maladie de la mosaïque du manioc a été effectuée à partir de 104 échantillons foliaires de manioc présentant des symptômes de CMD, prélevés principalement sur les hauts plateaux de Madagascar et la région de Tamatave entre 2005 et 2006 (Annexe 2).

L'efficacité de la thermothérapie comme moyen d'assainissement des cultivars de manioc virosés a été testée sur une variété malgache de manioc nommée « Pemba ». Cette étude est associée au diagnostic du virus impliqué dans la CMD par le clonage et le séquençage du génome viral complet.

III.1. Matériel végétal virosé

A partir des échantillons de feuilles de manioc prélevés sur le terrain, déshydratés et conservés avec du chlorure de calcium anhydre (Bos, 1977), l'ADN total de 104 échantillons a été extrait afin d'étudier la diversité des CMGs malgaches (III.2.1. Extraction d'ADN).

La thermothérapie a été réalisée sur 139 boutures de la variété «Pemba» virosée, issues du champ d'expérimentation du FOFIFA. Le choix des plantes mères a été basé sur le degré d'infection des plantes. En effet, les boutures choisies ont été prélevées sur des plants de manioc présentant des symptômes sévères de CMD de degré 4 selon l'échelle de Cours (Annexe 1). L'incidence de la maladie constatée sur cette variété avoisine les 100% et toutes les plantes présentent des symptômes. Les boutures ont été groupées en trois classes :

- classe 1: boutures aoûtées ayant 4 à 5 nœuds (extrémité basale),
- classe 2: boutures semi aoûtées ayant 6 à 8 nœuds,
- classe 3: boutures jeunes ayant 9 à 12 nœuds (extrémité apicale).

Afin de déterminer le ou les virus incriminés dans les symptômes de CMD de la variété Pemba, 6 échantillons foliaires ont été utilisés : trois provenant des quatre pieds mères à partir desquels ont été obtenues les 139 boutures et trois autres des plants de manioc ayant subi la thermothérapie mais ayant développé des symptômes de CMD.

III.2. Extraction d'ADN et détection de l'ADN viral

L'ADN total contenu dans les échantillons foliaires virosés a été extrait pour détecter la présence de l'ADN viral dans les plantes.

III.2.1. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été effectuée en utilisant le kit DNEASY plant (Qiagen) (Annexe 3). En effet:

- Les échantillons de feuilles déshydratées de manioc ont été pesés, puis broyés avec le broyeur à billes MM301 (Retsch, Allemagne).
- Une première étape de lyse cellulaire à 65°C permet de libérer les contenus cellulaires et de mettre en solution les ADN génomiques des plantes et l'ADN viral. L'utilisation d'une RNase va permettre de se débarrasser des ARNs cellulaires.
- Une deuxième étape va permettre de charger l'ADN grâce à l'aide d'une solution tamponnée.
- Enfin l'ADN chargé négativement va être adsorbé sur une colonne de silice chargée positivement, avant d'être élué avec de l'eau ultra-pure.

III.2.2. Détection de l'ADN viral

C'est une technique d'amplification *in vitro* de l'ADN. Elle permet d'obtenir une grande quantité d'un segment précis d'ADN à partir d'un extrait d'ADN peu abondant. Les séquences obtenues sont ensuite séparées selon leur taille par électrophorèse et révélées à la lumière UV. Les éléments nécessaires pour l'amplification sont:

- ❖ la matrice: c'est l'ADN viral à amplifier,
- ❖ les amorces: ce sont des courtes séquences d'ADN (ou d'ARN), complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière par une ADN polymérase. L'utilisation d'une amorce «sens» (F: forward) et «anti-sens» (R: reverse) permettent de définir la séquence de l'amplicon. Les amorces sont de deux types: les amorces dégénérées et les amorces spécifiques. Le premier type a été utilisé pour détecter la présence des begomovirus en général en se fixant sur les nucléotides des régions conservées, et le deuxième type a été utilisé

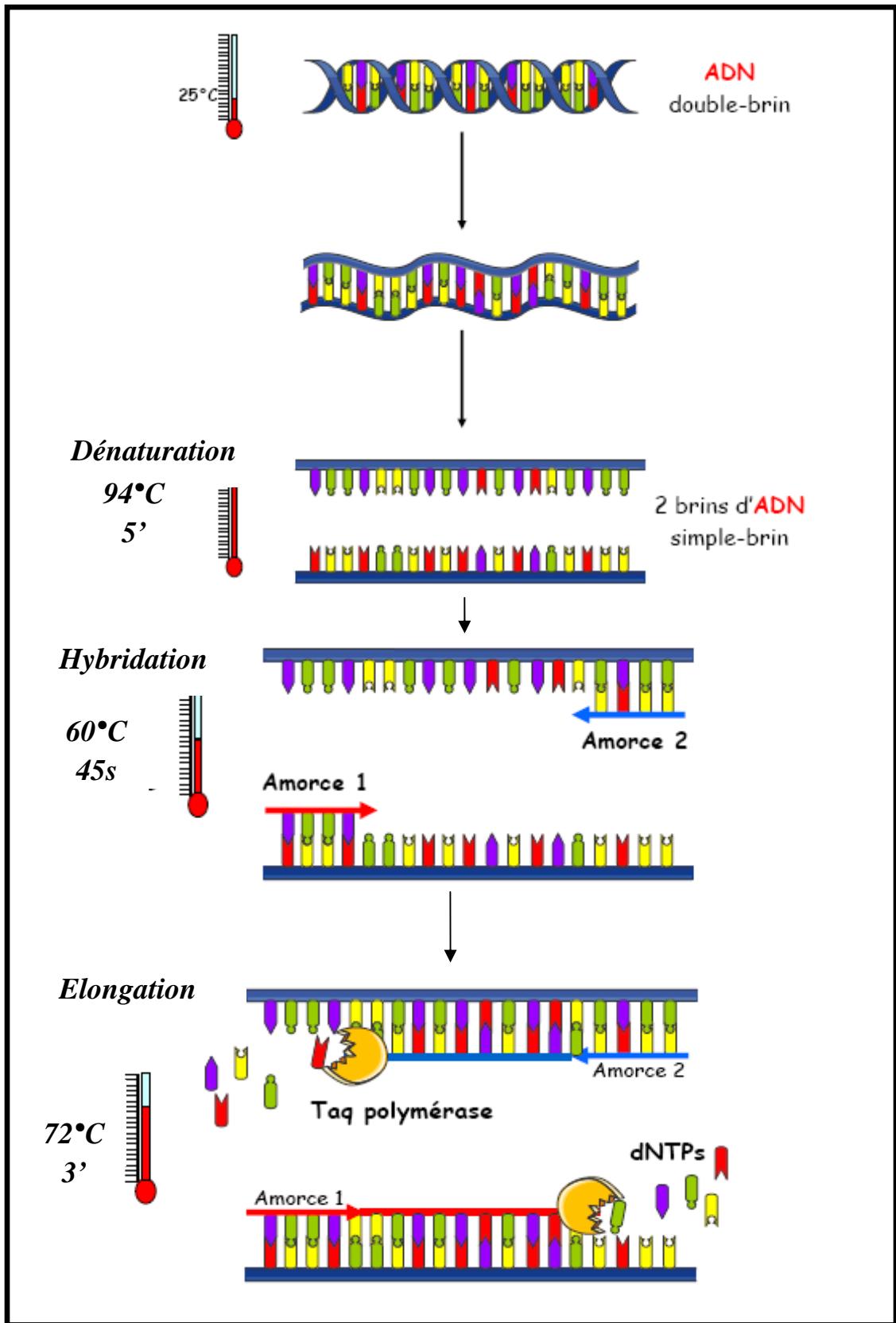


Figure 5 : Schéma de la technique PCR (Source : Dijoux B., Rapport de stage 2009).

pour détecter une séquence typique d'un virus particulier en se fixant sur les sites spécifiques du virus,

- ❖ les dNTPs: ce sont les mélanges des quatre desoxyribonucléotides: dATP (désoxy adénine triphosphate), dCTP (désoxy cytosine triphosphate), dGTP (désoxy guanine triphosphate), dTTP (désoxy thymine triphosphate),
- ❖ la Taq polymérase: c'est l'enzyme qui permet la fixation des dNTPs sur la matrice et qui permet l'elongation de la chaîne
- ❖ MgCl₂: il contient deux cations qui vont équilibrer les charges négatives des triphosphates de la molécule d'ADN.

Les trois étapes qui se suivent dans la PCR sont (figure 5):

- La dénaturation de l'ADN à 94°C,
- L'hybridation des amores à 40-65°C,
- L'elongation de la chaîne à 72°C.

Pour l'amplification PCR, les couples d'amores utilisés sont montrés dans le tableau 2.

Tableau 2: Couple d'amores utilisées pour l'amplification des fragments d'ADN viral contenus dans les feuilles de manioc:

Couple d'amores	Région amplifiée	Taille attendue
V537/C1345	CP	808pbs
VD1863/C6D2391	Rep	528pbs

Pbs : paires de bases

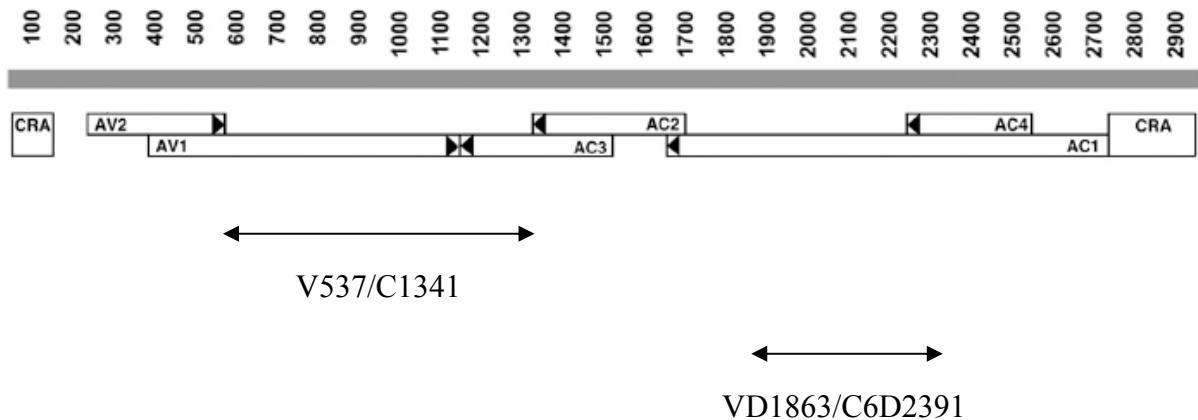


Figure 6: La position d'hybridation des amorces dégénérées sur la séquence d'ADN A viral à détecter

Un mix contenant les produits utilisés pour l'amplification est préparé:

Produits	Volumes (μl)
eau	13,5
dNTPs	2,5
tampon	2,5
MgCl ₂	1,5
F (V537 ou VD 1863)	1
R (C1345 ou C ₆ D2391)	1
Taq	1
Volume total	23

Dans une plaque PCR, un volume de 23 μl de mix est distribué dans chaque puit selon le nombre d'extraits. L'extrait d'ADN de 2 μl par puit a été ensuite ajouté. La plaque a été recouverte d'un papier aluminium autocollant pour éviter l'évaporation pendant la PCR.

Puis, le thermocycleur est programmé pour faire 30 cycles. La PCR a été effectuée selon le tableau suivant:

Etapes	Températures (°C)	Durée	
Dénaturation initiale	94	5mn	
Dénaturation	94	1mn	
Hybridation	55	1mn	
Elongation	72	1mn	
Elongation finale	72	5mn	
Température finale	12	∞	

} 30x

III.2.3. Électrophorèse

C'est une méthode qui permet de séparer les séquences d'ADN selon leur taille. La technique de l'électrophorèse en gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Cette séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose: les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures (Sambrook et Russel, 2001). L'utilisation d'un marqueur moléculaire est importante pour déterminer la taille de la séquence d'ADN. D'autre part, l'ajout d'un tampon de charge dans l'extrait d'acide nucléique va premièrement favoriser le dépôt des extraits au fond de chaque puit et deuxièmement permettre de suivre la progression de l'électrophorèse et plus précisément du front de migration de l'ADN par l'intermédiaire du bleu de bromophénol.

En effet, un gel d'agarose 1% (annexe 7) a été préparé. Du tampon de charge de 2 μ l est ajouté dans chaque puit de la plaque contenant les produits PCR. Puis, un extrait de 10 μ l de chaque mélange tampon-produit PCR a été déposé dans les puits du gel. Le marqueur utilisé pour repérer la taille des fragments est le «marqueur 100 pb». Dans un puit, un volume de 10 μ l de ce marqueur est ajouté. Après migration, le gel est placé dans un bain de BET pendant 10 minutes, puis dans l'eau de rinçage pendant 20 minutes avant la révélation à la lumière ultra-violette.

