

ACADEMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITE MONTPELLIER II

SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

# THESE

présentée à l'Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc  
pour obtenir le diplôme de DOCTORAT

SPECIALITE : PHYSIOLOGIE

Formation doctorale : **Bases de la Production Végétale**

Ecole doctorale : **Biologie des Systèmes Intégrés-Agronomie-Environnement**

**LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME :  
ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES AU BURKINA FASO  
ET VARIABILITE DU VIRUS**

*par*

*Cica GOUDOU-SINHA épouse URBINO*



21 JUIN 1995

soutenue le **04 Février 1995**

devant le Jury composé de :

M. BERGOIN Max, Professeur, Montpellier II	: Président
M. DEGRAS Lucien, Directeur de Recherches INRA	: Rapporteur
M. THOUVENEL Jean Claude, Directeur de Recherches ORSTOM	: Rapporteur
M. DUBERN Jean, Chargé de Recherches, ORSTOM	: examinateur
M. KONATE Gnissa, Maître de Recherches, INERA, Burkina Faso	: examinateur
M. QUIOT Jean Bernard Directeur de Recherches INRA	: examinateur

M. BERGOIN  
GOU

F 41.267

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un projet CEE intitulé "AMELIORATION ET VALORISATION DE L'IGNAME" (TSD 2A-0116-CI CD) . Le contrat impliquait la CEE, l'Université de Côte d'Ivoire, l'Institut International de Recherches Scientifiques pour le Développement à Adiopodoumè (IIRSDA) et l'ORSTOM (Laboratoire de ressources génétiques et d'amélioration des plantes tropicales, LRGAPT et Laboratoire de phytovirologie des régions chaudes, LPRC)

---

### Remerciements

#### ***Je tiens à exprimer tous mes remerciements et ma reconnaissance***

à Mr le Professeur **Max Bergoin** qui a présidé le jury et qui a été mon directeur de thèse pendant ces quatre années de Doctorat;

à Mr **Jean Dubern** pour m'avoir accueillie au LPRC et avoir dirigé ce travail;

au Dr **Gnissa Konaté**, qui m'a accueilli e au Laboratoire de Virologie de l'INERA pendant deux années. Au cours de mon séjour, j'ai eu l'occasion d'acquérir une grande expérience du travail de terrain et du diagnostic des maladies en champ. Je tiens à lui exprimer ma gratitude pour son accueil à Kamboinsé, son soutien scientifique et sa disponibilité;

à **Jean Bernard Quiot** et **Laurence Quiot** qui m'ont aidée tout au long de ce travail. Les expériences menées dans leur laboratoire et les conseils qu'ils m'ont prodigués pendant ces trois années m'ont aidé à mener à bien cette étude;

à Messieurs **Lucien Degras** et **Jean Claude Thouvenel** qui ont accepté de juger ce travail. Je les remercie vivement pour leurs critiques constructives ayant contribué à l'amélioration de cette épreuve.

Je tiens à remercier toute l'équipe du LPRC que j'ai souvent sollicitée au cours des différentes étapes de la thèse, pour leur disponibilité, leur encouragements et leur gentillesse.

Merci à **Gérard Labonne** et à **Michel Yvon** pour m'avoir aidée à effectuer les transmissions de virus par pucerons et m'avoir encouragé dans mes tentatives.

Merci à **Agnès Pinel** pour sa disponibilité, son efficacité, et son aide dans la réalisation des manipulations, **Martin Boeglin** pour sa gentillesse et son aide dans la réalisation des western blot et **Jamel Aribi** pour son travail et sa patience vis à vis des plantes d'igname à croissance folle.

Mes remerciements à Mr **Boukougou** pour m'avoir aidée dans la mise en place des essais, ainsi qu'à toute l'équipe du laboratoire de l'INERA qui a rendu mon séjour agréable, et m'a aidé à surmonter les petites difficultés des tournées sur le terrain.

Pour la bonne humeur, la gentillesse et le soutien moral je tiens à citer Agnès, Hélène, Serge, Brigitte, Alexandre et tous les autres

Je dédie ce travail à Alex, à mes parents et à mes frère et soeurs pour les remercier de leur soutien moral.

# TABLE DES MATIERES

<b>I- INTRODUCTION GENERALE</b>	1
<b>1- LES IGNAME</b>	1
1-1. Classification botanique	1
1-2. Reproduction de l'igname	5
1-3. Importance économique de l'igname	5
1-4. La place de l'igname au Burkina Faso	7
<b>2- LES MALADIES INFECTIEUSES DE L'IGNAME</b>	12
2 -1. L'antracnose	12
2 -2. Les maladies virales de l'igname	13
2 -2-1. Les virus des ignames médicinales	13
2 -2-2. Le virus de la mosaïque du concombre	14
2 -2-3. Le virus responsable de nécroses sur l'igname chinoise	14
2 -2-4. Le virus responsable des taches brunes internes	14
2 -2-5. Le virus de <i>Dioscorea alata</i>	15
2 -2-6. Le virus responsable de marbrure en anneau sur <i>Dioscorea alata</i>	15
2 -2-7. Le virus de la mosaïque de l'igname	16
2-3. Caractéristiques des potyvirus	20
<b>3 - ORIENTATION DES RECHERCHES</b>	25
<b>II- MATERIEL ET METHODES</b>	27
<b>1- CARACTERISATION DES VIRUS INFECTANT LES IGNAME DU BURKINA FASO</b>	28
1-1. Le matériel végétal	28
1-2. Symptomatologie des plantes d'igname cultivées en serre	28
1-3. Microscopie électronique	28
1-4. Microscopie optique	30
1-5. Etude sérologique	32
1-5-1. -Préparation des anticorps polyclonaux anti-YMV	32
1-5-2. -Préparation d'anticorps conjugué à la phosphatase alcaline	35
1-5-3. -Description de la technique DAS-ELISA	35

1-5-4. -Autres anticorps utilisés	37
1-6. Transmission du virus	37
1-6-1. -Transmission par tubercules	37
1-6-2. -Acquisition et transmission du virus par pucerons	37
1-7. Etude de la gamme de plantes-hôtes	38
1-8. Immunocapture-RT-PCR et hybridation avec une sonde nucléique spécifique du YMV	39
<b>2- ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO</b>	<b>45</b>
2-1. Les zones de prospection	45
2-2. Le matériel végétal	45
2-3. Etude de la prévalence de la mosaïque de l'igname au Burkina Faso	46
2-3-1. Prélèvement des échantillons	46
2-3-2. Méthodes de diagnostic de la présence du virus	46
2-3-3. Estimation des taux de prévalence	47
2-4. Estimation de l'incidence de la mosaïque de l'igname dans les régions Sud-Ouest et Centre du Burkina Faso	47
2-4-1. Dispositif expérimental	48
2-4-2. Suivi des essais	50
<b>3- ETUDE DE LA VARIABILITE DES ISOLATS DE VIRUS D'IGNAME</b>	<b>52</b>
3-1. La collection d'isolats de virus d'igname	52
3-2. Etude de la mobilité électrophorétique des protéines de capsidie par SDS-PAGE-western blot	54
3-3. Etude de la variabilité antigénique des isolats de virus d'igname à l'aide d'anticorps monoclonaux	57
3-3-1. Les anticorps monoclonaux anti-YMV <sub>112</sub>	57
3-3-2. Mise au point de l'utilisation des anticorps monoclonaux	57
3-3-3. Etude de la variabilité antigénique des isolats de virus d'igname	62
3-3-4. Mise au point d'un test de détection immunologique du YMV	62

**CHAPITRE 1- ETIOLOGIE DES MALADIES VIRALES DE L'IGNAME AU BURKINA FASO**

<b>1- IDENTIFICATION DU VIRUS RESPONSABLE DE LA MOSAIQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO</b>	<b>64</b>
1-1. Symptomatologie des plantes infectées	64
1-2. Observations au microscope électronique	66
1-3. Observations au microscope optique	66
1-4. Détection du virus par la technique DAS-ELISA	66
1-5. Transmission du virus par les tubercules	68
1-6. Transmission des isolats de virus par pucerons	68
1-7. Etude de la gamme de plantes-hôtes	70
1-8. Amplification de l'extrémité 3' terminale du génome et hybridation avec une sonde nucléique spécifique du YMV <sub>112</sub>	70
<b>2- AUTRES VIRUS DETECTES SUR IGNAME AU BURKINA FASO</b>	<b>72</b>
<b>3- DISCUSSION</b>	<b>72</b>

**CHAPITRE II- ASPECTS ECOLOGIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES D'UNE MOSAIQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO**

<b>1- REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO ET PREVALENCE DE LA MALADIE DANS TROIS ZONES DE PRODUCTION</b>	<b>76</b>
1-1. Observations des symptômes et détection du virus dans les échantillons prélevés au cours de la saison de culture de 1991	76
1-1-1. Symptomatologie des plantes en champ	76
1-1-2. Etude sérologique	78
1-2. Observations des symptômes et détection du virus dans les échantillons prélevés au cours des saisons de culture de 1992 et 1993	80
1-2-1. Symptomatologie des plantes en champ et estimation des taux de prévalence des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname	80

1-2-2. Estimation des taux de prévalence de la maladie à partir des résultats de l'étude sérologique	82
<b>2- INCIDENCE DE LA MALADIE DANS LES REGIONS SUD-OUEST ET CENTRE DU BURKINA FASO</b>	85
<b>3- DISCUSSION</b>	87
<b>CHAPITRE III- ETUDE DE LA VARIABILITE DES ISOLATS DE VIRUS INFECTANT LES IGNAME ET MISE AU POINT D'UN TEST IMMUNOLOGIQUE DE DETECTION DU VIRUS</b>	
<b>1- LA COLLECTION D'ISOLATS DE VIRUS DE L'IGNAME; SYMPTOMATOLOGIE DES PLANTES INFECTEES</b>	95
<b>2- DIFFERENCIATION DES ISOLATS DE VIRUS D'IGNAME PAR LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DE LEUR PROTEINE DE CAPSIDE</b>	97
<b>3- VARIABILITE ANTIGENIQUE DES ISOLATS DE VIRUS D'IGNAME</b>	100
3-1. Evaluation des anticorps monoclonaux	100
3-2. Optimisation de l'utilisation des MAbs pour l'étude de la variabilité antigénique	105
3-3. Etude de la variabilité antigénique	105
<b>4- VARIABILITE BIOLOGIQUE ET SEROLOGIQUE DES ISOLATS DE VIRUS INFECTANT L'IGNAME</b>	107
<b>5- MISE AU POINT D'UN TEST DE DETECTION IMMUNOLOGIQUE DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DE L'IGNAME</b>	109
<b>6- DISCUSSION</b>	111
<b>IV-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE</b>	
<b>DOCUMENTS ANNEXES</b>	122
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	155

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### TABLEAUX

TABLEAU 1 : Récapitulatif des virus décrits sur igname	18
TABLEAU 2 : Origine des isolats de virus du Burkina Faso utilisés pour la caractérisation du virus de la mosaïque de l'igname	27
TABLEAU 3 : Coloration des constituants cellulaires et des inclusions virales par l'O.G.	29
TABLEAU 4 : Origine des isolats de virus d'igname étudiés	51
TABLEAU 5 : Composition des gels de polyacrylamide	55
TABLEAU 6 : Conditions d'utilisation des différents réactifs dans les différentes procédures de test ELISA	59
TABLEAU 7 : Différentes procédures ELISA utilisées pour la mise au point du test de détection du virus de la mosaïque de l'igname	61
TABLEAU 8 : Résultats des transmissions du virus par puceron	67
TABLEAU 9 : Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS-ELISA effectués sur les échantillons feuillés (1991)	77
TABLEAU 10 : Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS-ELISA effectués sur les tubercules d'igname (1991)	77
TABLEAU 11 : Estimation des taux de prévalence des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname par comptage de plantes dans trois zones de production	81
TABLEAU 12 : Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS-ELISA effectués sur les échantillons feuillés (1992-93)	83
TABLEAU 13 : Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS-ELISA effectués sur des tubercules d'igname (1992-93)	84
TABLEAU 14 : Prévalence de la mosaïque de l'igname dans les champs entourant les essais mis en place dans les régions Sud-Ouest et Centre : détection du virus par le test DAS-ELISA	86
TABLEAU 15 : Contamination des essais en conditions naturelles par le virus de la mosaïque de l'igname dans les régions Centre et Sud-Ouest	86
TABLEAU 16 : Classement des isolats de virus d'igname par groupe en fonction de la migration électrophorétique de leur protéine de capsid	99
TABLEAU 17 : Réactivité des 22 anticorps monoclonaux vis à vis de l'isolat YMV 112 (virus purifié et extrait brut de plante infectée) selon 3 procédures ELISA	102
TABLEAU 18 : Détermination des titres des 22 anticorps monoclonaux par le test DAS-ELISA (procédure 2)	103

TABLEAU 19 : Caractéristiques des différents groupes d'isolats mis en évidence par la symptomatologie, la mobilité électrophorétique des protéines de capsid et la variabilité antigénique	108
TABLEAU 20 : Répartition des variants de virus dans les différentes zones géographiques et les populations d'ignames étudiées	108

## FIGURES

Figure 1: Position systématique du genre <i>Dioscorea</i> selon EMBERGER, 1960 modifié	1
Figure 2 : Principales espèces de <i>Dioscorea</i> cultivées	2
Figure 3 : Le Burkina Faso : situation géographique, domaines climatiques, isohyètes et principales zones de production	6
Figure 4 : Description du génome des potyvirus et maturation de la polyprotéine	21
Figure 5 : Localisation des axes et zones de prospections au Burkina Faso	44
Figure 6 : Dispositif expérimental de l'essai épidémiologique de Ouangolodougou	49
Figure 7 : Dispositif expérimental des essais épidémiologiques de Arbolle et Samba	49
Figure 8 : Symptômes de mosaïque et surcoloration nerveaire présentés par des plantes d'igname cultivées en serre ( <i>D. cayenensis-rotundata</i> et <i>D. alata</i> )	63
Figure 9 : Particules filamenteuses du virus infectant les ignames du Burkina Faso : observation en microscopie électronique	65
Figure 10 : Symptômes observés sur différentes plantes-hôtes inoculées avec le virus de la mosaïque de l'igname : <i>N. benthamiana</i> et <i>C. amaranticolor</i>	69
Figure 11 : Amplification par immunocapture/RT/PCR des extrémités 3' terminales du génome des isolats de virus d'igname et hybridation avec la sonde spécifique de l'isolat YMV112	71
Figure 12 : Symptômes de type viral observés sur des plantes d'igname au Burkina Faso	79
Figure 13 : Symptômes de surcoloration nerveaire sur des plantes d'igname de la collection	96
Figure 14 : Symptomatologie sur <i>N. benthamiana</i> infecté par les isolats de virus d'igname de la collection : deux types de symptômes	98
Figure 15 : Détection des protéines de capsid des isolats de virus d'igname par la technique de Western-blot à partir d'extraits bruts de <i>N. benthamiana</i> infectés	99
Figure 16 : Réactivité en Western-blot des quatre anticorps monoclonaux vis à vis du virus purifié	101
Figure 17 : Effet de l'addition d'extraits brut de plante (EB) sur la détection du virus purifié par les 4 anticorps monoclonaux	104
Figure 18 : Réactivité des 69 isolats de virus d'igname vis à vis des 4 anticorps monoclonaux, en DAS-ELISA (procédure 3)	106
Figure 19 : Réactivité des 69 isolats de virus d'igname vis à vis des 4 anticorps monoclonaux, en DAS-ELISA (procédure 2)	106
Figure 20 : Comparaison de trois procédures ELISA pour la détection du virus de la mosaïque de l'igname dans des extraits bruts d'igname	110

## **PROTOCOLES**

PROTOCOLE 1 : Purification du virus	31
PROTOCOLE 2 : Purification des immunoglobulines G	33
PROTOCOLE 3 : Marquage des anticorps polyclonaux à la phosphatase alcaline	33
PROTOCOLE 4 : Procédure DAS-ELISA	36
PROTOCOLE 5 : Immuno-capture/RT/PCR	41
PROTOCOLE 6 : Hybridation moléculaire des amplifiats avec une sonde marquée à la digoxigénine	42
PROTOCOLE 7 : SDS-PAGE et Western-blot	53
PROTOCOLE 8 : Procédures ACP et ACPI-ELISA	56
PROTOCOLE 9 : Procédures DASI-ELISA	58

## Abréviations

ACP (I)	: Antibody Coated Plate (Indirect)
ADN	: Acide desoxy ribo nucléique
ADNc	: Acide desoxy ribo nucléique complémentaire
AMV	: Avian Myeloblastoma Virus
ARN	: Acide ribo nucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
BFSOA	: Burkina Faso Sud-Ouest / <i>D. alata</i>
BFSOC	: Burkina Faso Sud-Ouest / <i>D. cayenensis-rotundata</i>
CIRAD	: Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le : Développement, France
CMV	: Cucumber mosaic virus
cv.	: cultivar
DAS (I)	: Double Antibody Sandwich (Indirect)
dATP	: désoxy Adénosine triphosphate
dCTP	: désoxy cytidine triphosphate
dTTP	: désoxy Thymidine triphosphate
dGTP	: désoxy Guanosine triphosphate
dUTP	: désoxy uridine triphosphate
dUTP-dig	: désoxy triphosphate marqué à la digoxigénine
<i>D. cay-rot</i>	: <i>Dioscorea cayenensis-rotundata</i>
D.O.	: Densité optique
DIECA	: di-ethyl dithio carbamate
EDTA	: Ethylène diamine tétra acétate de sodium
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
FAST	: Faculté des Sciences et Techniques d'Abidjan (Côte d'Ivoire)
h.	: heure
Hyb kren/prae	: Hybride de <i>Dioscorea cayenensis-rotundata</i> , cv. Krenglé et <i>D. praehensilis</i>
IBMC	: Immunologie et Biologie Moléculaire Cellulaire (CNRS)
IC/RT/PCR	: Immuno Capture / Reverse Transcriptase / Polymerase Chain Reaction
IDESSA	: Institut Des Savannes, Bouaké, Côte d'Ivoire
IGg	: Immunoglobuline G
IITA	: International Institute of Tropical Agriculture, Ibadan, Nigeria
ILTAB	: International Laboratory for Tropical Agriculture Biotechnology
INERA	: Institut d'Etudes et de Recherches Agricoles, Burkina Faso
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique, France
IP	: Igbame de Pilimpikou
kb	: kilobase
kD	: kilodalton

LPRC : Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes CIRAD/ORSTOM,  
Montpellier

LRGAPT Laboratoire des Ressources Génétiques pour l'Amélioration des Plantes  
Tropicales ORSTOM Montpellier

MAB(s) : Anticorps monoclonaux

MARA : Ministère de l'Agriculture et des Ressources animales, Burkina Faso  
min. : minute

NBT/BCIP : Nitro-Blue Tetrazolium / 5-Bromo 4-Chloro 3-Indolyl Phosphate

ORSTOM L'Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en  
Coopération

PAb(s) : Anticorps polyclonaux

pb : Paire de base

PBS-T : Phosphate Buffered Saline - Tween

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG : Poly Ethylène Glycol

PolyA : séquence polyadénylée

PVP : Poly Vinyl Pyrrolidone

PVX : Potato virus X

PVY : Potato virus Y

V : Volt

VPg : Protéine virale liée au génome

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

YMV : virus de la mosaïque de l'igname (yam mosaic virus)

# INTRODUCTION

## 1- LES IGNAME

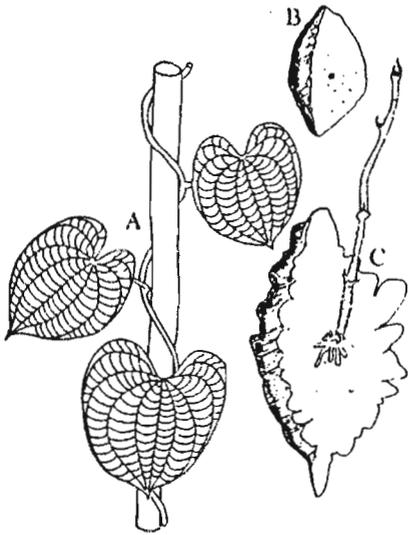
### 1-1- Classification botanique

Le terme "igname" désigne un complexe d'espèces cultivées pour leur tubercule, essentiellement en régions tropicales. Il regroupe les différentes espèces du genre *Dioscorea*. La classification botanique parmi les monocotylédones est la suivante :

<u>Souche</u>	<u>ordre</u>	<u>famille</u>	<u>Genre</u>	Nombre d'espèces
<b>LILIFLORES</b>	<b>Dioscoréales</b>	<b>Dioscoreacées</b>	<i>Dioscorea</i>	<b>603</b>
			<i>Rajania</i>	24
			<i>Tamus</i>	4
			<i>Stenomeris</i>	2
			<i>Avetra</i>	1
		Trichopodacées	<i>Trichopus</i>	
	Broméiales			
	Liliales			
Autres Liliflores				

Fig. 1 : Position systématique du genre *Dioscorea*, selon EMBERGER, 1960, modifié (DEGRAS, 1986)

La famille des Dioscoréacées est caractérisée par un port de liane volubile, un appareil souterrain à réserves amylacées, des feuilles pétiolées, des bourgeons axillaires sériaux et un système floral dioïque (rarement monoïque). Le genre *Dioscorea*, le plus important de la famille, regroupe 603 espèces (BURKILL 1960, EMBERGER 1960 in DEGRAS 1986, COURSEY 1967, AYENSU 1972, in DEGRAS 1986). Une cinquantaine d'espèces sont utilisées pour l'alimentation



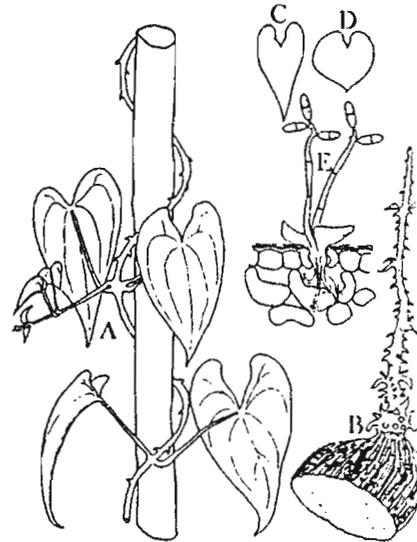
*D. bulbifera* A : tige et feuilles; B : bulbille;  
C : tubercule germant



*D. alata* A : tige et feuilles; B : portion de  
tubercule germant



*D. trifida* A : tige et feuilles; B : tubercule en  
pate à cheval; C : tubercule pédonculé



*D. cayenensis-rotundata* A : tige et feuilles;  
B : portion de tubercule germant; C : feuille de  
type "rotundata"; D : feuille de type cayenensis;  
E : champignon parasitant la face inférieure des  
feuilles

Figure 2 : Principales espèces de *Dioscorea* cultivées (D'après MESSIAEN, 1988)

humaine; les plus importantes sont : *D. alata* L., le complexe spécifique *D. cayenensis* Lam.-*D. rotundata* Poir., et *D. esculenta* Lour (Figure 2). Les espèces *D. trifida* L., *D. opposita* Thunb., *D. dumetorum* Pax, et *D. hispida* Dennst., bien que moins largement représentées, sont consommées dans certaines régions de production.

*D. alata*, d'origine asiatico-océanienne, est la plus diversifiée des espèces. Elle est actuellement représentée dans toute l'aire de culture de l'igname. Elle est caractérisée par la morphologie de sa tige (ailée, à section quadrangulaire et à enroulement dextrorse) et de ses feuilles (complètes, larges, cordiformes). La forme et le revêtement des tubercules sont très variables.

Le complexe spécifique *D. cayenensis*-*D. rotundata*, d'origine africaine, est très cultivé sur ce continent. L'étude des caractéristiques morphologiques et enzymatiques des prétendues espèces *D. cayenensis* et *D. rotundata* a montré que ces deux formes résultaient de pression de sélection et ne constituaient en réalité qu'une seule espèce à l'intérieur de laquelle existaient plusieurs variantes (HAMON, 1983). Les tiges sont souvent d'un vert bleuté ou bronzé; elles sont lisses, inermes ou épineuses avec des feuilles ovées plus ou moins grandes et étroites, et un limbe plus ou moins coriace. Les tubercules peuvent avoir des formes très variables et des écorces plus ou moins rugueuses portant des racines et parfois des épines.

*D. trifida* est principalement cultivée dans son aire d'origine (Amérique tropicale humide) et très peu ou pas dans les autres régions où elle a été introduite au début du 20ème siècle (Nouvelle Calédonie, Afrique de l'Ouest, Ceylan). Elle se distingue par ses feuilles lobées (3 à 5 lobes), une ou plusieurs tiges quadriaillées à

section quadrangulaire aplatie, et de nombreux tubercules pédonculés de petite taille.

*D. bulbifera* est souvent retrouvée à l'état sauvage ou cultivée dans les grandes zones de culture d'igname. D'origine asiatico-africaine, elle est peu consommée. Elle se caractérise par la production de bulbilles aériennes et parfois souterraines. Les feuilles sont larges et très cordiformes.

Dans toute l'aire de culture de l'igname, il existe aussi des ignames sauvages pérennes ou annuelles, rarement cultivées mais qui interviennent génétiquement dans la constitution et la sélection des populations d'ignames aujourd'hui cultivées. Ainsi, en Afrique de l'Ouest, il existe dans des régions de forêts ou en savane, des ignames intermédiaires entre des groupes savaniques (*D. mangenotiana* Miege, *D. abyssinica* Hoch., *D. lecardii* De Wild, *D. sagittifolia* Pax, *D. burkilliana* Miege, *D. dumetorum* Pax) et des espèces cultivées vivant dans des conditions climatiques ou pédologiques particulières.

La variabilité morphologique des espèces de *Dioscorea* est considérable. En Côte d'Ivoire, MIEGE, 1954 (in DEGRAS 1986) distinguait pour *D. alata*, deux groupes (Bété-Bété et N'Za) selon l'importance des anthocyanes dans les tubercules et les appareils aériens. Pour classer 350 clones de *D. alata*, trois groupes de cultivars ont été distingués par MARTIN et SADIK 1976 (in DEGRAS, 1986) à partir de l'étude de corrélations entre 13 caractères de parties aériennes et 17 caractères des tubercules, : le premier rassemble des cultivars primitifs, l'autre les cultivars sélectionnés, et le troisième, des cultivars intermédiaires type cv. Féo.). De même, 75 paramètres de la morphologie des plantes ont été nécessaires pour répartir 97 cultivars de *D. cayenensis-rotundata* en 9 groupes (MARTIN et RHODES, 1978); enfin, la description des variétés d'igname cultivées en Côte

d'Ivoire, basée sur les critères de morphologie a permis de les regrouper en 20 groupes variétaux (HAMON, HAMON et TOURE , 1986) : 15 d'entre eux, à affinité annuelles sont tetraploïdes ( $2n = 4x$  soit 40 chromosomes) tandis que 5 groupes se distinguent par leur affinité pérennes ou semi pérennes : quatre ont  $2n = 6x$  soit 60 chromosomes et le cinquième groupe a  $2n = 8x$  soit 80 chromosomes.

### ***1-2- Reproduction de l'igname***

Les ignames cultivées se reproduisent essentiellement par voie végétative (tubercules), ce qui limite la diversification génétique des populations existantes. La reproduction sexuée est rare et variable selon les espèces d'igname en raison de l'absence ou de l'irrégularité de la floraison chez plusieurs cultivars, de la disproportion entre individus mâles et femelles pour certaines populations et de la mauvaise germination des graines; elle a été observée chez *D. trifida* et *D. cayenensis -rotundata* mais très rarement chez *D. alata*.

Le cycle de culture de l'igname est le suivant : les semenceaux utilisés pour la plantation sont de petits tubercules ou des fragments de tubercules qui germent après une dormance de 1 à 5 mois selon les espèces et les conditions atmosphériques; la phase végétative s'étale sur une période de 6 à 12 mois selon les variétés, et les tubercules sont récoltés soit en deux fois pour certaines variétés, soit en fin de cycle . Une partie des tubercules est consommée et l'autre est conservée comme lot de semences pour l'année suivante.

### ***1-3- Importance économique de l'igname***

La culture de l'igname est répandue dans toutes les régions tropicales. Certaines espèces non comestibles ont un intérêt pharmaceutique du fait de leur production en diosgénine, stéroïde intervenant dans l'hémisynthèse de composés

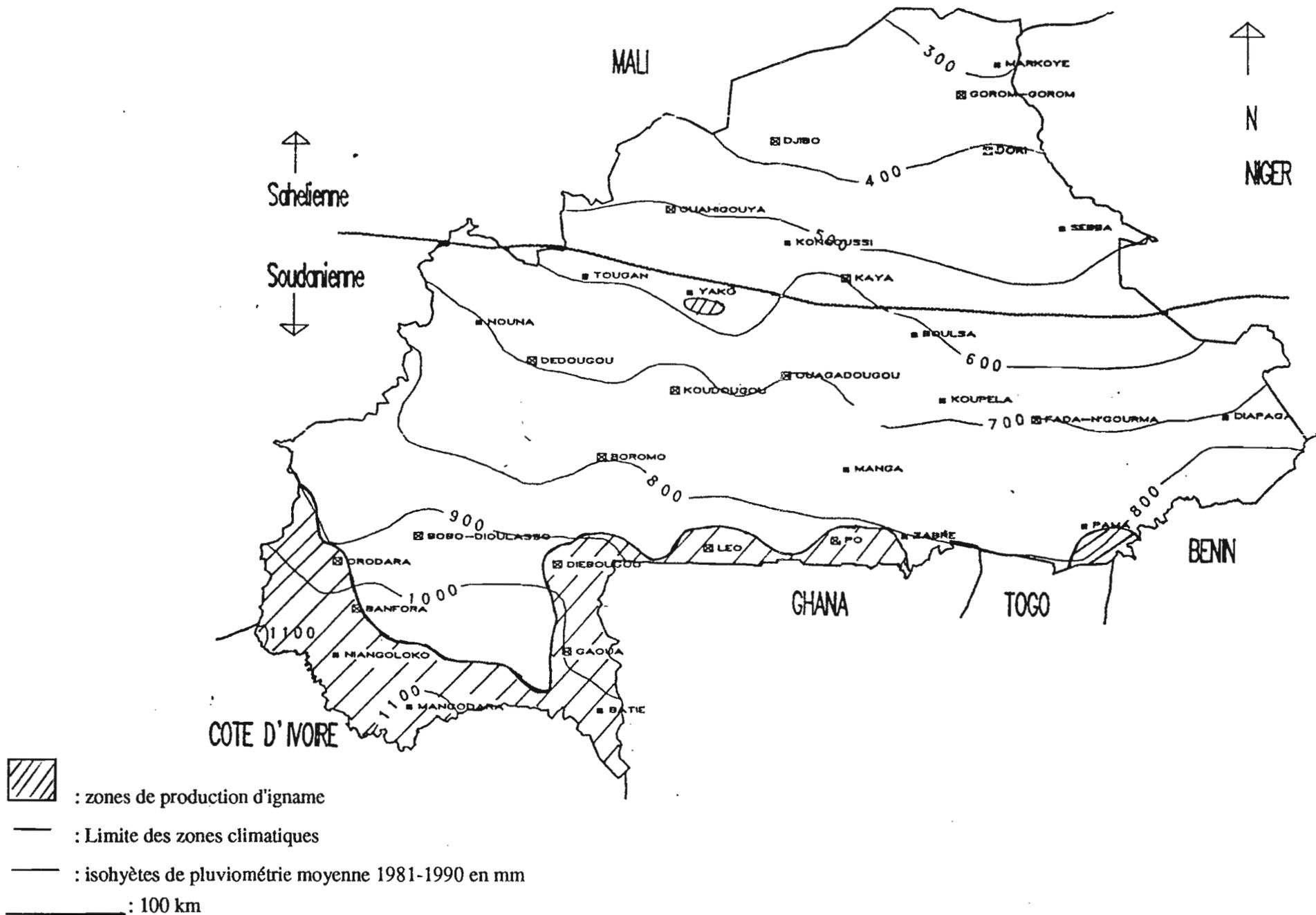


Figure 3 : Le Burkina Faso : situation géographique, domaines climatiques, isohyètes et principales zones de production d'igname

contraceptifs et cortisoniques. Les plus utilisées sont *D. composita* Hemsl., *D. floribunda* Mart. et Gal., *D. deltoïdea*, Wall., *D. mexicana* Guillemin, *D. spiculiflora* Hemsl. *D. friedrichstallii* Knuth., *D. prazeri*, *D. sylvatica*, *D. elephantipes*. Les espèces comestibles se distinguent par leur nombre et leur rôle dans l'alimentation humaine en région tropicale (12% de l'alimentation énergétique; COURSEY et MARTIN, 1970). La production mondiale est estimée à 28 millions de tonnes par an (FAO, 1993) et environ 95% de cette production revient à l'Afrique de l'Ouest; le Nigeria est le premier producteur avec 20 millions de tonnes par an.