III.3. Clonage

Le clonage consiste à multiplier l'ADN viral dans une cellule bactérienne dite «compétente» par l'utilisation d'un vecteur plasmide. Selon Raven *et al.*, en 2000, le clonage est «la technologie d'ADN recombinant». Elle est basée sur la possibilité de couper avec

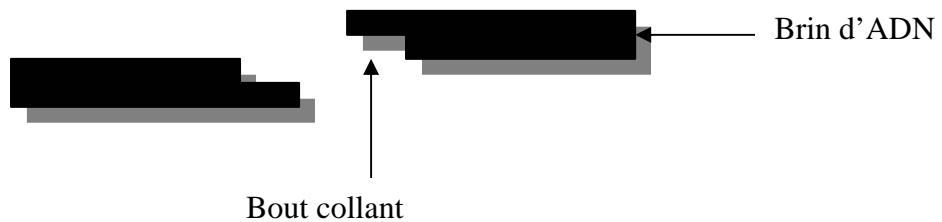


Figure 7 : Schéma montrant les bouts collants laissés par l'enzyme de restriction sur les brins d'ADN

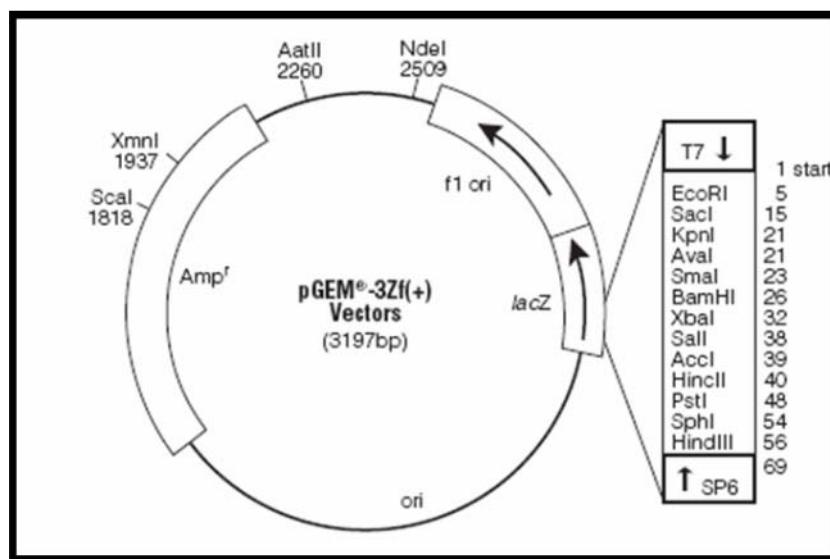


Figure 8 : Représentation du vecteur pGem-3Zf+ et des sites de restriction de la cassette de clonage (Source : Promega, Technical Bulletin pGem®-3Zf(+) Vector Novembre 2007).

précision des molécules d'ADNs qui sont l'ADN viral et l'ADN du plasmide en fragments spécifiques et de les réunir pour en faire des combinaisons nouvelles appelées «ADNs recombinants». Cette technique repose sur l'utilisation des enzymes de restriction (endonucléases de restriction), qui reconnaissent des séquences spécifiques d'ADN bicaténaires. Ces séquences ont généralement une longueur de 4 à 6 nucléotides et sont toujours symétriques. L'enzyme choisi doit posséder un seul site de restriction au niveau de l'ADN viral et au niveau de l'ADN du plasmide. L'enzyme coupe les brins à une distance de quelques nucléotides, laissant ce qu'on appelle des «bouts collants» (figure 7). Au niveau de leurs bouts collants, les brins d'ADN sont complémentaires et peuvent donc s'apparier entre eux et être soudées par l'ADN ligase. Cette propriété permet d'obtenir des recombinaisons pratiquement illimitées de matériel génétique, puisque la faculté de recombinaison des fragments d'ADN est indépendante de leur origine.

Le plasmide recombinant est introduit dans une cellule bactérienne compétente, lieu où il peut se répliquer de façon autonome. Cela se fait par choc thermique. L'augmentation brusque de la température entraîne l'ouverture des pores de la membrane cytoplasmique de la bactérie, permettant l'entrée du plasmide contenant l'insert à l'intérieur de la cellule. Quand la cellule bactérienne se multiplie, le plasmide à l'intérieur se réplique. Si une cellule bactérienne contenant un plasmide recombiné se divise et développe une colonie de plusieurs millions de cellules, celles-ci contiendront toutes le même plasmide recombinant avec le même insert d'ADN.

Même si toutes les cellules compétentes se trouvent en contact avec des plasmides recombinants, toutes ne seront pas transformées. En effet, un système de criblage est utilisé pour pouvoir identifier les bactéries qui contiennent les plasmides recombinants. L'utilisation de l'ampicilline dans le milieu de culture permet d'éliminer les bactéries qui ne possèdent pas de gène de résistance à l'antibiotique, en sachant que les plasmides utilisés possèdent un gène de résistance. Les colonies se développant dans le milieu sont donc des colonies de bactéries contenant un plasmide seul ou un plasmide recombinant. L'utilisation des plasmides portant le gène LacZ permet de cribler les colonies de bactéries à ADN recombinant. Les plasmides vecteurs comme pGem-3Zf+ (Promega, France) contiennent ce gène. Le gène LacZ code pour la β galactosidase, une enzyme qui hydrolyse les composées chimiques de la famille des lactoses. Il possède une région appelée cassette de clonage comportant un grand nombre de sites de restriction dont *Bam*HI (Figure 8). Après transformation, les bactéries qui contiennent

les plasmides avec le gène LacZ intact, non recombinant, produiront des colonies bleues si elles se développent sur un milieu de culture solide qui contient un sucre appelé X-gal. En effet, l'enzyme β galactosidase est capable de transformer les molécules X-Gal en un produit bleuté. Lorsque le gène LacZ est interrompu par un fragment d'ADN exogène lors du clonage, les colonies recombinantes apparaissent blanches car le gène lacZ a été altéré et ne peut plus produire la β galactosidase.

Le clonage peut être divisé en trois étapes majeures :

- La préparation de l'insert qui concerne l'étape d'amplification des génomes viraux par la stratégie de l'amplification en cercle roulant (polymérase Phi29) et de digestion sur un site de restriction unique afin de libérer des génomes doubles brins linéaires aptes à être cloné dans un plasmide bactérien.
- Le clonage proprement parlé qui consiste à intégrer et ligaturer un insert (ADN viral prétraité) dans un plasmide bactérien préalablement ouvert par digestion par l'intermédiaire d'une ligase.
- La transformation qui concerne l'étape dans laquelle est intégrée le plasmide de clonage dans une cellule bactérienne dite compétente par choc thermique.

III.3.1. Préparation de l'insert

Il consiste à amplifier l'ADN viral par la technique d'amplification Phi 29 et le purifier avant l'insertion dans le plasmide.

III.3.1.1. Amplification de l'ADN viral avec la polymérase Phi 29

C'est une technique d'amplification exponentielle d'ADN permettant de synthétiser une séquence complète et en grande quantité. Cette technique utilise la polymérase *Phi 29* qui est une polymérase issue du bactériophage *Phi 29* (Inoue-Nagata *et al.*, 2004). Le déroulement du processus d'amplification est le suivant :

- dénaturation thermique à 94°C permettant la séparation des brins d'ADN et la fixation des amorces,
- incubation enzymatique à 30°C durant 20 heures pendant laquelle l'enzyme *Phi 29* s'active pour l'elongation de la chaîne polypeptidique,

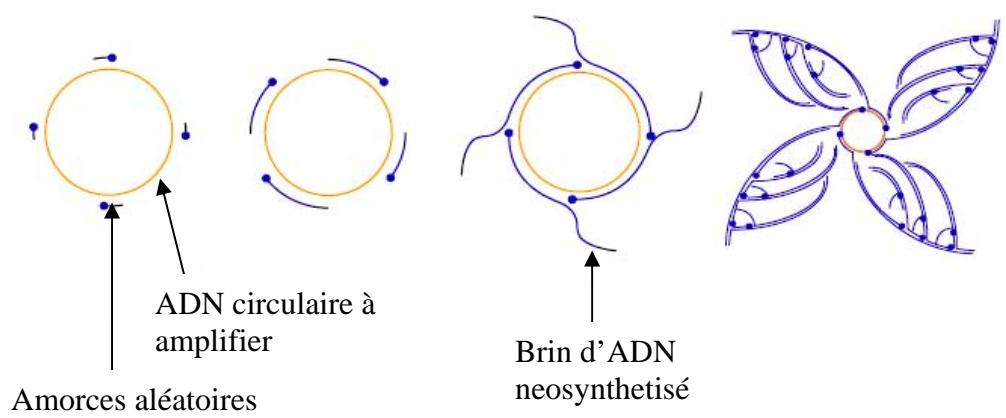


Figure 9 : Schéma de l'amplification de l'ADN viral avec la polymérase Phi 29.

- dénaturation de l'enzyme en fin d'incubation à 65°C.

Après la dénaturation, les amorces aléatoires d'environ 6pbs s'hybrident sur l'ADN et l'enzyme s'active pour l'elongation de la chaîne polypétidique. Elle se déplace pour la synthèse de nouveaux brins d'ADN. L'extrémité 3' de chaque produit d'extension est déplacée par un autre brin en amont dont l'extension est effectuée dans la même direction. L'amplification exponentielle de l'ADN viral est due aux propriétés de la polymérase *Phi 29*; par un mécanisme dit «hyperbranché», l'enzyme effectue à la fois :

- l'extension des amorces aléatoires,
- le déplacement des brins synthétisés de la matrice.

L'ADN déplacé présente plusieurs sites de fixation des amorces aléatoires et la réaction devient rapidement exponentielle (figure 9). La polymérase peut associer en moyenne 70000 nucléotides avant de se dissocier de la matrice (Blanco *et al.*, 1989). Cette polymérase a aussi une activité exonucléasique 3'-5' qui confère une haute fidélité aux ADNs produits. En effet, son activité consiste à éviter l'incorporation du mauvais nucléotide et il en résulte un faible taux d'erreur (seulement une seule erreur pour 10^6 à 10^7 nucléotides) (Kieleczawa, 2006). Les ADNs synthétisés forment des structures où les génomes viraux sont placés les uns derrière les autres. Afin d'obtenir des génomes viraux isolés ou monomères, l'amplification *Phi29* est digérée par une enzyme de restriction.

L'amplification a été effectuée en utilisant le kit commercial *TempliPhi* (Amersham, Biosciences) décrit en annexe 4.

III.3.1.2. Digestion *Phi 29* par l'enzyme *BamHI*

Après l'amplification *Phi29*, les ADNs se trouvent liés les uns derrière les autres. Pour les séparer, l'enzyme *BamHI* est utilisée. Elle possède un site de restriction unique au niveau des séquences d'ADN viral d'une grande majorité des ADN-A des bégonovirus et notamment la majorité des CMGs décrits jusqu'à présent. Son utilisation permet de couper les ADN viraux en un site précis et d'obtenir des séquences d'ADN total de taille d'environ 2800 pbs qui correspondent aux génomes complets des ADNs viraux.

La digestion *Phi 29* a été effectuée selon le protocole suivant:

- Un mix contenant l'enzyme est préparé:

Produits	Volumes (μ l)
Tampon 10X	2
<i>Bam</i> HI	2
Eau ultra pure	5
Volume total	9

- Le mix préparé est mis dans les puits d'une plaque PCR à raison de 9 μ l par puit suivant le nombre d'extrait TempliPhi.
- Le produit de l'amplification TempliPhi de volume égal à 11 μ l est ajouté dans le mix.
- Le mélange est incubé à l'étuve 3 heures à 37°C.
- Une électrophorèse sur gel d'agarose 0,7% (annexe 7) a été réalisée pour faire migrer les séquences à 2800pbs et de les différencier des autres séquences d'ADN. En effet, les produits de la digestion TempliPhi ont été déposés dans les puits du gel après ajout de tampon de charge de volume égal à 1 μ l. Le marqueur de taille utilisé est le «marqueur 1kb». L'électrophorèse a été effectuée à 100V pendant une heure.
- Pour révéler la présence de l'ADN, le gel est coloré dans un bain de SYBR Safe (Invitrogen, Paris) pendant 10 minutes, puis rincé à l'eau pendant 3 minutes. Le SYBR est un composé organique aromatique capable de se fixer sur tous les types d'acides nucléiques et représente un excellent fluorophore, capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.
- La révélation a été effectuée grâce à une table à lumière bleue (470 nm ; Safe Imager Blue-Light Transilluminator, Invitrogen, France). Les régions du gel contenant les séquences d'environ 2800pbs (équivalent à la taille d'un génome viral) ont été découpées.

III.3.1.3. Purification de l'ADN

Les fragments d'ADN contenus dans les portions de gel ont été purifiés en utilisant le kit Gene clean Turbo (Invitrogen, France) (Annexe 5). Après purification, les inserts sont prêts pour être liés avec le plasmide vecteur.

III.3.2. Ligation

Les inserts sont liés au plasmide par l'utilisation de la T4 DNA ligase. Le plasmide utilisé est le pGem3zf+ qui contient un gène de résistance à l'ampicilline (Amp). Il a été préalablement coupé par *Bam*HI et déphosphorylé pour pouvoir se lier avec l'ADN viral. Comme l'ADN viral et le plasmide sont coupés par l'enzyme *Bam*HI, leurs sites de coupures possèdent des nucléotides complémentaires pouvant se lier, ce qui facilite la ligation par la ligase. La ligation a été faite comme suit:

- Un mix contenant la ligase est préparé:

Produits	Volumes (μl)
Plasmide	1
Ligase 5u	1
Tampon ligase	1
Volume final	3

- L'insert de volume égal à 7μl est ajouté dans le mix préparé pour chaque échantillon.
- L'incubation se fait à température ambiante pendant une heure.

III.3.3. Transformation

Le plasmide contenant l'insert est introduit dans la cellule bactérienne compétente. La transformation a été effectuée comme suit:

- Les souches JM 109 sont sorties du congélateur -80°C (aliquots de 50μl) et sont mises dans de la glace.
- 10μl de ligation (insert + plasmide) est ajouté dans les 50μl de cellules bactériennes compétentes.
- Le mélange est laissé incuber 20 minutes dans la glace.
- Le choc thermique est effectué pendant 45 secondes dans un bain marie à 42°C.
- Les tubes sont mis pendant 2 minutes dans la glace.
- 200μl de milieu liquide LB (annexe 7) est ajouté dans chaque tube.

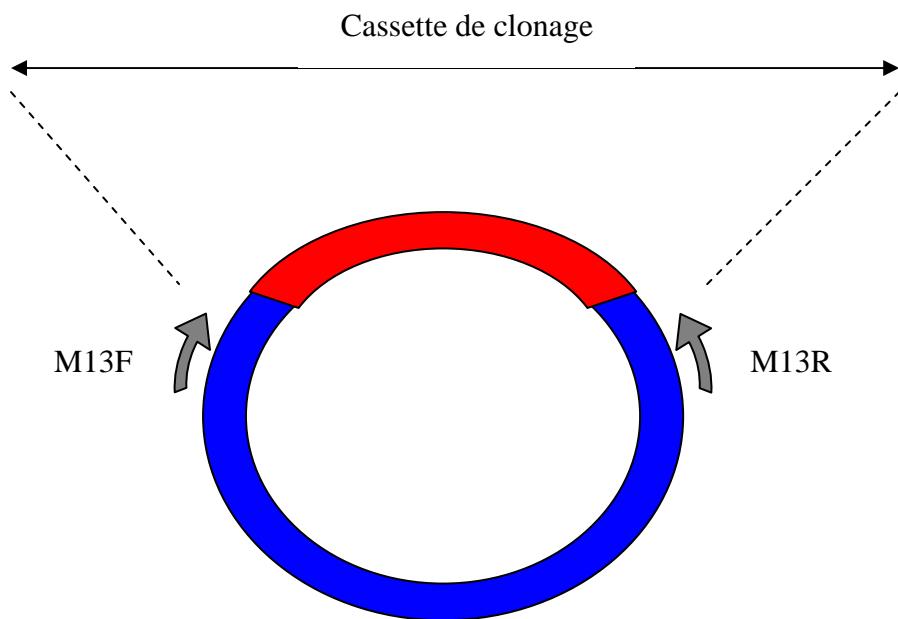


Figure 10 : Représentation du séquençage à partir des amorces M13F/R.

- Vecteur (plasmide)
- Insert (ADN viral)
- Amorces (M13F/R)

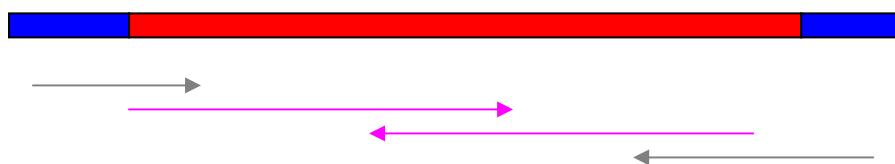


Figure 12 : Représentation du séquençage complet avec les amorces M13F/R et les amorces internes F/R.

- ADN à séquencer
- M13 Forward
- ← M13 Reverse
- Amorce interne Forward
- ← Amorce interne Reverse

- Le mélange est laissé incuber une heure à 37°C à l'étuve. Pendant ce temps, 100 µl d’IPTG et 20 µl de XGAL sont étalés sur des boites LB (Annexe 7) + antibiotique (Ampicilline).
- 120µl de la transformation est étalé sur les boites LB+antibiotique+XGAL+IPTG.
- Le tout est laissé incuber une nuit à 37°C.

III.3.4. Tri des colonies blanches

Après la phase d’incubation, les colonies bactériennes blanches ont été prélevées afin de vérifier la présence et la taille attendue des inserts (environ 2800 pbs) par PCR. Cinq colonies blanches par échantillon ont été prélevées pour la détection par PCR et pour la sauvegarde des colonies sur milieu solide LB + Amp. Les amorce universelles M13 *Forward* et *Reverse* présentent à gauche et à droite de la cassette de clonage du vecteur (Figure 10) ont été utilisées pour amplifier par PCR l’insert du plasmide recombinant, en utilisant les conditions suivantes :

Produits	Volumes (µl)
eau	15,5
dNTPs	2,5
tampon	2,5
MgCl ₂	1,5
M13F	1
M13R	1
Taq	1
Volume total	25

Le mix est déposé dans les puits d’une plaque PCR à raison de 25µl par puit selon le nombre de colonies prélevées. A l’aide d’une anse, quelques cellules bactériennes sont prélevées de chaque colonie choisie et sont mélangées avec le mix. La PCR a été effectuée comme suit :

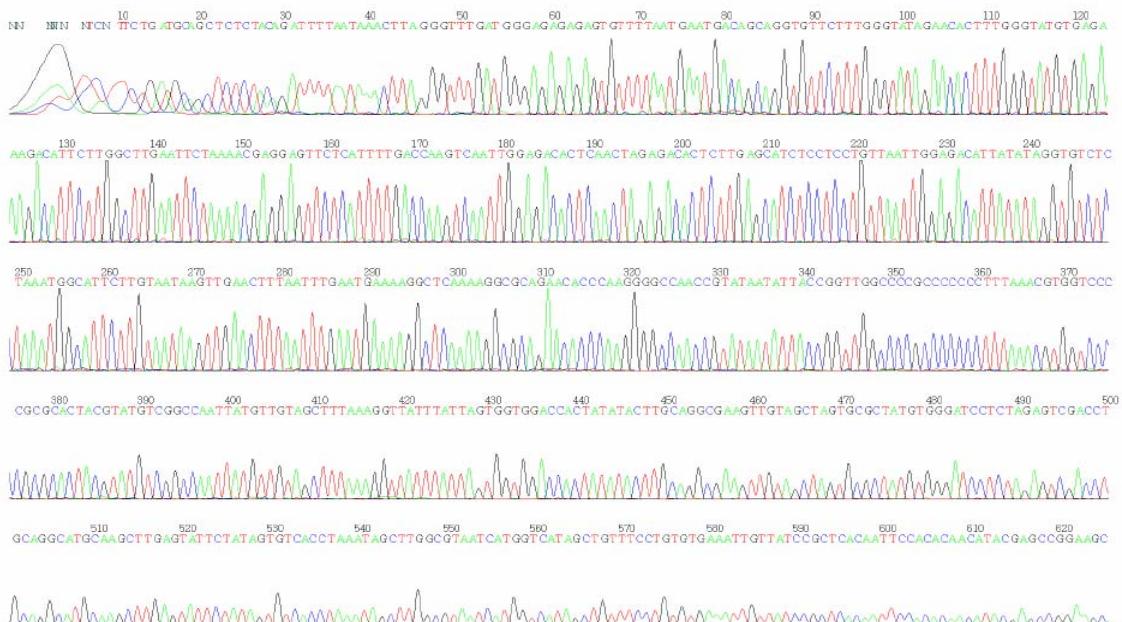


Figure 11 : Schéma d'un électrophorégramme montrant l'alignement des nucléotides dans une séquence d'ADN viral.

Etapes	Températures (°C)	Durée	
Dénaturation initiale	94	5mn	
Dénaturation	94	1mn	
Hybridation	65	1mn	
Elongation	72	3mn	
Elongation finale	72	5mn	
Température finale	12	∞	

} 30x

Le thermocycleur a été réglé pour faire 30 cycles. La migration par électrophorèse a été ensuite effectuée à 100V pendant une heure sur un gel d'agarose 1%. Pour cela:

- 2 μ l de tampon de charge est ajouté dans les produits PCR,
- 10 μ l de ce mélange est déposé dans les puits du gel pour chaque extrait PCR,
- 10 μ l de «marqueur 1kb» est déposé dans un puit pour servir de marqueur de taille.

Après migration, le gel est mis dans un bain de bromure d'ethidium (BET) pendant 10 minutes, puis rincé à l'eau pendant 20minutes, et les séquences ayant la bonne taille sont révélées aux ultraviolets (UV).

III.4. Séquençage partiel ou complet des génomes viraux

Le séquençage est une méthode de détermination des nucléotides qui s'associent pour former la séquence de l'ADN. La variabilité des nucléotides observés entre les séquences d'un gène ou d'un génome viral entre les individus d'une même espèce ou entre les espèces virales permet d'étudier leur diversité génétique et d'inférer leurs relations de parenté ou phylogénétiques.

Le séquençage de l'ADN est basé sur l'utilisation de didésoxynucléotides (ddNTPs) associés à des marqueurs fluorophores (*), qui inhibent les réactions de polymérisation et qui permettent d'identifier chaque nucléotide (ddATP*, ddCTP*, ddGTP* et ddTTP*). L'ADN à séquencé est polymérisé au cours d'une réaction PCR avec des amorces et des dNTPs en grand nombre, et une faible proportion de ddNTP*s. De façon aléatoire, un ddNTP* sera ajouté à la chaîne polynucléotidique en cours de synthèse, stoppant ainsi l'elongation. Le résultat du séquençage correspondra à un électrophoregramme associant l'intensité des quatre fluorophores, correspondant aux quatre ddNTP*s, en fonction de la position nucléotidique sur la séquence (Figure 11). Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences des banques de données nucléotidiques mondiales à l'aide de l'algorithme BLAST (NCBI).

III.4.1. Séquençage partiel

Le séquençage partiel des génomes viraux amplifiés avec les amores VD1863/C₆D2391 à partir des 104 extraits d'ADN de manioc virosées (Paragraphe III 1) a été réalisé par la technique du séquençage direct sur produits PCRs, sans étape de clonage. Les amplifiats PCRs ont directement été envoyés au séquençage en utilisant les amores VD1863/C₆D2391 (Macrogen, Corée du Sud).

III.4.2. Séquençage complet

Le séquençage complet des génomes viraux a été réalisé à partir des génomes viraux clonés dans les plasmides bactériens suite à l'amplification en cercle roulant et l'utilisation du kit commercial TemplPhi (GE HealthCare, France).

Les colonies recombinantes présentant des inserts de la bonne taille ont été sélectionnées, mises en culture et l'ADN plasmidique est extrait. La mise en culture bactérienne a consisté à ensemencer 5ml de milieu liquide LB avec 5µl d'ampicilline (1mg/ml). Le mélange a été incubé à 37°C à l'étuve pendant une nuit sous agitation. La culture bactérienne a été centrifugée à 15000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu a été jeté et le culot contenant les cellules bactériennes transformées a été traité pour extraire l'ADN plasmidique. L'extraction d'ADN plasmidique a été effectuée en utilisant le kit Miniprep Qiagen (annexe 6). Les extraits d'ADN plasmidique ont ensuite été envoyés à séquencer (Macrogen, Corée du Sud). Les amores universelles M13F/R ont été utilisées pour le séquençage. Elles se fixent aux extrémités de la cassette de clonage permettant l'amplification et le séquençage de l'insert (figure 10). La taille des séquençages étant limitée à environs 700 – 800bps, le séquençage du génome viral d'environ 2800bps ne peut pas être réalisé d'une seule traite. Pour cette raison, des amores internes ont été dessinées à partir des séquences obtenues avec les amores M13F/R (Figure 12). L'assemblage des quatre séquences chevauchantes d'environ 800pb obtenues à partir des deux couples d'amores a permis de reconstituer la séquence complète des génomes viraux. L'assemblage a été réalisé grâce au logiciel d'alignement et d'assemblage de séquences nucléiques DNAMAN (Lynnon, Canada).

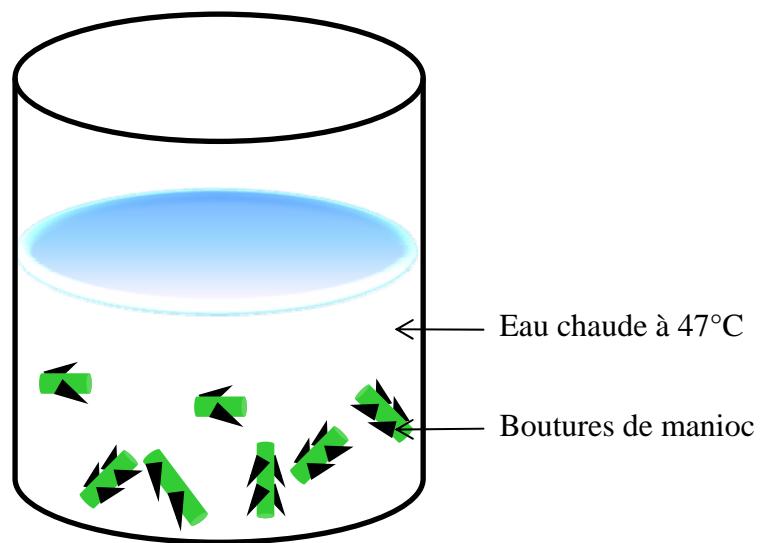


Figure 13: La thermothérapie des boutures

III.5. Analyse informatique des séquences obtenues

Les séquences nucléotidiques partielles et complètes de génomes viraux obtenues ont été alignées et comparées avec les virus apparentés grâce aux logiciels DNAMAN et MEGA4. Pour cette analyse, les séquences partielles ou complètes représentatives des 7 espèces de CMGs actuellement décrites en Afrique ont été utilisées, en associant également une séquence du variant Ougandais de l'EACMV. Ces séquences références ont été recherchées dans les banques internationales de données nucléotidiques GenBank-EMBL-DDBJ.

Les séquences partielles ou complètes de génomes viraux de bégomovirus ont été restituées phylogénétiquement grâce à la construction d'un arbre phylogénétique par la méthode du plus proche voisin (*Neighbor Joining* ou NJ) et par l'intermédiaire des logiciels DNAMAN et MEGA4. Les arbres ont été enracinés grâce aux séquences virales des deux espèces asiatiques de CMGs : SLCMV et ICMV. Pour déterminer la robustesse des arbres obtenus, une analyse de *bootstrap* a été effectuée, en utilisant 1000 répétitions (DNAMAN et MEGA4).

III.6. Application de la thermothérapie

Une étude préliminaire effectuée par Vohizy J. en 2001 sur plusieurs variétés de manioc de Madagascar a permis de valider la technique de thermothérapie avec un traitement de 30 minutes à 47°C (Vohizy et Ranomenjanahary, 2001). Notre travail d'assainissement a porté sur la variété locale de manioc Pemba très appréciée par la population rurale pour ses qualités gustatives et très sensible à la CMD, avec des indices de sévérité 4 et des incidences de 100%.

III.6.1. Traitement des boutures à l'eau chaude

La thermothérapie consiste à immerger les boutures dans l'eau chaude à 47° pendant 30 minutes. (Figure 13).

III.6.2. Culture sous serre

Après thermothérapie, les boutures sont plantées dans des bacs contenant du sol traité au bromure de méthyle pour la désinfection.

III.6.3. Suivi et évaluation des boutures

L’arrosage et le sarclage ont été effectués respectivement tous les deux et quinze jours.

Les paramètres utilisés pour cette étude ont été:

- le comptage des plantules infectées et saines issues des boutures thermotraitées (stade 5 feuilles déroulées). Ces relevés ont permis de déterminer le pourcentage de plantules saines obtenu et d'estimer l'efficacité de la thermothérapie,
- la sévérité de la CMD observée sur les plants issus de boutures thermotraitées en utilisant l'échelle de Cours. Ces relevés ont permis d'évaluer l'effet de la thermothérapie sur la sévérité des symptômes de CMD,
- le comptage des plantules qui ont survécu jusqu'avant la transplantation en plein champ afin d'évaluer le degré de mortalité des boutures sous l'effet de la thermothérapie.

IV- RESULTATS

IV.1. DIAGNOSTIC VIRAL, SEQUENCAGE PARTIEL ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES CMGs A MADAGASCAR

IV.1.1. Séquencage partiel des produits PCR et diagnostic viral

Les 104 échantillons foliaires symptomatiques analysés ont permis d'amplifier avec les amorces VD1863/C6D2391 un fragment de la Rep des CMGs de la taille attendue (environ 500pbs). Le séquençage direct de ces amplifiats PCR a permis d'obtenir 90 séquences partielles de génomes de begomovirus. Les résultats du diagnostic viral par une analyse de similarité nucléotidique (BLASTn, NCBI) de ces séquences avec les séquences virales disponibles dans les banques mondiales d'ADN (GenBank-EMBL-DDBJ) sont présentés dans le tableau 3. Ces résultats montrent la présence à Madagascar des trois principaux types viraux impliquées dans la CMD en Afrique : l'ACMV, l'EACMV et le SACMV. L'ACMV, l'EACMV et le SACMV ont ainsi été détectés respectivement dans 62%, 10% et 28% des échantillons analysés.