La culture de l'igname est un facteur socioculturel important dans les principales zones de production. Faisant l'objet de nombreux échanges commerciaux entre les zones rurales et les villes, elle constitue une source de revenus appréciable pour les producteurs. Le plus souvent, les échanges ne sont pas comptabilisés, ce qui rend difficile les estimations de production et oblige à prendre avec précaution les statistiques disponibles pour cette culture.

#### ***1-4- La place de l'igname au Burkina Faso***

Le Burkina Faso est un pays d'Afrique de l'Ouest (275 000 km<sup>2</sup> ; 8 700 000 habitants) situé en zone soudano-sahélienne et limité au sud par la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Togo et le Bénin, au Nord et à l'Est par le Niger et à l'Ouest par le Mali (fig. 3). La production nationale d'igname était estimée à 90 000 tonnes en 1990 (données du Ministère de l'Agriculture et des Ressources Animales, M.A.R.A., Burkina Faso). Dans ce pays où la culture céréalière est dominante, l'igname intervient en période de soudure alimentaire mais aussi dans l'approvisionnement des zones urbaines. Elle est surtout cultivée au sud de l'isohyète de 800 mm, dans les régions Sud (Léo) et Sud-Ouest (Niangoloko, Gaoua) du pays mais aussi dans

le centre du pays (Yako, 700 mm d'eau par an), dans la plaine de Pilimpikou, zone éloignée de plus de 200 km des autres zones de culture d'igname. Des îlots de culture avaient été identifiés dans l'Ouest, à la frontière malienne, mais il semblerait que le développement de la culture du coton dans cette zone ait provoqué la disparition quasi totale des populations d'ignames locales; il n'en a pas été observé lors des prospections effectuées; des essais de réintroduction à partir de variétés du Sud-Ouest sont en cours. D'après DUMONT et HAMON (1985), les ignames du Burkina Faso font partie d'un pool génétique très vaste s'étendant de la frontière malienne jusqu'au Bénin.

*D. cayenensis-rotundata* et *D. alata* sont les principales espèces cultivées dans les régions Sud et Sud-Ouest; elles sont présentes simultanément ou non selon les régions et les parcelles. *D. bulbifera* est rencontrée plus rarement, dans les mêmes régions en bordure de champ ou dans les bois environnants. Le cultivar Igname de Pilimpikou (IP) représente la quasi totalité des ignames de la région Centre; il fait partie des 5 groupes variétaux de *D. cayenensis-rotundata* à affinité pérennes ou semi-pérennes (formes savanicoles relevant du groupe *D. abyssinica* /*D. lecardii* /*D. sagittifolia*) ayant au moins 60 chromosomes ( $2n = 6x$ ); à ce titre, il se rapproche de la variété "Baniakpa" du Nord Bénin (DUMONT et HAMON, 1985) et du groupe du même nom identifié par HAMON, HAMON et TOURE (1986) en Côte d'Ivoire (la fiche de description de ce cultivar est donnée en annexe A1). Il se caractérise aussi par des bandes de migration très lente pour le système enzymatique phosphogluconate déshydrogénase. Ce cultivar est adapté à la faible pluviométrie locale compensée par des sols hydromorphes à pseudogley. Des essais d'introduction de populations d'igname du Sud-Ouest (*D. cayenensis-rotundata* et *D. alata*) ont été effectués par les agriculteurs de la région mais des difficultés d'adaptation sont intervenues du fait des conditions climatiques et

pédologiques locales. D'après DUMONT (1977), *D. esculenta* est cultivée au Burkina Faso mais elle n'a pas été rencontrée lors de nos prospections. De même, les ignames sauvages (*D. abyssinica*, *D. lecardii*, *D. sagittifolia*) n'ont pas fait l'objet de cette étude.

Les agriculteurs distinguent à l'intérieur de chaque espèce plusieurs populations différentes qui sont cultivées en juxtaposition à l'intérieur des parcelles. Leurs noms diffèrent selon les régions et les dialectes, ce qui rend difficile leur inventaire. Les observations effectuées au cours des prospections nous ont permis d'identifier par leurs noms vernaculaires, des variétés de *D. cayenensis-rotundata* (Kougè et Sanata, Kponan, Gnan), appartenant respectivement aux groupes "Soperé", "Kponan" et "Gnan" définis par HAMON, HAMON et TOURE en Côte d'Ivoire (1986). D'autres variétés de cette espèce sont présentes : Pononon, Wassara, Tula, Nabiayo ou Nabiala dans la région Sud, Kengèlè, Sanata, Bona, Boninkema ou fogopla dans la région Sud-Ouest, mais il n'a pas été possible de les rattacher à partir de leur nom à un groupe variétal donné. La variété de *D. alata* la plus cultivée est "Florido", originaire de Porto-Rico, communément appelée "Ignome américain," introduite dans plusieurs pays d'Afrique de l'Ouest pour son rendement élevé, la levée de dormance rapide et les facilités de récolte des tubercules. D'autres variétés sont aussi représentées : "Folou", "Kalinséré", "Nindegnuian" par exemple. *D. bulbifera* semble représenté par un seul cultivar (appelé Dandali), produisant des bulbilles aériennes (DUMONT, 1977). Il n'est pas aisé de distinguer par leur morphologie ou leur nom, les variétés d'une même espèce; par conséquent, il a été choisi d'effectuer les différentes études en confondant sous leur nom d'espèce respectif, les populations d'igname cultivées. Les tubercules de *D. cayenensis-rotundata* se distinguent de ceux de *D. alata* par leur forme (plus arrondis et plus petits pour *D. alata*), leur revêtement (lisse et

noirâtre pour *D.alata*, présence de racines et parfois d'épines pour *D.cayenensis-rotundata*), et leur désignation locale (igname à piler pour *D.cayenensis-rotundata* et igname à bouillir pour *D.alata*).

Certaines variétés de *D. cayenensis-rotundata* ont une tubérisation tardive et n'autorisent, comme pour *D. alata*, qu'une seule récolte en fin de cycle (décembre) tandis que d'autres, à tubérisation précoce, donnent deux récoltes : la première, fin août-début septembre, est destinée à la consommation et à la commercialisation (le tubercule est retiré mais la plante reste en place), tandis que la deuxième, en fin de cycle (décembre -février), est destinée à constituer le stock de semenceaux de la saison suivante. La culture est le plus souvent pratiquée sur buttes d'environ 0,75 m de large et de hauteur (pour les régions Sud et Sud-Ouest) ou sur billons dans la région Centre. Le tuteurage est appliqué surtout pour les variétés de *D. cayenensis-rotundata*, mais aussi parfois pour *D. alata*.

La taille des surfaces cultivées varie beaucoup selon les régions. On distingue 4 types de parcelles au Burkina Faso :

- de grandes parcelles de plus de 2 ha (régions Sud et Sud-Ouest) où l'igname est cultivée en monoculture (plusieurs espèces, plusieurs populations) sur des espaces défrichés où subsistent des arbres et arbustes d'utilisation traditionnelle (karité, néré ...).
- des parcelles de 0,5 à 2 ha, dans les mêmes régions, où l'igname est parfois cultivée en association avec d'autres cultures (patate douce, maïs, sésame).
- des parcelles d'igname de la région Centre mesurent entre 0,1 et 0,5 ha et le cultivar IP est présent en monoculture.
- de nombreux champs de case (0,05 ha), observés le long des axes routiers et à proximité des villages. Plusieurs cultures y sont représentées en juxtaposition (igname, patate douce, céréales).

La production de l'igname est principalement assurée par les régions Sud et Sud-Ouest (50% et 35% respectivement). La récolte et la vente des tubercules sont étalées sur une période de 5 à 6 mois. Il existe très peu de données sur les circuits de commercialisation de l'igname; cependant, les prospections effectuées en 1991 ont permis d'avoir des informations sur l'origine des semences. Elles proviennent le plus souvent de la récolte précédente mais les agriculteurs peuvent avoir recours à des apports extérieurs (achat chez un agriculteur de la même zone ou dans le pays voisin : Côte d'Ivoire, Ghana).

L'igname est une culture importante pour les régions tropicales; la domestication et la sélection massale à partir de prélèvement de tubercules ont abouti à la constitution de populations composées de plantes phénotypiquement semblables mais pouvant différer par l'historique de leur semence et par leur sensibilités respectives aux maladies.

Du fait de son rôle dans l'alimentation, l'igname a fait l'objet de nombreux échanges interrégionaux, internationaux ou intercontinentaux de tubercules; cela explique la présence actuelle des différentes espèces d'igname dans la plupart des régions productrices mais aussi sans doute d'un cortège d'agents pathogènes important. Les maladies dues aux champignons et aux virus ont été plus particulièrement décrites.

## 2- LES MALADIES INFECTIEUSES DE L'IGNAME

La culture de l'igname est soumise à de nombreuses contraintes phytosanitaires. Au cours du stockage, les pertes en tubercules peuvent aller de 20 à 40%. Les agents responsables sont des champignons tels que *Penicillium oxalicum*, *Bothriodiplodia theobromae* (RICCI *et al.*, 1974, 1979 in DEGRAS, 1986) ou des cochenilles pouvant gêner la germination : *Aspidiella Hartii*, *Planococcus citri*, *Aspidiotus destructor* (PANIS *et al.* 1974, in DEGRAS, 1986). En phase de culture, les fourmis manioc (*Acromyrmex octospinosus*) causent des défoliations et les vers blancs (stades larvaires des scarabéides) attaquent les tubercules en formation. Des dégâts foliaires dus à des champignons apparaissent à la suite de conditions climatiques humides. Les principales maladies sont causées par des champignons et des virus.

### 2-1- L'anthraxose

Responsable de graves épidémies en Afrique de l'Ouest et aux Antilles, l'anthraxose représente le principal problème cryptogamique de l'igname (principalement pour *D. alata* et *D. cayenensis-rotundata*). Elle est causée par *Colletotrichum gloeosporioides* qui provoque des nécroses sévères sur la tige et les feuilles, allant jusqu'à la nécrose totale des éléments aériens. Les attaques sont fréquentes en condition d'humidité maximum. La transmission de la maladie est assurée par la persistance de spores sur les débris de cultures ou sur les tubercules-semences mais aussi par le transport des spores par le vent ou les projections d'eau de pluie (TORIBIO, 1980).

Les méthodes de lutte consistent à utiliser des variétés résistantes ou tolérantes pour *D. alata*, et plus généralement à éliminer les sources de

contamination sur le sol, traiter les semences et le feuillage au Benlate (benomyl). La plantation précoce de plants lourds, en terrain riche en matière organique, en culture associée ou tuteurée, avec combinaison de fongicide est conseillée.

## **2-2- Les maladies virales de l'igname**

Les maladies virales ont été étudiées sur toutes les catégories de culture en fonction de leur importance. La bibliographie rapporte la présence du virus latent des *Dioscorea*, du virus de la mosaïque du Concombre, du virus responsable de la nécrose de l'igname de Chine, du virus responsable des taches brunes dans les tubercules, et de nombreux virus filamenteux dont le virus de la mosaïque de l'igname.

### **2-2-1- Les virus des ignames médicinales**

Un potexvirus nommé virus latent des *Dioscorea* (*Dioscorea Latent Virus*, DLV) a été identifié à Porto-Rico sur les espèces *D. floribunda* et *D. composita* (LAWSON *et al.*, 1973); il se caractérise par l'absence de symptôme sur les plantes-hôtes mais provoque un faible jaunissement des feuilles de *Philodendron selloum*. Il a pu être transmis mécaniquement à *N. benthamiana*, *N. megalosiphon*, et *D. bulbifera* mais pas à *D. alata* (PHILLIPS *et al.*, 1986).

Un potyvirus flexueux filamenteux responsable de surcoloration nerveaire chez les *Dioscorea* (*Dioscorea greenbanding virus*, DGBV) a été observé dans les mêmes espèces à Porto-Rico. Il a été trouvé en infection mixte avec le DLV et a pu être transmis mécaniquement à *Dioscorea* spp. (HEARON *et al.* 1978). Au cours d'études précédentes, RUPPEL, DELPIN et MARTIN, 1966 in DEGRAS, (1986) ont réussi à transmettre un virus semblable à *N. glutinosa* et à *Crotalaria striata*.

### **2-2-2 -Le virus de la mosaïque du concombre (CMV)**

Il a été identifié à la Guadeloupe dans les ignames cultivées (*D. cayenensis-rotundata*, *D. alata* et *D. trifida*) et ne semble pas causer de dégâts sur les cultures (MIGLIORI, 1977).

### **2-2-3- Le virus responsable de nécroses sur l'igname de Chine**

Le virus responsable de nécroses sur l'igname de Chine (Chinese yam necrotic virus), est un virus filamenteux de 660 nm de long et 12-13 nm de diamètre; il a été observé sur *D. batatas* (ou *D. opposita*) au Japon (FUKUMOTO et TOCHIHARA, 1978) et provoque des taches chlorotiques sur les feuilles. Ce virus serait un carlavirus, mais aucune précision n'existe à ce sujet (BRUNT *et al.*, 1990).

### **2-2-4- Le virus responsable des taches brunes internes**

Des taches brunes ont été observées dans des tubercules de *D. alata* à la Barbade, dépréciant les tubercules pour la vente (MANTELL et HAQUE, 1978) et provoquant 29 à 41% de pertes (MANTELL et HAQUE, 1979 a). La microscopie électronique avait mis en évidence la présence d'un virus bacilliforme de 130 x 29 nm (HARRISON et ROBERTS, 1973), souvent associé à un virus filamenteux de 750 x 13 nm. Ce dernier ne serait pas déterminant dans l'apparition des taches brunes car ces symptômes n'apparaissent pas dans les tubercules de *D. cayenensis-rotundata*, *D. alata*, *D. esculenta* et *D. bulbifera* où il serait seul présent (MOHAMED, 1976). La maladie est transmise par les tubercules contaminés. Aucun insecte vecteur n'a été identifié (MANTELL et HAQUE, 1979b). Le virus bacilliforme est actuellement connu sous le nom de "Internal Brown Spot badnavirus" (IBSV, BRUNT *et al.* 1990). Les mêmes symptômes ont été observés

dans des tubercules de *D. alata* en Côte d'Ivoire bien qu'aucun virus bacilliforme n'ait été identifié (THOUVENEL, FARGETTE et FAUQUET, 1988). Cependant, un virus filamenteux d'environ 750 nm de long a été observé en microscopie et s'est révélé relié en sérologie au virus de la mosaïque de l'igname; les dimensions de ce virus sont semblables à celles du virus filamenteux trouvé par HARRISON et ROBERTS (1973) à la Barbade. La relation entre la présence de taches brunes et ce virus filamenteux n'a pas été établie.

#### **2-2-5- Le virus de *D. alata***

Le virus de *D. alata* (*D. alata* virus, DaV) a été observé dans des feuilles de *D. alata* au Togo et semble ne pas être transmissible mécaniquement. Les travaux de PORTH *et al.* (1987) suggèrent que ce potyvirus serait sérologiquement relié aux isolats de YMV identifiés au Togo et en Côte d'Ivoire mais qu'il en différerait par sa transmissibilité. Les mêmes observations ont été effectuées au Nigeria sur des plantes de *D. alata* présentant des jaunissements de nervures (ANONYME, 1982).

#### **2-2-6-Le virus responsable de marbrure en anneaux sur *D. alata***

Le virus de la marbrure en anneaux de *D. alata*, (*D. alata* ring mottle virus, DaRMV ; PORTH et NIENHAUS, 1983) est un potyvirus identifié sur *D. alata* au Togo. Il s'est ensuite avéré être sérologiquement relié au virus de la mosaïque de la betterave (Beet mosaic virus, BtMV) et différent des autres potyvirus précédemment décrits sur igname (PORTH *et al.*, 1987). Malheureusement, l'isolat de référence a été perdu et on ne dispose pas d'autre information à ce sujet.

### 2-2-7- Le virus de la mosaïque de l'igname

Le virus de la mosaïque de l'igname (yam mosaic virus, YMV) est le plus connu et le plus répandu des virus filamenteux infectant l'igname. Il provoque des pertes de rendement en poids de tubercule d'environ 27% sur *D. alata* cv. Florido (THOUVENEL et DUMONT, 1990). Des symptômes de mosaïque avaient été observés sur igname en Afrique de l'Ouest (WEST, 1938; CHANT, 1957; ROBERTSON, 1961; COURSEY, 1967) et dans la Caraïbe (ADSUAR, 1955; RUPPEL, DELPIN et MARTIN, 1966 in DEGRAS, 1986). Des descriptions plus précises ont ensuite été apportées au sujet d'une mosaïque affectant *D. cayenensis-rotundata*, *D. alata*, *D. esculenta* et *D. trifida* en Afrique de l'Ouest (THOUVENEL et FAUQUET, 1977; TERRY, 1977; RECKHAUS et NIENHAUS, 1981) et dans la Caraïbe (HARRISON et ROBERTS, 1973; MIGLIORI et CADHILAC, 1976; MARCHOUX, 1980). La maladie se manifeste par des symptômes de surcoloration nerveaire (green vein banding) ou encore par une mosaïque, des cloques sur les feuilles et parfois, un nanisme de la plante. EDWIGE (1979) et MARCHOUX (1981) donnent un large éventail des symptômes de maladie virale présentés par les plantes d'igname à la Guadeloupe. Un virus filamenteux flexueux a été observé en microscopie électronique; il a été démontré que la maladie était transmissible par les tubercules et propagée par des pucerons.

En 1979, THOUVENEL et FAUQUET ont identifié précisément l'agent causal de la mosaïque de l'igname en Côte d'Ivoire, un potyvirus de 785 nm de long et de 13 nm de diamètre. Il est transmis par pucerons (*Aphis gossypii*, *A. craccivora*, *A. fabae*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum maydis*, et *Toxoptera citricidus*) selon le mode non persistant; l'insecte ne reste infectieux que pendant un temps court (quelques minutes) succédant à la piqûre de la plante infectée.

L'utilisation de tubercules-semences contaminés assure la reproduction de la maladie d'une saison de culture à l'autre. Par contre, la transmission par les graines n'a jamais été observée ni établie (TERRY, 1977; THOUVENEL et FAUQUET, 1979).

En plus des Dioscoréacées citées précédemment, le YMV est capable d'infecter *D. mangenotiana*, *D. togoensis*, *D. liebrechtsiana*, *D. praehensilis*, et *D. preussii*. Parmi les Solanacées, *N. clevelandii*, *N. megalosiphon* et *Nicotiana benthamiana*, peuvent aussi être infectées par inoculation mécanique artificielle (THOUVENEL et FAUQUET, 1979; THOTTAPPILLY, 1981). *N. benthamiana* est utilisée pour multiplier et maintenir le virus en culture. Le YMV est différent des potyvirus observés sur les ignames médicinales; il ne les infecte pas et ne peut être transmis à *Crotalaria striata*.

Le rendement de purification du YMV est de 15-25 mg de virus /kg de feuilles d'igname. Le spectre d'absorption est caractéristique des potyvirus avec un maximum d'absorption à 262 nm et un minimum à 247 nm ( $A_{260}/A_{280} = 1,2$ ;  $A_{max}/A_{min} = 1,13$ ) indiquant un taux en ARN de 5%. La protéine de capsid a un poids moléculaire d'environ 34 kD. La purification du YMV et la préparation d'un anticorps polyclonal anti-YMV par THOUVENEL et FAUQUET (1980) ont permis la mise au point d'un test de diagnostic par la méthode immuno-enzymatique ELISA (CLARK et ADAMS, 1977) et donc la détection du virus dans les plantes. Le YMV est relié sérologiquement à d'autres potyvirus africains (THOUVENEL et FAUQUET 1986) : le virus des taches ocellées de l'arachide (groundnut eyespot virus, GEV), le virus de la mosaïque de l'herbe de Guinée (guinea grass mosaic virus, GGMV), le virus de la panachure du poivron (pepper veinal mottle virus, PVMV), le virus des taches annulaires du fruit de la passion (passion fruit ringspot

TABLEAU 1 Récapitulatif des virus décrits sur igname

Espèce d'igname	agent pathogène	symptômes	particularités du virus	Références
<b>IGNAMES A DIOSGENINE</b> <i>D. floribunda</i> <i>D. composita</i> (Porto-Rico)	* <i>Dioscorea</i> latent virus	surcoloration nerveaire	400 à 600 nm, absence de symptôme en réinoculation mécanique (potexvirus)	LAWSON <i>et al.</i> 1973 PHILLIPS <i>et al.</i> 1986
	* virus flexueux	surcoloration nerveaire	610 à 730 nm; transmissible par <i>Aphis gossypii</i> à <i>D. bulbifera</i> , <i>Crotalaria striata</i> , <i>N. glutinosa</i> et <i>N. tabacum</i>	HEARON <i>et al.</i> 1978
<b>IGNAMES ALIMENTAIRES</b>				
<i>D. trifida</i> , <i>D. alata</i> , <i>D. cayenensis</i> - <i>rotundata</i> (Guadeloupe)	Cucumber Mosaic Virus	faible jaunissement	ne cause pas de dégâts importants	MIGLIORI, 1977
<i>D. alata</i> (Barbade, Côte d'Ivoire)	* Internal Brown Spot virus	taches brunes à l'intérieur du tubercule	130 x 29 nm ; badnavirus, souvent associé au virus filamenteux suivant	MOHAMED, 1976 MANTEL et HAQUE, 1979 b HARRISON et ROBERTS, 1973
	* potyvirus	mosaïque	750 x 13 nm ; sérologiquement proche du YMV en Côte d'Ivoire	HARRISON et ROBERTS, 1973
<i>D. batatas</i> f. <i>typica</i> (Japon)	Chinese yam necrotic virus	taches chlorotiques	Carlavirus ?	FUKUMOTO et TOCHIHARA, 1978
<i>D. cayenensis</i> - <i>rotundata</i> , <i>D. alata</i> , <i>D. trifida</i> (Caraïbe, Guyane, Côte d'Ivoire, Nigéria, Togo)	Yam Mosaic Virus	surcoloration nerveaire mosaïque, cloques	différents isolats trouvés dans les pays cités; 750 x 13 nm; spécifique des Dioscoréacées ; transmissible à <i>N. benthamiana</i> , <i>N. clevelandii</i> , <i>N. megalosiphon</i>	THOUVENEL et FAUQUET, 1979; 1986
<i>D. alata</i> (Togo)	<i>D. alata</i> virus		virus filamenteux non transmissible mécaniquement; sérologiquement relié au YMV de Côte d'Ivoire et du Togo	PORTH <i>et al.</i> , 1987
<i>D. alata</i> (Togo)	Beet Mosaic virus <i>D. alata</i> ring mottle virus		considéré comme un isolat igname du Beet Mosaic Virus transmissible sur <i>N. benthamiana</i> et sur betterave à sucre	PORTH et NIENHAUS, 1983

virus , PRSV) et le virus de la mosaïque de la courgette (*Cucurbita mosaic virus*, CuMV).

Pour éradiquer les virus de plantes, l'isolement du méristème apical et sa mise en culture *in vitro* a souvent été employée. Des plantes saines de *D. trifida* ont ainsi été obtenues par BALAGNE, 1985; SALEIL, DEGRAS et JONARD, 1990. A la Barbade, la culture de méristème a permis de débarrasser des plantes de *D. alata* cv. White Lisbon du virus impliqué dans la formation de taches brunes dans les tubercule (MANTELL et HAQUE, 1979 a) et de relancer la production et l'exportation de tubercules. La thermothérapie a été essayée pour assainir des plants mais les résultats restent incertains (MALAURIE *et al.*, 1992). En outre, le passage par la graine, soit par germination directe soit par sauvetage d'embryon, permettrait d'éradiquer le virus de plante. Cependant, la recontamination des plantes saines est rapide dans des environnements où règne une forte pression d'inoculum. (GOUDOU-SINHA, 1990). L'obtention de variétés issues de l'hybridation de géniteurs sélectionnés pour leur reproduction sexuée et végétative permettrait de pallier les effets de pertes de rendement et de disposer chaque année de plants de semences sains produits en conditions protégées.

Au cours des années suivantes, des potyvirus ont été identifiés dans plusieurs régions productrices sur les ignames cultivées : Cameroun (MVILA, 1991), Guyane (BOEGLIN *et al.*, 1993) et des études sérologiques ont montré qu'il s'agissait de virus sérologiquement reliés au YMV et biologiquement semblables. De plus, PORTH *et al.* (1987), utilisant des techniques diverses de sérologie et de microscopie, ont montré que, parmi les différents virus filamenteux de l'igname précédemment identifiés, les isolats du Togo et du Nigeria étaient sérologiquement reliés entre eux. Contrairement au YMV qui a été précisément identifié, il n'existe

pratiquement pas d'information sur les autres potyvirus observés sur l'igname notamment sur leur relation avec le YMV. Le tableau 1 rassemble les données concernant les différents virus observés sur igname.

L'étude du YMV requiert un rappel des caractéristiques biologiques des membres du groupe des potyvirus.

### ***2-3-Caractéristiques des potyvirus***

Les potyvirus dont le représentant type est le virus Y de la pomme de terre (PVY), constitue le plus grand groupe de virus végétaux par le nombre de ses membres et l'importance des dégâts causés (SHUKLA, *et al.*, 1994). Ce sont des virus sans enveloppe, flexueux, dont le génome est constitué d'un ARN monocaténaire positif à symétrie hélicoïdale (DOUGHERTY et CARRINGTON, 1988). La coque protéique enfermant l'ARN est composée de plusieurs unités de la protéine de capsid (CP, HOLLINGS et BRUNT, 1981).

Les critères actuels de classification ont permis de regrouper dans la famille des potyviridae, les potyvirus, les bymovirus, les rymovirus et les ipomovirus qui sont respectivement transmis par des pucerons, des champignons, des acariens et des mouches blanches. Tous ces virus se caractérisent par l'induction d'inclusions cytoplasmiques cylindriques (en forme de roue à aube ou "pinwheels") dans les cellules infectées (EDWARDSON, 1974; FENNER, 1976, FRANCKI *et al.*, 1991).

Les principales caractéristiques permettant d'identifier un potyvirus sont :

- la présence d'inclusions cytoplasmiques en forme de "pinwheels" dans les cellules infectées;
- les dimensions de la particule : 680 à 900 nm de long et 11 à 15 nm de diamètre,
- la transmissibilité du virus par des pucerons selon le mode non persistant

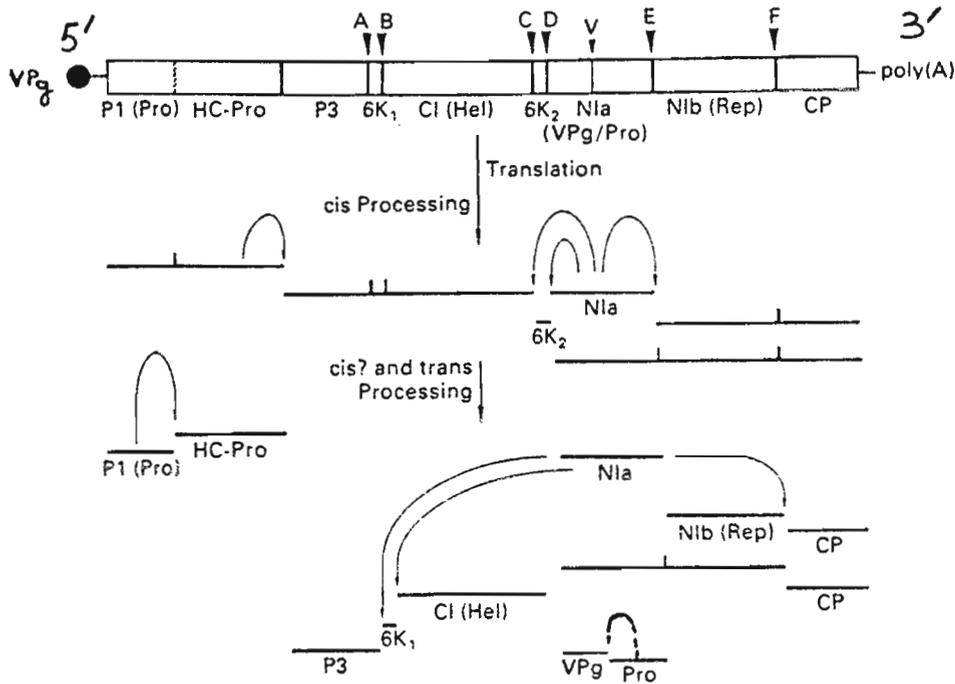


FIGURE 4 : Description du génome des potyvirus et maturation de la polyprotéine  
 La polyprotéine est clivée en divers sites de clivages (A à F) par des phénomènes de protéolyses autocatalytiques (NIa , HC/Pro) suivies de clivages en cis et en trans (d'après RIECHMANN *et al.*, 1992).

P1 et P3 : protéines 1 et 3; Pro : protéase; HC : helper component; 6K1 et 6K2 : protéines 1 et 2 de 6kD; NIa et NIb : inclusions nucléaires a et b; Rep : réplisase;  
 Hel : hélicase; CI : inclusions cytoplasmiques; CP : protéine capsidaire; VP g : protéine virale g. A,B, C, D, E, F, V : sites de clivage de la polyprotéine

Le génome des potyvirus transmis par pucerons est constitué d'un ARN monopartite (8,8 - 10,25 kb). Il est lié en son extrémité 5' à une protéine virale appelée VPg et possède en son extrémité 3', une queue poly-adénylée (20 - 160 adénosines). Il comporte en ses extrémités 3' et en 5', des régions non codantes qui pourraient jouer un rôle dans le cycle viral. La partie codante est traduite en une polyprotéine d'environ 340 à 368 kD qui est ensuite clivée en plusieurs protéines par des protéases selon un phénomène de protéolyse autocatalytique (RIECHMANN *et al.*, 1992; figure 4).