IV.1.2. Etude phylogénétique des séquences obtenues

L'alignement des 90 séquences partielles Rep a permis d'obtenir une matrice de distance génétique (MEGA4) et la construction d'un arbre phylogénétique par la méthode du plus proche voisin (NJ). L'arbre phylogénétique confirme que les séquences nucléotidiques obtenues sur la région Rep sont associés aux trois groupes génétiques responsables de la CMD en Afrique : l'ACMV, l'EACMV et le SACMV (figure 14). Il suggère également que les séquences sont relativement homogènes au sein de chaque groupe. Cette homogénéité des séquences virales a été confirmée par la matrice de similarité obtenue à partir de l'alignement des 90 séquences partielles Rep de Madagascar avec celles de séquences de références correspondant aux sept espèces de CMGs africains et aux deux espèces de CMGs asiatiques. L'analyse a ainsi permis de montrer que les isolats d'ACMV, d'EACMV et de SACMV de Madagascar présentent respectivement, entre 90 et 96% de similarité nucléotidique avec l'isolat tanzanien de l'ACMV, 93% de similarité nucléotidique avec l'isolat tanzanien de

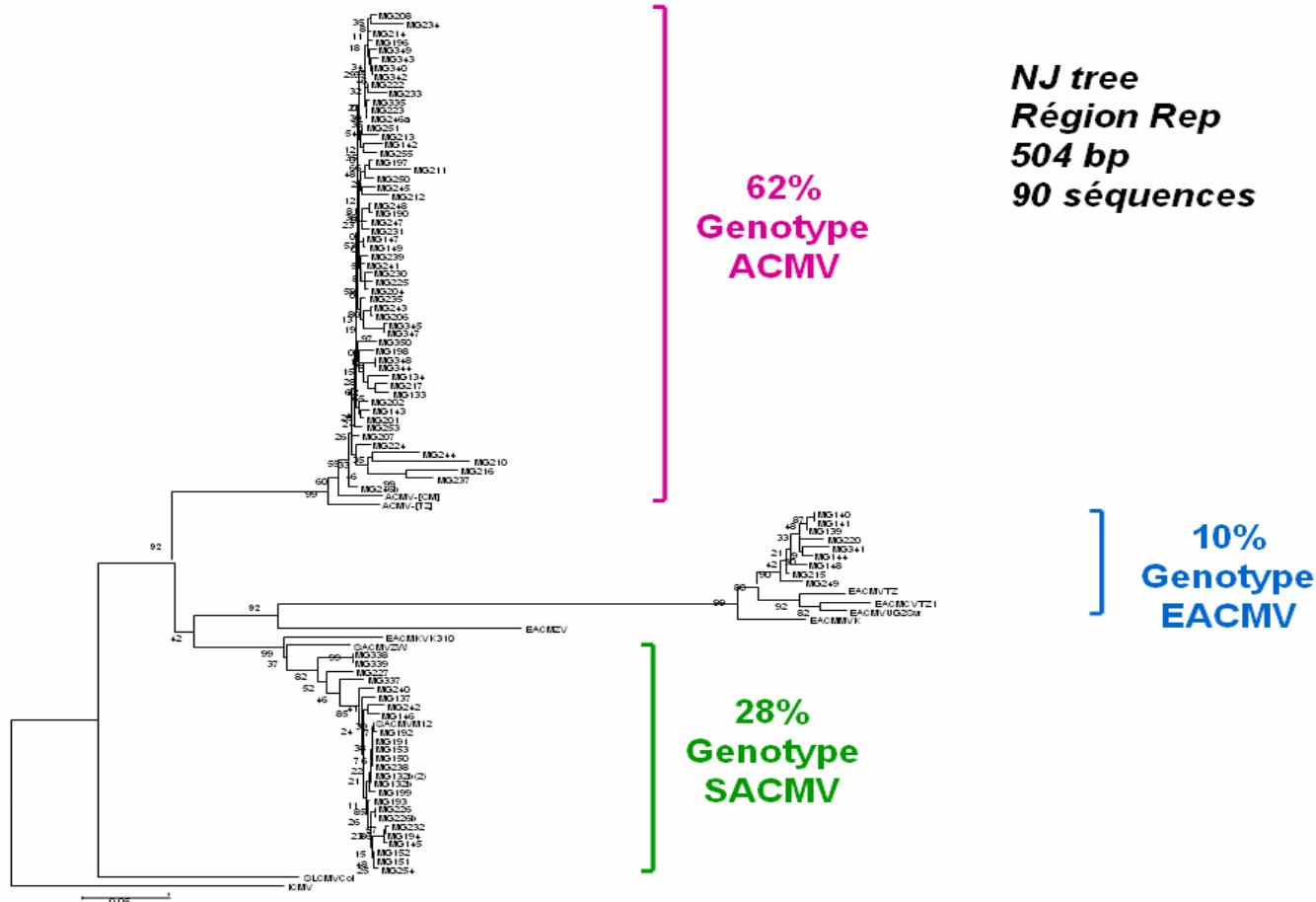


Figure 14 : Arbre construit par la méthode du plus proche voisin indiquant les relations phylogénétiques entre les séquences d'ADN du corps de la Rep des CMGs. L'arbre a été construit en utilisant la méthode de distance corrigée par Jukes et Cantor. L'arbre a été enraciné par deux séquences asiatiques : SLCMV et ICMV. Les nombres associés avec les nœuds indiquent le pourcentage de fois où ces nœuds ont été retrouvés après 1000replications de bootstrap.

Tableau 3 : Descriptif des échantillons de feuilles de manioc virosées et diagnostic viral par similarité nucléotidique (BLASTn, NCBI) à partir des séquences partiels Rep.

Identifiant taxonomique	Identifiant Laboratoire	Localité	Diagnostic viral
MG132a	132_MT050106	Antananarivo/collection Ambatobe/origine Lac Alaotra	SACMV
MG132b	132-MT050106	Antananarivo/collection Ambatobe/origine Lac Alaotra	SACMV
MG133	133_MI131205	Iboaka	ACMV
MG134	134_MI141205	Iboaka	ACMV
MG137	137_MF121205	Fianarantsoa	SACMV
MG139	139_MF121205	Fianarantsoa	EACMV
MG140	140_MTu050106	Toliary	EACMV
MG141	141_MTu050106	Toliary	EACMV
MG142	142_Mtu050606	Toliary	ACMV
MG143	143_MTu050106	Toliary	ACMV
MG144	144_MTu050106	Toliary	EACMV
MG145	145_MT050106	Antananarivo	SACMV
MG146	146_MT050106	Antananarivo	SACMV
MG147	147_MAni310306	Anivorano Mahitsy	ACMV
MG148	148_Mamb260306	Ambatomanjaka	EACMV
MG149	149_Mamb280306	Ambatomanjaka	ACMV
MG150	150_Mant060406	Antandrokomby	SACMV
MG151	151_Mant060406	Antandrokomby	SACMV
MG152	152_MTa050106	Toamasina	SACMV
MG153	153_Mani310306	Anivorano Mahitsy	SACMV
MG190	190_MAmba171106	Ambatolampy	ACMV
MG191	191_MFa181106	Fanandrama	SACMV
MG192	192_MTa181106	Toamasina Mangarano	SACMV
MG193	193_MFa181106	Fanandrama	SACMV
MG194	194_MIv201106	Ivoloina	SACMV
MG196	196_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG197	197_MAnk161106	Ankerana	ACMV

MG198	198_MIvo201106	Ivoloina	ACMV
MG199	199_MIv201106	Ivoloina	SACMV
MG201	201_MAnt211106	Antsirabe	ACMV
MG202	202_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG204	204_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG206	206_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG207	207_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG208	208_MTr191106	Tritriva	ACMV
MG210	210_Mank161106	Ankerana	ACMV
MG211	211_MAn141106	Anjeva - Ambatomirahavavy	ACMV
MG212	212_MTa181106	Toamasina Mangarano	ACMV
MG213	213_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG214	214_MT151106	Antananarivo - ambatobe - Fofifa	ACMV
MG215	215_MAmbo151106	Ambohikely	EACMV
MG216	216_MIv201106	Ivoloina	ACMV
MG217	217_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG220	220_MAnk161106	Ankerana	EACMV
MG222	222_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG223	223_MAmbo151106	Ambohikely	ACMV
MG224	224_MAmboh151106	Ambohidrazana	ACMV
MG225	225_MAnk161106	Ankerana	ACMV
MG226a	226_MAn141106	Anjeva	ACMV
MG226b	226b_MT151106	Antananarivo - Ambatobe - Fofifa	SACMV
MG227	227_MT151106	Antananarivo - Ambatobe - Fofifa	SACMV
MG230	230_MIv201106	Ivoloina	ACMV
MG231	231_MAnk161106	Ankerana	ACMV
MG232	232_Man141106	Anjeva	SACMV
MG233	233_MAmbo151106	Ambohikely	ACMV
MG234	234_MAmbo151106	Ambohikely	ACMV
MG235	235_Mant211106	Antsirabe	ACMV
MG237	237_Mambo151106	Ambohikely	ACMV
MG238	238_MAmbo151106	Ambohikely	SACMV
MG239	239_MAnk161106	Ankerana	ACMV

MG240	240_Mamba171106	Ambatolampy	SACMV
MG241	241_MAnt211106	Antsirabe	ACMV
MG242	242_MA nk161106	Ankerana	SACMV
MG243	243_MAmbo151106	Ambohikely	ACMV
MG244	244_MA nk161106	Ankerana	ACMV
MG245	245_MIv201106	Ivoloina	ACMV
MG246a	246_An141106	Anjeva	ACMV
MG246b	246_MA mboh151106	Ambohidrazana	ACMV
MG247	247_MA mbo151106	Ambohikely	ACMV
MG248	248_MFa181106	Fanandrama	ACMV
MG249	249_Mambo151106	Ambohikely	EACMV
MG250	250_MA mbo151106	Ambohikely	ACMV
MG251	251_MAn141106	Anjeva	ACMV
MG253	253_MA nk161106	Ankerana	ACMV
MG254	254_MA nk161106	Ankerana	SACMV
MG255	255_MA nk161106	Ankerana	ACMV
MG335	335_Ambila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	ACMV
MG337	337_MA mbila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	SACMV
MG338	338_MA mbila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	SACMV
MG339	339_MA mbila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	SACMV
MG340	340_MFe020307	Fenoarivo-Be	ACMV
MG341	341_MFe020307	Fenoarivo-Be	EACMV
MG342	342_MFe020307	Fenoarivo-Be	ACMV
MG343	343_MA mbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	ACMV
MG344	344_MA mbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	ACMV
MG345	345_MA mbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	ACMV
MG347	347_MA mbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	ACMV
MG348	348_MA mbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	ACMV
MG349	349_MA mbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	ACMV
MG350	350_MA mbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	ACMV

ND : non déterminé

Répartition géographique des CMVs

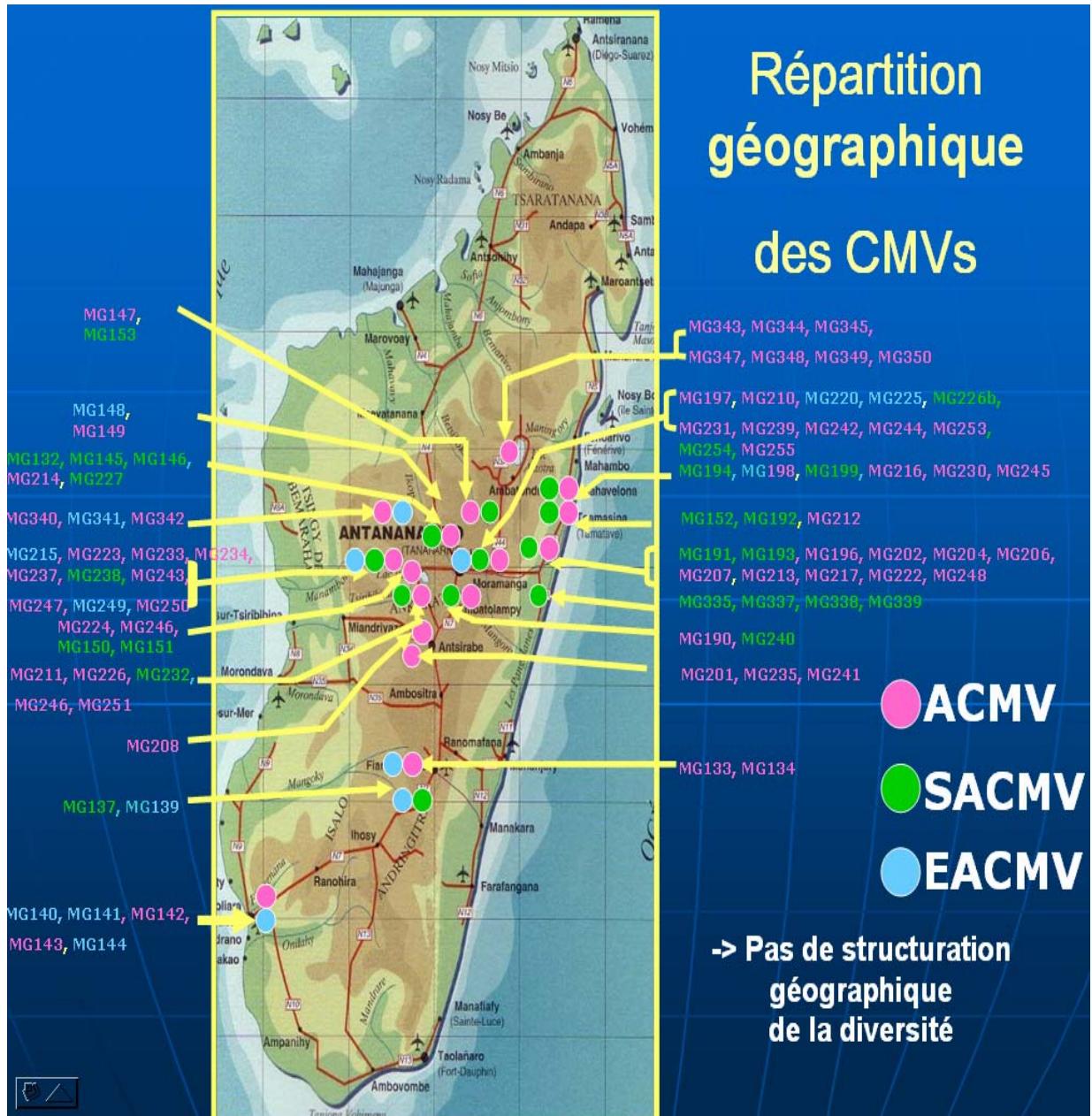


Figure 15 : Carte montrant la répartition géographique des CMGs à Madagascar.
(Source : carte FTM)

l'EACMV, et, entre 97 et 100% de similarité nucléotidique avec un isolat malgache M12 de SACMV.

IV.1.3. Répartition géographique des CMGs à Madagascar

Une carte de répartition géographique des isolats viraux a été établie en associant les résultats du diagnostic viral obtenu à partir des séquences partielles de Rep et l'origine géographique du prélèvement foliaire (Figure 15). L'analyse de la distribution géographique des CMGs malgaches suggère l'absence de structuration géographique de la diversité génétique des CMGs et le chevauchement des aires de répartition des virus. En effet, les trois types génomiques viraux sont répartis aléatoirement dans les régions étudiées et aucune région ne semble épargnée par l'une ou l'autre espèce virale.