Les activités protéasiques de la protéine P1, du "helper component" (HC/Pro) et de la protéine composant les inclusions nucléaires (NIa) permettent de réguler l'expression du génome. La réplication de ce dernier est principalement effectuée dans le cytoplasme. Elle fait intervenir plusieurs protéines : celle constituant les inclusions cytoplasmiques (CI) qui possède une activité ARN hélicase (LAIN *et al.*, 1990), celle constituant les inclusions nucléaires "b" (NIb) qui serait une ARN polymérase ARN dépendante (LAIN *et al.*, 1989; ROBAGLIA *et al.*, 1989), et la partie N-terminale de la protéine composant les inclusions nucléaires "a" (NIa) qui constituerait le VPg. Les protéines 6K1 et 6K2 seraient impliquées dans l'ancrage du VPg à la membrane. Les différentes étapes du processus de réplication des potyvirus sont encore mal connues.

Les potyvirus sont localisés dans le cytoplasme des cellules du parenchyme et provoquent des infections systémiques dans la plupart des plantes-hôtes. Cela explique que le virus peut être transmis par les formes de multiplication végétative (boutures, greffes, tubercules). La dissémination du virus de cellule à cellule serait assurée par les protéines P1, CI, HC et CP (MATTHEWS, 1991). Les protéines CI forment des inclusions cytoplasmiques appelées "pinwheels" et sont associées à la

membrane plasmique et aux plasmodesmes. Le transport de cellule à cellule se ferait par une modification du cytosquelette permettant le passage des particules virales (CALDER et INGERFELD, 1990).

Dans le cas des virus transmis par pucerons, deux protéines sont nécessaires à la transmission du virus : le "helper component" qui serait acquis avec le virus, et la protéine de capsid qui est impliquée à la fois dans l'interaction plante hôte-vecteur-virus et dans la transmissibilité du virus (HARRISON et ROBINSON, 1988). ATREYA *et al.* (1990) ont mis en évidence l'importance de l'intégrité de la séquence protéique DAG à l'extrémité N-terminale de la protéine de capsid dans la transmission du virus.

Le virus se multiplie rapidement dans la plante-hôte et cette dernière devient à son tour une source de contamination pour les plantes environnantes. La transmission par pucerons permet de générer des infections de proximité ; on parle d'épidémies polycycliques dont l'ampleur dépend de l'importance des sources de virus, de l'activité des vecteurs et de la sensibilité des plantes environnantes (cultures ou plantes-hôtes intermédiaires).

La variabilité des potyvirus semble reposer essentiellement sur des modifications de séquences localisées au niveau de l'extrémité 3' du gène codant pour la protéine de capsid, l'extrémité 5' du gène codant pour la protéine P3 et au niveau de la région 3' non codante du génome; cette dernière peut fortement varier en longueur (FRENKEL *et al.*, 1989; TURPEN *et al.*, 1989). Par contre, certaines séquences semblent conservées pour tous les potyvirus.

Ainsi, l'étude de la variabilité du YMV sera basée sur l'étude de ces régions ou sur les protéines qui en sont issues, notamment la protéine de capsid. De nombreuses études réalisées sur la variabilité sérologique des potyvirus ont révélé l'intérêt des anticorps monoclonaux dirigés contre la partie N-terminale de la protéine de capsid; en effet les épitopes spécifiques d'un virus donné sont situés sur cette partie de la protéine tandis que les épitopes spécifiques du groupe des potyvirus sont situés sur la partie centrale de la protéine ou core virus (SHUKLA *et al.*, 1988). Enfin, grâce à la technique récente d'amplification spécifique de séquences d'acides nucléiques (Polymerase chain reaction, PCR), il est possible d'amplifier des régions variables du génome des potyvirus en utilisant comme amorces les séquences conservées situées de part et d'autre de ces zones. Cette méthode permet de comparer des isolats de potyvirus entre eux.

### 3- ORIENTATION DES RECHERCHES

L'identification de potyvirus infectant l'igname, biologiquement semblables au YMV, a été rapportée par plusieurs auteurs dans les différentes zones de production d'igname. Ces isolats de virus provoquent des baisses de rendement sur une culture importante en régions tropicales. Peu d'études ont été effectuées sur l'épidémiologie et l'écologie de cette maladie ainsi que sur la variabilité de l'agent (ou des agents) pathogène(s) responsable(s).

**Le premier objectif** de cette étude a été de **caractériser des isolats de virus dans les ignames du Burkina Faso**, Aucune étude n'ayant déjà été réalisée dans ce pays sur ce sujet, il a été choisi d'étudier principalement les ignames cultivées dans les principales zones de production. Le Burkina Faso est situé dans une zone particulièrement intéressante sur le plan climatique; en effet, certaines zones de production sont situées en limite de culture des variétés traditionnelles locales d'igname. Les populations cultivées sont différentes de celles rencontrées dans les grandes zones de production en milieu tropical humide. Il est donc permis d'envisager la présence d'isolats particuliers de virus dans ces populations. D'autre part, le Burkina Faso étant frontalier de pays producteurs d'igname, il est intéressant de vérifier la présence d'isolats habituels du virus de la mosaïque de l'igname dans les populations cultivées.

La caractérisation au Burkina Faso, d'un potyvirus semblable au YMV a conduit à étudier en **second objectif, certains aspects de l'écologie et de l'épidémiologie de la maladie dans trois zones de production** : répartition géographique, estimation des taux de prévalence et d'incidence de la maladie, et prévalence des symptômes sur les feuilles des plantes cultivées en champ. Des

prospections ont été effectuées dans trois zones de production et l'identification du virus a été réalisée au moyen de test DAS-ELISA sur des échantillons feuillés et sur des tubercules.

**Le troisième objectif a été de comparer entre eux, des isolats de virus d'igname** provenant de différentes zones de production et infectant différentes plantes hôtes. Divers critères de variabilité des potyvirus ont été utilisés : symptomatologie sur une plante-hôte déterminée, variabilité de la protéine de capsid (mobilité électrophorétique et présence de sites antigéniques spécifiques). Les principales techniques utilisées pour l'étude de la biodiversité du virus sont l'inoculation mécanique sur *N. benthamiana*, la séparation par électrophorèse des protéines de capsid et leur révélation par immunologie (SDS-PAGE western blot) et le test immunoenzymatique ELISA avec des anticorps monoclonaux anti- YMV.

En application des résultats obtenus avec les anticorps monoclonaux, la mise au point d'une technique de diagnostic fiable de la présence du YMV dans les plantes cultivées a été réalisée. En effet, l'obtention d'un test de détection très sensible devrait permettre de développer des programmes de sélection sanitaire basés sur l'utilisation de tubercules-semences sains; ce test pourra également être utile aux laboratoires d'amélioration génétique de l'igname dans les programmes de sélection variétale .

# MATERIEL ET METHODES

**TABLEAU 2 : Origine des isolats de virus du Burkina Faso utilisés pour la caractérisation du virus**

ISOLATS	ESPECE-HOTE	ORIGINE	LIEU DE PRÉLEVEMENT
BFC 1	<i>D. cay-rot</i> cv. IP	Arbollé, RC	champ
BFC 2	<i>D. cay-rot</i> cv. IP	Arbollé, RC	champ
BFC 3	<i>D. cay-rot</i> cv. IP	Arbollé, RC	marché
BFC 4	<i>D. cay-rot</i> cv. IP	Samba , RC	champ
BFC 5	<i>D. cay-rot</i> cv. IP	Samba , RC	champ
BFC 6	<i>D. cay-rot</i> cv. IP	Samba , RC	champ
BF SOA 1	<i>D. alata</i> cv. Florido	Mangodara, SO	champ
BF SOA 2	<i>D. alata</i> cv. Florido	Ouangolodougou, SO	champ
BF SOA3	<i>D. alata</i>	Mangodara	marché
BF SOC 1	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Gaoua	marché
BF SOC 2	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Mangodara, SO	champ
BF SOC 3	<i>D. cayenensis-rotundata</i>	Ouangolodougou, SO	champ

**BFC** : Burkina Faso Centre; **BF SOA** Burkina Faso Sud-Ouest *D. alata*; **BF SOC** : Burkina Faso Sud-Ouest *D. cayenensis-rotundata*; ***D. cay-rot* cv. IP** : *D. cayenensis-rotundata*: cultivar Ighame de Pilimpikou; **RC** : région centre; **SO** : Sud-Ouest

# 1- CARACTERISATION DES VIRUS INFECTANT LES IGNAMEES DU BURKINA FASO

## 1-1- *Le matériel végétal*

L'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-YMV en DAS-ELISA a permis de détecter au Burkina Faso la présence d'un virus dans des plantes d'igname cultivées (*D. alata*, *D. cayenensis-rotundata*). Ce virus est capable d'infecter des plantes de *N. benthamiana* par inoculation mécanique artificielle. Lors des prospections effectuées dans différentes zones de production du Burkina Faso, les tubercules issus de ces plantes d'igname ont été collectés (tableau 2), et cultivés en serre au laboratoire de virologie de l'IN.E.R.A (Institut National d'Etudes et de Recherches Agricoles) de Kamboinsé, puis au L.P.R.C./ORSTOM (Laboratoire de Phytovirologie des Régions Chaudes) de Montpellier. Les études de caractérisation des isolats de virus ont été réalisées à partir de tubercules, des plantes issues de ces tubercules infectés, et des plantes de *N. benthamiana* infectées par inoculation mécanique.

## 1-2- *Symptomatologie des plantes d'igname cultivées en serre*

Les plantes d'igname ont été observées au cours de leur croissance en serre et les symptômes ont été notés.

## 1-3- *Microscopie électronique*

Les observations du virus en microscopie électronique ont été réalisées selon le principe de la "dip method" : un morceau de feuille d'igname ou de *N. benthamiana* infecté a été finement découpé dans une goutte d'eau avec une lame de rasoir; les fragments de feuilles ont ensuite été éliminés, et une grille, recouverte

**TABLEAU 3: Coloration des constituants cellulaires et des inclusions virales par l'O.G.**

<b>Constituants cellulaires et inclusions</b>	<b>Coloration obtenue</b>
Inclusions	vert olive
Noyau	orange
Nucléole	vert
Paroi cellulaire	jaune- vert
Cytoplasme	jaune - pâle
Plastes	jaune- vert
Microcristaux	vert
P - Protéines (phloème)	vert

d'un film de collodion carboné, a été déposée sur cette préparation pendant 1 minute. Après un rinçage à l'eau (quelques gouttes), la coloration négative a été réalisée à l'acétate d'uranyl 2 % pendant 1 minute. La grille a ensuite été observée à l'aide d'un microscope électronique à transmission, JEOL (JEM 100 CX II).

#### **1-4- Microscopie optique**

Les inclusions virales caractéristiques des infections par les potyvirus ont été recherchées dans des fragments d'épidermes de *N. benthamiana* infectés par des isolats de virus du Burkina Faso. La technique utilisée est celle de CHRISTIE et EDWARDSON (1986). Les lambeaux d'épiderme ont été prélevés en insérant les pointes d'une pince fine sous l'épiderme d'une nervure de jonction et en tirant délicatement. Les fragments ont été colorés selon le procédé de coloration à l'O.G. (Calcomine orange mélangé au vert brillant Luxol ).

Après élimination des plastes par un bain de 30 minutes dans du Triton X100 à 5%, les lambeaux ont été immergés 10 minutes dans une solution colorée composée de :

- 1 goutte d'eau distillée
- 1 goutte de calcomine orange
- 8 gouttes de vert brillant Luxol

Après deux rinçages successifs et rapides dans du 2- méthoxyéthyl acétate, les lambeaux colorés ont été déposés dans une goutte d'euparal entre lame et lamelle. L'observation a ensuite été effectuée au microscope. Les colorations des différents constituants subcellulaires de la plante et des inclusions virales sont indiquées dans le tableau 3.

**PROTOCOLE N° 1 : PURIFICATION DU VIRUS**

Broyer les feuilles dans une solution tamponnée phosphate 0,2M pH 8 (4 ml/g de feuille)

+ 2-Mercapto-éthanol 1%

+ EDTA  $5 \cdot 10^{-4}$  M

+ chloroforme 2 ml/g de feuille

Centrifuger 10 minutes à 7500 g.

Récupérer la phase aqueuse après filtration sur miracloth.

Précipiter le virus en ajoutant du PEG 6 000 (6%) et du NaCl 1% et agiter 2 heures.

Centrifuger 10 minutes à 20 000 g.

Reprendre le culot dans du tampon citrate 0,05M pH 8 pendant la nuit.

Centrifuger à faible vitesse (10 minutes à 12 000 g).

Concentrer le virus par ultracentrifugation à travers 7 ml de coussin de saccharose 20% dans la solution tampon citrate (2 heures 30 minutes à 29 000 rpm (rotor Ti 50 2)).

Reprendre le culot dans 0,5 ml de tampon citrate et centrifuger à 5 000 g pendant 10 minutes .

Concentrer le surnageant par ultracentrifugation sur gradient discontinu de saccharose de 10 à 40% pendant 2 heures 30 minutes à 25 000 rpm (rotor SW41).

Récupérer le contenu des tubes à l'aide d'un collecteur de fraction couplé à un spectrophotomètre qui indique l'absorbance à 280 nm.

Rassembler les fractions liées à une forte absorbance à 280 nm. Concentrer le virus par ultracentrifugation à 30 000 rpm pendant 2 h 30 min (rotor 50 2 Ti), reprendre le culot dans la solution tampon citrate et établir le spectre d'absorption du virus (220 à 300 nm) au spectrophotomètre.

## 1-5- Etude sérologique

### 1-5-1- Préparation des anticorps polyclonaux anti-YMV

L'isolat YMV<sub>112</sub> originaire de Côte d'Ivoire a été utilisé pour immuniser des lapins. Ses propriétés biologiques et sérologiques ont été contrôlées en microscopie électronique, en immunologie et par l'étude de sa gamme de plantes-hôtes. La souche YMV<sub>112</sub> s'est révélée très semblable à la souche YMV<sub>294</sub> décrite par THOUVENEL et FAUQUET (1979).

L'isolat YMV<sub>112</sub> a été multiplié dans des plantes de *N. benthamiana* par inoculation mécanique; les feuilles ont été récoltées 3 semaines après inoculation et ont été directement utilisées pour la purification du virus ou conservées à -80°C. Les étapes suivantes ont été effectuées à 4°C. Après élimination des pigments foliaires par broyage en présence de chloroforme, le virus a été concentré par addition de PEG puis par ultracentrifugation sur un coussin de saccharose à 20%. Cette étape a été suivie d'une ou deux ultracentrifugations sur gradient de saccharose (protocole 1).

Après avoir vérifié que le rapport A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> était de 1,2, le spectre d'absorption de la préparation virale a été étudié et la concentration en virus a été calculée de la façon suivante :

$$\frac{A_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution}}{2,4}$$

$$2,4$$

2,4 étant le coefficient d'extinction moléculaire des potyvirus.

**PROTOCOLE N° 2 : PURIFICATION DES IgGs**

Ajouter 9 ml d'eau distillée à 1 ml de serum.

Ajouter goutte à goutte 10 ml de solution de sulfate d'ammonium saturée (4 M).

Incuber 30 minutes à 1 heure à température ambiante sous agitation puis centrifuger 10 minutes à 10 000 g.

Dissoudre le précipité dans 2 ml de PBS 1/2 et dialyser à 4°C, 3 fois 4 heures contre du PBS 1/2 .

Equilibrer la DEAE-cellulose avec du PBS 1/2 jusqu'à l'obtention d'un pH identique à celui du PBS (7,4).

Préparer une colonne contenant environ 7 cm de DEAE-cellulose et ajouter le dialysat obtenu au dessus de la colonne.

Eluer la colonne avec du PBS 1/2 et recueillir la solution au bas de la colonne par fractions numérotées de 1 ml.

Mesurer l'absorbance du contenu de chaque tube à 280 nm. Rassembler les contenus des tubes dont l'absorbance à 280 nm est supérieure à 0,8 de Densité Optique et mesurer l'absorbance du mélange.

Calculer la concentration en IgG sachant qu'une absorbance de 1,4 correspond à une concentration de 1 mg / ml d'IgG.

Conservé à -20°C les anticorps dilués à 50% dans du glycérol.

**PROTOCOLE N° 3 : MARQUAGE DES ANTICORPS POLYCLONAUX A LA PHOSPHATASE ALCALINE**

Ajouter 100 µl de phosphatase alcaline (10 mg/ml; Boehringer) à 1 ml d'IgG (1 mg/ml) et dialyser à température ambiante pendant 5 heures contre 500 ml de PBS contenant 0,06% de glutaraldéhyde.

Eliminer l'excès de glutaraldéhyde, à 4°C, par 3 dialyses successives de 3 heures chacune, contre 500 ml de PBS. Conservé le conjugué à -20°C après addition d'albumine sérique (5 mg/ml) et dilution à 50% dans du glycérol.

L'immunisation du lapin a été réalisée après trois injections intramusculaires (0,5 ml de virus purifié à 1 mg/ml) effectuées à deux semaines d'intervalle. Lors de la première injection, la préparation virale était émulsifiée dans de l'adjuvant complet de Freund afin de provoquer une forte réponse immunitaire, tandis que les injections suivantes étaient émulsifiées dans de l'adjuvant incomplet de Freund. Un premier prélèvement de sang a été effectué au niveau de la veine marginale de l'oreille deux semaines après la dernière injection et le sérum a été titré; les différentes prises de sang ont été analysées par la méthode DAS-ELISA. Lorsque le titre du sérum est suffisant, le lapin est saigné et le sérum récupéré. Sinon, une ou deux injections sont à nouveau effectuées.

Après incubation pendant 1 heure à 37°C puis 1 nuit à 4°C, le sérum subit une première centrifugation à 500 g pendant 5 minutes; le surnageant récupéré est ensuite centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes puis filtré à travers un filtre millipore de 0,2 µm, dilué à 50% dans du glycérol et conservé en fractions aliquotes à -20°C.

La présence d'immunoglobulines G (IgG) dirigées contre des antigènes autres que le YMV peut entraîner des bruits de fond gênants lors du test ELISA. Par conséquent, les IgGs ont été isolées des autres protéines sériques afin d'augmenter la sensibilité de l'antisérum; les IgGs ont été précipitées par addition d'une solution saturée en sulfate d'ammonium puis purifiées sur une colonne échangeuse d'anions qui, dans les conditions de pH et de molarité utilisées, permet de séparer les protéines indésirables (retenues sur la colonne) des IgGs (protocole 2).

### **1-5-2- Préparation d'anticorps conjugués à la phosphatase alcaline**

Le couplage des IgGs à la phosphatase alcaline est effectué en présence de glutaraldéhyde, réactif permettant de lier entre elles les protéines possédant des amines primaires en surface; l'excédent de réactif est ensuite éliminé par trois dialyses successives (protocole 3).

### **1-5-3- Description de la technique DAS ELISA**

La recherche du virus a été réalisée par la technique immuno-enzymatique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), développée par VOLLER *et al.* (1976) et adaptée par CLARK et ADAMS (1977) pour la détection des virus de plantes. Le principe du test en double sandwich direct (DAS) permet de visualiser à l'aide d'une réaction enzymatique colorée la reconnaissance d'un antigène par un anticorps.

Deux anticorps polyclonaux anti-YMV différents ont été utilisés dans les tests de détection par la technique DAS-ELISA :

- des anticorps polyclonaux anti-YMV préparés par THOUVENEL et FAUQUET à partir d'un isolat de Côte d'Ivoire YMV294;
- des anticorps polyclonaux anti-YMV préparés par le LPRC à partir d'un isolat de Côte d'Ivoire YMV112;

Ces deux anticorps sont aussi disponibles sous la forme conjuguée à la phosphatase alcaline.

Les plaques utilisées sont des plaques Nunc Maxisorp F96. Les compositions des solutions tampons utilisées figurent dans le protocole 4. Le seuil

**PROTOCOLE N°4 : DAS ELISA****coating**

IgG : 1 µg /ml dans solution tampon carbonate pH 9,6  
100 µl/puits; 3 heures à 37°C ou 1 nuit à 4°C

3 rincages

**saturation**

PBS-T 0,05% additionné de lait écrémé 3%  
200 µl/puits; 1 heure à 37°C

3 rincages

**dépôt de l'antigène**

broyage au 1/20 dans du PBS-T + lait écrémé 3%  
centrifugation 5 min à 10 000t/min

déposer 100 µl/puits; et incuber 3 heures à 37°C

3 rincages

**Anticorps polyclonal anti-YMV conjugué à la**  
phosphatase alcaline 1/2000 dans PBS-T 0,05% + BSA 2%  
3 heures à 37°C

3 rincages

**dépôt du substrat PNP-P**

100 µl/puits;

lecture à 405 nm après 1 heure à l'obscurité à 37°et après 1 nuit à 4°C

**SOLUTION TAMPON CARBONATE pH 9,6** : 1,59g NaCO<sub>3</sub>; 2,93 g NaHCO<sub>3</sub>;  
pour 1 litre d'eau distillée

**SOLUTION TAMPON PBS pH 7,4** : 8 g NaCl; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ;  
0,2 g KCl; pour 1 litre d'eau distillée

Rinçage des plaques PBS-T: PBS + 0,05% Tween 20

Extraction du virus : PBS-T + 3% Lait écrémé;

**SOLUTION TAMPON DIETHANOLAMINE pH 9,8** : 97 ml diéthanolamine  
dans 1 litre d'eau distillée

**SUBSTRAT** : p-nitrophényl phosphate dissout à 1 mg/ml dans solution tamponnée  
diéthanolamine

de positivité est la valeur de D.O. (densité optique : absorbance à 405 nm; A<sub>405</sub>) au dessus de laquelle les échantillons sont considérés infectés par le virus. Il a été fixé à 2 fois la D.O. du témoin sain (feuille d'igname ou de *N. benthamiana* saine) et doit être supérieur à 0,100 après 1 heure de réaction enzymatique à 37°C. Le témoin positif utilisé est un extrait de feuille de *N. benthamiana* infecté par la souche YMV112.

#### **1-5-4- Autres anticorps utilisés**

Des kits de détection ELISA produits par SANOFI et dirigés contre différents virus, (Potato virus Y (PVY), Potato virus X (PVX) et Cucumber mosaic virus (CMV), ont été utilisés pour rechercher d'autres virus dans les ignames du Burkina Faso.

#### **1-6- Transmission du virus**

##### **1-6-1- Transmission par tubercules**

Les tubercules issus des plantes virosées (BFC 1, BFC 2, BFC 3, BFSOA 1, BFSOA 2, BFSOC 1, BFSOC 2) ainsi que les plantes issues de ces tubercules infectés ont été testés en DAS-ELISA. Pour cela, des fragments de chair ont été prélevés sur les parties extérieures du tubercule (en contact avec le revêtement) et ont été traités comme il a été décrit pour les échantillons feuillés (protocole 4).

##### **1-6-2- Acquisition et transmission du virus par pucerons**

Les élevages de *Myzus persicae* et *Aphis gossypii* ont été effectués respectivement sur courgette et sur aubergine en chambre climatique au laboratoire de zoologie de l'I.N.R.A. Montpellier (G. LABONNE et M. YVON). Les pucerons ont été prélevés sur la plante d'élevage à l'aide d'un tube-aspirateur à

bouche et ils ont été placés dans des tubes à hémolyse à raison d'environ 100 par tube. Après une période de jeûne de 2 heures, les pucerons ont été déposés sur des feuilles de la plante source (*N. benthamiana* infecté par un isolat de virus d'igname) pendant 7 minutes (période d'acquisition). Les pucerons ont ensuite été transférés sur de jeunes plantes de *N. benthamiana* saines (stade 5 feuilles) à raison de 20 pucerons par plante et de 10 ou 20 plantes par isolat testé. Le témoin positif utilisé était un isolat originaire de Guyane dont la transmission par vecteur dans les mêmes conditions avait été vérifiée (BOEGLIN *et al.* , 1993). Les plantes ont été recouvertes par une boîte et le dispositif a été maintenu une nuit. Les pucerons ont ensuite été éliminés par un traitement insecticide (Décis) et les plantes ont été placées en chambre climatique. L'observation des symptômes et un test DAS-ELISA de contrôle ont été effectués 3 semaines après la transmission.

Cinq essais ont été effectués :

1er essai : transmission par *M. persicae* sur 10 plantes, 20 pucerons par plante;

2ème, 3ème et 4 ème essais : transmission par *A. gossypii* sur 10 plantes, 20 pucerons par plante;

5ème essai : transmission par *A. gossypii* sur 20 plantes, 20 pucerons par plante.

### **1-7- Etude de la gamme de plantes-hôtes**

Différentes espèces de plantes hôtes ont été inoculées avec différents isolats d'igname du Burkina Faso. Les feuilles infectées ont été broyées dans une solution tamponnée de phosphate de sodium 0,03 M, pH 8,3, contenant 0,2% de DIECA. Le broyat a été filtré puis inoculé à cinq plantes de chaque espèce en présence de carborundum. Les plantes ainsi traitées ont ensuite été placées en

conditions contrôlées (25°C, 70 % humidité relative, 16 heures de photopériode, 4000 à 5000 lux d'intensité lumineuse). La présence de symptômes a été notée à partir du quinzième jour après inoculation. La recherche du virus dans les plantes a été effectuée à l'aide de la technique DAS-ELISA.

Les plantes hôtes testées sont les suivantes :

Solanacées : *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* cv. Samsun, *N. tabacum* cv. Samsun NN, *N. tabacum* cv. Xanthi nc., *N. megalosiphon*; *Petunia hybrida*, *Datura stramonium*;

Chenopodiacees : *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*;

Amaranthacées : *Gomphrena globosa*

Des plantes de *N. benthamiana* ont été utilisées comme plante-hôte pour maintenir et multiplier le virus. Les plantes ont été infectées par inoculation mécanique au stade de 7 feuilles.

#### **1-8- Immunocapture-RT-PCR à partir d'extrait brut de plante infectée et hybridation avec une sonde nucléique spécifique du YMV**

La technique d'amplification enzymatique *in vitro* d'ADN (communément appelée en anglais Polymerase Chain Reaction, PCR, (SAIKI *et al.*, 1985; ERLICH 1989) permet une amplification sélective de séquence cible d'ADN. L'utilisation de courtes séquences nucléotidiques (amorces) complémentaires de séquences d'ADN permet à l'ADN polymérase de synthétiser la région comprise entre les deux amorces; cette séquence est ensuite amplifiée par des réactions enzymatiques en chaîne. Dans le cas d'étude sur des génomes à ARN, il est nécessaire de passer par une étape de transcription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) par la transcriptase reverse (RT). La technique d'immunocapture /RT/ PCR (IC/RT/PCR) a été mise au point par WETZEL *et al.* (1992) sur le plum pox virus (PPV) et

permet de travailler directement à partir d'extraits de plantes infectés : le virus est d'abord capturé par des anticorps spécifiques puis l'ARN viral est libéré et transcrit en ADNc. Le protocole de PCR décrit par PAPPU *et al.* (1993) pour l'amplification de séquences de l'extrémité 3' terminale du génome des potyvirus a été utilisé. Il est basé sur l'utilisation de deux amorces dégénérées (LANGEVELD *et al.*, 1990) complémentaires respectivement de la séquence poly-A présente à l'extrémité 3' du génome des potyvirus et d'une région conservée située au niveau du gène de la protéine de capsid. L'amplification de la séquence comprise entre ces deux amorces permet de détecter des potyvirus dans les plantes avec une sensibilité 5000 fois supérieure à celle de la technique ELISA (WETZEL *et al.*, 1992).

La détection du virus par IC/RT/PCR dans des extraits de *N. benthamiana* infectés a été réalisée selon le protocole 5. Les amplifiats obtenus pour chaque isolat ont ensuite été mis en présence d'une sonde spécifique de l'isolat YMV112 (séquence génomique de cet isolat, comprise entre les amorces MVWCIEEN et polyA et marquée par la digoxigénine selon le protocole 6). Il s'agit d'un cDNA de 700 pb, provenant de la transcription reverse puis de l'amplification de l'extrémité 3' terminale du génome de l'isolat YMV112. Cette séquence nous a été fournie par M-E. ALEMAN (ILTAB, La Jolla, Californie), clonée dans un plasmide "Invitrogen". Le marquage a été effectué par addition d'UTPs marqués à la digoxigénine dans le milieu d'amplification de la PCR (protocole 6). Cette technique permet de comparer l'identité de la séquence amplifiée après immunocapture par des anticorps polyclonaux anti-YMV avec celle de l'isolat YMV112.



Congeler 30 µl issus de la première amplification. Procéder de nouveau à 20 cycles d'amplification sur 20 µl restant en ajoutant 80 µl de MRA et 70 µl d'huile de paraffine;

**Préparation du MRA pour 1 tube**

(1) Solution tampon PCR 10X	5 µl
mélange des 4 dNTP à 25 mM chacun	2,85 µl
Amorce WCIEN 100 µM	0,5 µM
Taq Polymérase 5 U/µl	
Bioprobe	0,05 µl
H <sub>2</sub> O	34,2 µl

(1) : Tris HCl 100 mM, pH 9 + KCl 500 mM + MgCl<sub>2</sub> 15 mM + Triton 100X 1%

Amorce dégénérée WCIEN synthétisée par Appligène : TTG-TGY-ATI-GAI-AAY

(I : deoxyinosine; Y : C ou T; )

Traitement des amplifiats par analyse sur gel d'agarose

Mélanger 5 µl d'amplifiat + 1 µl tampon de charge 10 X (3)+ 4 µl H<sub>2</sub>O

Les amplifiats ont été analysés directement après l'amplification, sur gel d'agarose 1%. L'électrophorèse a été effectuée dans une solution tampon tris borate EDTA (TBE)(4); 5 à 10 µl d'amplifiat sont déposés par puits. La migration a été effectuée sous voltage constant de 100 V pendant 45 minutes, puis le gel a été coloré au bromure d'éthidium (10 µl/10 ml de TBE).

(3) Tampon de charge 10X : 0,41% bleu de bromophénol + 0,41% xylène cyanol FF + 50% glycérol dans H<sub>2</sub>O

(4) TBE 5X : 0,09M Tris borate , 2 mM EDTA, pH 7

**PROTOCOLE N° 6 : HYBRIDATION MOLECULAIRE DES AMPLIFIATS AVEC UNE SONDE MARQUEE À LA DIGOXIGENINE (Boehringer Mannheim)**

**1) Préparation de la sonde froide**

La séquence utilisée est marquée avec la digoxigénine par amplification en présence d'UTPs marqués à la digoxigénine : 40 cycles (Méthode Niblett) dans le MRA suivant :

**Préparation du MRA pour le marquage à la digoxigénine :**

(5) solution tampon 10 X	10 µl
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	10 µl
H <sub>2</sub> O	53,2 µl
dATP 10mM	2 µl
dCTP 10mM	2 µl
dGTP 10 mM	2 µl
dTTP 10mM	1,3 µl
dUTP-Dig 1 mM (Boehringer)	7 µl
Amorce polyA 100 µM	1 µl
Amorce WCIEN 100 µM	1 µl
ADNc 1ng/µl	10 µl
Taq Polymérase 5 U/µl (Promega)	0,5 µl
huile de paraffine	100 µl

(5) solution tampon : Thermo DNA poly 10x reac buffer Mg free (Boehringer)

## 2) Hybridation moléculaire des amplifiats avec la sonde froide

Les amplifiats sont séparés selon leur taille sur un gel d'agarose 1%; l'ADN est dénaturé dans le gel par dépurination en présence d'une solution HCl 0,25 N pendant 20 min puis de NaOH 0,4 N pendant 15 min. Les amplifiats sont transférés sous vide sur une membrane de nylon Hybond+ 45 µm (Amersham) en présence de NaOH 0,4 N pendant 1 heure.

La membrane est ensuite rincée dans une solution SSC 2X<sup>(1)</sup> et traitée comme il est décrit dans le manuel Boehringer Mannheim pour l'hybridation de fragments d'ADN sur une membrane de nylon :

- La membrane est préhybridée 1 heure dans une solution tamponnée qui sature les sites de liaison non spécifique : **S 1** : SSC 5X +BR 1% <sup>(2)</sup>+ N lauroyl sarcosine 1% + SDS 0,02%).