IV.2. LA THERMOTHERAPIE

IV.2.1. Evaluation de l'efficacité de la thermothérapie des boutures

Au total, 67% des plantules sont saines. Le taux de plantules saines obtenues suivant les trois classes de boutures après l'application de la thermothérapie. Les classes 1 (boutures aoutées), 2 (boutures semi-aoutées) et 3 (boutures jeunes) donnent respectivement 67%, 69% et 67% de plantules saines.

Si au départ, les boutures sont toutes issues des plantes malades présentant des symptômes de degré 4 (50 à 80% de la surface foliaire attaquée), 78% des plantules encore symptomatiques après la thermothérapie montrent une sévérité de degré 1 (1 à 10% de la surface foliaire attaquée), et les autres plantules malades restantes montrent une sévérité de degré 2 et 4 dont les taux sont respectivement 16% et 6%. Aucune plantule n'a montré une sévérité de degré 3 (30 à 50% de la surface foliaire attaquée) (figure 16).

Après traitement par thermothérapie, 70% des boutures plantées ont survécues jusqu'avant la transplantation. La figure 17 montre que les classes 2 (boutures semi-aoutées) et 3 (boutures jeunes) ont des taux de débourrement relativement élevés respectivement de 70% et 78%, tandis que la classe 1 (boutures aoutées) montre un taux faible de 58%.

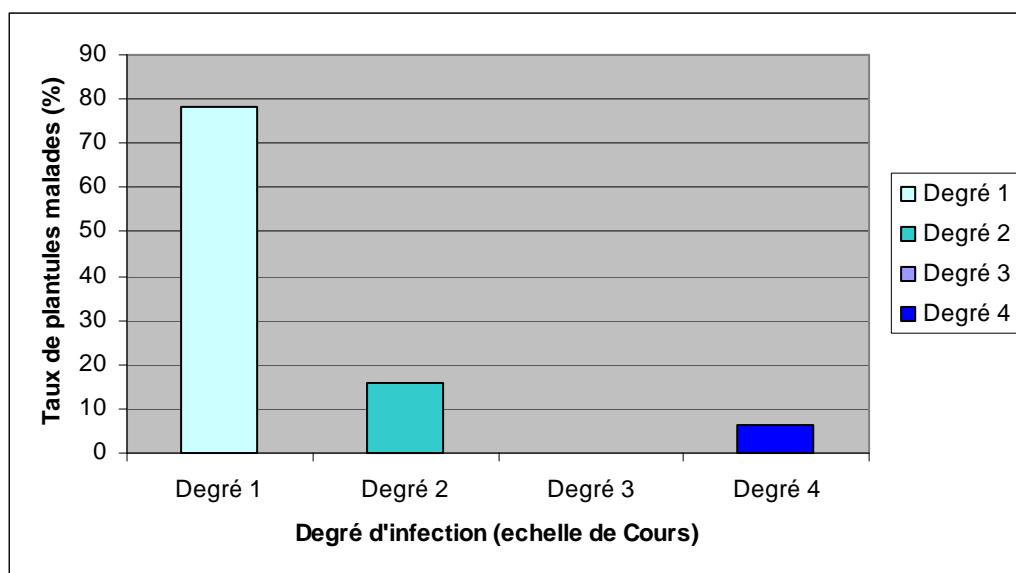


Figure 16: Histogramme montrant la relation entre le taux de plantules encore malades (%) et la sévérité du symptôme (échelle de Cours).

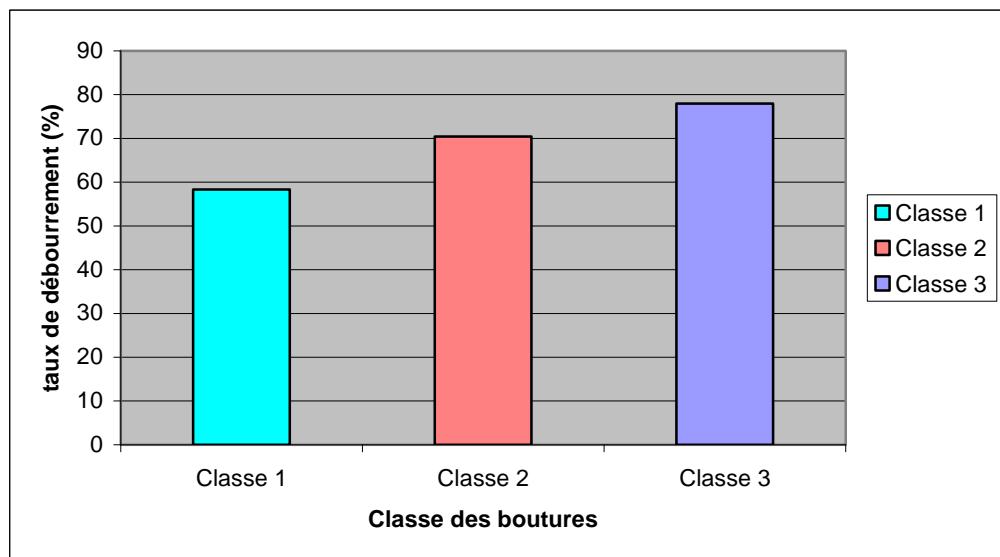


Figure 17: Histogramme montrant le taux de débourrement (%) avant la transplantation des plantules selon la classe des boutures.

IV.2.2. Caractérisation des virus présents dans les échantillons foliaires de la variété impliquée dans la thermothérapie

IV.2.2.1. Clonage et Séquençage complet du génome viral

Les échantillons foliaires prélevés sur les pieds mères de manioc de la variété Pemba, à partir desquels ont été produits les boutures utilisées pour la thermothérapie et les échantillons foliaires prélevés sur des plantules filles symptomatiques ont permis de diagnostiquer la présence d'ADN viraux de CMGs. En effet, des fragments d'ADN d'environ 800 pbs ont été produits lors de l'amplification PCR de la région de la CP avec le couple d'amorces V537/C1345 pour tous les échantillons. Aussi, des fragments d'ADN d'environ 500pbs ont été produits lors de l'amplification PCR de la région Rep avec le couple d'amorces VD1863/C6D2391 pour deux échantillons foliaires des pieds mères (Figure 18).

L'amplification virale en cercle roulant (Kit TemplPhi) a permis d'obtenir des monomères d'ADN viraux d'environ 2800pbs après coupure par *BamHI* pour les 3 pieds mères et les trois pieds filles testés (figure 19).

Suite à l'étape de clonage et de transformations, vingt colonies recombinantes (colonies blanches) ont été ciblées afin de déterminer la taille des inserts en utilisant les amorces universelles M13F et M13R. Les inserts correspondant potentiellement aux dix-huit colonies parmi les 20 colonies blanches testées ont montré des fragments d'environ 3000pbs de la bonne taille lors de l'amplification PCR (génome viral (2800pbs) et cassette de clonage du vecteur (300pbs) (Figure 20).

IV.2.2.2. Analyse phylogénétique à partir des génomes complets

Le résultat de séquençage du génome complet d'ADN A de begomovirus issu d'échantillons foliaires de deux pieds mères de manioc ont été obtenus avant la fin du délai de réalisation du mémoire de stage et intégré dans l'analyse phylogénétique. L'alignement de ces séquences complètes avec les séquences virales de référence des sept espèces africaines de begomovirus et d'une espèce asiatique impliquée dans la CMD a permis d'étudier leur lien de parenté, de générer une matrice de distance génétique et de construire un arbre

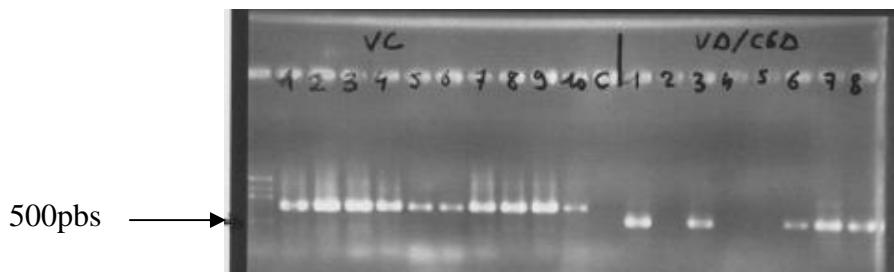


Figure 18 : Gel d'électrophorèse montrant les résultats de l'amplification de l'ADN viral des CMGs par PCR avec les amorces V537/C1345 et les amorces VD1863/C6D2391. Les pistes 1-2-3 correspondent aux échantillons foliaires prélevés sur 3 des pieds mères à partir desquels ont été produits les boutures thermotraitées. Les pistes 4-5-6 correspondent à 3 pieds filles thermotraités présentant des symptômes de CMD. Les pistes 7-8-9-10-C correspondent aux témoins positifs.

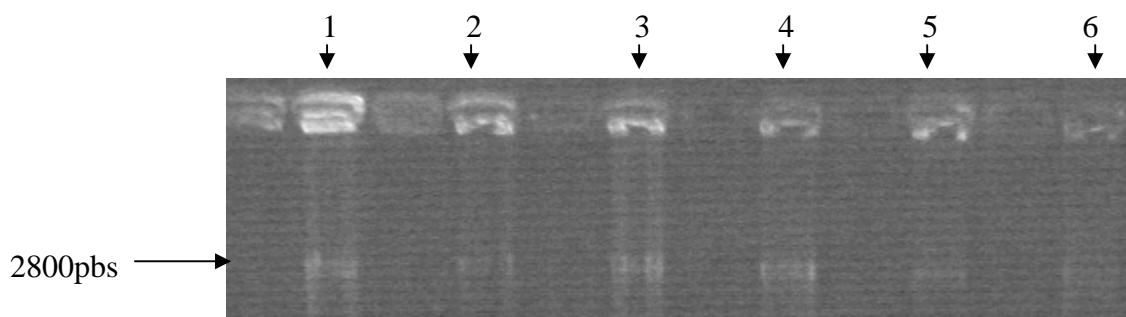


Figure 19 : Gel d'électrophorèse des monomères d'ADN double brin viraux après digestion *Bam*HI de l'amplification en cercle roulant obtenue par TempliPhi. La flèche montre l'emplacement des ADN viraux d'environ 2800pbs.

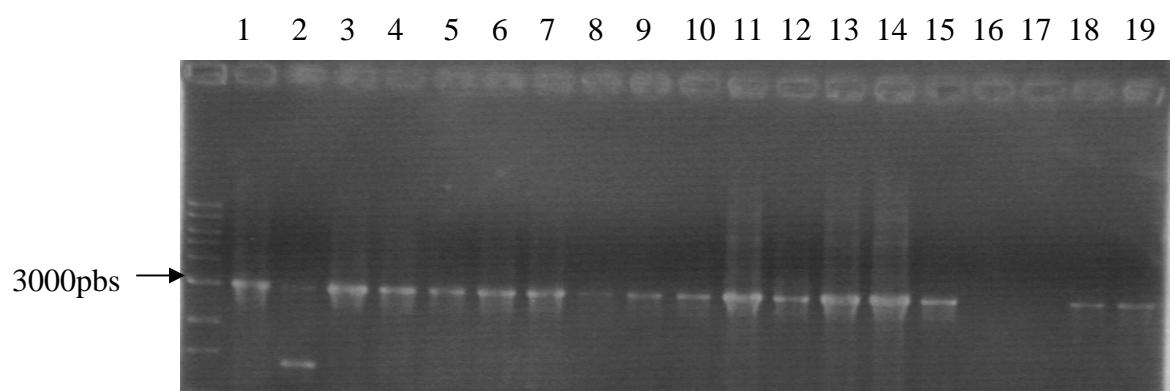


Figure 20 : Gel d'électrophorèse illustrant le tri des colonies blanches par PCR avec les amorces universelles M13F et M13R. La flèche indique la taille des inserts d'environ 3kb correspondant à la taille des génomes viraux (environ 2800pbs) et de la cassette de clonage (300 pbs).

phylogénétique (Figure 21). L’arbre phylogénétique montre que les deux pieds mères de manioc étaient contaminés par l’ACMV et les isolats malgaches d’ACMV (MGA5 ACMV et MGC13 ACMV) présente un niveau de similarité ou d’apparentement le plus élevé (100%) avec l’isolat ACMV de Tanzanie (ACMV-TZ) (Figure 21).

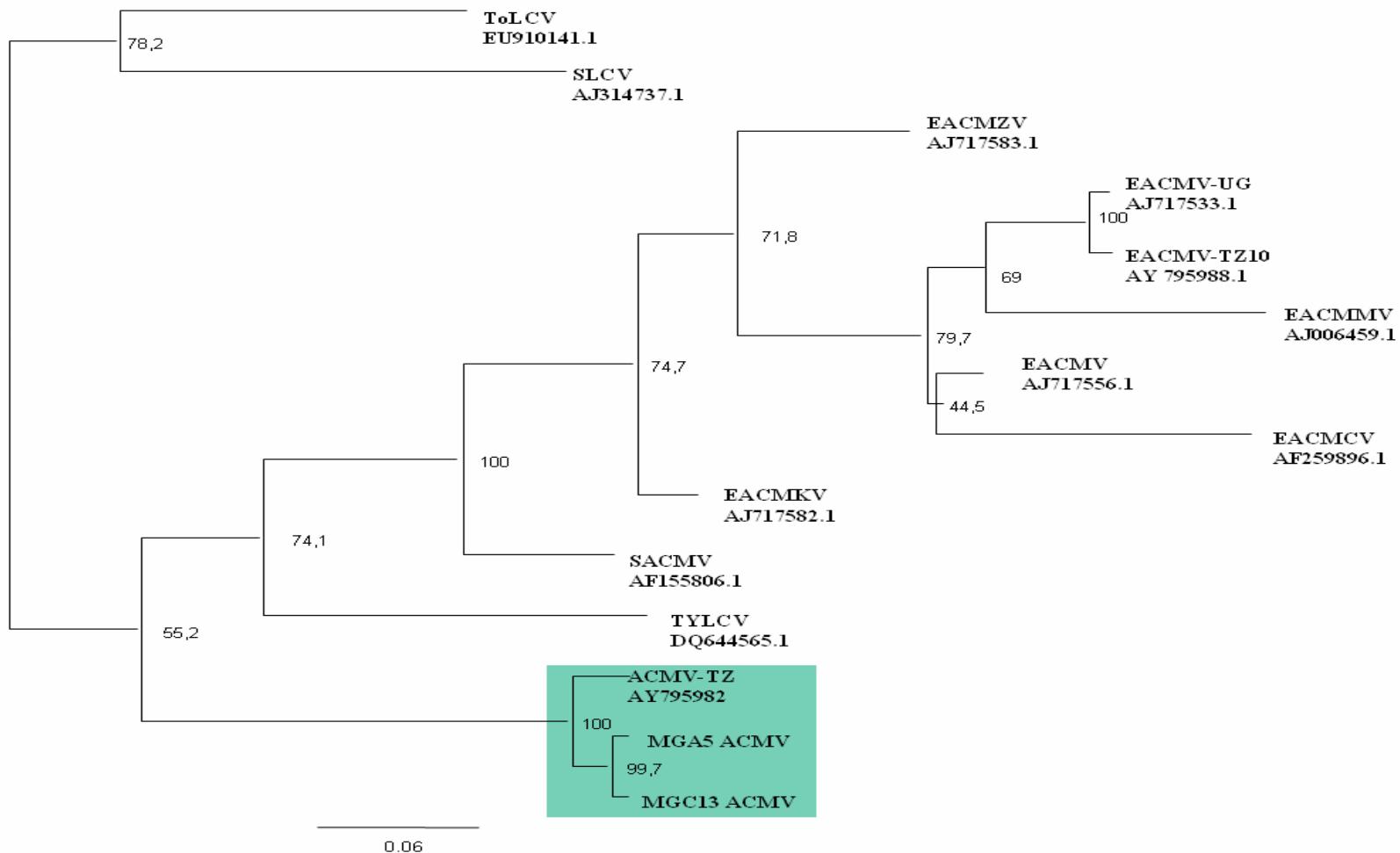


Figure 21 : Arbre construit par la méthode du plus proche voisin indiquant les relations phylogénétiques entre les isolats d'ACMV de Madagascar avec les séquences de référence en Afrique. L'arbre a été enraciné par une séquence asiatique : SLCMV et une séquence de virus de tomate (ToLCV). Les nombres associés avec les nœuds indiquent le pourcentage de fois où ces nœuds ont été retrouvés après 1000réplications de bootstrap.