- L'hybridation est effectuée pendant une nuit à 68°C dans **S 1** en présence de la sonde préalablement dénaturée par chauffage 10 min. à 100°C (10 µl dans 5 ml de solution tamponnée). la sonde résiduelle non hybridée est éliminée par 3 séries de lavages stringents : 2 fois dans une solution de SSC 2X 30 min à 68°C ; 2 fois dans une solution de SSC 2X + 0,1% SDS, 30 min à 68°C, puis 2 fois dans une solution de SSC 0,1X + SDS 0,1%, 30 min à 68°C.

- La membrane est incubée dans une solution **S 2** (acide maléique 100mM + NaCl 150mM pH 5,5) pendant 30 min puis dans **S 2** additionnée de B.R. 1%

- incubation de la membrane en présence d'anticorps anti-digoxigénine couplés à la phosphatase alcaline (1/5000 dans **S 2** additionnée de B.R. 1%) pendant 30 min.

(Antidigoxigénine -AP Fab fragment 150 U/200 µl; Boehringer)

Après 2 rinçages dans **S 2**, puis trempage dans la solution **S 3** (Tris Hcl 100mM, pH9,5 + NaCl 100 mM+ MgCl<sub>2</sub> 50 mM), la révélation est effectuée dans **S 3** additionnée de NBT et de BCIP.

La réaction a été observée après 3 heures d'incubation à température ambiante.

(1) : SSC 20X : NaCl 3M + Citrate Na 0,3M pH 7,0

(2) : BR : Blocking reagent DNA labelling and detection kit non radioactive (Boehringer)

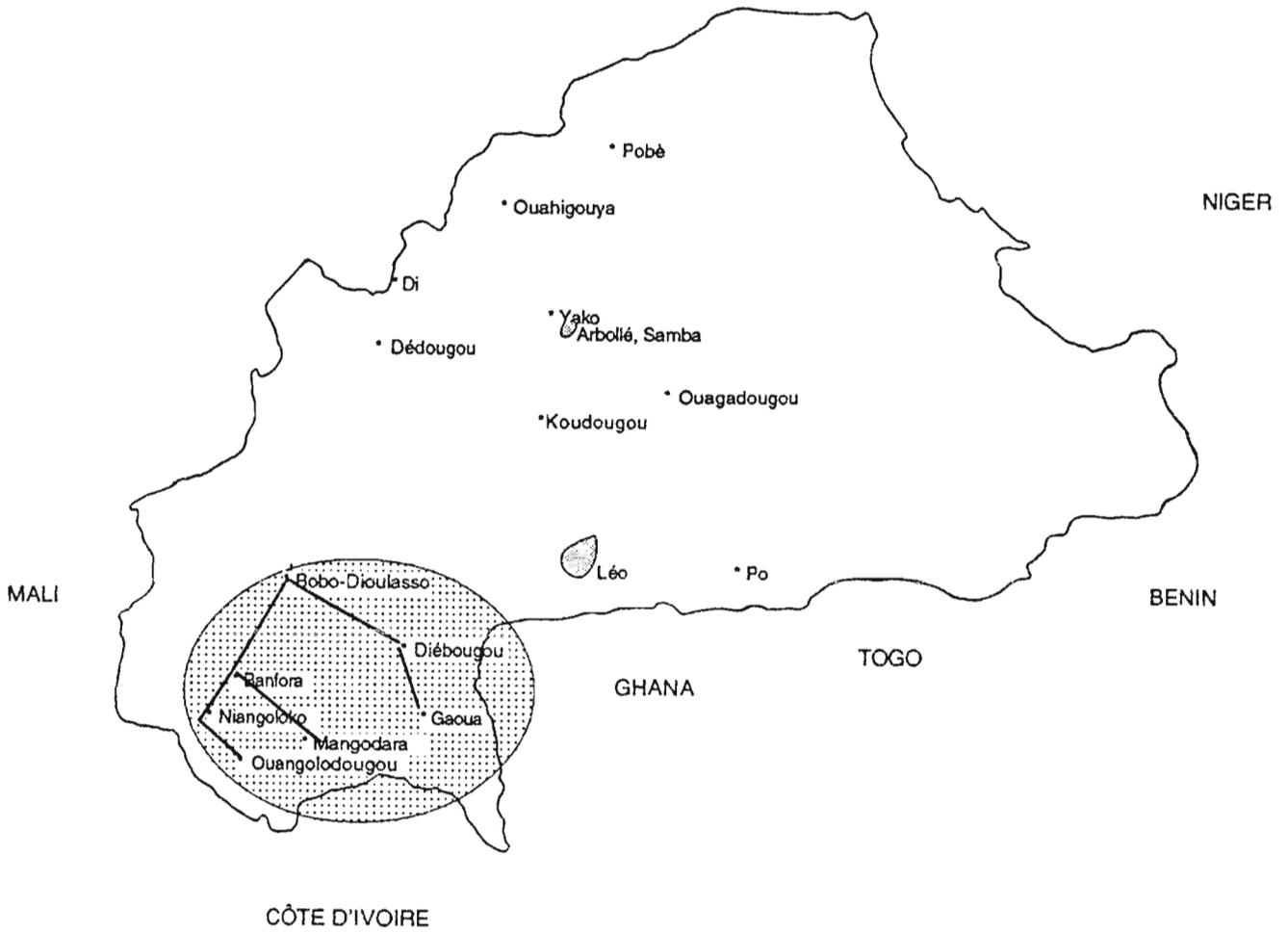


Figure 5 : Localisation des axes et zones de prospections au Burkina Faso

— : axes parcourus

● : zones de prospection

## 2- ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO

### 2-1- *Les zones de prospection*

Les zones étudiées ont été choisies en fonction des informations recueillies au début du stage : les régions Sud et Sud-Ouest produisent respectivement 50% et 35% de la production nationale et sont situées aux frontières du Ghana et de la Côte d'Ivoire; la région Centre présente un intérêt sur le plan écologique, du fait de son isolement, et parce qu'elle est considérée comme une relique de la zone de culture du cultivar IP. Les zones prospectées sont situées autour des axes Bobo Dioulasso -Banfora-Mangodara et Gaoua-Batié pour la région Sud-Ouest, dans les villages situés autour de Léo pour la région Sud et dans ceux situés autour de Yako (Arbollé, Samba) pour la région Centre (figure 5). Les prospections ayant été effectuées essentiellement dans des champs et sur les marchés, elles n'ont pas permis d'étudier les ignames sauvages du Burkina Faso.

### 2-2- *Le matériel végétal*

La culture de l'igname au Burkina Faso paraît très diversifiée au niveau des modes de culture et des populations cultivées. L'étude a été réalisée principalement sur les 2 principales espèces cultivées (*D. alata*, *D. cayenensis-rotundata*) qui sont connues pour être sensibles à la mosaïque de l'igname; *D. bulbifera* est beaucoup moins représentée. Des échantillons feuillés et des tubercules ont été prélevés dans les trois zones de prospections :

- Des tubercules de *D. alata* , *D. cayenensis-rotundata* et des bulbilles de *D. bulbifera* ont été achetés sur les marchés des zones de production au Burkina Faso. Ce matériel a été testé par la technique DAS-ELISA pour rechercher le virus.

- Les plantes d'igname (*D. alata* , *D. cayenensis-rotundata* , *D. bulbifera*) ont été observées dans les champs durant les prospections effectuées dans les différentes zones de production au Burkina Faso; des comptages de plants présentant des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname (mosaïque, surcoloration nervaire, cloques, nanisme de la plante) et des prélèvements de feuilles pour des tests DAS-ELISA ont été effectués.

### **2-3- Etude de la prévalence de la mosaïque de l'igname au Burkina Faso**

#### **2-3-1- Prélèvement des échantillons en champ**

Les échantillons feuillés ont été prélevés dans les champs sur des plantes d'igname en cours de croissance; les possibilités de détection des virus étant plus grandes dans les feuilles ayant atteint le stade adulte, celles-ci ont été prélevées préférentiellement et la présence ou l'absence de symptômes sur les feuilles a été notée; environ 5 feuilles ont été prélevées par plante. Les échantillons ont été conservés au froid puis testés en DAS-ELISA.

#### **2-3-2- Méthodes de diagnostic de la présence du virus**

La présence du virus dans les échantillons prélevés (feuilles ou tubercules) a été diagnostiquée par le test DAS-ELISA tel qu'il a été décrit dans le protocole 4 en utilisant les anticorps polyclonaux anti-YMV294 pour les tests effectués en 1991, puis les anticorps polyclonaux anti-YMV112 pour ceux effectués en 1992 et 1993.

Le test d'infectivité qui consiste à vérifier la présence du virus par inoculation mécanique artificielle sur des plantes de *N. benthamiana* a été appliqué à 10 plantes de chaque région dans lesquelles le virus n'avait pas été détecté par le test DAS-ELISA. Les plantes inoculées ont été maintenues en

chambre climatique. L'observation des symptômes et un test DAS-ELISA de contrôle ont été effectués sur ces plantes 2 semaines après leur inoculation.

### **2-3-3- Estimation des taux de prévalence**

Le taux de prévalence d'une maladie se définit comme le nombre total de cas infectés existant à un moment donné, rapporté à la taille de la population. Il a été évalué pour la mosaïque de l'igname, au Burkina Faso, en testant en DAS-ELISA des échantillons feuillés provenant des 3 zones de culture et des tubercules achetés sur les marchés de ces mêmes zones. Pour les échantillons prélevés en 1991, il n'y a pas eu de distinction des espèces d'igname ni des symptômes présents sur les plantes; par contre, ces informations ont été notées pour les échantillons collectés en 1992 et en 1993.

La prévalence des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname dans les champs a été estimée par des comptages effectués au cours des prospections. Cinq, sept et trois parcelles ont été prospectées dans les régions Sud, Sud-Ouest et Centre respectivement; 30% des plantes ont été observées dans chaque champ avec un maximum de 1500 plantes et un minimum de 100 plantes par champ.

### ***2-4- Estimation de l'incidence de la mosaïque de l'igname dans les régions Sud-Ouest et Centre du Burkina Faso***

L'incidence d'une maladie se définit comme le nombre de nouveaux individus infectés au cours d'une période de culture, rapporté à la taille de la population. Le taux d'incidence de la maladie virale qui affecte les ignames des régions Sud-Ouest et Centre a été estimé par le suivi de la recontamination naturelle au cours d'une saison de culture, de plantes non virosées installées dans des champs infectés (détection du virus par le test ELISA).

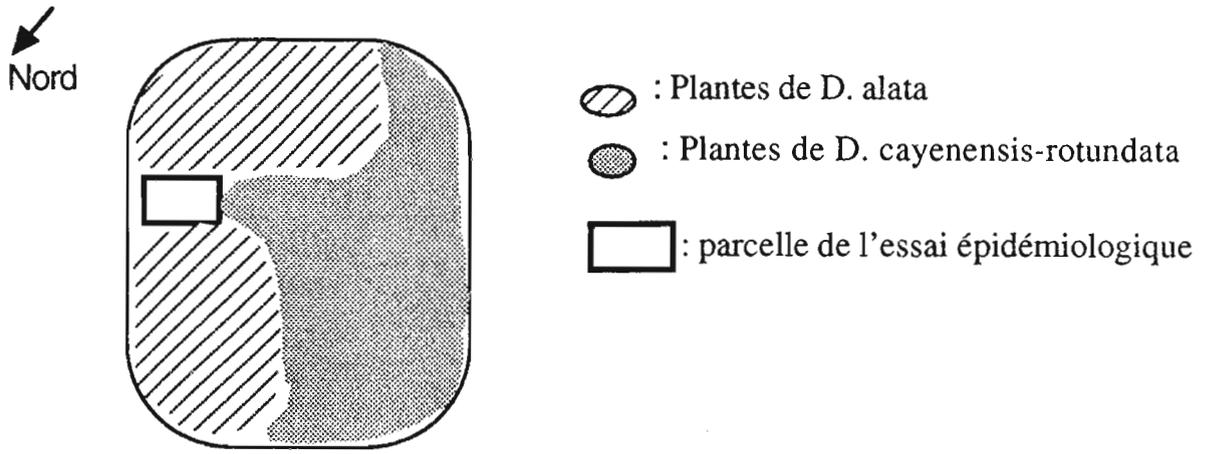
### 2-4-1- Dispositif expérimental

Les essais ont été installés dans deux agrosystèmes différents : Ouangolodougou dans la région Sud-Ouest; Arbollé et Samba dans la région Centre. Le choix et la distribution des effectifs correspondent aux possibilités pratiques d'installation et d'observation des plantes.

- **Ouangolodougou** (province de la Comoé) est un village situé à 50 km de Niangoloko à la frontière de la Côte d'Ivoire. De très grandes parcelles de monoculture d'igname ont été observées autour de ce village. La parcelle choisie compte environ 10 000 plantes appartenant à plusieurs populations des deux espèces *D. cayenensis-rotundata* et *D. alata*. Les plantes sont tuteurées et cultivées sur des buttes individuelles espacées d'environ 0,75 m l'une de l'autre.

-**Arbollé et Samba** (Province du Passoré) sont deux villages producteurs d'igname situés à 3 km l'un de l'autre, le long de l'axe Ouagadougou-Yako. L'igname de Pilimpikou (IP) est le seul cultivar représenté dans les parcelles. Les plantes sont cultivées sur des billons, espacées de 30 à 40 cm l'une de l'autre, et portées par des tuteurs épineux (on a observé parfois 3 plantes sur le même tuteur). Les parcelles choisies dans chaque village sont de taille semblable et comptent environ 1000 plantes.

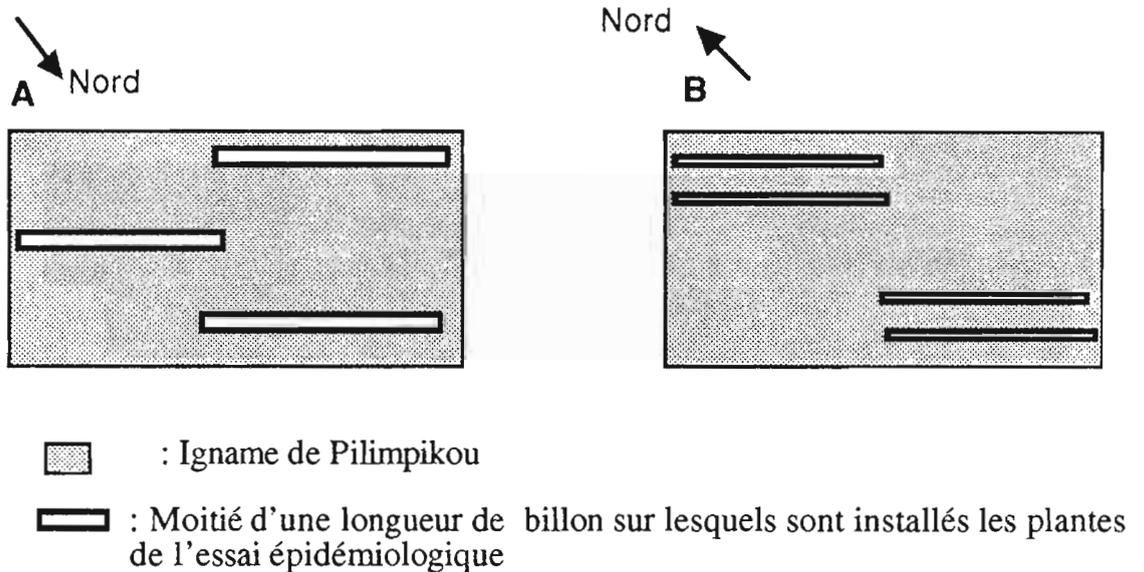
La prévalence de la maladie a été estimée dans les 3 parcelles avant la mise en place des essais, par des tests DAS-ELISA, sur 158 plantes à Ouangolodougou, 45 plantes à Arbollé, et 45 plantes à Samba. Les tubercules de *D. cayenensis-rotundata* et de *D. alata* achetés l'année précédente sur les marchés des régions Sud et Sud-Ouest, ont été testés en DAS-ELISA; ceux dans lesquels le virus n'a pas été détecté ont été conservés et fragmentés; ils ont été utilisés comme



**Figure 6 :** Dispositif expérimental de l'essai de Ouangolodougou (Sud-Ouest)

115 tubercules d'igname ont été semés sur 15 rangées de buttes espacées de 75 cm l'une de l'autre. Il y a 6 à 9 tubercules par rangées : 2 de *D. cayenensis-rotundata* alternés avec 1 de *D. alata*.

Le champ d'igname compte environ 10 000 plantes des 2 espèces.



**Figure 7 :** Dispositifs expérimentaux des essais de la région Centre : Arbolle(A) et Samba (B)

**A:** Environ 38 tubercules espacés de 40 cm l'un de l'autre ont été plantés sur chaque moitié de billon (5ème, 9ème et 12ème billon) dans un champ comportant 15 billons espacés de 75 cm l'un de l'autre et environ 1000 plantes de l'Igname de Pilimpikou;

**B :** Environ 29 tubercules espacés de 40 cm l'un de l'autre ont été plantés sur chaque moitié de billon (7ème, 13ème, 16ème et 19ème billon) dans un champ comportant 23 billons espacés de 75 cm l'un de l'autre et environ 1000 plantes de l'Igname de Pilimpikou.

semenceaux dans les essais de contamination en conditions naturelles. Des tubercules de *D. cayenensis-rotundata* et de *D. alata* ont été semés entre le 01 et le 04 Juillet 1993 dans des champs d'igname contaminés par le virus, à raison de 115 semenceaux dans chacun des trois essais. Les essais ont été mis en place à l'intérieur des parcelles cultivées, selon le dispositif indiqué sur les figures 6 et 7.

#### **2-4-2- Suivi des essais**

Les plantes issues des tubercules semés à l'intérieur de parcelles infectées ont été observées pendant 5 mois (de juillet à décembre 1993) pour l'apparition des symptômes de la maladie. Elles ont également été testées en DAS-ELISA chaque mois pour la présence du virus. Le nombre de plantes contaminées a été évalué au bout de 5 mois à partir des résultats de l'observation des symptômes et de ceux du test DAS-ELISA. Les tubercules issus de la croissance de ces plantes ont été récoltés et testés en DAS-ELISA.

TABLEAU 4 : Origine des isolats de virus étudiés

N° des isolats	lieu de prélèvement	Ville/pays d'origine	espèce	cultivar	Matériel
1 à 4	*Champs	Arbolle/B. F.	<i>D. cay-rot/D. abys</i>	I. Pilimpikou	plante
5 à 7	*Champs	Samba/B. F.	<i>D. cay-rot/D. abys</i>	I. Pilimpikou	plante
8 et 9	* marchés	Arbolle/B. F.	<i>D. cay-rot/D. abys</i>	I. Pilimpikou	plant
10 à 15	* marchés	Samba/B. F.	<i>D. cay-rot/D. abys</i>	I. Pilimpikou	plante
16 et 17	* marchés	Mangodara/B. F.	<i>D. alata</i>	Florido	plante
18	*Champs	Ouangolodougou/B.F.	<i>D. alata</i>	Florido	plante
19	* marchés	Bobo-Dioulasso/B.F.	<i>D. cay-rot</i>		plante
20	* marchés	Ouangolodougou/B.F.	<i>D. cay-rot</i>		plant
21	* marchés	Mangodara/B.F.	<i>D. cay-rot</i>		plante
22 à 29	*Champs	Ouangolodougou/B.F.	<i>D. cay-rot</i>		plante
30 à 32	IITAWye College	Nigeria	<i>D. cay-rot</i>	TDR 915;916;917	vitroplant
33	IITA/Burkina Faso	Nigeria	<i>D. cay-rot</i>	TDR 608	plante
34	Station INA	N'dali/Bénin	<i>D. cay-rot</i>	Baniakpa	tubercule
35 et 36	Station INA	N'dali/Bénin	<i>D. cay-rot</i>	Makpawa	tubercule
37	* marchés	Savalou/Bénin	<i>D. cay-rot</i>	Laboko	tubercule
38 à 40	*Champs	Goua/Bénin	<i>D. cay-rot</i>	Baniakpa	tubercule
41	collection ORSTOM	Dompago/Bénin	<i>D. cay-rot</i>	Makpawa	plante
42	collection ORSTOM	Bamileke/Cameroun	<i>D. cay-rot</i>	Shoufing	vitroplant
43 et 44	ORSTOM/FAST	Abidjan/C. d'Ivoire	<i>Hyb Kren/D. prae</i>		vitroplant
45	*Champs	Nord-Ouest/Guyane Fr.	<i>D. trifida</i>	cousse couche violet	plante
46 à 54	* marchés	Nord-Est/ Guyane Fr.	<i>D. trifida</i>	cousse couche violet	plante
55	Collection INRA	Guadeloupe	<i>D. alata</i>	Divin N°1	plante
56	Collection INRA	Guadeloupe	<i>D. trifida</i>	INRA 5-20	vitroplant
57	Collection INRA	Guadeloupe	<i>D. cay-rot</i>	Grande savanne	vitroplant
58	collection ORSTOM	Abidjan/C. d'Ivoire	<i>D. cay-rot</i>	Gbangban	plante
59	collection ORSTOM	Abidjan/C. d'Ivoire	<i>D. cay-rot</i>	Baka ganou	plante
60 = YMV 112	ORSTOM/DESSA	Bouaké/ C. d'Ivoire	<i>D. cay-rot</i>	Nandokaka	vitroplant
61	collection ORSTOM	Bouaké/ C. d'Ivoire	<i>D. mangenotiana</i>		plante
62	collection ORSTOM	Dourou/Cameroun	<i>D. cay-rot</i>	Tii	vitroplant
63	Collection INRA	Guadeloupe	<i>D. alata</i>	AIA 445	plante
64	Collection INRA	Guadeloupe	<i>D. cay-rot</i>	Pognon	vitroplant
65	collection ORSTOM	Brésil	<i>D.alata</i>	Florido	vitroplant
66	collection ORSTOM	Ateou/N. Calédonie	<i>D. alata</i>	Koubaou	vitroplant
67	collection ORSTOM	Ateou/N. Calédonie	<i>D.alata</i>	Katjoa	vitroplant
68	collection ORSTOM	Boyen N. Calédonie	<i>D.alata</i>	Fidji	vitroplant
69	collection ORSTOM	Ateou/N. Calédonie	<i>D.alata</i>	Katjoa N'ZA	vitroplant

\* Les isolats proviennent de champs et de marchés différents

*D. cay-rot* : *D. cayenensis-rotundata*; *D. abys* : *D. abyssinica*; Guyane FR. : Guyane Française;

*Hyb Kren/D. prae* : Hybride de *D. cayenensis-rotundata* cv. *krenge* et de *D. praehensilis*

Les cultivars de *D. cayenensis-rotundata* : Igname de Pilimpikou, Makpawa et Baniakpa sont des variétés à affinité pérennes ou semi pérennes

### 3- ETUDE DE LA VARIABILITE DES ISOLATS DE VIRUS D'IGNAME

#### 3-1- *La collection d'isolats de virus d'igname*

Une collection d'isolats de virus a été constituée à partir d'échantillons originaires du Burkina Faso (prélevés au cours des prospections), du Bénin (fournis par R. DUMONT, CIRAD/IITA et Mr. DOSSOU, INA), du Nigeria (fournis par Dr MANTELL, Wye College R.U.), de Guyane Française, de la Guadeloupe (fournis par l'INRA Antilles Guyane). L'indexation de la collection de vitroplants d'igname du L.R.G.A.P.T. de l'O.R.S.T.O.M. Montpellier a permis de compléter cette collection avec des échantillons de Côte d'Ivoire, du Cameroun, du Brésil, et de Nouvelle Calédonie. Le tableau 4 donne pour les différents isolats, les origines (plantes hôtes et origines géographiques).

Chaque isolat a été transmis par inoculation artificielle à partir de feuille d'igname ou de fragment de tubercule sur des plantes de *N. benthamiana* selon le protocole de transmission mécanique. Après vérification de l'infection par le test DAS-ELISA (avec les anticorps polyclonaux anti YMV<sub>112</sub> et anti YMV<sub>294</sub>), les symptômes observés ont été notés.

Différents potyvirus ont été testés en DAS-ELISA pour évaluer la spécificité des anticorps monoclonaux : le virus de la mosaïque de la canne à sucre (SCMV; offert par P. BAUDIN CIRAD-CA); le virus de la mosaïque du navet (TuMV; offert par C. KERLAN INRA, Rennes le Rheu), le virus des taches ocellées de l'arachide (GEV), le virus de la panachure du poivron (PVMV) le virus du shoestring de *Datura* (*Datura shoestring virus*, DSV), et le virus Y de la pomme de terre (PVYo), (offerts par Dr BRUNT, Little Hampton, U.K.).

## PROCOLE N°7 : SDS-PAGE ET WESTERN BLOT

Préparation des échantillons : broyage des feuilles virosées au 1/5 (g/ml) dans de l'eau distillée; après filtration sur un fragment de Miracloth, ajouter (v/v) la solution dissociante de Laemmli ; incuber à 100°C pendant 3 minutes puis centrifuger 5 minutes à 5000 g;

Séparation des protéines par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide discontinu (5% puis 12%) en présence de SDS : dépôt des échantillons dans les puits (20-40 µl) et migration sous les conditions électrophorétiques suivantes : courant constant; voltage 60 V pendant 1 h 30 puis 60 à 85 V pendant 30 minutes puis 80 V pendant 12 heures;

Transfert électrophorétique des protéines sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm Schleicher et Schell) pendant 1 heure sous un voltage constant de 100V et un courant de 1A (Transblot electro cell; Bio Rad).

### REVELATION IMMUNO ENZYMATIQUE

Saturation avec PBS T 0,05% + 5% lait écrémé  
1 h à 37°C

3 rinçages de 3 minutes dans PBS-T

Incubation avec les anticorps anti-YMV<sub>112</sub> (1/800) (1)  
ou MAb 1/10 000 (2)  
dans PBS-T + Héparine 5 U / ml  
2 h à température ambiante

3 rinçages de 3 minutes dans PBS-T

Incubation avec les anticorps anti-IgG de lapin  
1/6000 (1) ou  
anti IgG de souris 1/6000 (2) dans PBS-T  
+ Héparine 5 U / ml  
2 h à température ambiante

3 rinçages de 3 minutes dans PBS-T  
2 rinçages de 5 minutes dans PBS

révélation de l'activité enzymatique avec NBT/BCIP dans Tris HCl 0,1M + NaCl 0,1M  
+ MgCl<sub>2</sub> 5mM

### **3-2- Etude de la mobilité électrophorétique des protéines de capsidie par SDS-PAGE -Western blot**

Cette technique a pour avantage de séparer en fonction de leur mobilité électrophorétique, les protéines présentes dans les extraits bruts de plantes, et de les détecter ensuite par une méthode immuno-enzymatique. Pour cela, les protéines sont séparées en conditions dénaturantes (en présence de sodium dodécyl sulfate; SDS) selon le système discontinu de LAEMMLI (1970). Les bandes de protéines sont ensuite transférées sur une feuille de nitrocellulose et seules les protéines reconnues par l'anticorps utilisé sont révélées par une réaction immuno-enzymatique colorée.

L'utilisation de la technique SDS PAGE-western blot a nécessité des mises au point aussi bien au niveau de l'électrophorèse (concentration du gel de polyacrylamide, conditions de migration) que pour la révélation immunologique des bandes de protéines. Plusieurs concentrations de gels de polyacrylamide ont été testées pour comparer la migration des protéines de capsidie à partir de préparations de virus purifié : 10%, 12%, 13%, ainsi que des gradients linéaires de polyacrylamide : 7,5 à 15%; 10 à 20%. La composition des gels est indiquée dans le tableau 5. Les conditions de migration retenues sont les suivantes :

**1h30 min à 60V+ 30 min de 65 à 80 V + 14 h à 80 V (protocole 7)**

Le transfert est réalisé selon la technique décrite par TOWBIN *et al.*, (1979) sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm; Schleicher et Schuell) par électrophorèse (trans-blot electrophoretic transfer cell, BioRad) pendant 1 heure sous un courant de 100V et un ampérage de 1 A .

**SOLUTIONS TAMPONS UTILISES POUR L'ELECTROPHORESE**

**SOLUTION DISSOCIANTE DE LAEMMLI** : Tris-HCl 62,5mM pH 6,8; SDS 2%;  
2-Mercapto-éthanol 5%; Glycérol 10%

**SOLUTION TAMPON DE MIGRATION** : Tris 25mM; Glycine 192 mM SDS 0,1%

**SOLUTION TAMPON DE TRANSFERT** : Tris 25mM; Glycine 192 mM ; Méthanol 20 %

**ACRYLAMIDE 30%** : Acrylamide 30%; bis- Acrylamide 8%

**TRIS HCL 1,875M** pH 8,8; **TRIS HCL 1,25M** pH 6,8

**SDS 10%** ; **APS 10%**

**TABLEAU 5 COMPOSITION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE**

% Acrylamide	Gel de séparation Gradient 10-20 %		Gel de séparation	Gel de concentration
	10% 15ml	20 % 15 ml		
Solutions	10% 15ml	20 % 15 ml	12% 30 ml	5% 5 ml
Acrylamide30% (ml)	5	10	12	2,5
Eau (ml)	6,77	1,77	11,5	9,18
Tris 1,875 M (ml)	3	3	6	-
Tris 1,25 M (ml)	-	-	-	3
SDS 10% (ml)	0,150	0,150	0,300	0,150
TEMED (ml)	0,0075	0,0075	0,0150	0,0075
APS 10% (ml)	0,025	0,025	0,050	0,025

**MARQUEURS DE POIDS MOLECULAIRE**

MW SDS 70L kit  
SIGMA

Albumine bovine	66000
Ovalbumine	45000
Glyceraldehyde 3-p deshydrogénase	36000
Trypsinogène	24000
Inhibiteur de Trypsin	20100
a-Lactalbumine	14200

**PROTOCOLES N° 8 : ACP ET ACPI ELISA**coating

broyer le matériel végétal et diluer au 1/20 dans une solution tampon carbonate pH 9,6  
centrifuger 5 min à 10 000 t/min  
déposer 100 µl/puits; 3 heures à 37°C  
3 rincages

saturation

PBS-T 0,05% additionné de lait écrémé 3%  
1 heure à 37°C  
3 rincages

ACP

Anticorps anti-YMV conjugué  
à la phosphatase alcaline  
1/1000 dans PBS-T 0,05%  
3 heures à 37°C

3 rincages

ACPI

Anticorps polyclonal anti-YMV(1)  
ou Anticorps monoclonal anti-YMV (2)  
dans PBS-T 0,05%, 3 heures à 37°C

3 rincages

Anticorps anti-lapin (1)ou  
Anticorps anti-souris (2)  
dans PBS-T 0,05%, 3 heures à 37°C  
3 rincages

dépôt du substrat PNP-P

100 µl/puits

lecture à 405 nm après 1 heure à l'obscurité à 37° et après 1 nuit à 4°C

La révélation immunologique a été réalisée selon la méthode décrite par BODE *et al.*, (1984), à l'aide des anticorps polyclonaux anti YMV<sub>112</sub> (1/800) puis d'anticorps anti-immunoglobulines de lapin (goat anti rabbit; Sigma; 1/6000).

### ***3-3- Etude de la variabilité antigénique des isolats de virus d'igname à l'aide d'anticorps monoclonaux***

#### **3-3-1- Les anticorps monoclonaux anti -YMV<sub>112</sub>**

Des anticorps monoclonaux dirigés contre la souche YMV<sub>112</sub> ont été préparés par L. GIVORD et G. SOMMERMEYER (IBMC Strasbourg) selon les procédures décrites par FAZEKAS de ST GROWTH et SCHEIDEGGER, (1980) et STOCKER *et al.*, (1982). Sept hybridomes ont été obtenus et sous clonés deux fois. Les 28 sous-clones obtenus ont été injectés à des souris pour la production de liquide d'ascites. Ces liquides d'ascites ont été testés et quatre d'entre eux ont été retenus pour l'étude de la variabilité antigénique des isolats de virus d'igname.

#### **3-3-2- Mise au point de l'utilisation des anticorps monoclonaux**

La réactivité des 28 sous-clones vis à vis de l'isolat YMV<sub>112</sub> (préparation de virus purifié, VP, 1 µg/ml; extrait brut de plante infectée, 1/20) a été testée en DASI-ELISA, en ACPI-ELISA et en western-blot. La procédure du double sandwich indirect (DASI-ELISA; protocole 8) a été utilisée pour étudier la réactivité des anticorps monoclonaux vis à vis du virus de l'igname. La méthode du simple sandwich indirect (ACPI; protocole 9) permet d'étudier cette même réactivité vis à vis d'un antigène directement fixé sur la plaque. Les procédures ELISA utilisées sont décrites dans le tableau 6.

**PROTOCOLE N° 9 : DASI ELISA**coating

Anticorps Monoclonal anti-YMV (1)  
 ou Anticorps Polyclonal IGg1  $\mu\text{g/ml}$  (2)  
 dans une solution tampon carbonate pH 9,6  
 100  $\mu\text{l/puits}$ ; 3 heures à 37°C  
 3 rincages

saturation

PBS-T 0,05% additionné de lait écrémé 3%  
 200  $\mu\text{l/puits}$ ; 1 heure à 37°C  
 3 rincages

dépôt de l'antigène

broyer le matériel végétal au 1/20 dans du PBS-T +lait 3%  
 centrifugation 5 min à 10 000 t/min  
 déposer 100  $\mu\text{l/puits}$ ; 3 heures à 37°C  
 3 rincages

Anticorps polyclonal anti-YMV (1) ou  
 Anticorps monoclonal anti-YMV (2)  
 dans PBS-T 0,05%, 3 heures à 37°C  
 3 rincages

Anticorps anti-lapin (1) 1/6000; ou  
 Anticorps anti-souris (2) 1/6000  
 dans PBS-T 0,05%, 3 heures à 37°C  
 3 rincages

dépôt du substrat PNP-P

100  $\mu\text{l/puits}$

lecture à 405 nm après 1 heure à l'obscurité à 37° et après 1 nuit à 4°C

**TABLEAU 6 Conditions d'utilisation des différents réactifs dans les différentes procédures de test ELISA**

Procédures	Etapas					
1	DAS	PAb $10^{-3}$	Ag 1/20	PAb-E $0,5 \cdot 10^{-3}$		PNP-P
2	DASI	PAb $10^{-3}$	Ag 1/20	MAb *	GAM-E 1/4000	PNP-P
3	DASI	MAb $10^{-4}$	Ag 1/20	PAb $10^{-3}$	GAR-E 1/6000	PNP-P
4	ACP		Ag 1/20	PAb-E $0,5 \cdot 10^{-3}$		PNP-P
5	ACPI		Ag 1/20	PAb $10^{-3}$	GAR-E 1/6000	PNP-P
6	ACPI		Ag 1/20	MAb*	GAM-E 1/4000	PNP-P

PAb : Anticorps polyclonal anti YMV; MAb : anticorps monoclonal anti YMV; Ag : antigène

PAb-E : Anticorps polyclonal anti YMV marqué à la Phosphatase alcaline; GAR-E Anticorps de chèvre anti lapin marqué à la Phosphatase alcaline; GAM-E : Anticorps de chèvre anti souris marqué à la Phosphatase alcaline; PNP-P : para nitro phényl phosphate.

\* : Les MAbs 3.5.1, 7.4.3 et 11.1.2 sont utilisés à la dilution  $10^{-5}$  et le MAb 15.3.3 à la dilution  $10^{-4}$

La détection de la protéine de capside du virus purifié YMV<sub>112</sub> en western blot, par les anticorps monoclonaux, permet d'étudier la réactivité des MAbs vis à vis de la protéine traitée en conditions dénaturantes. Après avoir déposé, sur un gel de polyacrylamide 12%, des préparations de virus purifié (2 µg/ puits), les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose et les bandes ont été incubées, avec successivement des anticorps monoclonaux et des anticorps anti-IgG de souris. Le protocole utilisé est le même que celui qui a été décrit dans le protocole 7.

Les titres des quatre MAbs utilisés pour la détection du VP (YMV<sub>112</sub>, 1 µg/ml) ont été déterminés en DASI-ELISA (procédure 2) en testant des dilutions de liquides d'ascites allant de 10<sup>-3</sup> à 10<sup>-9</sup>. Le seuil de détection est fixé à une D.O. de 0,300 après une réaction enzymatique de 1 heure à 37°C.

Nous avons voulu vérifier si les constituants de l'extrait brut (EB) de plante saine (*N. benthamiana*) pouvaient influencer sur la détection du virus YMV<sub>112</sub> par les anticorps monoclonaux en DASI-ELISA (procédure 2). Pour cela, différentes préparations d'EB de *N. benthamiana* sain (1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/100) ont été ajoutées à des dilutions différentes de VP de façon à avoir une concentration finale en virus de 0,2, 0,4, 0,8 et 1 µg/ml. Des préparations de virus sans EB constituent les témoins positifs, tandis que les différentes dilutions d'EB ont été testées comme témoins négatifs.



### 3-3-3 Etude de la variabilité antigénique des isolats de virus d'igname

La collection des 69 isolats a été testée contre 4 anticorps monoclonaux en DASI ELISA (procédures 2 et 3); les dilutions des différents anticorps et antigènes ont été choisies en fonction des résultats obtenus lors de la mise au point du test (§ 3-3-2) et sont rassemblées dans le tableau 6.

### 3-3-4-Mise au point d'un kit de détection immunologique du YMV

La mise au point d'un test de détection du YMV avec un anticorps monoclonal a été effectuée à partir d'isolats provenant de différentes espèces et variétés d'igname, afin de répondre aux besoins actuels d'un kit de détection utilisable sur cette culture. Deux isolats proviennent de *D. alata* cv. Florido; trois de *D. trifida* cv. cousse-couche violette, deux de *D. cayenensis-rotundata* cv. IP, un de *D. cayenensis-rotundata* cv. Nandokaka et un d'un hybride de *D. cayenensis-rotundata* cv. Krenglé et *D. praehensilis*.

Six procédures du test ELISA ont été comparées et des modifications ont été apportées au niveau des différentes étapes du test (tableau 7 ):

Deux tampons de broyage de l'antigène ont été testés : le tampon PBS-T 0,05% + lait écrémé 3% utilisé habituellement, ou PBS-T 0,05% + lait écrémé 3% + PVP 2% + DIECA 0,2%;

Quatre méthodes de broyage ont été comparées : mortiers à 24°; mortiers à -20°C; broyage à 0°C à l'aide d'un appareil ultra-turrax; et broyage à 0°C à l'aide d'un broyeur à bille.

Trois dilutions de l'antigène ont été testées : 1/20; 1/50; 1/100.

# **RESULTATS-DISCUSSION**

**CHAPITRE I ETIOLOGIE DES MALADIES VIRALES DE  
L'IGNAME AU BURKINA FASO**

**CHAPITRE II ASPECTS ECOLOGIQUES ET  
EPIDEMIOLOGIQUES D'UNE MOSAIQUE DE L'IGNAME AU  
BURKINA FASO**

**CHAPITRE III ETUDE DE LA VARIABILITE DES ISOLATS DE  
VIRUS INFECTANT LES IGNAME ET MISE AU POINT D'UN  
TEST DE DETECTION IMMUNOLOGIQUE DU VIRUS**



Photo 1 : Symptômes de mosaïque sur feuille de *D. cayenensis-rotundata*



Photo 2 : Symptômes de mosaïque sur feuille de *D. alata*

Figure 8 : Symptômes de mosaïque et surcoloration nervaire présentés par des plantes d'ignames cultivées en serre *D. cayenensis*, *D. alata*

## CHAPITRE I - ETIOLOGIE DES MALADIES VIRALES DE L'IGNAME AU BURKINA FASO

### 1- IDENTIFICATION DU VIRUS RESPONSABLE DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO

La caractérisation du virus infectant les plantes d'igname au Burkina Faso, a été effectuée à partir des observations de symptômes foliaires, des observations en microscopie électronique et en microscopie optique, à partir de l'étude de la gamme de plantes hôtes de ce virus et des modes de transmission de la maladie. Des anticorps polyclonaux anti-YMV<sub>112</sub> et anti-YMV<sub>294</sub> ont été utilisés pour diagnostiquer la présence du virus. L'amplification de l'extrémité 3' du génome des différents isolats par la technique d'immunocapture-RT-PCR a été effectuée et l'hybridation moléculaire des amplifiats avec la même séquence amplifiée à partir de l'isolat YMV<sub>112</sub> a été vérifiée.

#### 1-1- *Symptomatologie des plantes infectées*

Parmi les plantes cultivées en serre, celles provenant de la région Centre (6 plantes du cultivar IP) et de la région Sud-Ouest (3 plantes de *D. cayenensis-rotundata*) présentent des symptômes très forts de mosaïque et de surcoloration nerveaire, semblables à ceux observés au Nigeria à la Guadeloupe et en Côte d'Ivoire sur les plantes de même espèce; par contre, les symptômes de mosaïque sont beaucoup plus atténués sur les 3 plantes de *D. alata* originaires du Sud-Ouest et cultivés dans les mêmes conditions (Fig. 8, photos 1 et 2).

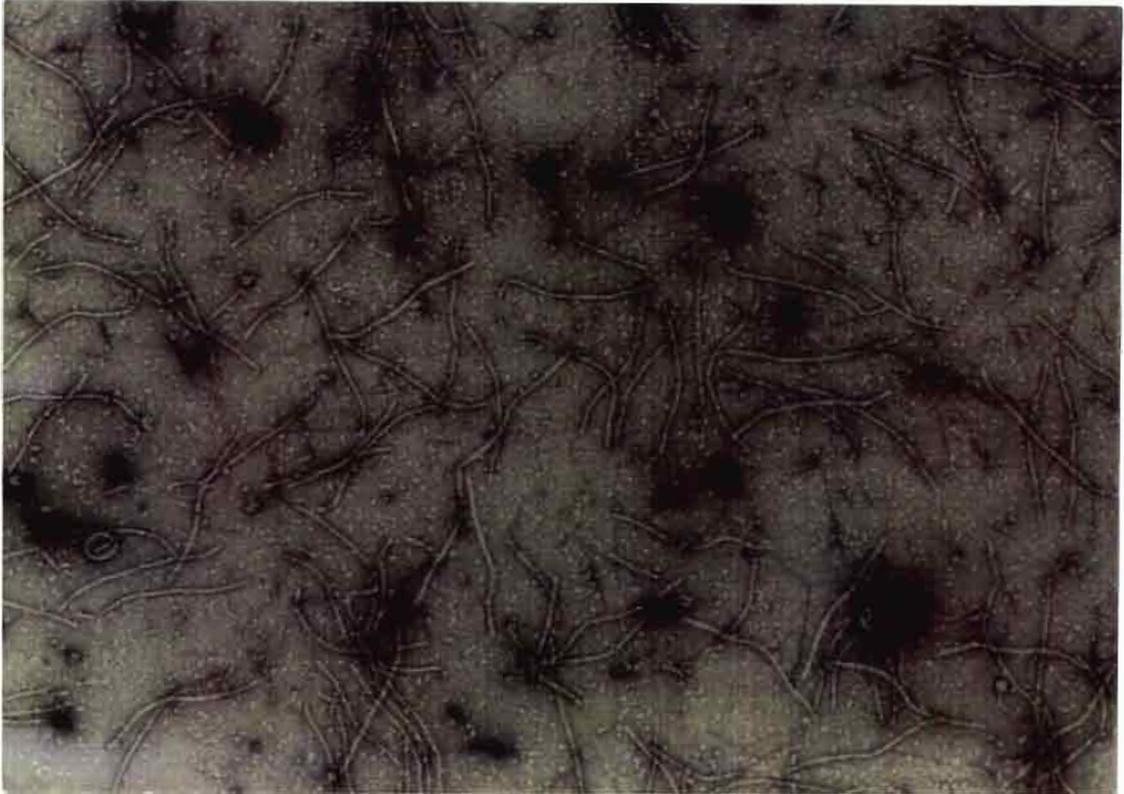


Figure 9: Particules filamenteuses du virus infectant les ignames du Burkina Faso: observation en microscopie électronique après coloration négative à l'acétate d'uranyle 2%

└── : 327 nm

### **1-2- Observations au microscope électronique**

Des grilles de microscopie ont été préparées avec des extraits de feuilles d'igname ou de *N. benthamiana* infectées par les différents isolats de virus. L'observation au microscope électronique des grilles préparées avec des extraits de feuilles de *N. benthamiana* a permis d'identifier dans tous les cas, de nombreuses particules filamenteuses et flexueuses, parfois agrégées bout à bout. Les observations effectuées sur des préparations de feuilles d'igname présentent de très rares filaments de même nature. La mesure de 120 de ces particules a permis d'obtenir les dimensions moyennes suivantes :  $753 \pm 27$  nm de long et 13 nm de diamètre (Fig. 9). Les préparations effectuées à partir de préparations de virus purifié YMV<sub>112</sub> permettent d'observer le même type de particules.

### **1-3- Observations au microscope optique**

La présence d'inclusions cylindriques cytoplasmiques, typiques des infections par des potyvirus, a été recherchée dans les cellules épidermiques de feuilles de *N. benthamiana* infectées par les différents isolats de virus d'igname. Les procédés de coloration (CHRISTIE et EDWARDSON, 1986) ont permis d'observer des inclusions cytoplasmiques peu nombreuses mais caractéristiques dans les cellules des plantes infectées par les différents isolats.

### **1-4- Détection du virus par la technique DAS-ELISA**

Plusieurs tests DAS-ELISA ont été effectués sur les plantes d'igname cultivées en serre et sur des plantes de *N. benthamiana* infectées. Le virus a été détecté dans toutes les plantes par les anticorps polyclonaux anti-YMV<sub>112</sub> et anti-YMV<sub>294</sub>. Les valeurs de D.O. obtenues montrent que la détection du virus dans les feuilles d'igname est très aléatoire, selon le stade de développement de la

TABLEAU 8 : Résultats des essais de transmission du virus par pucerons

isolat	nb de plantes infectées sur le nombre de plantes inoculées				
	1er essai	2ème essai	3ème essai	4ème essai	5ème essai
	<i>M. persicae</i>	<i>A. Gossypii</i>	<i>A. Gossypii</i>	<i>A. Gossypii</i>	<i>A. Gossypii</i>
BF SOA 1	0/10	nt	4/10	2/10	10/20
BF SOA 2	nt	1/10	2/10	nt	nt
BF SOC 1	0/10	2/10	2/10	2/20	1/20
BF SOC 2	nt	nt	2/10	0/10	nt
BFC 1	nt	nt	0/10	0/10	0/10
BFC 2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
BFC3	0/10	0/10	0/10	0/10	nt
Guyane	0/10	3/10	6/10	4/10	10/20

BF SOA Burkina Faso Sud-Ouest *D. alata*; BF SOC : Burkina Faso Sud-Ouest *D. cayenensis-rotundata*; BFC : Burkina Faso Centre

nt : non testé

plante, l'âge des feuilles prélevées et les périodes de prélèvement des échantillons. Par contre, pour toutes les plantes de *N. benthamiana* infectées, des valeurs de D.O. largement supérieures au seuil de positivité (donc indiquant la présence du virus) ont été obtenues.

#### **1-5- Transmission du virus par les tubercules**

Le virus a été détecté en DAS-ELISA avec les deux anticorps polyclonaux anti-YMV dans des extraits bruts de tubercules issus de plantes virosées; les feuilles des plantes issues de ces tubercules présentent des symptômes de mosaïque et les anticorps polyclonaux anti-YMV y détectent aussi la présence du virus.

#### **1-6- Transmission des isolats de virus par pucerons**

Cinq séries d'essais de transmission d'isolats de virus par des pucerons ont été effectuées avec l'aide de G. LABONNE et M. YVON (Laboratoire de Zoologie de l'INRA Montpellier). La présence du virus a été diagnostiquée dans les plantes de *N. benthamiana* inoculées, par l'observation des symptômes et les réponses du test DAS-ELISA. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 8.

Les isolats infectant les ignames *D. cayenensis-rotundata* et *D. alata* (BFSOC 1 et 2, BFSA 1 et 2) ont pu être transmis au moins une fois par *Aphis Gossypii* selon le mode non persistant (2ème, 3ème, 4ème, et 5ème essais); les plantes de *N. benthamiana* infectées présentaient au bout de 10 jours une forte mosaïque et des cloques marquées. Par contre, les isolats infectant les ignames de la région Centre (BFC 1, BFC 2, et BFC 3) n'ont jamais pu être transmis dans nos conditions de travail. L'essai effectué avec *Myzus persicae* n'a donné aucun résultat positif (1er essai).



Photo 1 : Symptômes de mosaïque sur des plantes de *N. benthamiana* infectées par le virus de la mosaïque de l'igname

photo 2: Plante de *N. benthamiana* infectées par le virus de la mosaïque de l'igname et présentant des cloques et une mosaïque



photo 3 :Spots chlorotiques sur des feuilles de *C. amaranticolor* infecté par le virus de la mosaïque de l'igname

Figure 10 : Symptômes observés sur différentes plantes -hôtes inoculées avec le virus de la mosaïque de l'igname ; *N. benthamiana*; *C. amaranticolor*.

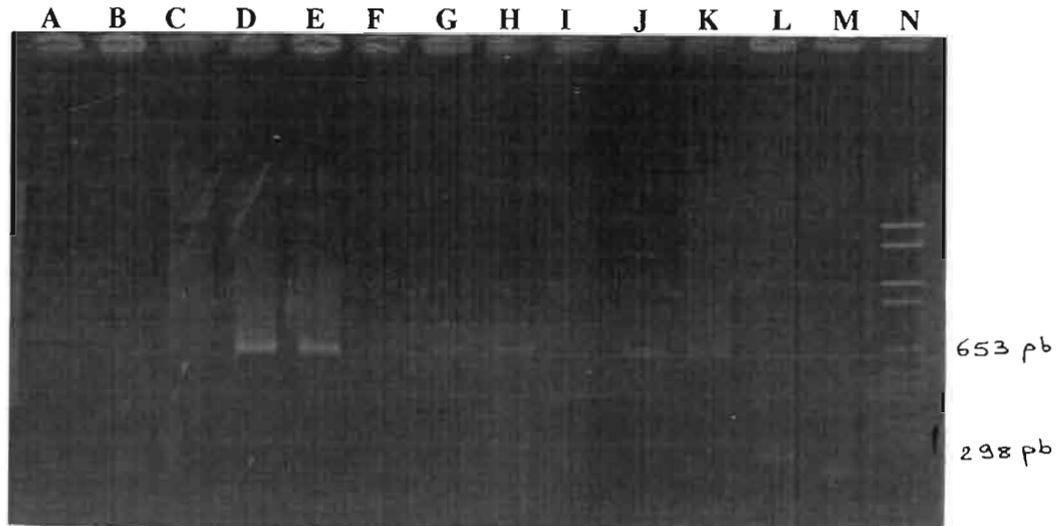
### **1-7- Etude de la gamme de plantes-hôtes**

Tous les isolats de virus étudiés ont pu être transmis mécaniquement à quatre espèces différentes de plantes-hôtes : *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, et *N. megalosiphon* présentaient au bout de 10 jours une infection systémique se manifestant par une mosaïque jaune et des cloques (photo 1 et 2 figure 10), tandis que des lésions locales chlorotiques apparaissaient après 3 semaines sur les feuilles inoculées de *C. amaranticolor* (photo 3 figure 10). Les mêmes plantes-hôtes inoculées avec l'isolat YMV<sub>112</sub> présentaient les mêmes symptômes.

### **1-8- Amplification de l'extrémité 3' terminale du génome et hybridation moléculaire avec une sonde nucléique spécifique de l'isolat YMV<sub>112</sub>**

Des anticorps polyclonaux anti-YMV<sub>112</sub> ont été utilisés pour capturer les différents isolats de virus du Burkina Faso à partir d'extraits bruts d'igname ou de *N. benthamiana* infectés. Quatre isolats de virus d'igname originaires de Guyane Française et de la Guadeloupe ont aussi été testés (les origines de ces isolats sont indiquées dans le tableau 4). Après amplification des ADNc, des fragments d'ADN de 0,7 kb environ ont été obtenus pour les isolats BFSOA1, BFSOA2, BFC1, BFC2, BFC3, ceux des Antilles (isolats N° 55, 56) et un isolat de Guyane (N° 51); des bandes de même taille ont été obtenues pour l'isolat YMV<sub>112</sub>; des bandes de 0,2 à 0,3 kb environ ont été obtenues pour l'isolat BFSOC 1 et l'isolat de Guyane N° 51 (photo 1 figure 11). Cette bande est plus diffuse en raison de sa petite taille et de la concentration du gel d'agarose utilisé. Elle n'a pas été retrouvée dans les amplifiats de témoin sain ni dans le milieu réactionnel témoin..

Afin de comparer ces isolats avec l'isolat YMV<sub>112</sub>, une sonde spécifique de l'extrémité 3' terminale de cet isolat et marquée à la digoxigénine a été utilisée. Le



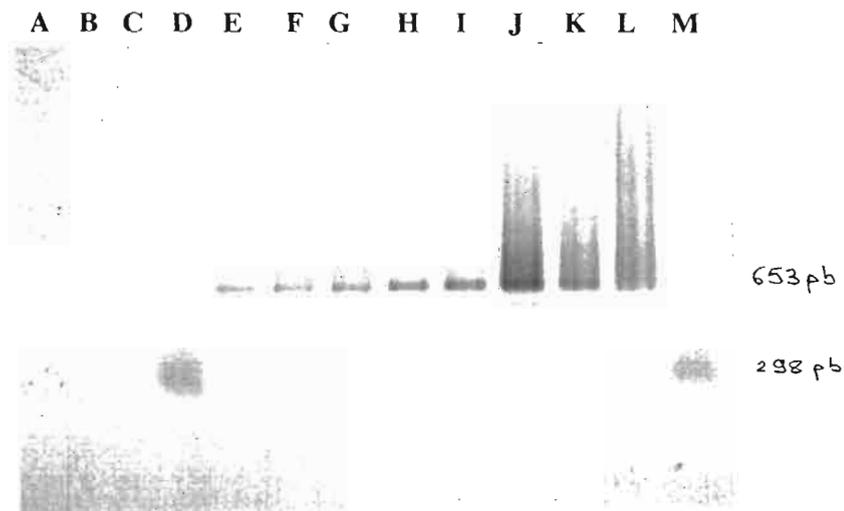
**Photo 1** : Gel d'agarose 1% Résultat de l'amplification par PCR des extrémités 3' terminales du génome des isolats de virus d'igname. Coloration au bromure d'ethyidium

**A** : Témoin sain; **B** : BFSOC 1; **C** : BFC 1; **D** : BFC2; **E** : BFC3; **F** : YMV 112; **G** : YMV 112 virus purifié; **H** : *D. alata* N° 55; **I** : isolat N°45 Guyane; **J** : BF SOA1; **K** : L Isolats *D. trifida* N°56; **M** : isolat Guyane 51; **N** : référence de poids moléculaire (Gibco BRL)



**Photo 2** Gel d'agarose 1% : Amplifiats obtenus par PCR : amplification des extrémités 3' terminales du génome des isolats de virus d'igname. Coloration au bromure d'ethyidium

**A** : Témoin sain; **B** : Référence de poids moléculaire (Gibco BRL); **C** : ADN MSV; **D** : BFSOC 1; **E** : Isolats *D. trifida* N°56; **F** : Isolats N°45 Guyane; **G** : BF SOA1; **H** : YMV 112 virus purifié; **I** : YMV 112; **J** : BFC3; **K** : BFC2; **L** : BFC 1; **M** : isolat Guyane 51.



**Photo 3** : Membrane de Nylon Hybond + après transfert du gel ci-dessus et hybridation avec la sonde YMV112-digoxigénine. Lettres A à M : mêmes isolats que sur la photo 2.

**Figure 11** : Amplification par IC/RT/PCR des extrémités 3' terminales du génome des isolats de virus d'igname et hybridation avec la sonde spécifique du YMV 112

résultat est illustré sur la figure 11. Tous les amplifiats de 0,7 kb obtenus à partir des différents isolats testés ont hybridés spécifiquement avec la sonde utilisée (photos 2 et 3). Les fragments de 0,2 à 0,3 kb ont été révélés par la réaction enzymatique. La réaction issue de l'hybridation des amplifiats avec la sonde utilisée est très sensible car des bandes à peine visibles sur le gel ont été bien colorées. Utilisés comme témoins négatifs, des fragments d'ADN d'origines différentes (Maize streak virus, MSV, geminivirus) et les marqueurs de poids moléculaire utilisés n'hybrident pas avec la sonde.

## **2- AUTRES VIRUS DETECTES SUR IGNAME AU BURKINA FASO**

Plusieurs kits de détection ELISA ont été utilisés pour rechercher dans les échantillons d'igname originaires du Burkina Faso, des virus définis ou d'autres qui leur sont sérologiquement reliés : PVX; PVY; CMV. Des réactions positives ont été obtenues avec le kit de détection du PVX pour un isolat de la région Centre (BFC 4) et 4 isolats de la région Sud-Ouest (BFSOC 1, BFSOC 2, BFSOA 1, BFSOA 3); aucun échantillon n'a donné de réponse positive avec le kit de détection du CMV ni avec celui du PVY.

## **3- DISCUSSION**

Les ignames du Burkina sont infectées par un virus ayant les caractéristiques des potyvirus (famille des potyviridae; BRUNT, 1992) :

- particules flexueuses et filamenteuses d'environ 750 x 13 nm;
- présence d'inclusions cytoplasmiques dans les cellules infectées;
- transmissibilité du virus par *A. gossypii* selon le mode non persistant pour l'isolat de la région Sud-Ouest.

De plus, ce virus est détecté par la technique d'IC/RT/PCR lorsqu'on utilise des amorces spécifiques du génome des potyvirus. Ce potyvirus infecte les espèces *D. alata* et *D. cayenensis-rotundata*; il possède les mêmes propriétés biologiques que l'isolat de YMV identifié par THOUVENEL et FAUQUET (1986) :

- il provoque des symptômes de mosaïque, cloques, et surcoloration nervaire sur les plantes d'igname infectées,
- il est mécaniquement transmissible sur la même gamme de plantes-hôtes,
- il est transmissible par tubercules,
- il est reconnu par les anticorps polyclonaux anti-YMV112 et anti-YMV294,
- il existe une homologie de séquence et de taille importante entre les extrémités 3' terminales (région 3' non-codante et une partie du gène de la protéine de capsid) des isolats du Burkina Faso et celle de l'isolat YMV112.

Ces informations conduisent à affirmer que les isolats de virus détectés dans les ignames du Burkina Faso sont très similaires au virus de la mosaïque de l'igname. Les isolats ainsi définis viennent s'ajouter à la liste des potyvirus identifiés comme étant des isolats probables du YMV : le virus de l'igname au Nigéria (Yam virus, TERRY, 1977), le virus de la mosaïque et de surcoloration nervaire de *Dioscorea* au Togo (*Dioscorea* greenbanding mosaic virus, RECKHAUS et NIENHAUS, 1983), le virus de *Dioscorea trifida* (*Dioscorea trifida* virus) à la Guadeloupe et en Guyane (BOEGLIN *et al.*, 1993). Les études sérologiques effectuées par PORTH *et al.*, (1987) ont permis de mettre en évidence des relations sérologiques entre certains isolats; ainsi, l'isolat du Nigéria et celui du Togo seraient des isolats d'un même virus, différent mais sérologiquement relié au YMV. L'absence de transmission de l'isolat Centre par puceron au cours de nos essais le distingue de autres isolats identifiés au Burkina Faso et il pourrait s'agir

d'un virus différent mais sérologiquement relié au YMV mais différent. Des études supplémentaires sont nécessaires pour le confirmer. Cependant, ce fait ne suffit pas à l'écarter du groupe des potyvirus de l'igname dont il possède toutes les autres propriétés, ni même de celui des isolats de YMV; en effet, parmi les variations biologiques observées au sein des potyvirus, 18 % seraient dues à des modifications de relations existant entre l'isolat et les insectes vecteurs (LECOQ et PURCIFULL, 1992). Dans certains cas, les isolats peuvent perdre leur transmissibilité après plusieurs transmissions mécaniques, dans d'autres cas, en raison de la production de protéine "Helper Component" disfonctionnelle ou encore d'une modification de la séquence protéique DAG au niveau de la protéine de capsid comme pour le virus de la mosaïque jaune de la courgette (zucchini yellow mosaic virus, ZYMV; LECOQ et PURCIFULL, 1992). De plus, les taux de transmission obtenus étant faibles, il se pourrait que ces isolats soient peu transmissibles ou encore que l'espèce d'insecte choisie pour les transmissions en laboratoire (*A. gossypii*) ne soit pas efficace pour transmettre cet isolat ; elle a pourtant été utilisée avec succès pour transmettre les isolats de Côte d'Ivoire (THOUVENEL et FAUQUET, 1986), du Nigéria (TERRY, 1977) et de Guyane Française (BOEGLIN *et al.*, 1993).

L'amplification des extrémités 3' du génome des potyvirus infectant les ignames du Burkina Faso a permis d'obtenir des fragments d'ADN de taille homogène (environ 0,7 kb) et il a été démontré que ces fragments hybrident avec la sonde préparée à partir du génome de l'isolat YMV<sub>112</sub>. La sonde utilisée est très spécifique des amplifiats testés; de très faibles quantités d'ADN ont été révélées par l'hybridation. Des fragments de plus petite taille ont été révélés pour deux échantillons (BFSOC 1 et l'isolat Guyane N° 51); cela peut s'expliquer soit

par des problèmes au moment de la transcription de l'ARN viral, ou soit par l'amplification de l'extrémité 3' terminale d'un potyvirus différent mais sérologiquement proche du YMV112, et comportant des homologies de séquence à ce niveau avec l'isolat YMV112. La variabilité de la taille de la région 3' non codante a été fréquemment observée parmi les membres des potyvirus (QUEMADA *et al.*, 1990). Des relations sérologiques complexes existant entre la plupart des potyvirus, il ne peut être exclu que des potyvirus différents du YMV et infectant l'igname aient été capturés par les anticorps polyclonaux; de plus, les amorces utilisées étant communes à tous les potyvirus, les extrémités 3' terminales de ces virus auront pu être amplifiées.

Un virus a été détecté par les anticorps anti-PVX dans des plantes ignames; les tests de détection du CMV sont restés négatifs. Il n'y a aucune référence à des infections d'igname par des potexvirus dans la bibliographie, excepté le Dioscorea latent virus qui infecte les ignames à diosgénine (§ 2-2-1). Il n'est pas exclu que le potato virus X puisse infecter l'igname. Des études complémentaires sont prévues au niveau du laboratoire pour identifier précisément le potexvirus infectant les ignames et étendre le diagnostic à toute la collection d'igname de l'ORSTOM.