V- DISCUSSION

- Diversité et Distribution des CMGs à Madagascar

L’analyse de similarité des 90 séquences nucléotidiques partielles de la Rep obtenues à partir des 104 échantillons confirme la présence à Madagascar des trois principaux types génomiques de begomovirus impliqués dans la CMD en Afrique : l’*African cassava mosaic virus* (ACMV), l’*East African cassava mosaic virus* (EACMV) et le *South African cassava mosaic virus* (SACMV) (tableau 3), conformément à ce qui a été décrit par Ranomenjanahary *et al.* (2002). Exception faite de l’Afrique du Sud (Berry et Rey, 2001), Madagascar représente actuellement la seule région au monde où ces trois espèces virales ont été décrites et correspond de ce fait à un « *hot spot* » de diversité génétique des begomovirus responsables de la CMD en Afrique.

La présence d’une importante diversité virale, l’absence apparente de structuration géographique de la diversité génétique des CMGs et le chevauchement des aires de répartition des trois espèces virales (figure 15) représente des conditions idéales pour l’émergence d’un variant sévère par recombinaison interspécifique et présente un risque épidémiologique majeur pour la culture du manioc malgache. En effet, l’épidémie sévère de la CMD qui sévit depuis une vingtaine d’années en Afrique de l’Est et qui s’est étendu en Afrique Centrale (Legg et Fauquet, 2004), résulte premièrement de l’émergence d’un nouveau variant nommé « variant Ougandais » (EACMV-UG) issu de la recombinaison interspécifique entre l’ACMV et l’EACMV (Zhou *et al.*, 1997), et deuxièmement de la synergie entre le EACMV-UG et l’ACMV sur la sévérité de la CMD (Legg et Fauquet, 2004). D’autres exemples ont récemment permis de montrer l’implication de nouvelles espèces de begomovirus issus de recombinaisons interspécifiques et présentant des phénotypes pathologiques plus agressifs que ceux de leur parents. C’est notamment le cas du *Tomato yellow leaf curl Malaga virus* et du *Tomato yellow leaf curl Axarquia virus* responsables d’une épidémie sévère de la maladie du jaunissement et de l’enroulement foliaire de la tomate dans le sud de l’Espagne depuis ces dix dernières années (Monci *et al.*, 2002 ; Garcia-Andres *et al.*, 2007).

Les données de séquences nucléotidiques partielles de la Rep ont permis de caractériser une importante diversité à Madagascar. Néanmoins, ces séquences partielles ne

permettent pas d'identifier la présence du variant Ougandais à Madagascar sachant que seule la région centrale de la CP, qui correspond à la zone de recombinaison entre l'EACMV et l'ACMV, est capable de diagnostiquer le variant sévère. L'acquisition de séquences de génomes complets de CMGs malgaches permettra à terme de répondre à cette question.

Le mode de multiplication du manioc par bouturage semble jouer un rôle primordial dans la dissémination à courte et à longue distance des CMGs, dans la distribution des populations virales actuellement caractérisée à Madagascar et l'accumulation au cours du temps d'un fardeau viral. En effet, la présence d'importantes populations d'aleurodes vectrices sur les cultures de manioc et la forte corrélation entre la densité des populations d'aleurodes et la sévérité des symptômes observée récemment lors d'une mission de collecte réalisée dans le sud de Madagascar (Mai 2009), suggère l'existence sur le terrain d'infections mixtes et de possibles phénomènes de synergie. L'importance des contaminations mixtes et de la synergie virale reste cependant à confirmer et représente une des perspectives immédiates de ce travail.

- Origine et Histoires évolutives des CMGs

La répartition *a priori* aléatoire de la diversité des CMGs à Madagascar ne suggère pas que la CMD soit le fruit d'une introduction récente de l'une ou l'autre espèce virale et sa diffusion sur le territoire malgache par l'intermédiaire de manioc contaminé. L'hypothèse qui semble la plus vraisemblable c'est que ces virus soient indigènes de Madagascar et que leur diversification et leur distribution géographique soient antérieures à l'introduction au 18^{ème} siècle du manioc à Madagascar. Ces interrogations sur l'origine des CMGs soulèvent également la question des plantes hôtes réservoirs des ancêtres des virus actuels à l'origine du saut d'espèce entre les plantes indigènes et les plantes cultivées de manioc du Nouveau Monde. Très peu de données sont actuellement disponibles sur la gamme de plantes réservoirs des CMGs à Madagascar et en Afrique en général.

La présence majoritaire à Madagascar de l'ACMV alors que cette espèce virale était jusqu'alors principalement décrite en Afrique de l'Ouest (Ndunguru *et al.*, 2005), remet en cause la distribution géographique de la diversité des CMGs initialement décrite : EACMV en Afrique de l'Est et du Sud, ACMV en Afrique de l'Ouest et le SACMV en Afrique du Sud et à Madagascar. De plus, la présence des trois types génomiques de CMGs africains (ACMV,

EACMV et SACMV) à Madagascar et l'absence du SACMV en Afrique de l'Est ne conforte pas l'hypothèse émise récemment qui suggère que l'Afrique de l'Est représente le centre d'origine et de diversification des CMGs (Ndunguru *et al.*, 2005).

L'obtention de séquences de génomes complets des CMGs de Madagascar permettra à terme d'étudier l'histoire évolutive des populations virales malgaches et les événements de recombinaison interspécifiques qu'ils ont subi. Une des perspectives immédiate serait de pouvoir identifier les facteurs moléculaires à l'origine de l'épidémie très sévère de CMD qui affecte actuellement les régions côtières sud de Madagascar et de l'épidémie très grave de CMD qui a affecté les cultures de manioc à Madagascar dans les années 1930s. Dans les deux cas, l'implication potentielle d'un variant recombinant sévère et de la synergie virale représentent des hypothèses fortes.

- L'efficacité de la thermothérapie

Le protocole d'assainissement des boutures de manioc par thermothérapie a été validée sur la variété Pemba avec 66 à 67% de plantules saines produites (efficacité de traitement) quelque soit les classes de boutures traitées. Néanmoins, il semblerait que les boutures issues du bois le plus jeune (classe 3) supportent mieux les effets négatifs du traitement thermique (78% de survie) (figure 17).

En plus de l'effet dénaturant sur le virus avec la déstabilisation de la particule virale et l'inactivation de la replicase virale (Dawson, 1976), la thermothérapie semble également agir sur l'agressivité virale. En effet, une importante diminution du degré de sévérité de la maladie sur les plantes virosées issues de la thermothérapie est observée (figure 16). Ainsi, la majorité des plantules symptomatiques post-traitements (78%) présente un indice de sévérité de degré 1 selon l'échelle de Cours alors qu'ils sont issus de plantes mères présentant un indice de sévérité de degré 4 (50 à 80% de la surface foliaire attaquée). Ces résultats confirment les effets négatifs de la thermothérapie sur la virulence et vraisemblablement sur la multiplication virale. Aussi, la diminution de la sévérité des symptômes de CMD implique l'amélioration de la structure foliaire siège de l'activité photosynthétique. Même si à l'heure actuelle, aucune donnée quantitative ne permet d'étayer clairement ce dernier point, nos résultats expérimentaux sur l'amplification de l'ADN viral par la polymérase Phi 29 et la révélation sur gel des monomères de génomes viraux suggèrent effectivement une charge virale plus

importante dans les échantillons foliaires issus des pieds mères que des pieds filles (Figure 19).

- Importance de la thermothérapie

Faces aux exigences culturelles et culinaires de la population paysanne, la thermothérapie représente une technique très avantageuse d'assainissement des variétés locales de manioc du fait de son efficacité et de sa facilité de mise au point et d'utilisation. En effet, les paysans sont très souvent attachés à leurs variétés locales mêmes s'il s'avère qu'elles sont très sensibles aux CMGs et qu'elles produisent peu de tubercules sous l'effet de la CMD. La thermothérapie offre à cet effet, le moyen d'assainir les variétés locales appréciées. En plus, c'est une méthode simple et peu coûteuse adaptée au peu de moyens que possèdent les cultivateurs malgaches. D'autre part, face à l'utilisation de variétés sélectionnées pour leur résistance à la CMD ou des OGMs, et l'appauvrissement génétique des plantes cultivées, la méthodologie d'assainissement par thermothérapie représente un outil pour lutter contre la perte de la diversité génétique du manioc et des variétés locales.

Malgré l'efficacité et la simplicité de la mise en œuvre de la thermothérapie, les plantules saines produites ne seront pas à l'abri des possibilités de recontamination par l'insecte vecteur *B. tabaci*. Néanmoins, les études menées par Fauquet *et al.*, en 1988, ont montré qu'une plante de manioc obtenu à partir de boutures contaminées (avant plantation) perd beaucoup plus de production (55 à 77 %) qu'une plante contaminée par *B. tabaci* (après plantation) même si la contamination a lieu précocement. Ces résultats confirment l'intérêt d'une méthode d'assainissement du matériel végétal comme la thermothérapie malgré les risques de recontamination en plein champ par l'insecte vecteur. D'autre part, le mode de contamination joue un rôle important sur le rendement et représente un élément important dans la mise au point d'une stratégie de lutte à long terme contre la CMD. En effet, des travaux antérieurs ont permis de démontrer une corrélation positive entre le degré de sévérité de la CMD et les pertes de rendement de la culture de manioc (Fauquet *et al.* 1988). Les plantes issues des boutures saines produisent 50% de récolte en plus qu'une bouture infectée.

L'assainissement des boutures de manioc associé aux techniques culturales améliorées comme l'utilisation d'engrais biologiques (Ranomenjanahary *et al.*, 1997), et le développement des périmètres d'irrigation surtout pour les régions à longue saison sèche,

devrait favoriser l'augmentation du rendement et de la qualité des tubercules et des feuilles comestibles. En outre, la pérennité de l'assainissement du matériel par thermothérapie doit être combinée avec une technique de contrôle des populations d'insectes vecteurs à fin de limiter la vitesse de recontamination du matériel végétal.

VI- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L’analyse moléculaire effectué sur un effectif régional d’échantillons foliaires de manioc présentant des symptômes de la CMD a permis de diagnostiquer la présence de trois types génomiques de begomovirus à Madagascar : l’ACMV, l’EACMV et le SACMV qui sont les principaux virus responsables de la maladie de la mosaïque du manioc en Afrique. Les résultats du séquençage partiel de la Rep et l’alignement des séquences obtenues ont servis à construire une matrice de similarité et un arbre phylogénétique mettant en évidence les liens de parentés des isolats de Madagascar avec ceux de l’Afrique. Ces analyses ont permis de montrer l’existence d’un lien de parenté entre les isolats viraux de Madagascar (supérieur au seuil de distinction taxonomique de 89%) et les isolats africains de CMGs de références. L’analyse de la distribution géographique des isolats malgaches de CMGs suggère l’absence de structuration géographique de la diversité génétique des CMGs et le chevauchement des aires de répartition des virus. En effet, les trois types génomiques viraux sont répartis *a priori* aléatoirement dans les régions étudiées et aucune région ne semble épargnée par l’une ou l’autre espèce virale.

Face à l’importance de la culture du manioc pour le paysannat malgache et les pertes de rendement associées à la CMD, l’efficacité de la thermothérapie comme moyen d’assainissement du matériel virosé est étudiée sur une variété douce, populaire et très sensible nommée « Pemba ». Le protocole de thermothérapie, préalablement optimisé par Ranomenjanahary (non publiés, 47°C pendant 30 minutes), a permis d’obtenir un taux élevé de plantules sains (66-67%), avec une importante diminution du degré de sévérité des symptômes de CMD de 4 à 1 (échelle de Cours), pour les plantules virosées issus des boutures thermotraitées. D’autre part, les boutures thermotraitées issues du bois le plus jeune (classe 3) supportent mieux le traitement avec 78% de débourrement. L’application de cette méthode d’assainissement simple et peu coûteuse sur le terrain, combinée avec des techniques de culture améliorées et le contrôle des populations d’aleurodes vectrices, dans le but de limiter la recontamination des plantes, devraient favoriser la lutte contre la maladie de la mosaïque, et ainsi augmenter la production de manioc en tubercules et en feuilles.

La présence d’une importante diversité virale, l’absence apparente de structuration géographique de la diversité génétique des CMGs et le chevauchement des aires de répartition des trois espèces virales représente des conditions idéales pour l’émergence d’un variant

sévère par recombinaison interspécifique et présente un risque épidémiologique majeur pour la culture du manioc malgache. Cependant, les données de séquences nucléotidiques partielles ne permettent pas actuellement d'identifier la présence du variant Ougandais (EACMV-UG), ou l'existence d'autres variants recombinants sévères à Madagascar. Par conséquent, l'acquisition de séquences de génomes complets de CMGs malgaches devrait permettre à terme de répondre à de nombreuses interrogations à la fois sur l'épidémiologie de la CMD à Madagascar mais également sur l'histoire évolutive des populations virales malgaches et les évènements de recombinaison interspécifiques qu'ils ont subi. D'autre part, seul un inventaire complet de la pression parasitaire virale permettra d'initier avec clairvoyance des programmes de sélection et d'assainissement des variétés locales de manioc. En effet, la production de boutures saines des variétés locales assainis par thermothérapie avec des rendements élevés semble être une des portes de sortie pour assurer à la fois la sécurité alimentaire du paysannat malgache et la valorisation industrielle sous forme de farine.

VIII- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASTIER, S., ALBOUY, J., MAURY, Y., LECOQ, H. 2001. Principes de virologie végétale. Génome, pouvoir pathogène et écologie des virus. Eds INRA, 439p.
- BECK, B.D.A. and CHANT, S.R. 1958. A preliminary investigation on the effect of mosaic virus on *Manihot utilissima* Pohl in Nigeria. *Tropical agriculture, Trinidad*, 59-64. *Review of applied Mycology* 37, 627.
- BERRY, S. and REY, M.E.C. 2001. Molecular evidence for diverse populations of cassava-infecting begomoviruses in Southern Africa. *Arch Virol* 2001 146: 1795-1802.
- BLANCO, L., BERNAD, A., LAZARO, J.M., MARTIN, G., GARMENDIA, C. and SALAS, M. 1989. Highly Efficient DNA Synthesis by the phage phi29 DNA Polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol.Chem.*, 264: 8935-8940.
- BIRD, J. and MARAMOROSCH, K. 1978. Viruses and virus diseases associated with whitefly. *Advanced in virus research*. 22, 55-110.
- BIGARRE, L. 1999. Diversité des géminivirus et interactions avec leurs hôtes. Thèse de doctorat, Université Paris XI, Paris, 118p.
- BROWN, J.K., IDRIS, A.M., TORRES JEREZ, I., BANKS, G.K. and WYATT, S.D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of virology* 146, 1581-1598.
- BULL, S.E., BRIDDON, R. W., SSERUBOMBWE, W.S., KAHIU NGUGI, MARKHAM, P.G. and STANLEY, J. 2006. Genetic diversity and phylogeography of cassava mosaic viruses in Kenya. *Journal of general virology* 87, 3053-3065.
- CHANT, S.R. and BECK, B.D. 1959. The effect of cassava mosaic virus on the anatomy of cassava leaves. *Tropical agriculture, Trinidad* 36, 231-236.

CHANT, S.R., BATEMAN, J.G., and BATES, D.C. 1971. The effect of cassava mosaic virus infection of the metabolism of cassava leaves. *Tropical agriculture, Trinidad* 48, 263-270.

CORBAZ, R. 1990. Principe de phytopatologie et de lutte contre les maladies des plantes. Eds Presses polytechniques et universitaires romandes, 286p.

COURS, G. 1951. Le manioc à Madagascar. Mémoire de l'institut scientifique de Madagascar, série B, Tome III, fascicule 2, 400p.

DARLU, P. and TASSY, P. 1993. La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes. Paris, Masson, 245p.

DAWSON, W.O. 1976. Synthesis of TMR RNA at restrictive high temperatures. *Virol.*, 73, 319-326.

DELATTE, H., REYNAUD, B., GRANIER, M., THORNARY, L., LETT, J.M., GOLDBACH, R. & PETERSCHMITT, M. 2005. A new silverleaf inducing biotype Ms of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) indigenous of the islands of the south-west Indian Ocean. *Bulletin of Entomological research* 95, 29-35.

DOSTIE, B., RANDRIAMAMONJY, J., RABENASOLO, L. 1999. La filière manioc : amortisseur oublié des vulnérables. Institut national de la statistique 1999.

DUBERN, J. 1976. La mosaïque du manioc : bilan des connaissances actuelles. Rapport ORSTOM, 29p.

FAO 2006. <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>.

FAUQUET, C., FARGETTE, D., THOUVENEL, J.C. 1988. Impact de la mosaïque africaine du manioc sur la croissance et le rendement du manioc. In : *Actes ; Séminaire internationale sur la mosaïque africaine du manioc et son contrôle*, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, 4-8 Mai 1987, pp. 19-22.

FAUQUET, C., FARGETTE, D. 1990. African cassava mosaic virus: etiology, epidemiology and control. *Plant disease* 74, 404-411.

FAUQUET, C.M., STANLEY, J. 2003. Geminivirus classification and nomenclature, progress and problems. *Annals of Applied Biology* 142, 165-189.

FAUQUET, C.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., MORIONES, E., STANLEY, J., ZERBINI, M. and ZHOU, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of virology* (2008), 153 : 783-821.

FRANCOIS, E. 1937. Un grave péril: la mosaïque du manioc. *Agron. Coloniale* 26, 33–38.

GARCIA-ANDRES, S., TOMAS, D. M., SANCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J. and MORIONES, E. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated begomoviruses. *Virology* 359, 302–312.

HUSAIN, M.A., and TREHAN, K. N. 1933. Observations on the life-history, bionomics and control of whitefly of cotton (*Bemisia gossypiperda* M. & L.). *Indian Journal of Agricultural Science* 3: 701 – 753.

INOUE-NAGATA, A.K., ALBUQUERQUE, L.C., ROCHA, W.B., NAGATA, T. 2004. A simple method for cloning the complete begomovirus genome using the bacteriophage Phi 29 DNA polymerase. *J Virol Methods* 116(2): 209-211.

JONES, W.O. 1959. Manioc in Africa. University Press Stanford, California, 315p.

JONES, D.R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 109, 195-219.

KIELECZAWA, J. 2006. DNA sequencing II: optimizing preparation and clean up. Édition2 illustrée, eds. Jones & Bartlett Publishers, 362 p.

LEFEUVRE, P., DELATTE, H., NAZE, F., DOGLEY, W., REYNAUD, B. and LETT, J.M. 2007. A new tomato leaf curl virus from the Seychelles archipelago. *Plant pathology*, **56** (2): 342.

LEGG, J.P. and THRESH, J.M., 2000. Cassava mosaic virus disease in East Africa: a dynamic disease in a changing environment. *Virus research* 71 (1-2): 135-149.

LEGG, J.P. and FAUQUET, C.M. 2004. Cassava mosaic geminiviruses in Africa. *Plant molecular biology* 2004, 56(4): 585-99.

LIU, H., BOULTON, M.I. and DAVIES. 1997. Maize streak virus coat protein binds single and double stranded DNA in vitro. *Journal of general virology* 78 (Pt 6): 1265-1270.

MARKAM, P. G., BEDFORD, S. L., and PINNER, M. S. 1994. The transmission of geminivirus by *Bemisia tabaci*. *Pestic. Sci.* 1994, 42: 123 - 128.

MASSALA, R. 1984. La mosaïque africaine du manioc au Congo: importance, distribution, méthode de lutte. In : Actes ; *Séminaire International sur la Mosaïque Africaine du Manioc et son Contrôle*, Yamoussoukro (Cote d'Ivoire), 4-8 May 1987, Fauquet, C Fargette, D.(eds), Paris (France) 1988, p. 13-17.

MINK, G.I., WAMPLE, R., HOWELL, W.E. 1997. Heat treatment of perennial plants to eliminate phytoplasmas, viruses and viroids while maintaining plant survival. In: *Plant virus disease control*, Hadidi A., Khetarpal R.K., Koganezawa H. eds., APS Press, St Paul, Minnesota, USA, 332-345.

MONCI, F., SANCHEZ-CAMPOS, S., NAVAS-CASTILLO, J. and MORIONES, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Phytopathology* 303,317-326.

NDUNGURU, J., LEGG, J., AVELING, T., THOMPSON, G. and FAUQUET C. 2005. Molecular biodiversity of cassava begomoviruses in Tanzania: evolution of cassava

geminiviruses in Africa and evidence for East Africa being a center of diversity of cassava geminiviruses. *Virology Journal* 2 (1): 21.

OECD Publishing: Organisation for Economic Co-operation and Development. Section de traduction française 1999. Glossaire de l'agriculture: anglais/français. Édition2, Éd. OECD Publishing, 599p.

PADIDAM, M., BEACHY, R.N. and FAUQUET, C.M. 1995. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *Journal of General virology* 76 (Pt 2): 249-63.

PADIDAM, M., SAWYER, S. and FAUQUET, C.M. 1999. Possible emergence of new viruses by frequent recombination. *Virology* 265, 218-225.

RANOMENJANAHARY, S., RABINDRAN, R., ROBINSON, D.J. 2002. Occurrence of three distinct begomoviruses in cassava in Madagascar. *Ann. Appl. Biol.* (2002). 140: 315-318.

RAISON, J.P. 1972. L'introduction du manioc à Madagascar: un problème non résolu. *Terre Malgache* (13) : 223-228.

SAITOU, N. and NEI, M. 1987. The neighbour joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular and biological evolution* 4, 406-425.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual. Edition 3, ed. CSHL Press, 2100p.

SAUNDERS, K., LUCY, A. and STANLEY, J. 1991. DNA forms of the géminivirus African cassava mosaic virus consistent with a rolling circle mechanism of replication. *Nucleic Acids Res* 19 (9): 2325-2330.

STOREY, H. H., and NICHOLS, R. F. W. 1938. Studies on the mosaic of cassava. *Ann. Appl. Biol.* 25: 790 - 806

SWANSON, M.M., HARISSON, B.D. 1994. Properties, relationships and distribution of cassava mosaic geminiviruses. *Tropical science* 34, 15-25.

THRESH, J.M., OTIM-NAPE, G.W., FARGETTE, D. 1998b. The control of African cassava mosaic virus disease: phytosanitation and/or resistance? In: Hadidi A, Khetarpal, RK, Koganezawa H, eds. *Plant virus disease control*. St Paul, MN, USA: APS Press, 670-677.

THRESH, J.M, COOTER, R.J. 2005. Strategies for controlling cassava mosaic disease in Africa. *Plant Pathol.* 2005; 54:587–614.

VOHIZY, R.G. J. 2001. Etude de l'impact de la thermothérapie des boutures et de l'apport de cendres sur le développement du plant de manioc. Mémoire de DEA, Univ. d' Antananarivo, 47p.

ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUÑOZ, C., OTIM-NAPE, G. W., ROBINSON, D.J. and HARRISON B.D. 1997. Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *Journal of general virology* 78, 2101-11.



ANNEXES



Photo 1 : Un plant de manioc atteint de la maladie de la mosaïque.



Photo 2 : L'insecte vecteur *Bemisia tabaci*.



Photo 3 : Des plantules saines obtenues après thermothérapie des boutures.



Photo 4 : Des plantules montrant des symptômes de la CMD après thermothérapie des boutures.

Annexe 1 : Echelle de la gravité du symptôme selon Cours G. (1951) :

échelle	Intensité du symptôme	Effet sur la plante
0	Aucun symptôme	Pas de mosaïque sur les feuilles
1	1 à 10% de la surface foliaire attaquée	La plante se développe normalement, mais les feuilles présentent des panachures dont l'action ne modifie pas la forme du lobe.
2	10 à 30% de la surface foliaire attaquée	La plante a un port normal, mais l'aspect du lobe est altéré par l'abondance des taches jaunes.
3	30 à 50% de la surface foliaire attaquée	La plante conserve son port habituel, mais il est plus réduit que chez les individus normaux. Presque toutes les feuilles sont atteintes.
4	50 à 80% de la surface foliaire attaquée	Les bois se court-nouent. La plante rabougrie prend un port érigé et le limbe est gaufré.
5	80 à 100% de la surface foliaire attaquée	Les rameaux court-noués sont à peine développés. Les feuilles réduites au 1/10 de leur surface ne fonctionnent presque plus.

Source : Mémoire de DEA Vohizy, 2001.

Annexe 2 : Les échantillons de feuilles de manioc virosées utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des begomovirus.

Identifiant taxonomique	Identifiant Laboratoire	Localité	Variétés de manioc
132MG	132_MT050106	Antananarivo/collection Ambatobe/origine Lac Alaotra	H 63
132bMG	132b_MT050106	Antananarivo/collection Ambatobe/origine Lac Alaotra	ND
133MG	133_MI131205	Iboaka	ND
134MG	134_MI141205	Iboaka	ND
135MG	135_MI141205	Iboaka	ND
136MG	136_MI141205	Iboaka	ND
137MG	137_MF121205	Fianarantsoa	ND
138MG	138_MF121205	Fianarantsoa	ND
139MG	139_MF121205	Fianarantsoa	ND
140MG	140_MTu050106	Toliary	ND
141MG	141_MTu050106	Toliary	ND
142MG	142_Mtu050606	Toliary	ND
143MG	143_MTu050106	Toliary	ND
144MG	144_MTu050106	Toliary	ND
145MG	145_MT050106	Antananarivo	madarasy
146MG	146_MT050106	Antananarivo	madarasy
147MG	147_MAni310306	Anivorano Mahitsy	ND
148MG	148_Mamb260306	Ambatomanjaka	ND
149MG	149_Mamb280306	Ambatomanjaka	ND
150MG	150_Mant060406	Antandrokomby	ND
151MG	151_Mant060406	Antandrokomby	ND
152MG	152_MTa050106	Toamasina	ND
153MG	153_Mani310306	Anivorano Mahitsy	ND
190MG	190_MAmba171106	Ambatolampy	ND
191MG	191_MFa181106	Fanandrama	ND
192MG	192_MTa181106	Toamasina Mangarano	ND
193MG	193_MFa181106	Fanandrama	ND

194MG	194_MIv201106	Ivoloina	ND
195MG	195_MAmba161106	Ambatolampy	ND
196MG	196_MFa181106	Fanandrama	ND
197MG	197_MA nk161106	Ankerana	ND
198MG	198_MIvo201106	Ivoloina	ND
199MG	199_MIv201106	Ivoloina	ND
200MG	200_MA nk161106	Ankerana	ND
201MG	201_MA nt211106	Antsirabe	ND
202MG	202_MFa181106	Fanandrama	ND
203MG	204_MFa181106	Fanandrama	ND
204MG	205_MA nt211106	Antsirabe	ND
205MG	206_MFa181106	Fanandrama	ND
206MG	207_MFa181106	Fanandrama	ND
207MG	208_MTr191106	Tritriva	ND
209MG	209_MT151106	Antananarivo - Ambatobe - Fofifa	Ravoanjo
210MG	210_Mank161106	Ankerana	ND
211MG	211_MAn141106	Anjeva - Ambatomirahavavy	ND
212MG	212_MTa181106	Toamasina Mangarano	ND
213MG	213_MFa181106	Fanandrama	ND
214MG	214_MT151106	Antananarivo - Ambatobe - Fofifa	Ravoanjo
215MG	215_MA mbo151106	Ambohikely	ND
216MG	216_MIv201106	Ivoloina	ND
217MG	217_MFa181106	Fanandrama	ND
218MG	218_MTa181106	Toamasina Mangarano	ND
219MG	219_MFa181106	Fanandrama	ND
220MG	220_MA nk16106	Ankerana	ND
221MG	221_MA nk161106	Ankerana	ND
222MG	222_MFa181106	Fanandrama	ND
223MG	223_MA mbo151106	Ambohikely	ND
224MG	224_MA mboh151106	Ambohidrazana	ND
225MG	225_MA nk161106	Ankerana	ND
226MG	226_MAn141106	Anjeva	ND
226bMG	226b_MT151106	Antananarivo - Ambatobe - Fofifa	ND