## **CHAPITRE II- ASPECTS ECOLOGIQUES ET EPIDEMIOLOGIQUES D'UNE MOSAIQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO**

L'identification d'un potyvirus semblable au YMV et infectant les principales espèces d'ignames cultivées au Burkina Faso a conduit à étudier certains aspects de l'écologie et de l'épidémiologie de cette maladie dans les différentes zones de production : répartition géographique, symptomatologie en champ des plantes infectées, estimation des taux de prévalence et d'incidence.

### **1- REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU VIRUS DE LA MOSAIQUE DE L'IGNAME AU BURKINA FASO ET PREVALENCE DE LA MALADIE DANS TROIS ZONES DE PRODUCTION**

#### ***1-1- Observations des symptômes et détection du virus dans les échantillons prélevés au cours de la saison de culture de 1991***

Les premières prospections ont été entreprises en septembre 1991 donc tardivement dans le cycle de culture de l'igname. Des tubercules ont été achetés sur 3, 4 et 2 marchés, des zones Sud, Sud-Ouest et Centre respectivement.

##### **1-1-1- Symptomatologie des plantes en champ**

Les symptômes observés sur les feuilles des plantes cultivées dans les régions Sud et Sud-Ouest sont surtout des chloroses et des taches nécrotiques sur *D. cayenensis-rotundata* et *D. alata*. Aucun symptôme typique de maladie virale n'a été observé sur les feuilles de *D. bulbifera* ; par contre des symptômes de mosaïque et de surcoloration nervaire ont été fréquemment observés sur les jeunes feuilles des plantes du cultivar IP dans la région Centre.

TABLEAU 9 : Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS ELISA effectués sur les échantillons feuillés (1991)

Régions	Nombre d'échantillons testés	Nombre d'échantillons positifs en DAS ELISA	% *
SUD	117	0	0±5
SUD-OUEST	118	37	31±8
CENTRE	72	63	87±8

échantillons positifs en ELISA : échantillons ayant donné une réponse (D.O.) supérieure à 0,100 et supérieure à 2 x D.O. du témoin sain après une incubation du substrat d'une heure à 37°C et une nuit à 4°C

\* : (nbre d'échantillons positifs/ nbre d'échantillons testés) x 100

Intervalle de confiance calculé avec un niveau de certitude de 95%

TABLEAU 10 : Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS ELISA effectués sur les tubercules (1991)

Régions	Nbre de marchés visités	Espèce	nbre de tubercules testés	nombre de positifs	% *
SUD	3	<i>D. cay-rot</i>	15	0	0±25
		<i>D. alata</i>	7	0	
SUD-OUEST	4	<i>D. cay-rot</i>	20	1	8±9
		<i>D. alata</i>	16	2	
CENTRE	2	IP	22	22	100

*D. cay-rot*: *D. cayenensis-rotundata*; IP : Igname de Pilimpikou  
Les échantillons positifs sont définis comme dans le tableau 9.

\* Le pourcentage est calculé par rapport au nombre total de tubercules testés dans chaque région. L'intervalle de confiance a été calculé avec un niveau de certitude de 95%.

### 1-1-2- Etude sérologique

Les tests DAS-ELISA ont été effectués avec les anticorps polyclonaux (PAb) anti-YMV 294. Les résultats des tests effectués sur les échantillons feuillés et sur les tubercules sont rassemblés dans les tableaux 9 et 10 respectivement.

Le virus a été détecté dans les zones Centre et Sud-Ouest, dans les échantillons feuillés et les tubercules, avec un taux de prévalence particulièrement élevé pour la région Centre ( $87\% \pm 8\%$  pour les échantillons feuillés et  $100\%$  pour les tubercules testés). Aucune réponse positive n'a été obtenue parmi les échantillons de la région Sud. Les tubercules des différentes espèces testées sont infectés (*D. cayenensis-rotundata*, *D. alata*, et IP).

D'autre part, 26 échantillons feuillés et 15 bulbilles de *D. bulbifera* originaires de la région Sud-Ouest ont été testés en DAS-ELISA; le virus n'a été détecté dans aucun échantillon. *D. bulbifera* est très peu représentée parmi les cultures d'igname au Burkina Faso. Par conséquent, les études suivantes n'ont pas été effectuées sur cette espèce.

Le test d'infectivité a permis de détecter la présence du virus dans dix échantillons feuillés de la région Centre qui s'étaient révélés être négatifs en DAS-ELISA; aucune infection n'a été détectée pour ceux des 2 autres zones.



Photo 1 Symptômes de panachure présentés par *D. alata*



Photo 2 : Feuilles de *D. cayenensis-rotundata* cloquées et déformées

Figure 12 :Symptômes de type viral observé sur des feuilles d'igname au Burkina Faso

## **1-2- Observations des symptômes et détection du virus dans les échantillons prélevés au cours des saisons de culture de 1992 et 1993**

### **1-2-1- Symptomatologie des plantes en champ et estimation des taux de prévalence des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname**

De nouvelles prospections ont été effectuées dans les mêmes zones que précédemment et les observations ont été effectuées plus précocement au cours du cycle de culture (juillet-Août). Des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname (cloques, surcoloration nervaire, mosaïque, déformation foliaire) ont été observés sur les principales espèces cultivées (*D.cayenensis-rotundata* et *D.alata*, notamment la variété Florido) dans les régions Sud et Sud-Ouest et sur le cultivar IP dans la région Centre (voir figure 8). Certains plants de *D. cayenensis-rotundata* présentaient d'autres types de symptômes, de type viral mais différents de ceux habituellement cités pour la mosaïque de l'igname : marbrure et panachure pour *D. alata* (figure 12, photo 1), feuilles en lacet sur des plantes de *D.cayenensis-rotundata* ( figure 12, photo 2).

Les comptages de plantes présentant des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname ont permis d'estimer les taux de prévalence des symptômes de la maladie dans les 3 zones étudiées; les résultats sont indiqués dans le tableau 11. Les symptômes typiques de la mosaïque de l'igname ont été observés dans les trois zones avec toujours une fréquence plus grande dans la région Centre ( $82\% \pm 2\%$ ) par rapport aux autres régions ( $2,6\% \pm 0,5\%$  dans le Sud-Ouest et  $0,6\% \pm 0,2\%$  dans le Sud). Les taux de prévalence dans les régions Sud et Sud-Ouest sont assez faibles et même nul pour les parcelles où moins de 500 plantes ont été observées. Ces résultats sont à interpréter avec précaution car les espèces

TABLEAU 11 : Estimation des taux de prévalence des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname par comptage des plantes dans trois zones de culture (1992)

Régions	N° du champ	Nombre de plantes par champ *	Nombre de plantes observées	Nbre de plantes présentant des symptômes typiques	%	% ** par région
SUD	1	1500	500	0	0	0,6±0,2
	2	1500	500	0	0	
	3	2000	700	2	0,3	
	4	2000	700	6	0,9	
	5	5000	1500	18	1,2	
SUD-OUEST	1	100	100	0	0	2,6±0,5
	2	100	100	0	0	
	3	100	100	0	0	
	4	200	100	0	0	
	5	2000	800	32	4	
	6	3000	1000	29	2,9	
	7	17000	1500	37	2,4	
CENTRE	1	1000	500	374	75	82±2
	2	1000	500	423	84	
	3	2000	500	438	87	

\* estimation du nombre de plantes par champ

\*\* pourcentage de plantes présentant des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname par rapport au nombre total de plantes observées dans la région. L'intervalle de confiance a été calculé avec un niveau de certitude de 95%.

d'igname dans ces deux régions sont constituées d'un mélange de populations pouvant différer par l'historique de leur semence et leur sensibilité respective au virus. La situation est différente dans la région Centre, où un seul cultivar a été observé.

### **1-2-2- Estimation des taux de prévalence de la maladie à partir des résultats de l'étude sérologique**

Le taux de prévalence de la maladie a été estimé dans chaque zone à partir des résultats des tests DAS-ELISA. Des échantillons feuillés indexés pour la présence ou l'absence de symptômes et des tubercules achetés sur les marchés des zones de production (6, 6 et 3 marchés, dans les régions Sud, Sud-Ouest et Centre respectivement) ont été testés contre les anticorps polyclonaux anti-YMV<sub>112</sub>. Les résultats sont contenus dans les tableaux 12 (A; B; C) et 13. Un contrôle des résultats du test ELISA par le test d'infectivité a aussi été effectué sur 10 échantillons dans les mêmes conditions que précédemment.

Les résultats obtenus dans les 3 régions confirment ceux obtenus en 1991, notamment l'importance de la maladie dans la région Centre et son absence dans la région Sud. Le taux de prévalence de la maladie dans la région Centre est beaucoup plus élevé que celui observé dans la région Sud-Ouest (76% contre 9,8 % dans les plantes cultivées; 100% contre 16% dans les tubercules). Malgré la forte pression virale existant dans la région Centre, les rares plantes de *D. cayenensis-rotundata* originaires de la région Sud-Ouest et cultivées en association avec l'igname de Pilimpikou ne semblent pas infectées.

Le test d'infectivité, appliqué à des échantillons de chaque région ayant donné des résultats négatifs en sérologie, a donné les mêmes résultats que l'année

**TABLEAU 12 :** Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS ELISA effectués sur les échantillons feuillés (1992-93)

**A-REGION SUD**

Espèce	symptomatologie	Nbr d'échantillons testés	*% positifs	% par région
<i>D. cayenensis-rotundata</i>	S+	41	0	0
	S-	471	0	
<i>D. alata</i>	S+	0	0	
	S-	183	0	

total : 695

**B-REGION SUD-OUEST**

Espèce	symptomatologie	Nbr d'échantillons testés	*% positifs	% par région
<i>D. cayenensis-rotundata</i>	S+	131	13,7	9,8
	S-	321	3,1	
<i>D. alata</i>	S+	115	4,6	
	S-	310	1,6	

total : 877

**C-REGION CENTRE**

Espèce	symptomatologie	Nbr d'échantillons testés	*% positifs	% par région
Igname de Pilimpikou	S+	143	80	76
	S-	78	50	
<i>D. cayenensis-rotundata</i>	S-	26	0	0

total : 221 IP

\* Les échantillons positifs sont ceux qui ont donné une D.O. supérieure à 0,100 après une incubation du substrat de 1 heure à 37°C et une nuit à 4°C.

Les pourcentages d'échantillons positifs par région sont calculés par rapport au nombre d'échantillons étudiés (total indiqué); pour la région Centre, on ne tient compte que des échantillons du cv. Igname de Pilimpikou

**TABLEAU 13** : Estimation des taux de prévalence de la mosaïque de l'igname dans trois zones de culture à partir des résultats des tests DAS ELISA effectués sur les tubercules (1992-93)

Régions	Nbre de marchés visités	Espèce	nbre de tubercules testés	nombre de positifs	* %
SUD	6	<i>D. cay-rot</i>	79	0	0±4
		<i>D. alata</i>	40	0	
SUD-OUEST	6	<i>D. cay-rot</i>	71	10	16±6
		<i>D. alata</i>	65	12	
CENTRE	3	IP	75	75	100
		<i>D. cay-rot</i>	25	0	0

*D. cay-rot* : *D. cayenensis-rotundata*; IP : Iigname de Pilimpikou

\* : Régions Sud et Sud-Ouest : les pourcentages sont calculés par rapport au nombre total d'échantillons testés dans chaque région

Région Centre : le pourcentage a été calculé séparément pour les deux populations étudiées.

Intervalle de confiance calculé avec un niveau de certitude de 95%

précédente : seuls les 10 échantillons négatifs de la région Centre sont infectés par un virus qui est détecté après transmission sur *N. benthamiana*. Ce résultat semble indiquer que le test d'infectivité est plus sensible que le test DAS-ELISA utilisé dans cette étude.

Les plantes dans lesquelles le virus a été détecté en ELISA présentaient des symptômes de mosaïque, cloques, et surcoloration nervaire au niveau des feuilles; pour certaines, les feuilles étaient complètement déformées en forme de lacet. Les données des tableaux 12 (A, B, et C) révèlent que dans la région Sud, il n'existe pas de relation entre la présence de symptômes et la détection du virus dans les plantes; La relation est moyenne dans la région Sud-Ouest et plus forte dans la région Centre. Le virus a pu être détecté avec une plus grande fréquence dans les échantillons présentant des symptômes que dans ceux n'en présentant pas. *D. alata* semble plus infectée que *D. cayenensis-rotundata* dans la région Sud-Ouest. D'autre part, ces résultats mettent en évidence l'absence de corrélation directe entre la présence de symptômes et la détection du virus. Bien que des symptômes de mosaïque aient été observés dans la région Sud sur *D. cayenensis-rotundata*, le virus n'a jamais été détecté dans les 695 échantillons feuillés testés.

## **2- INCIDENCE DE LA MALADIE DANS LES REGIONS SUD-OUEST ET CENTRE**

La contamination de plantes saines par le virus, a été estimée dans les deux régions où le virus a été identifié : région Sud-Ouest et région Centre. Les essais ont été mis en place dans des parcelles pour lesquelles les taux de prévalence ont été estimés par des tests DAS-ELISA (tableau 14). Ils sont très élevés dans les 2 parcelles de la région Centre ( $86 \pm 10\%$  et  $91 \pm 8\%$ ). Environ  $49 \pm 8\%$  des plantes

**TABLEAU 14 : Prévalence de la mosaïque de l'igname dans les champs entourant les essais mis en place dans les régions SUD OUEST et CENTRE : détection du virus par des tests DAS ELISA**

REGIONS	Espèce cultivée	Nbre d'échantillons testés	Nbre d'échantillons positifs	% positifs
Ouangolodougou Sud-Ouest	<i>D. cay-rot</i>	75	29	48,7±7,8
	<i>D. alata</i>	83	48	
Arbollé Centre	IP	45	41	91±8
Samba Centre	IP	45	39	86±10

*D. cay-rot* : *D. cayenensis-rotundata* ; IP : Igname de Pilimpikou

Les pourcentages d'échantillons positifs en DAS ELISA sont calculés par rapport au nombre total d'échantillons testés par parcelle. L'Intervalle de confiance a été calculé avec un niveau de certitude de 95%.

**TABLEAU 15 : Contamination en conditions naturelles dans les Régions CENTRE et SUD-OUEST**

localisation	Nb de plantes ayant germé	1 mois Nb de plantes		2 mois Nb de plantes		3 mois Nb de plantes		5 mois Nb de plantes		
		S+	E+	S+	E+	S+	E+	S+	E+	E+/T
Ouangolodougou	92	0	0	0	0	0	0	0	2	4
Arbollé	69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Samba	104	0	0	0	0	0	0	0	0	0

S+ : plante présentant des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname

E+ : plante donnant une réponse positive au test ELISA

E+/T : tubercule donnant une réponse positive au test ELISA

voisines de l'essai de la parcelle de Ouangolodougou (région Sud-Ouest) sont infectées; le virus est présent sur les 2 principales espèces cultivées.

Les résultats du suivi des essais depuis la germination des tubercules plantés, jusqu'au contrôle de la contamination en conditions naturelles sont indiqués dans le tableau 15. La germination des tubercules a eu lieu au cours du premier mois et les taux de germination étaient de 75 à 80% dans les 2 régions; la croissance des plantes installées dans la région Centre n'a pas été très forte (peu de feuilles, chlorose des plantes) probablement en raison de la mauvaise adaptation des variétés utilisées (variétés originaires du Sud et du Sud-Ouest ) aux conditions climatiques et pédologiques de cette région. L'absence de détection du virus dans les plantes pendant les deux premiers mois indiquent que les tubercules plantés étaient bien indemnes du YMV. Aucun symptôme de maladie virale n'a été observé sur les feuilles au cours de l'essai ; cependant, 5 mois après l'installation de l'essai, le virus a été détecté dans 2 plantes dans la région Sud-Ouest (à partir d'échantillons feuillés) et dans 4 tubercules récoltés (y compris ceux provenant des 2 plantes précédentes). Par contre aucune contamination n'a été observée dans la région Centre où pourtant la pression d'inoculum autour des essais était élevée.

### **3- DISCUSSION**

Le virus de la mosaïque de l'igname a été détecté dans les régions Centre et Sud-Ouest dans des plantes de *D. cayenensis-rotundata*, *D. alata*, et l'Igname de Pilimpikou. Malgré la présence de symptômes de mosaïque sur certaines plantes, il n'a pas été possible d'isoler le virus dans la région Sud.

L'évaluation de la prévalence de la maladie a été réalisée à partir des résultats obtenus par quatre méthodes : comptage de plantes présentant des

symptômes typiques de la mosaïque de l'igname, tests ELISA effectués sur des tubercules achetés sur les marchés, tests ELISA effectués sur des échantillons feuillés prélevés en champ, et pour les confirmer, des tests d'infectivité sur *N. benthamiana* effectués à partir des échantillons dans lesquels le virus n'avait pas été détecté en ELISA. On constate que les taux de prévalence obtenus par ces différentes méthodes diffèrent d'une année à l'autre, et selon la méthode de détection du virus (par exemple, en 1991, pour la région Sud-Ouest, 31% des échantillons feuillés et 8% des tubercules testés ont été trouvés infectés tandis que pour la période 1992-1993, les pourcentages obtenus étaient de 9,8%, et 16% respectivement, et 2,6% des plantes observées présentaient des symptômes de mosaïque).

Ces observations peuvent s'expliquer par les faits suivants :

- les études de prévalence ont été effectuées sur les deux principales espèces cultivées (*D. cayenensis-rotundata*, *D. alata*), elles-mêmes constituées d'un mélange de populations pouvant différer par leur sensibilité respective au virus; par exemple, Florido, la principale variété de *D. alata* rencontrée lors des prospections, est sensible au virus de la mosaïque de l'igname; mais il est possible que parmi les autres variétés de la même espèce, certaines soient tolérantes ou mêmes plus ou moins résistantes au YMV. Au cours de l'étude épidémiologique effectuée à la Guadeloupe sur les ignames cultivées (GOUDOU-SINHA, 1990), il avait été constaté que sur 90 variétés de *D. alata* cultivées dans un environnement où la pression d'inoculum et l'incidence de la maladie étaient très importantes, seules deux variétés étaient infectées en fin de saison de culture. Etant donné qu'il n'a pas été possible d'identifier les différentes populations lors

des différents prélèvements effectués, il est difficile de comparer les résultats obtenus d'une année à l'autre et d'un échantillonnage à l'autre.

- Les observations effectuées au cours de nos prospections dans les 3 zones montrent que la présence et le type de symptômes ne sont pas suffisants pour présumer de la présence du virus. Dans la région Sud, cela peut s'expliquer par le faible nombre d'échantillons testés, mais on peut aussi imaginer que ces symptômes soient dus à un autre virus ou à un isolat de YMV différent sérologiquement du YMV<sub>112</sub>. Dans la région Sud-Ouest, la détection du virus dans les plantes présentant ou non des symptômes typiques de la mosaïque de l'igname pourrait être dû à l'hétérogénéité génétique des ignames cultivées, impliquant des différences au niveau de l'expression des symptômes. Ce n'est pas le cas de la région Centre dans laquelle la présence d'un unique cultivar suppose une homogénéité de la symptomatologie des plantes et donc une relation plus étroite entre les résultats obtenus par le test ELISA et ceux basés sur l'observation des symptômes. L'absence de symptômes typiques sur les feuilles des plantes d'igname infectées par le virus de la mosaïque de l'igname a souvent été constatée au Nigeria (THOTTHAPPILLY, 1981). La présence et l'intensité des symptômes dépendent souvent des conditions climatiques et de la croissance de la plante. Des plantes de *D. cayenensis-rotundata* présentant des feuilles en lacet (shoestring) ont été observées en Côte d'Ivoire mais ces symptômes disparaissaient pour laisser place à une mosaïque lorsque les plantes étaient transposées de Bouaké à Abidjan. Ces symptômes ont aussi été décrits par MARCHOUX (1981) parmi les symptômes viraux observés chez les plantes d'igname à la Guadeloupe. D'autre part, la présence de symptômes de mosaïque sur des plantes négatives au test DAS-ELISA peut être due à un agent pathogène autre que le YMV; parmi les différents virus

pouvant infecter l'igname, le CMV provoque de faibles jaunissements sur les feuilles d'igname en Guadeloupe (MIGLIORI, 1977); le BtMV trouvé en association avec le *D. alata* virus est responsable de "leaf mottling" sur les feuilles de *D. alata* (PORTH et NIENHAUS, 1983). Le potyvirus observé en association avec l'IBSV provoque aussi des symptômes de mosaïque sur les feuilles de *D. alata* (HARRISON et ROBERTS, 1973; THOUVENEL, FARGETTE et FAUQUET, 1988). Des symptômes de chlorose, de marbrures et d'enroulement de feuilles, ont été observés sur des plantes d'igname mais non expliqués (THOUVENEL et FAUQUET, 1982; TOTTHAPPILLY, 1983).

- La maladie étudiée est végétativement transmissible et la localisation du virus dans la plante peut varier en fonction des stades de développement; cela peut se traduire par l'absence de détection du virus dans les feuilles de plantes infectées comme il a parfois été observé dans des plantes cultivées en serre (voir Chapitre I, 1-4), ou par des concentrations très faibles du virus dans les feuilles, détectées seulement après passage par inoculation mécanique sur *N. benthamiana* (cas des dix échantillons de la région Centre testés chaque année selon cette méthode).

Les résultats des tests ELISA effectués sur les échantillons feuillés prélevés en champ dépendent donc des populations sur lesquelles les prélèvements ont été effectués et du stade de développement des plantes et des feuilles au moment du prélèvement. En ce qui concerne les tests effectués sur tubercules, notamment sur le cultivar IP, les résultats semblent plus précis que ceux obtenus à partir d'échantillons feuillés (100% des tubercules testés sont infectés). Cette observation devra être vérifiée au niveau de populations d'igname bien définie car il permettrait la détection directe du virus au niveau des semences et du matériel végétal destiné aux introductions.

Il ressort de ces informations que la mesure de la prévalence de la mosaïque de l'igname n'est pas aisée, surtout dans la situation d'un mélange de populations ou de variétés d'igname. L'utilisation de plusieurs méthodes de détection permet de confirmer les résultats obtenus. Dans le cas de l'étude épidémiologique effectuée au Burkina Faso, ils sont concordants et indiquent la présence du virus dans les régions Sud-ouest et Centre et l'absence de ce virus dans la région Sud..

Les mesures de prévalence obtenues dans la région Centre sur trois années de culture indiquent des taux compris entre 75 et 100%. Le fort pourcentage de plantes infectées peut s'expliquer par le fait que l'Igname de Pilimpikou est pratiquement le seul cultivar présent dans cette zone. L'absence d'échange de tubercules-semences avec les autres zones de production et l'utilisation année après année de tubercules-semences virosés auraient abouti à l'infection quasi-totale des ignames de ce cultivar.

L'étude épidémiologique effectuée a permis d'identifier un virus de la mosaïque de l'igname dans la région Sud-Ouest avec un taux de prévalence d'environ 10% dans les plantes cultivées et de 16% dans les tubercules commercialisés au cours de la période 1992-1993. Plusieurs facteurs permettent d'expliquer la présence du virus dans cette zone : la culture de populations sensibles à ce virus, l'utilisation des tubercules virosés comme semences, et les échanges de matériel végétal avec des zones de production où le virus a été identifié . Comparés à ceux obtenus dans la région Centre, les taux observés sont faibles; cela peut être dû au fait que dans la plupart des champs d'igname, plusieurs populations et parfois plusieurs espèces sont cultivées en juxtaposition; les différences de sensibilité au virus de ces différentes variétés peuvent influencer la propagation de la maladie dans le champ. Les taux de contamination des

tubercules observés sont faibles, contrairement au cas de la région Centre. Il est possible que dans certains cas (infection tardive ou autre phénomène biologique), des tubercules issus de plantes infectées échappent à l'infection. Cette hypothèse a été émise par THOUVENEL *et al* (1989) lors d'une étude épidémiologique de la mosaïque de l'igname en Côte d'Ivoire; le phénomène a été observé pour des boutures de manioc, saines, bien qu'issues de plantes contaminées par le virus de la mosaïque africaine du manioc (African Cassava Mosaic Virus, ACMV; FAUQUET *et al.*, 1987) et pour des plants d'ail issues de plantes infectées par le virus de la jaunisse nanisante de l'oignon (Onion Yellow Dwarf Virus, OYDV; VAN DJIK, 1993). Au cours des études effectuées, ce phénomène n'a pas été observé sur des plantes d'igname mais il mérite d'être étudié.

Malgré l'utilisation combinée de la sérologie et du test d'infectivité, il n'a pas été possible de détecter le virus dans un seul échantillon ( feuille d'igname ou tubercule) de la région Sud. Ce résultat suggère que le YMV n'est pas présent dans cette région ou alors qu'il s'agit d'un isolat non détecté par les anticorps polyclonaux utilisés. L'absence de symptôme sur la gamme de plantes-hôtes inoculée avec des extraits de plantes provenant de cette zone tendrait à favoriser la première hypothèse.

Aucune transmission de virus par des pucerons n'a été observée dans la région Centre pendant la durée de l'essai de contamination en conditions naturelles et les taux d'incidence obtenus dans la région Sud-Ouest (dans l'essai de Ouangolodougou) étaient faibles (4%). THOUVENEL *et al.* (1989) avaient obtenu un taux de 6% dans le Nord de la Côte d'Ivoire sur *D. alata* cv. Florido (dans des conditions climatiques comparables à celle du Sud-Ouest du Burkina). Au cours des essais effectués à la Guadeloupe (sur des plants de *D. cayenensis*-

*rotundata* et *D. trifida*), des taux de contamination d'environ 50% avaient été observés après 6 mois de culture dans une région fortement contaminée par le virus (GOUDOU-SINHA, 1990).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces observations en champ :

- la mauvaise croissance des plantes dans les essais, due en partie à l'utilisation de variétés de *D. alata* et *D. cayenensis-rotundata* non adaptées aux conditions de culture de la zone Centre;

- ces plantes ne sont peut-être pas sensibles à l'isolat de virus qui infecte l'Igname de Pilimpikou dans la région Centre. En effet, le virus n'a jamais été détecté dans d'autres plantes que celles du cultivar IP. Pour évaluer l'incidence de la maladie dans cette zone, il aurait fallu disposer de plantes saines de IP obtenues par culture de méristème, les implanter dans les conditions de culture habituelles et suivre leur recontamination par puceron; cela n'était pas possible dans nos conditions de travail.

- une population trop faible ou non efficace de pucerons peut aussi expliquer les faibles taux de transmission obtenus.

-Il faut cependant noter qu'il n'avait pas été possible de transmettre, en conditions de laboratoire, des isolats originaires de la région Centre par des pucerons (voir résultats du chapitre I, 1-6); le taux de transmission par pucerons des isolats de virus de la région Sud-Ouest est faible, comparé à celui obtenu pour l'isolat originaire de Guyane Française. Il apparaît que les isolats de virus du Burkina Faso sont peu ou difficilement transmissibles, et que l'infection des plantes en champ provient plus de l'utilisation de tubercules virosés que de transmissions

par vecteur au cours du cycle de culture (THOUVENEL, comm. personnelle). Les résultats de nos essais dans les zones infectées, comparés aux taux de prévalence de la maladie dans les tubercules, tendrait à conforter cette hypothèse. Cependant, la sensibilité aux virus des populations utilisées n'étant pas connue, il n'est pas possible de conclure définitivement sur la transmissibilité des isolats du Burkina Faso; il serait nécessaire d'effectuer de nouvelles études épidémiologiques pour confirmer ces résultats.

### **CHAPITRE III- ETUDE DE LA VARIABILITE DES ISOLATS DE VIRUS INFECTANT L'IGNAME ET MISE AU POINT D'UN TEST IMMUNOLOGIQUE DE DETECTION DU VIRUS**

Des isolats de virus d'igname ont été identifiés sur cette culture dans des régions géographiques différentes et sur des plantes-hôtes différentes mais aucune étude de la variabilité de ces isolats de virus n'a été effectuée. Il est possible de déceler des macro différences entre les isolats en comparant, soit les symptômes qu'ils provoquent sur des feuilles de *N. benthamiana* infectées, soit les mobilités électrophorétiques de leur protéine de capsid par la technique SDS-PAGE-western-blot. De plus, la production récente d'anticorps monoclonaux (MAb) par L. GIVORD et G. SOMMERMEYER (IBMC Strasbourg) nous permet de révéler l'existence de sites antigéniques spécifiques et donc de mettre en évidence une variabilité antigénique parmi les isolats sérologiquement reliés au YMV, infectant l'igname.

#### **1- LA COLLECTION D'ISOLATS DE VIRUS DE L'IGNAME; SYMPTOMATOLOGIE DES PLANTES INFECTEES**

La collection d'isolats a été constituée à partir d'échantillons provenant de prospections effectuées au Burkina Faso et en Guyane Française, mais aussi par des dons de laboratoires et instituts différents (voir tableau 4 Matériel et Méthodes 3-1). Nous disposons ainsi de 69 isolats de virus provenant de 4 espèces et de 2 populations particulières d'igname (l'Igname de Pilimpikou et l'hybride interspécifique *D. praehensilis* / *D. cayenensis-rotundata* cv. Krenglé). La distribution géographique est large et couvre l'Afrique de l'Ouest et Centrale(5



Photo 1 : Symptômes de surcoloration nervaire sur feuilles de *D. trifida*



Photo 2 : Mosaïque et cloques sur les feuilles de *D. cayenensis-rotundata*

Figure 13 : Symptôme de surcoloration nervaire sur des plantes d'igname de la collection

pays), l'Amérique du Sud (Brésil, Guyane), la Caraïbe (Guadeloupe) et le Pacifique (Nouvelle Calédonie). Tous les isolats ont répondu positivement en DAS-ELISA avec les anticorps polyclonaux anti-YMV112 ou anti-YMV294.

En général, les plantes infectées de *D. cayenensis-rotundata* et *D. trifida* dans la collection présentent des symptômes de mosaïque et de surcoloration nervaire plus ou moins marqués (fig. 13), tandis que les symptômes présentés par les plantes de *D. alata* sont plus atténués (figure 8, photo 2 ). Le maintien de la collection a été effectué sur *N. benthamiana*; tous les isolats provoquent des symptômes de mosaïque ou des cloques sur les feuilles (figure 14, photos 1) mais l'isolat originaire du Nord-Ouest de la Guyane (isolat N° 45) se distingue par une surcoloration nervaire très marquée, en arête de poisson (fig 14, photo 2).

## **2- DIFFERENCIATION DES ISOLATS DE VIRUS D'IGNAME PAR LA MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DE LEUR PROTEINE DE CAPSIDE**

La migration des extraits bruts sur des gels en gradients de 10 à 20% de polyacrylamide permet d'observer des bandes très fines avec une bonne résolution des protéines; cependant, étant données les difficultés pour obtenir des gradients de polyacrylamide uniformes sur toute la largeur du gel, nous avons essentiellement travaillé avec des gels homogènes à concentration en polyacrylamide de 12% .

Les résultats des "western blot" sur les 69 isolats testés sont représentés sur la figure 15 : dans tous les cas, les protéines de capsid ont été détectées par les anticorps polyclonaux sur les membranes de nitrocellulose. Les poids moléculaires de ces protéines ont été estimés par les migrations des références de poids moléculaires et sont compris entre 30 et 33 kD. Les 69 isolats peuvent se classer

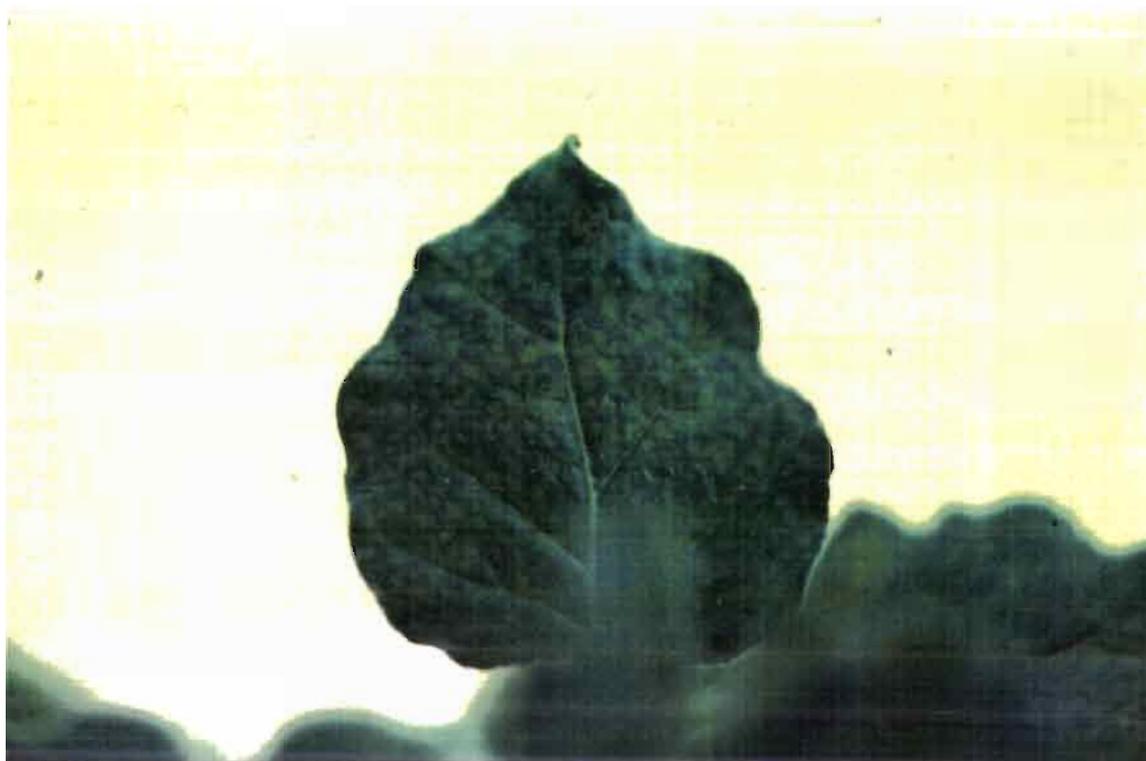


Photo 1 : Symptômes de mosaïque observés sur les plantes de *N. benthamiana* infectées par les autres isolats de virus de la collection



Photo 2 : Symptômes de surcoloration nervaire présentés par les plantes de *N. benthamiana* infectées par l'isolat N° 45, originaire du Nord Ouest de Guyane Française

Figure 14 : Symptomatologie sur *N. benthamiana* infectées par les isolats de virus d'igname de la collection : deux types de symptômes ont été observés

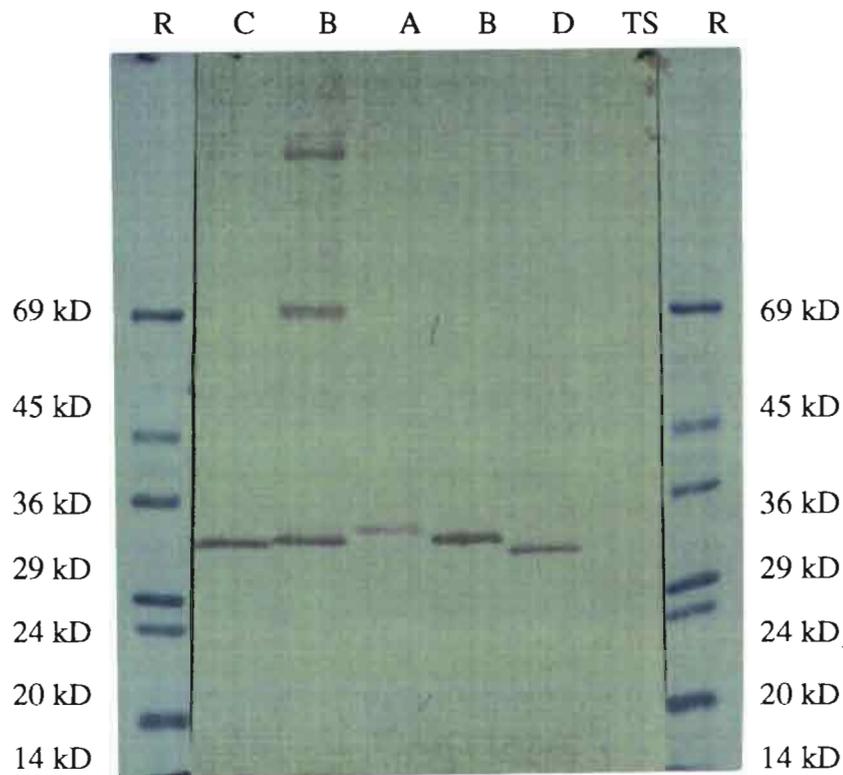


Fig. 15: Détection des protéines de capside des isolats de virus d'igname par la technique de Western blot, à partir d'extraits bruts de *N. benthamiana* infectés

R : Marqueurs de poids moléculaire Sigma;

TS : Témoin sain

A, B, C et D : isolats dont la protéine de capside a une mobilité électrophorétique de type 1, 2, 3, et 4 respectivement.

Anticorps polyclonal anti-YMV<sub>112</sub> (1/800); Anticorps conjugué IgG anti immunoglobulines de lapin Sigma (dilution 1/6000)

Révélation NBT/BCIP

Révélation des bandes de marqueurs moléculaires S : Coloration au Noir amido.

**TABLEAU 16** : Classement des isolats de virus par groupe en fonction de la mobilité électrophorétique de leur protéine de capside

groupe de M.E.	Numéros des isolats
1	62; 67
2	30 à 33; 42; 46 à 49; 55; 56
3	16 à 29; 34 à 41; 43 à 45; 50 à 54; 57 à 61; 63; 65; 66; 68; 69
4	1 à 15; 64

Les isolats correspondants à ces isolats sont décrits dans le tableau 4  
M.E. : mobilité électrophorétique

respectivement, du Cameroun et de Nouvelle Calédonie et infectant deux espèces hôtes différentes; les groupes 2 et 3 sont constitués par respectivement 9 et 36 isolats d'origines variées tandis que le groupe 4 rassemble tous les isolats originaires de la région Centre du Burkina Faso infectant le cultivar IP ainsi qu'un isolat infectant *D. cayenensis-rotundata* et originaire de la Guadeloupe. Ces résultats sont répétitifs et mettent en évidence une variabilité des isolats au niveau des protéines de capsid (taille, conformation, mobilité électrophorétique).

### **3- VARIABILITE ANTIGENIQUE DES ISOLATS DE VIRUS D'IGNAME**

#### **3-1- Evaluation des anticorps monoclonaux**

Vingt huit sous-clones provenant de sept hybridomes différents ont été fournis par L. GIVORD sous forme de liquides d'ascites et ont été testés pour leur réactivité vis à vis de l'isolat YMV<sub>112</sub>. Six sous clones ont été éliminés en raison de l'absence totale de réactivité quelle que soit la préparation de l'antigène utilisée (virus purifié ou extrait brut de plante infectée). Les 22 autres sous clones (tableau 17) détectent le virus en DASi ELISA (procédure 2) et en western blot (figure 16); 14 sous clones issus de 3 hybridomes détectent aussi le virus en ACPI ELISA (procédure 6), tandis que les 8 autres, issus de l'hybridome 7 ne le détectent pas .

Les titres des 22 sous-clones ont été estimés en DASi ELISA (procédure 2) à partir de préparations de virus purifié (YMV<sub>112</sub>, 1 µg/ml). Les résultats sont indiqués dans le tableau 18. Les sous-clones sélectionnés pour chaque hybridome sont : MAb **3.5.1**; MAb **7.4.3**; MAb **11.1.2**; et MAb **15.3.3** car ils répondent aux conditions fixées (D.O. > 0,300 après 1 heure de réaction enzymatique à 37°C) aux dilutions 10<sup>-7</sup> pour les MAbs **3.5.1**, **7.4.3** et **11.1.2** et 10<sup>-5</sup> pour le MAb **15.3.3**.

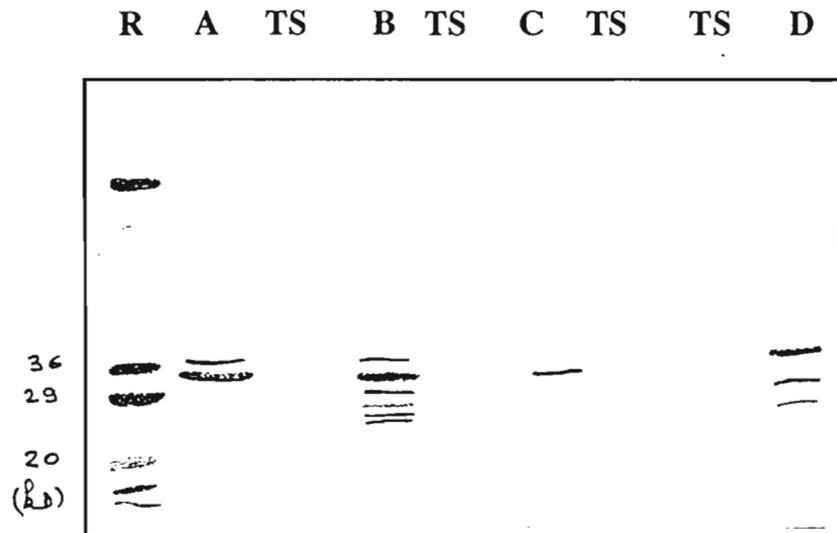


Figure 16 : Réactivité des quatre MAbs en Western-Blot, vis a vis du virus purifié

**A, B, C et D** : Détection de la protéine de capside à partir de préparation du virus purifié (2 µg/puits) par les MAbs 3.3.1, 15.3.3, 7.43, et 11.1.2, respectivement.

TS : Témoin sain

R : Marqueurs de poids moléculaires (Sigma)

Révélation des bandes de marqueurs de poids moléculaires par coloration au Noir amido.

Détection : Anticorps polyclonal anti-YMV<sub>112</sub> (1/800); Anticorps conjugué : IgG anti immunoglobulines de lapin Sigma (dilution 1/6000)

Révélation : NBT/BCIP

**TABLEAU 17** : Réactivité des 22 MAbs vis à vis de l'isolat YMV112 (virus purifié et extrait brut de pante infectée) selon 3 procédures ELISA

N° des sous- clones	DASI 1 ELISA		DASI 2 ELISA		ACPI-ELISA	
	procédure 3		procédure 2		procédure 6	
	VP	EB	VP	EB	VP	EB
3.3.1	+	+	+	+	+	+
3.3.2	+	+	+	+	+	+
3.5.1	+	+	+	+	+	+
3.5.2	+	+	+	+	+	+
3.6.1	+	+	+	+	+	+
3.6.3	+	+	+	+	+	+
3.7.1	+	+	+	+	+	+
3.7.2	+	+	+	+	+	+
7.1.1	+	+	+	+	-	-
7.1.2	+	+	+	+	-	-
7.1.4	+	+	+	+	-	-
7.4.1	+	+	+	+	-	-
7.4.2	+	+	+	+	-	-
7.4.3	+	+	+	+	-	-
7.4.4	+	+	+	+	-	-
11.1.1	+	+	+	+	+	+
11.1.2	+	+	+	+	+	+
15.2.1	+	+	+	+	+	+
15.2.2	+	+	+	+	+	+
15.3.1	+	+	+	+	+	+
15.3.3	+	+	+	+	+	+
15.5.1	+	+	+	+	+	+

cellules grisées : sous clones ne détectant pas le virus en ACPI ELISA

+ : D.O. supérieure à 0,100 ; - D.O. inférieure à 0,100

VP : virus purifié 1 µg/ml; EB : préparation d'extrait brut dilué au 1/20 dans PBS-T

**TABLEAU 18** : Détermination des titres des 22 MAb par le test ELISA (Procédure 2)

N° des sous clones	Dilution des MAb					
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
<b>3.3.1</b>	+++	+++	++	+	-	-
<b>3.3.2</b>	+++	+++	++	-	-	-
<b>3.5.1</b>	+++	+++	+++	++	-	-
<b>3.5.2</b>	+++	+++	++	-	-	-
<b>3.6.1</b>	+++	+++	++	-	-	-
<b>3.6.3</b>	+++	+++	++	-	-	-
<b>3.7.1</b>	+++	+++	++	-	-	-
<b>3.7.2</b>	+++	+++	++	-	-	-
<b>7.1.1</b>	+++	+++	++	-	-	-
<b>7.1.2</b>	+++	+++	++	+	-	-
<b>7.1.4</b>	+++	++	-	-	-	-
<b>7.4.1</b>	+++	+++	+++	++	-	-
<b>7.4.2</b>	+++	+++	++	+	-	-
<b>7.4.3</b>	+++	+++	+++	++	-	-
<b>7.4.4</b>	+++	+++	+++	++	-	-
<b>11.1.1</b>	+++	+++	++	+	-	-
<b>11.1.2</b>	+++	+++	+++	++	-	-
<b>15.2.1</b>	+++	++	-	-	-	-
<b>15.2.2</b>	+++	++	-	-	-	-
<b>15.3.1</b>	+++	++	-	-	-	-
<b>15.3.3</b>	+++	+++	+	-	-	-
<b>15.5.1</b>	+++	++	-	-	-	-

cases grisées : sous-clones ayant donné les titres les plus élevés

+++ : D.O. >1,0;

++ : 0,3-1,0;

+ : 0,1-0,3;

- : D.O.<0,1

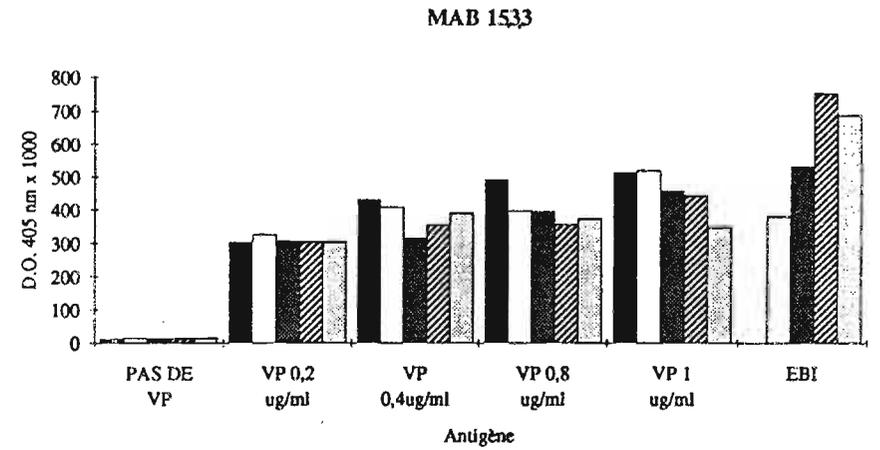
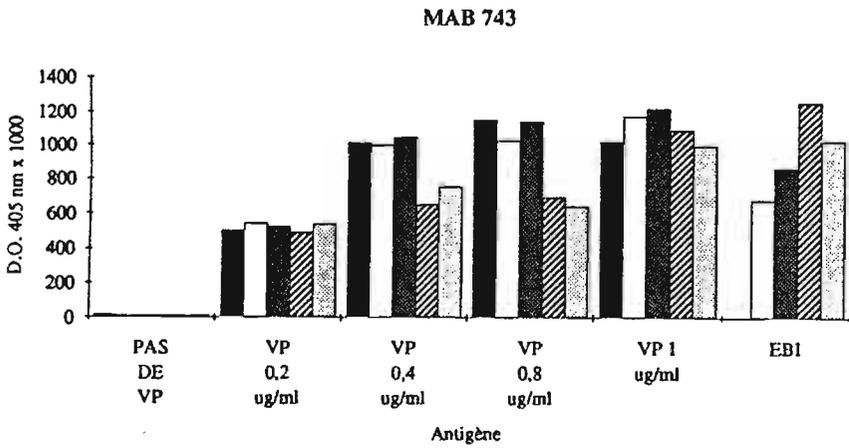
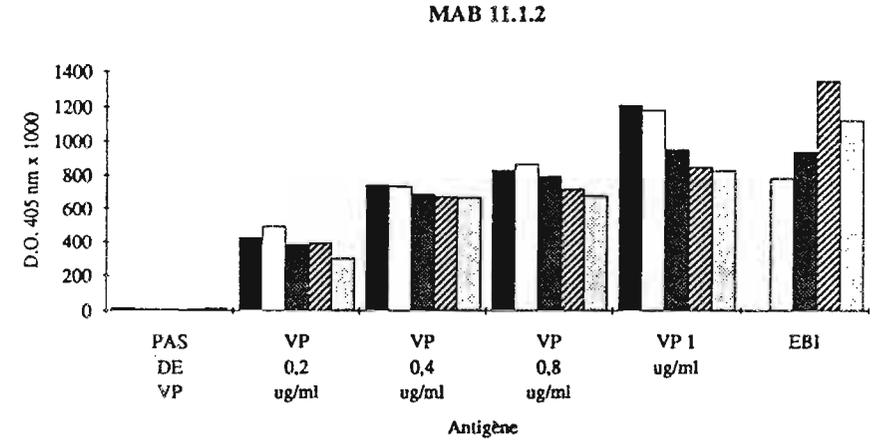
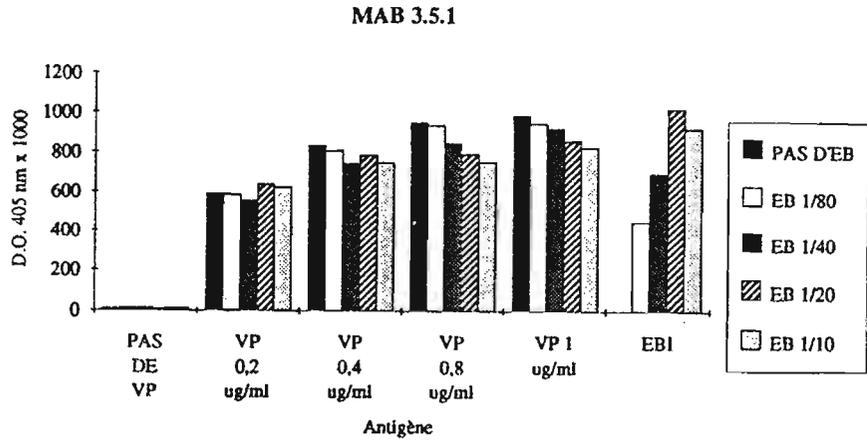


Figure 17 : Effet de l'addition d'extrait brut de plante sur la détection du virus purifié par les 4 MAb

EBI : Extrait brut de plante infectée; EB : Extrait brut de plante saine; VP : préparation de virus purifié (µg/ml); 1/10; 1/20; 1/40; 1/80 : dilutions de l'extrait brut testées

Aucun des 6 potyvirus africains (DSV, GEV, PVMV, PVY<sub>o</sub>, SCMV, TuMV) testés n'a pu être détecté par ces quatre MAb anti YMV.

### ***3-2- Optimisation de l'utilisation des MAb pour l'étude de la variabilité antigénique***

La mise au point du test a été effectuée à partir d'extraits bruts de *N. benthamiana* infectés par YMV<sub>112</sub>. La détection du virus purifié par les MAb ne semble pas affectée de façon significative par l'addition d'extrait brut de *N. benthamiana* sain (figure 17). On note aussi que la dilution au 1/20 de l'extrait brut de *N. benthamiana* infecté est celle qui permet d'obtenir la valeur de D.O la plus élevée.

### ***3-3- Mise en évidence de la variabilité antigénique***

Soixante neuf isolats de virus d'igname ont été testés contre 4 MAb anti-YMV<sub>112</sub>. Les procédures 2 et 3 ont été retenues pour étudier la variabilité antigénique du YMV. En DASi ELISA (procédure 3; coating avec les anticorps monoclonaux; figure 18), il a été observé que les isolats N° 1 à 15 étaient détectés par les MAb 3.5.1, 7.4.3 et 11.1.2, mais pas par le MAb 15.3.3; tandis que les autres isolats (N° 16 à 69) étaient détectés par tous les MAb. Ce résultat indique que 2 épitopes différents au moins sont détectés par les 4 MAb : un épitope est reconnu par le MAb 15.3.3, et un au moins serait reconnu par les 3 autres MAb. Cependant, en DASi ELISA (procédure 2; coating avec les anticorps polyclonaux et détection avec les MAb); certains isolats précédemment détectés par les 4 MAb (isolats 16 à 57) ne sont plus détectés par le MAb 7.4.3 (figure 19). Cela suggère que l'épitope reconnu par cet anticorps est différent de celui reconnu par les MAb 3.5.1 et 11.1.2. Il semble donc que les 4 MAb utilisés dans cette étude

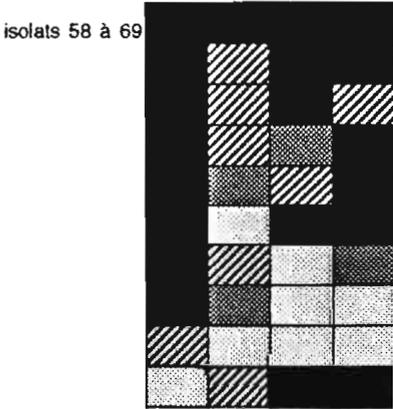
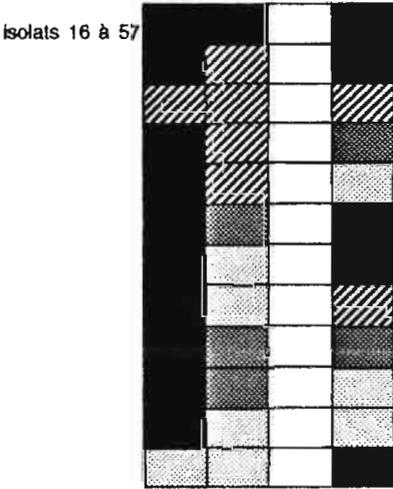
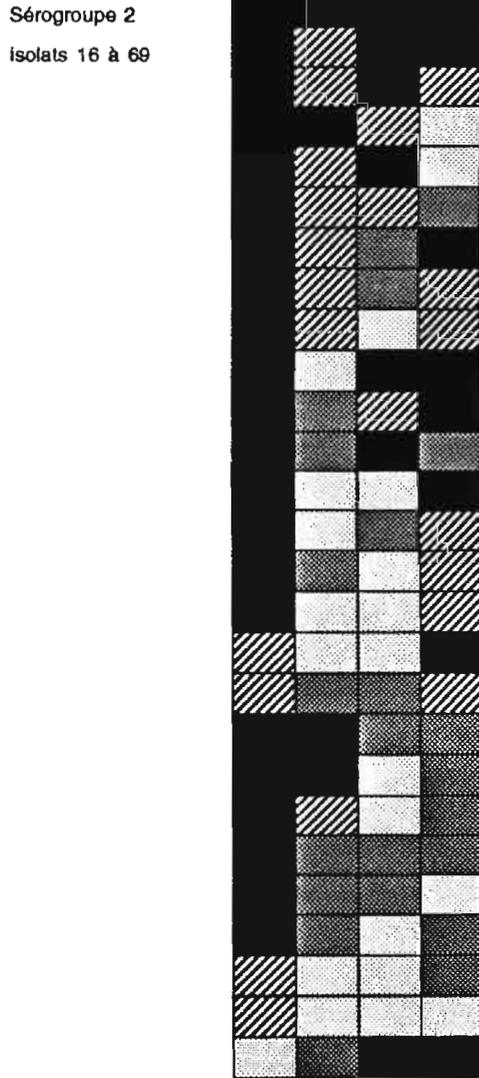
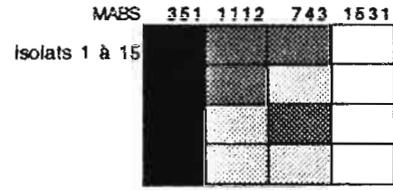
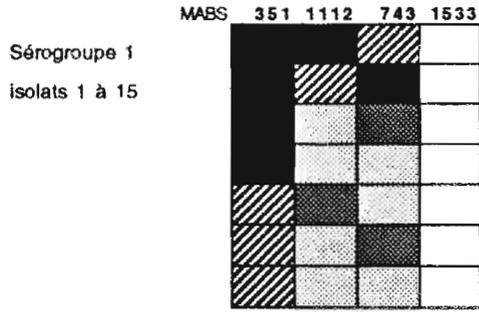


Fig. 18 : Réactivité des 69 isolats de virus d'igname vis a vis des 4 MAb en DASI-ELISA (procédure 3)

- D.O.405 nm
- Black : 1,5 -2,0
  - Diagonal : 1,0-1,5
  - Black (darker) : 0,5-1,0
  - White (darker) : 0,1-0,5
  - White (lighter) : 0-0,1

Fig.19 : Réactivité des 69 isolats de virus d'igname vis a vis des 4 MAb en DASI-ELISA (procédure 2)

Les légendes sont les mêmes que celles de la fig. 18

sont spécifiques d'au moins 3 épitopes différents : le premier est reconnu par le MAb **15.3.3**; le deuxième est reconnu par le MAb **7.4.3**, et au moins un épitope est reconnu par les MAbs **3.5.1** et **11.1.2**. Ce résultat permet de constituer 2 sérogroupes à partir des 69 isolats de virus en utilisant les réactions positives ou négatives avec chacun des MAbs : les isolats du séro groupe 1 (qui proviennent tous de la région Centre du Burkina Faso et qui infectent le cultivar IP) sont reconnus par tous les MAbs sauf le MAb **15.3.3**, tandis que ceux du séro groupe 2 sont reconnus par tous les MAbs.

D'autre part, à l'intérieur de chaque séro groupe, il est possible de distinguer des sous-groupes d'isolats présentant des profils de réaction différents vis à vis des différents MAbs. Par exemple, certains isolats du séro groupe 2 réagissent fortement (D.O. > 1,5) avec les 4 MAbs tandis que d'autres réagissent fortement avec 1 ou 2 MAbs et faiblement avec les autres. Ce résultat suggère l'existence d'une variabilité des isolats, basée sur le niveau de représentation des différents épitopes sur la protéine de capsid.

Enfin, il faut noter que tous les isolats de notre collection possèdent au moins un épitope en commun qui est reconnu par les anticorps monoclonaux **3.5.1** et **11.1.2**. Ce résultat sera utilisé pour la mise au point d'un test de diagnostic du virus de la mosaïque de l'igname.

#### **4- VARIABILITE BIOLOGIQUE ET SEROLOGIQUE DES ISOLATS DE VIRUS INFECTANT L'IGNAME**

La réunion de tous les résultats obtenus sur la variabilité des isolats de virus d'igname a abouti à la constitution de 6 groupes différents (tableau 19). La distribution de ces groupes dans les différentes zones de production et dans les

**TABLEAU 19** : Caractéristiques des différents groupes d'isolats de virus mis en évidence par la symptomatologie, la mobilité électrophorétique de la protéine de capsid, et la variabilité antigénique

Groupe	*surcoloration nervaire	M.E.	**reacivité avec 15.3.3	@isolats
A	-	1	+	62, 67
B	-	2	+	30 à 33; 42; 46 à 49; 55; 56
C	+	3	+	4 5
D	-	3	+	16 à 29; 34 à 41; 43; 44; 50 à 54; 57 à 61; 63; 65; 66; 68; 69
E	-	4	+	64
F	-	4	-	1 à 15

M.E. : mobilité électrophorétique;

\* : + = présence de surcoloration nervaire sur les feuilles de *N. benthamiana* infectées par l'isolat d'un groupe donné. - = absence de surcoloration nervaire

\*\* : + = détection de l'isolat par le MAb 15.3.3; - = pas de détection de l'isolat

@ : Les isolats correspondant à ces numéros sont décrits dans le tableau 4

**TABLEAU 20** : Répartition des variants de virus dans les différentes zones géographiques et dans les populations d'igname cultivées

ESPECES	ZONES			
	Afrique de l'Ouest	Guadeloupe	Amérique du Sud	Nouvelle Calédonie
<i>D. cayenensis-rotundata</i>	A B D	D E		
<i>D. alata</i>	D	B D	D	A D
<i>D. trifida</i>		B	B C D	
<i>D. mangenotiana</i>	D			
Hybride Krengle- <i>D. praehensilis</i>	D			
Igname de Pilimpikou	F			

A,B, C, D, E et F : différents groupes d'isolats définis dans le tableau 19

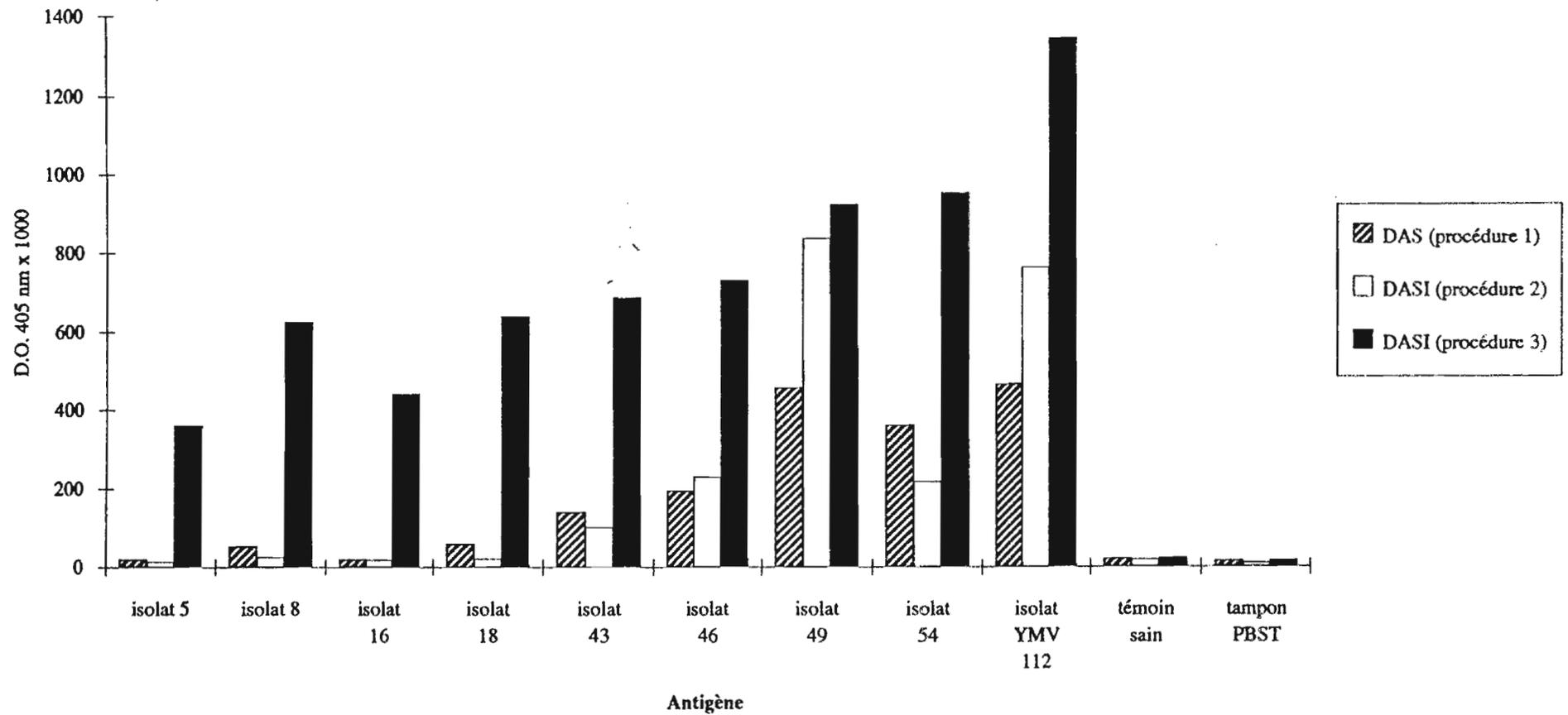
différentes populations d'ignames testées est donnée dans le tableau 20 : les groupes B et D sont les plus fréquemment rencontrés (respectivement 11 et 42 isolats); les groupes A, C et E ne sont représentés que par 1 ou 2 isolats. Il faut noter que nous ne disposons pas au niveau de la collection d'un échantillonnage plus large (différentes espèces d'igname) pour certaines zones géographiques (Nouvelle Calédonie, Cameroun, Nord-Ouest de la Guyane). Le groupe F est constitué par tous les isolats de la région Centre testés (15). Il semble donc qu'un seul type d'isolat ait été identifié par nos critères dans cette région.