227MG	227_MT151106	Antananarivo - Ambatobe - Fofifa	Ravoanjo
228MG	228_Man141106	Anjeva	ND
229MG	229_MFa181106	Fanandrama	ND
230MG	230_MIv201106	Ivoloina	ND
231MG	231_MAnk161106	Ankerana	ND
232MG	232_Man141106	Anjeva	ND
233MG	233_MAmbo151106	Ambohikely	ND
234MG	234_MAmbo151106	Ambohikely	ND
235MG	235_Mant211106	Antsirabe	ND
236MG	236_Tr191106	Tritriva	ND
237MG	237_Mambo151106	Ambohikely	ND
238MG	238_MAmbo151106	Ambohikely	ND
239MG	239_MAnk161106	Ankerana	ND
240MG	240_Mamba171106	Ambatolampy	ND
241MG	241_MAnt211106	Antsirabe	ND
242MG	242_MAnk161106	Ankerana	ND
243MG	243_MAmbo151106	Ambohikely	ND
244MG	244_MAnk161106	Ankerana	ND
245MG	245_MIv201106	Ivoloina	ND
246MG	246_An141106	Anjeva	ND
246MG	246_MAmboh151106	Ambohidrazana	ND
247MG	247_MAmbo151106	Ambohikely	ND
248MG	248_MFa181106	Fanandrama	ND
249MG	249_Mambo151106	Ambohikely	ND
250MG	250_MAmbo151106	Ambohikely	ND
251MG	251_MAn141106	Anjeva	ND
252MG	252_MIv201106	Ivoloina	ND
253MG	253_MAnk161106	Ankerana	ND
254MG	254_MAnk161106	Ankerana	ND
255MG	255_MAnk161106	Ankerana	ND
335MG	MG335_Ambila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	Morgaya
337MG	337_MAmbila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	Morgaya
338MG	338_MAmbila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	Morgaya

339MG	339_MAmbila041106	Ambilalemaitso -Ambava canal	Morgaya
340MG	340_MFe020307	Fenoarivo-Be	Pemba
341MG	341_MFe020307	Fenoarivo-Be	Pemba
342MG	342_MFe020307	Fenoarivo-Be	Pemba
343MG	343_MAmbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	H 506
344MG	344_MAmbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	Miandrazaka
345MG	345_MAmbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	H R2
347MG	347_MAmbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	H R49
348MG	348_MAmbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	H R49
349MG	349_MAmbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	H R43
350MG	350_MAmbato020307	Ambatondrazaka - Lac Alaotra	H R43
ND	1MG090508	Ambatobe-origine Soanierana Ivongo	Pemba
ND	2MG090508	Ambatobe-origine Soanierana Ivongo	Pemba
ND	3MG090508	Ambatobe-origine Soanierana Ivongo	Pemba
ND	4MG120609	Ambatobe-origine Soanierana Ivongo	Pemba
ND	5MG120609	Ambatobe-origine Soanierana Ivongo	Pemba
ND	6MG120609	Ambatobe-origine Soanierana Ivongo	Pemba

ND : non déterminé

H : hybride

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN viral: Kit DNEASY plant (Qiagen)

1. Préchauffer de l'eau distillée à l'étuve (65°C)
2. Broyer 200 à 500 mg de feuilles fraîches (ou 20 mg feuilles en « bos ») avec le broyeur à billes
3. Ajouter 400 µl de tampon AP1 et 4 µl de RNase A (100mg/ml). Vortexer vigoureusement.
NB : Si le Tampon AP1 n'est pas homogène, le passer quelques minutes à 65°C
4. Incuber 10 min à 65°C. Mélanger 2 à 3 fois pendant l'incubation en basculant le tube.
5. Ajouter 130 µl de Tampon AP2, mélanger et incuber 5 minutes dans la glace. Centrifuger 5 minutes à vitesse maximale.
6. Déposer le surnageant sur une colonne mauve et centrifuger 2 minutes à vitesse maximale dans un tube de 2 ml.
7. Transférer ce produit dans un nouveau tube en évitant de remettre en suspension le culot.
8. Ajouter 1,5 fois le volume de tampon AP3/E. Mélanger à la pipette.
9. Déposer 650 µl de ce produit sur une colonne blanche et centrifuger 1 minute à 8 000 rpm dans un tube de 2 ml. Eliminer le surnageant.
10. Répéter l'étape 9 avec le volume restant.
11. Déposer la colonne dans un nouveau tube de 2 ml et ajouter 500 µl de tampon AW. Centrifuger 1 minute à 8000 rpm. Eliminer le surnageant.
12. Ajouter à nouveau 500 µl de tampon AW et centrifuger de nouveau 2 minutes à vitesse maximale pour sécher la colonne.

13. Transférer la colonne dans un tube de 1.5 ml. Déposer 50 μ l d'eau préchauffée à 65 °C. Incuber 5 minutes à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 8 000 rpm.

14. Répéter l'étape 12. Volume final 100 μ l.

Annexe 4 : Kit templiph

L'amplification se fait comme suit :

- ❖ Un volume égal à 2,5 μ l de « sample buffer » est prélevé et déposé dans chaque puit suivant le nombre d'extraits d'ADN.
- ❖ L'extrait d'ADN de volume égal à 3,5 μ l est ensuite ajouté.
- ❖ La dénaturation de l'ADN est effectuée à 95°C pendant 3 minutes au thermocycleur, puis les extraits sont laissés refroidir à 4°C.
- ❖ La fixation des amorces et de l'enzyme Phi 29 sur l'ADN se fait à 30°C. Pour cela, 5 μ l de tampon de réaction et 0,2 μ l d'enzyme Phi 29 ont été ajouté dans chaque extract d'ADN. Le mélange est laissé incuber 5 minutes à cette température.
- ❖ L'elongation se fait dans la même température. Le tout est placé dans le thermocycleur à 30°C pendant 20 heures.
- ❖ L'enzyme Phi 29 est ensuite désactivée à 65°C pendant 10 minutes.
- ❖ Le tout est laissé refroidir à 4°C.

Annexe 5 : Protocole de purification d'ADN sur colonne : Kit GENECLEAN turbo

1. Mesurer le volume d'ADN à purifier dans un tube de 1.5 ml.
2. Ajouter 5 fois ce volume de la solution « Turbo Salt » et mélanger.
3. Transférer < de 600 µl du mélange de l'étape 2 sur la colonne.
4. Centrifuger 30 secondes pour que la solution traverse la colonne. Vider le cache.
5. Ajouter 500 µl de la solution « turbo wash » sur la colonne.
6. Centrifuger pendant 30 secondes. Vider le cache.
7. Centrifuger 4 minutes pour assécher la colonne.
8. Transférer la colonne sur un tube de 1.5 ml et déposer 30 µl de solution « Turbo élution » sur la colonne. Incuber 5 minutes à température ambiante.
9. Centrifuger 1 minute afin de récupérer l'ADN purifié. Jeter la colonne.

Annexe 6: Protocole d'extraction plasmidique : QIA prep Spin Miniprep

Kit

- 1- Préchauffer un tube d'eau HPCL à l'étuve de 65°C.
- 2- Centrifuger la mise en culture bactérienne 10 minutes à 4500 rpm.
- 3- Jeter le surnageant.
- 4- Resuspendre le culot dans 250 µl de tampon P1 et transférer dans un tube de 1.5 ou 2 ml.
- 5- Ajouter 250 µl du tampon P2 et homogénéiser par inversion 4 à 6 fois.
- 6- Ajouter 350 µl du tampon N3 et mélanger immédiatement par inversion 4 à 6 fois.
- 7- Centrifuger 10 min à 14 000 rpm. (préparer les colonnes pendant la centrifugation).
- 8- Mettre le surnageant dans la colonne QIAprep.
- 9- Centrifuger 30 à 60 sec à 14 000 rpm.
- 10- Jeter l'éluat.
- 11- Laver la colonne avec 750 µl de tampon PE et centrifuger 30 à 60 sec à 14 000 rpm.
- 12- Jeter l'éluat.
- 13- Centrifuger à nouveau 1 minute à 14 000 rpm afin de bien sécher la colonne.
- 14- Ajouter 50 µl d'eau HPLC préchauffée à 65°C.
- 15- Attendre 5 minutes.
- 16- Centrifuger de nouveau 1 minute à 14 000 rpm.
- 17- Récupérer l'eau contenant l'ADN.

Annexe 7 : Préparation des milieux

Préparation du gel d'agarose 1% :

- Peser 1g d'agarose dans un Erlenmeyer,
- Ajouter 100ml de tampon TAE,
- Faire bouillir le mélange jusqu'à dilution de l'agarose,
- Couler le liquide dans un plateau électrophorèse,
- Laisser le mélange se solidifier.

Préparation du gel d'agarose 0,7% :

- Peser 0,7g d'agarose dans un Erlenmeyer,
- Suivre le même protocole que celui du gel d'agarose 1%.

Préparation du milieu LB :

Pour 1litre de milieu liquide :

Trypone ou pastone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	10g
Agar	16g (pour un milieu solide)

pH 7,2

Tableau 4 : Résultats obtenus lors de l'application de la thermothérapie sur les boutures de la variété « Pemba »

Types de boutures	Classes de boutures	Nombre de boutures cultivées	Taux de débourrement	Taux de plantules saines obtenues	Nombre de plantules infectées suivant le degré d'infection			
					Degré 1	Degré 2	Degré 3	Degré 4
Boutures aoutées	Classe 1	36	58,33% (21)	66,66% (14)	5	2	0	0
Boutures semi-aoutées	Classe 2	44	70,45% (31)	67,74% (21)	17	1	0	2
Boutures jeunes	Classe 3	59	77,96% (46)	67,39% (31)	13	2	0	0
Total	-	139	70,50% (98)	67,34% (66)	25 (78,12%)	5 (15,62%)	0%	2 (6,25%)

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET ECOLOGIE VEGETALES

« La maladie de la mosaique du manioc à Madagascar : Diversité génétique des begomovirus et thermotherapie »

Présenté par : **HARIMALALA Mireille Aurelie**

RESUME

La maladie de la mosaique du manioc (CMD) est devenue ces dernières années un problème majeur sur les cultures de manioc à Madagascar. Les pertes de rendement occasionnées par la CMD et les impacts sur la malnutrition des paysans malgaches sont considérables. Cette maladie est associée à l'infection virale par des géminivirus appelés *Cassava mosaic geminivirus* (CMGs) qui sont transmis par l'insecte vecteur *Bemisia tabaci*. Face à cette situation épidémique, la caractérisation moléculaire du ou des agents pathogènes responsables de la CMD à Madagascar et l'identification d'une méthode d'assainissement des variétés locales virosées sont devenues nécessaires.

A partir des prélèvements d'échantillons foliaires de manioc présentant des symptômes de la CMD, des travaux de détection, d'amplification par PCR et de sequençage direct de la région Rep de l'ADN viral ont été effectués. L'analyse des relations phylogénétiques à partir des séquences nucléotidiques virales ont permis de détecter la présence des trois principaux génotypes de CMGs à Madagascar : ACMV, EACMV et SACMV. Ces trois espèces virales représentent respectivement 62%, 10% et 28% des échantillons. L'analyse de la distribution géographique des isolats malgaches de CMGs suggère l'absence de structuration géographique de la diversité génétique des CMGs et le chevauchement des aires de répartition des virus. L'efficacité de la thermothérapie comme moyen d'assainissement du matériel virosé a été testée sur une variété locale, douce, populaire et très sensible à la CMD. Le protocole de thermothérapie (47°C pendant 30 minutes), a permis d'obtenir un taux élevé de plantules sains (66-67%), avec une importante diminution du degré de sévérité des symptômes de CMD de 4 à 1 (échelle de Cours), pour les plantules virosées issues des boutures thermotraitées. L'application de cette méthode d'assainissement simple et peu coûteuse sur le terrain a été discutée.

Mots clés : Mosaïque du manioc, geminivirus (CMGs), phylogenie, thermotherapie, séquençage d'ADN

Rapporteurs : Professeur RANOMENJANAHARY Sahondramalala

Docteur Jean Michel LETT

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

« The cassava mosaic disease in Madagascar : genetic diversity of begomoviruses and Thermotherapy »

By: **HARIMALALA Mireille Aurelie**

ABSTRACT

Cassava mosaic disease became in recent years a major problem on cassava crop in Madagascar. Yield loss caused by the CMD and the impact on Malagasy farmers malnutrition are considerable. This disease is associated with viral infection by geminiviruses called *Cassava mosaic geminiviruses* (CMGs) that are transmitted by the vector insect *Bemisia tabaci*. Facing this epidemic situation, the molecular characterization of pathogen responsible of CMD in Madagascar and the identification of a sanitization therapy of local cassava varieties became necessary.

From Malagasy cassava leaves samples showing symptoms of CMD, a diagnostic by PCR amplification and a direct sequencing of the region Rep of viral DNA were performed. The analysis of phylogenetic relationship based on viral nucleotid sequences were used to detect the presence of three major genotypes of CMGs in Madagascar: ACMV, EACMV and SACMV. These three viral species represent respectively 62%, 10% and 28% of the samples. The analysis of geographical distribution of Malagasy isolates of CMGs suggest the absence of geographical structures of CMGs genetic diversity and an overlapping range of viruses. The effectiveness of heat therapy as mean for affected plants clean up was tested on a local, sweet, popular and highly susceptible variety to CMD. The protocol of thermotherapy (47°C for 30 minutes), achieved a high rate of healthy seedlings (66-67%), with a significant reduction in the level of CMD symptom severity from 4 to 1 (Cours scale) for the infected seedlings. The application of this simple and inexpensive sanitizing method in the field was discussed.

Key words: *Cassava mosaic geminivirus*, phylogeny, thermotherapy, DNA sequencing

Advisors: Professeur RANOMENJANAHAHARY Sahondramalala

Docteur Jean Michel LETT