## **5- MISE AU POINT D'UN TEST DE DETECTION IMMUNOLOGIQUE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DE L'IGNAME**

L'utilisation des anticorps polyclonaux dirigés contre l'isolat YMV112 a permis de détecter les 69 isolats de virus d'igname à partir d'extraits bruts de *N. benthamiana* infectés; mais le même test utilisé pour détecter le virus de la mosaïque de l'igname en champ au Burkina Faso avait montré des limites par l'absence de détection dans des échantillons infectés provenant de la région Centre (Chapitre II). L'étude de la variabilité des isolats de virus d'igname a montré que tous les isolats étudiés étaient détectés par les MAbs 3.5.1 et 11.1.2 et aussi que la méthode de diagnostic utilisée était importante pour le contrôle phytosanitaire de l'igname dans les différentes zones de production.

Dans le but de produire un nouveau test de diagnostic du YMV sur igname, nous avons entrepris de tester différentes méthodes d'utilisation du MAb 3.5.1 pour la détection du virus dans des plantes d'igname (DASI procédures 2, 3, ACPI, procédure 6) et de les comparer aux tests de diagnostic de la maladie utilisant

**Figure 20 : Comparaison de trois procédures ELISA pour la détection du virus de la mosaïque de l'igname à partir d'extrait brut de feuille d'igname**



seulement des anticorps polyclonaux (DAS procédure 1, ACP procédure 4, et ACPI procédure 5).

Selon les différentes procédures testées, 2 tampons de broyage des échantillons, 3 méthodes de broyage, et 3 dilutions de l'extrait brut ont été utilisées. Les résultats sont rassemblés dans la figure 20. Les tests effectués avec les procédures ACP et ACPI n'ont pas permis de détecter le virus dans les échantillons testés; par conséquent, seuls les résultats des procédures DAS et DASI (procédures 1, 2, et 3) ont été utilisés pour la représentation illustrée sur la figure 20. De même, seules les conditions de test donnant les meilleurs résultats ont été utilisées: broyage des échantillons à - 20°C; tampon de broyage : PBS-T + lait 3%; dilution de broyage de l'échantillon 1/20 (w/v). L'ensemble des valeurs de D.O. obtenues sont rassemblés en annexe.

La représentation graphique utilisée indique clairement que la meilleure détection est permise par la procédure 3. L'utilisation du MAb 3.5.1 pour le revêtement de la plaque permet une détection du virus bien supérieure à celle obtenue avec les deux autres procédures utilisant les anticorps polyclonaux pour cette étape.

## **6- DISCUSSION**

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence la variabilité biologique et sérologique existant parmi des isolats de virus sérologiquement reliés au YMV, et infectant différentes populations d'igname dans les régions de production. Tous les isolats de virus d'igname étudiés sont reconnus par les anticorps polyclonaux anti-YMV<sub>112</sub> et anti-YMV<sub>294</sub>. Ils sont donc tous sérologiquement reliés au YMV. Parmi les critères utilisés, la symptomatologie a déjà été citée comme étant l'un des

principaux sujets de variabilité dans le groupe des potyvirus (LECOQ ET PURCIFULL, 1992); d'autre part, la symptomatologie sur plante-hôte et la mobilité électrophorétique des protéines de capsid ont été utilisées pour étudier la variabilité du papaya ringspot virus (PRSV) par QUIOT-DOUINE *et al.* (1990). L'utilisation des MAbs est très courante dans les études de variabilité car ils permettent de classer des isolats en fonction de leur réactivité. Dans le cas des potyvirus, il est très intéressant de disposer de MAbs dirigés contre des épitopes situés sur la partie N-terminale de la protéine de capsid, en raison de leur spécificité pour un virus donné (SHUKLA *et al.*, 1988).

Au niveau de la collection d'isolats, il n'a pas été possible d'étudier pour chaque zone de prospection, des isolats appartenant aux différentes populations ou espèces cultivées. Cela limite les informations qui auraient pu être obtenues sur la variabilité existant dans certaines régions mais ne gêne pas la mise en évidence des différents types d'isolats existant. L'identification précise des isolats infectant différentes populations d'igname nécessitera un échantillonnage plus complet dans les régions de production.

Les symptômes de surcoloration nerveaire observés sur les feuilles de *N. benthamiana* infectées par l'isolat 45 semblent spécifiques de cet isolat car ils ont été observés dans différentes conditions de culture en chambre climatique mais aussi sur des plantes de *N. benthamiana* infectées par l'intermédiaire de pucerons vecteurs; BOEGLIN *et al.* (1992) avaient déjà observé ces symptômes lors de l'étude de cet isolat.

La mise en évidence de 4 mobilités électrophorétiques différentes pour les protéines de capsid des isolats s'explique soit par des différences de poids

moléculaires, soit par des phénomènes de conformations différentes des protéines. BOEGLIN *et al.* (1992) avaient déjà mis en évidence des mobilités de type 2 et 3 lors de la caractérisation d'isolats de virus d'igname originaires des Antilles Françaises. De nombreuses études effectuées sur les protéines de capsid des potyvirus ont montré que les mobilités électrophorétiques des protéines de capsid n'étaient pas directement reliées à leurs poids moléculaires et que des conformations différentes pouvaient modifier la mobilité électrophorétique des protéines de capsid.

L'utilisation pour la première fois d'anticorps monoclonaux préparés contre le YMV a permis de mettre en évidence une variabilité antigénique, basée sur la réaction positive ou négative des différents isolats avec le MAb 15.3.3 : tous les isolats sont détectés par ce MAb sauf ceux qui infectent le cultivar IP de la région Centre du Burkina Faso.

Les différences de profils sérologiques observés entre certains isolats d'un même séro groupe méritent d'être étudiées; elles suggèrent que des différences existent au niveau de la représentation des différents épitopes sur la protéine de capsid. Des études sérologiques plus précises (caractérisation des épitopes, production de nouveaux anticorps monoclonaux) devront être réalisées pour les mettre en évidence.

L'absence de détection en DAS-ELISA (procédure 2) des isolats N°16 à 57 par le MAb 7.4.3 peut s'expliquer par un phénomène de compétition entre ce MAb et les anticorps polyclonaux, compétition qui n'aurait pas lieu lorsque l'anticorps monoclonal est utilisé pour le revêtement de la plaque (procédure 3). Le fait que ce même anticorps monoclonal ne puisse pas détecter le virus en ACPI

peut être dû au type d'immunoglobuline le constituant, mais aussi à la conformation de la protéine de capsid au niveau de l'antigène ; en effet, celle-ci peut différer selon la procédure DASI ou ACPI, étant donné que les tampons de broyage utilisés ont des pH différents (7,4 en DASI et 9,6 en ACPI).

La variabilité biologique et sérologique qui résulte de cette étude sur les isolats de virus infectant les principales espèces cultivées (*D. cayenensis-rotundata*, *D. alata*, *D. trifida*), apparaît importante étant donné le peu de critères utilisés pour la mettre en évidence, mais surtout, elle ne semble liée ni à l'origine géographique ni à l'espèce infectée; en effet, les groupes B et D ont été identifiés dans les différentes zones de production et sur les trois principales espèces; mais celles-ci peuvent aussi être infectées par les groupes A, C ou E dans certaines zones. Les variants A, B, C, D, et E ont tous été identifiés en régions tropicales humides. Il est certain qu'un plus large échantillonnage sur les différentes populations aurait apporté plus d'information sur la variabilité des isolats. L'étude de 15 isolats infectant le cultivar IP dans la région Centre du Burkina semble indiquer qu'un seul type d'isolat (variant F) est impliqué dans cette région. Il infecte une population d'igname peu représentée et cultivée dans une région tropicale sèche éloignée de toutes les autres zones de culture d'igname au Burkina Faso (Chapitre 2). La caractérisation effectuée par L. GIVORD et G. SOMMERMEYER, (IBMC STRASBOURG) a révélé que ce MAb était dirigé contre un épitope situé sur la partie N-terminale de la protéine de capsid, tandis que les autres reconnaissent des épitopes situés sur la core protéine donc pouvant être commun à plusieurs potyvirus différents. Ce résultat suggère que l'isolat identifié dans la région Centre serait un virus différent des autres isolats étudiés. De plus, contrairement aux autres isolats identifiés, il semble ne pas être

transmissible par puceron. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de la partie N-terminale a permis de préciser la taxonomie de plusieurs potyvirus ou isolats de potyvirus à l'intérieur de ce groupe en raison de leur spécificité vis à vis d'un virus donné (SHUKLA *et al.*, 1992). La caractérisation de potyvirus d'igname avait conduit PORTH *et al.* (1987) à la conclusion que le virus du Nigeria et celui du Togo étaient des isolats d'un même virus différent du YMV de Côte d'Ivoire. Les relations complexes existant entre les potyvirus rendent difficile leur caractérisation par des méthodes biologiques et sérologiques. L'utilisation d'outils de biologie moléculaire et des études de comparaisons de séquences génomiques pourraient permettre de situer ces isolats par rapport au YMV.

L'exemple du cultivar IP non soumis à des échanges extérieurs peut s'opposer au cas des principales espèces cultivées, notamment *D. cayenensis-rotundata*, et *D. alata*, qui, depuis plusieurs années, ont fait l'objet de nombreux échanges et introductions, du fait des besoins alimentaires et des programmes d'amélioration variétale. C'est le cas d'une variété comme Florido (*D. alata*), sensible au YMV, qui a été introduite en Afrique, aux Antilles et en Amérique du Sud en raison de son rendement élevé en tubercules.

Le risque d'introduction de matériel infecté (tubercules) existe au niveau de ces échanges et ceux-ci pourraient être à l'origine de la présence de virus dans les différentes zones de production d'igname. L'étude des pathotypes du YMV n'a pas encore été effectuée mais ce travail devrait être réalisé pour mieux apprécier l'importance de la variabilité mise en évidence dans cette étude. Néanmoins, le danger d'introduction de virus dans du matériel végétal doit être pris en compte et des précautions phytosanitaires devraient être prises lors de ces échanges.

La mise au point d'un test sensible de détection de la maladie est donc nécessaire pour le contrôle du matériel végétal et les résultats obtenus à partir du MAb 3.5.1 sont intéressants. Pour mettre au point un test sensible de détection d'isolats du virus de la mosaïque de l'igname (dans les plantes ou les tubercules), il a été retenu d'utiliser un anticorps monoclonal permettant de détecter tous les isolats à notre disposition. Le MAb 3.5.1 permet de détecter 69 isolats (infectant 6 populations différentes d'igname dans 9 pays différents). Le test mis au point avec ce MAb apparaît plus sensible que celui utilisant des anticorps polyclonaux car ce dernier n'avait pas permis de détecter systématiquement le virus dans des échantillons virosés de la région Centre. Cependant, ce MAb est dirigé contre un épitope situé sur la partie centrale de la protéine de capsid ou core virus (L. GIVORD, G. SOMMERMEYER, IBMC/CNRS Strasbourg), donc commun à plusieurs potyvirus (SHUKLA *et al.*, 1988). Le MAb 3.5.1 pourrait donc détecter des isolats de virus différents du YMV. Les tests effectués sur six potyvirus africains n'ont pas donné de résultats positifs; des études devront être effectuées pour préciser la spécificité de cet anticorps.

#### IV CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHES

Les études que nous avons effectuées ont conduit à l'identification d'isolats de potyvirus dans les ignames cultivées dans les régions Sud-Ouest et Centre du Burkina Faso; le virus semble absent dans la région Sud. Les isolats originaires du Sud-Ouest sont très semblables biologiquement et sérologiquement à ceux identifiés en régions tropicales humides (Afrique de l'Ouest, Caraïbe) comme étant des isolats de YMV; tandis que l'isolat identifié dans la région Centre (hors des zones climatiques habituelles de l'igname et sur un cultivar adapté aux conditions climatiques locales) en diffère par sa non transmissibilité par pucerons et l'absence de réactivité avec le MAb 15.3.3. Cet isolat pourrait être un virus différent mais très proche du YMV.

La variabilité mise en évidence parmi les isolats de virus de l'igname a été basée sur des caractères biologiques et sérologiques. Six variants de virus ont été mis en évidence parmi 69 isolats de potyvirus d'igname provenant de zones de culture différentes. La variabilité observée ne semble liée ni à l'origine géographique ni à la nature de l'espèce infectée. Les principales espèces cultivées sont infectées par les différents variants observés, tandis que certaines populations d'igname, peu impliquées dans des programmes d'amélioration culturale donc peu ou pas soumises à des échanges de matériel végétal, (Igname de Pilimpikou, certaines variétés de *D. trifida*) semblent infectées par un nombre plus restreint d'isolats de virus d'igname. Ces résultats ne permettent pas de conclure sur le pouvoir pathogène des isolats ni sur leur capacité à infecter une plante hôte donnée. Des études restent à faire à ce sujet.

L'étude épidémiologique de la maladie au Burkina Faso a révélé les difficultés liées aux mesure de prévalence de la maladie, la nécessité de mieux connaître les différentes populations d'igname cultivées et de disposer d'un test de diagnostic très sensible de la maladie. Enfin, une meilleure connaissance des variétés d'igname, de leur sensibilité respective aux virus permettra de faciliter les études épidémiologiques et d'identifier des facteurs de résistance au virus de la mosaïque de l'igname.

Les tubercules semblent avoir un rôle important dans la propagation du virus : tous les tubercules testés dans la région Centre (cultivar IP) sont infectés et les taux de prévalence observés dans cette zone sont particulièrement élevés; par contre, les taux de transmission des isolats par pucerons sont faibles dans la région Sud-Ouest et nuls dans la région Centre.

L'identification d'un isolat de virus d'igname particulier dans la région Centre du Burkina Faso (aire de culture du cultivar Igname de Pilimpikou) est très intéressante car cette zone isolée est considérée comme une relique d'une ancienne région de production d'igname allant du Nord du Bénin au Mali. L'hypothèse de la mise en évidence d'un potyvirus différent du YMV devra être étudiée; cette observation peut aussi résulter d'une spéciation liée à un isolement géographique de l'isolat dans la plaine de Pilimpikou. Les études de séquences génomiques permettront de préciser la taxonomie de cet isolat. Des prospections devront être envisagées dans d'autres zones isolées de culture d'igname (au Mali, en Guinée, au Cameroun, en Afrique Centrale), afin de rechercher de nouveaux isolats de virus.

Les conclusions de la présente étude ne permettent pas de définir plus précisément les isolats de potyvirus infectant l'igname. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire (séquençage du YMV, identification de séquences caractéristiques de ce virus et comparaison avec les séquences homologues des isolats) devraient permettre de savoir s'il s'agit de virus différents ou d'isolats d'un même virus. En outre, la caractérisation des épitopes (notamment ceux situés sur l'extrémité N-terminale de la protéine de capsid) par des anticorps monoclonaux sera utile pour l'identification des isolats. D'autre part, il sera nécessaire d'étudier le pouvoir pathogène des variants de virus afin de mieux orienter les programmes de sélection variétale et de permettre le développement de variétés tolérantes ou résistantes à ce virus .

Il n'existe actuellement aucune méthode de lutte en champ de la maladie. Les résultats obtenus à partir des études épidémiologiques sont très utiles pour la compréhension de l'interaction plante-virus-milieu et permettent de mettre au point des stratégies de lutte. Les méthodes de lutte appliquées pour la maladie virale de la pomme de terre causée par le virus Y (PVY), associent la sanitation des plants et leur multiplication; ces mesures ont permis de fournir aux producteurs des plants sains. Cela a nécessité une infrastructure administrative et scientifique importante.

La mise en place de programme de lutte contre les virus de la mosaïque de l'igname implique l'obtention de matériel sain (tubercules ou plants sains), leur multiplication dans une zone peu ou pas contaminée, et des méthodes de diagnostic très fiables de la maladie.

Des méthodes d'éradication du YMV dans les plantes d'igname ont été développées en laboratoire (culture *in vitro* de méristèmes, sauvetage d'embryons, thérapie thermique et chimiothérapie), mais ne sont pas encore utilisées à grande échelle. Des études devront être effectuées pour vérifier la possibilité d'obtenir des tubercules sains à partir de plantes infectées. Cette observation, si elle est vérifiée permettrait d'envisager l'obtention rapide de matériel sain, notamment dans le cas des populations d'igname fortement contaminées (*D. trifida* aux Antilles et en Amérique du Sud, Igname de Pilimpikou au Burkina Faso). D'autre part, des cas de variétés d'igname tolérantes ou résistantes à la mosaïque de l'igname ont été observés (MARTIN 1976, *in* DEGRAS, 1986; GOUDOU-SINHA, 1990). L'identification de telles propriétés parmi les principales espèces cultivées pourrait permettre de développer des programmes de sélection variétale.

La multiplication du matériel sain devra être réalisée dans une région indemne de la maladie. De telles zones de culture ont été identifiées dans le Sud du Burkina Faso; des études précédentes effectuées à la Guadeloupe (GOUDOU-SINHA, 1990) avaient permis d'identifier des zones de culture à pression d'inoculum faible ou nulle. Il serait intéressant de savoir si cette situation est due à l'absence de vecteur ou à la culture de variétés résistantes; cela nécessite des études épidémiologiques précises. Néanmoins, il serait possible de multiplier des semences indemnes de maladies virales dans ces zones. La transmissibilité par puceron des différents isolats devra être précisée. En effet, dans le cas d'isolats peu ou pas transmissibles, il est possible d'imaginer la sanitation des variétés infectées et leur réinstallation dans le même milieu. Ainsi, à la Barbade, l'absence apparente de vecteur pour le virus responsable des taches brunes dans le tubercule (IBSV,

badnavirus) a permis le développement d'un programme de sanitation de l'igname *D. alata*, et l'éradication de la maladie (MANTELL et HAQUE, 1979a).

Toutes les propositions effectuées pour éliminer le virus de la mosaïque de l'igname sont conditionnées par la disponibilité d'un test de diagnostic très sensible permettant la détection du virus aussi bien dans les plantes infectées que dans les tubercules. Le test développé au cours de cette étude devra être confronté à d'autres techniques et à d'autres isolats pour vérifier sa sensibilité. Il pourra être utilisé par les services de protection des végétaux, les organismes de recherches et surtout, les sélectionneurs. La technique PCR pourrait aussi être utilisée pour vérifier l'état sanitaire du matériel en raison de sa très grande sensibilité; elle est déjà utilisée pour la détection d'autres potyvirus : le virus de la Sharka des arbres fruitiers (PPV; WETZEL *et al.*, 1992), les infections mixtes par potyvirus de la patate douce (SPFMV; COLINET *et al.*, 1993) le "Dasheen mosaic virus", (DsMV; PAPPU *et al.* 1993). Les études actuellement menées par l'équipe de C. FAUQUET à l'ILTAB en Californie sur le séquençage du génome du YMV permettront la caractérisation de séquences cibles spécifiques de ce virus et donc la détection précoce des infections dans les plantes et les tubercules.

Enfin, l'accent devra être mis sur les contrôles sanitaires du matériel destiné aux échanges internationaux afin d'éviter la dissémination d'isolats de virus d'igname.

# DOCUMENTS ANNEXES



A 1-Description du cultivar Igname de Pilimpikou, d'après HAMON, HAMON et TOURE, 1986

## GROUPE BANIAKPA

### 1. Caractères morphologiques

- PLANTE : jeune tige vert et violet, épineuse, avec de la pruine - Tige adulte vert bleuté à vert foncé tacheté de vert clair, avec de la pruine et des épines jaunâtres - Nombreuses ramifications secondaires - Jeune feuille cuivrée - Feuille adulte vert foncé à lobes écartés, à bords très ondulés - L/l = 1,36 - Floraison mâle abondante.
- TUBERCULE : Généralement unique - Long, mince avec une tête petite et l'extrémité basale aplatie - Aspect boutonneux, lisse au toucher - Racines épineuses - Chair jaune clair - Très précoce.

### 2. Noms vernaculaires

Sp. Douce : Côte d'Ivoire  
 Baniakpa : Bénin  
 Igname de Pilimpikou : Burkina Faso.

---

N.B. : Deux échantillons de la collection initiale de la Faculté des Sciences et Techniques d'Abidjan, répertoriés "originaires de Côte d'Ivoire" (sans plus de précision) appartiennent à ce groupe. De tels échantillons n'ont pas été retrouvés au cours de nos prospections.

Nous pensons, qu'en fait, ce groupe répandu au Nord-Est Bénin, serait plutôt d'origine béninoise, voire nigériane.

\*\* Le nom figurant sur le tubercule de la photo ci-contre est une erreur.

A 2- Comparaison des différentes procédures de test ELISA, des différentes méthodes de broyage des échantillons et des deux tampons de broyage pour l'optimisation du test de détection du virus de la mosaïque de l'igname : Valeurs de D.O. obtenues

**Tests DAS ELISA et DASI ELISA : échantillon dilué au 1/20**

<i>DAS proc. 1</i>	54	46	49	5	8	16	18	43	TS	TV	Tampon P
PBST-LAIT											
Mortiers24°	60	200	170	35	45	16	100	260	22	780	15
Mortiers-20°	40	95	100	20	50	20	55	140	20	465	14
Broyeur à bille	20	115	110	4	40	7	70	30	4	460	2
Ultraturrax	50	320	90	20	60	20	75	280	22	1300	2
PBST-L-P-D											
Mortiers24°	60	120	150	20	30	20	55	210	15	720	6
Mortiers-20°	40	100	70	10	30	40	30	110	10	350	9
Broyeur à bille	30	150	85	4	70	15	7	110	3	625	10
Ultraturrax	100	330	250	20	90	30	90	450	15	1150	15
<i>DASI proc. 2</i>	54	46	49	5	8	16	18	43	TS	TV	Tampon P
PBST-LAIT											
Mortiers24°	40	120	80	15	20	15	35	190	20	350	7
Mortiers-20°	18	30	35	14	25	8	20	100	18	160	5
Broyeur à bille	45	120	80	9	60	10	80	39	5	350	4
Ultraturrax	25	170	40	15	30	15	35	250	15	650	9
PBST-L-P-D											
Mortiers24°	45	65	90	5	20	5	20	170	12	370	12
Mortiers-20°	20	50	40	4	20	20	15	90	15	125	15
Broyeur à bille	40	155	60	12	140	15	10	150	10	500	10
Ultraturrax	70	200	135	15	70	15	30	250	20	630	7
<i>DASI proc. 3</i>	54	46	49	5	8	16	18	43	TS	TV	Tampon P
PBST-LAIT											
Mortiers24°	972	750	1020	320	752	41	521	782	33	1750	14
Mortiers-20°	847	950	984	524	698	184	631	852	25	1740	14
Broyeur à bille	950	730	920	360	625	440	640	680	30	1340	20
Ultraturrax	741	784	854	214	750	68	310	642	26	1760	17
PBST-L-P-D											
Mortiers24°	591	457	501	214	425	76	210	580	12	955	17
Mortiers-20°	452	482	774	380	485	524	245	752	19	784	12
Broyeur a bille	730	555	710	260	510	375	203	710	20	825	20
Ultraturrax	537	497	621	175	417	212	198	720	21	952	15

**D.O. (Absorbance à 405 nm) x 1000; Echantillons testés : voir tableau 4**

Tampon P : PBS-Tween; PBST-LAIT et PBST-L-P-D (Lait+ PVP+ DIECA) : tampons de broyage de l'échantillon  
DAS Proc. 1: Double sandwich direct avec les anticorps polyclonaux anti YMV112

DASI proc. 2 : Double sandwich indirect avec les anticorps polyclonaux en revêtement de plaque et l'anticorps monoclonal 3.5.1 en deuxième anticorps

DASI proc. 3 : Double sandwich indirect avec l' anticorps monoclonal 3.5.1 en revêtement de plaque et les anticorps polyclonaux en deuxième anticorps

TS : témoin sain; TV : Témoin virosé, YMV 112

**Tests DAS ELISA et DASi ELISA : échantillon dilué au 1/50**

<b>DAS proc. 1</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon P</b>
<b>PBST-LAIT</b>											
Mortiers24°	55	170	100	25	45	25	55	150	25	550	7
Mortiers-20°	40	80	70	25	40	25	40	110	25	315	9
Broyeur à bille	25	80	75	3	35	3	41	17	4	390	4
Ultraturrax	55	250	70	30	55	20	50	230	25	950	10
<b>PBST-L-P-D</b>											
Mortiers24°	45	90	125	10	30	25	30	250	13	520	5
Mortiers-20°	25	75	45	10	25	45	15	120	10	170	7
Broyeur à bille	15	100	60	4	40	25	3	65	1	485	2
Ultraturrax	80	280	190	15	115	30	40	450	15	750	9
<b>DASi proc. 2</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon P</b>
<b>PBST-LAIT</b>											
Mortiers24°	25	85	45	10	20	10	20	100	15	180	7
Mortiers-20°	15	30	20	10	20	10	20	55	20	70	11
Broyeur à bille	26	90	25	10	45	7	40	25	10	260	10
Ultraturrax	25	110	30	20	35	15	25	140	20	430	4
<b>PBST-L-P-D</b>											
Mortiers24°	25	35	70	10	25	15	20	170	15	215	7
Mortiers-20°	20	30	25	10	20	25	15	105	20	60	9
Broyeur à bille	15	75	45	5	50	10	5	60	10	315	10
Ultraturrax	40	110	80	15	65	20	25	290	15	335	11
<b>DASi proc. 3</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon P</b>
<b>PBST-LAIT</b>											
Mortiers24°	890	780	890	320	650	70	420	955	15	1380	12
Mortiers-20°	1000	905	1110	450	750	270	580	1000	18	1360	14
Broyeur à bille	760	560	960	230	420	185	390	520	20	1070	20
Ultraturrax	710	760	840	220	715	125	300	1000	12	1440	21
<b>PBST-L-P-D</b>											
Mortiers24°	750	600	790	300	620	150	315	890	12	1100	12
Mortiers-20°	750	540	815	140	540	210	80	810	10	1000	15
Broyeur à bille	650	480	850	165	420	225	130	690	15	1010	9
Ultraturrax	780	770	920	450	900	315	350	1000	21	1350	20

Mêmes légendes que sur la page précédente

**Tests DAS ELISA et DASI ELISA : échantillon dilué au 1/100**

<b>DAS proc. 1</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon P</b>
<b>PBST-LAIT</b>											
Mortiers24°	30	60	70	5	15	10	15	160	10	250	5
Mortiers-20°	20	50	25	5	15	20	10	60	10	115	4
Broyeur à bille	15	90	55	3	40	7	35	9	2	320	3
Ultraturrax	50	190	110	10	75	15	25	340	15	390	7
<b>PBST-L-P-D</b>											
Mortiers24°	65	160	95	30	70	30	65	140	35	465	14
Mortiers-20°	45	70	65	20	50	30	45	100	30	270	12
Broyeur à bille	10	60	75	0	30	4	3	45	2	325	11
Ultraturrax	55	210	70	30	75	30	50	200	30	870	13
<b>DASI proc.2</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon P</b>
<b>PBST-LAIT</b>											
Mortiers24°	10	30	25	3	20	6	20	30	15	95	8
Mortiers-20°	15	20	20	5	20	8	15	25	15	40	7
Broyeur à bille	20	90	20	10	50	5	25	15	5	200	4
Ultraturrax	15	50	20	10	25	10	15	65	20	185	8
<b>PBST-L-P-D</b>											
Mortiers24°	18	20	40	5	10	10	10	115	15	45	10
Mortiers-20°	10	20	15	5	10	10	10	55	15	20	7
Broyeur à bille	10	30	30	4	25	5	5	25	4	175	5
Ultraturrax	25	75	40	15	35	15	15	200	15	70	8
<b>DASI proc. 3</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon P</b>
<b>PBST-LAIT</b>											
Mortiers24°	740	650	750	200	575	40	300	860	12	1140	12
Mortiers-20°	810	750	990	325	625	180	450	930	21	1220	14
Broyeur à bille	755	575	830	200	390	155	345	450	19	1100	10
Ultraturrax	530	660	750	140	645	90	250	945	12	1420	8
<b>PBST-L-P-D</b>											
Mortiers24°	570	420	635	145	370	140	200	800	15	800	12
Mortiers-20°	710	480	610	100	485	125	45	730	10	810	9
Broyeur à bille	540	440	590	130	375	165	90	630	10	1010	14
Ultraturrax	590	610	745	180	600	110	215	910	18	1010	11

Même légende que la page précédente

**Tests ACP ELISA et ACPI ELISA : échantillon dilué au 1/20**

<b>ACP proc 4</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon C</b>
Mortiers24°	102	185	402	31	42	27	31	351	28	65	14
Mortiers-20°	382	563	538	40	42	25	30	201	28	60	17
Ultraturrax	233	524	562	58	38	35	46	204	39	70	12
<b>ACPI proc 5</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon C</b>
Mortiers24°	271	345	515	100	90	104	36	531	61	165	21
Mortiers-20°	635	570	832	141	106	86	37	498	37	152	21
Ultraturrax	532	675	651	118	44	45	66	411	48	166	25
<b>ACPI proc 6</b>	<b>54</b>	<b>46</b>	<b>49</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>43</b>	<b>TS</b>	<b>TV</b>	<b>Tampon C</b>
Mortiers24°	25	38	80	12	46	12	17	85	13	36	12
Mortiers-20°	142	82	123	19	34	9	13	69	9	38	10
Ultraturrax	61	72	122	22	34	16	27	68	14	31	8

- ACP proc. 4 : antigen coated plate ; détection avec les anticorps polyclonaux anti-YMV112 conjugués à la phosphatase alcaline; ACPI proc. 5 : ACP indirect; détection avec des anticorps polyclonaux, puis un anticorps anti-lapin; ACPI proc. 6 : ACP indirect; détection avec l' anticorps monoclonal 3.5.1, puis un anticorps anti- souris;

- Tampon C : Tampon carbonate

Les résultats des tests effectués avec les échantillons dilués au 1/50 et 1/100 étant inférieurs au seuil de positivité, ils n'ont pas été présentés dans ce tableau .

**A 3- Publication 1 : Ecology and etiology of a yam mosaic disease in Burkina Faso**

C. GOUDOU-URBINO, G. KONATE, J.B. QUIOT, J. DUBERN

*Tropical Sciences* , acceptée Juin 1994

## Etiology and ecology of a Yam mosaic disease in Burkina Faso

*C. Goudou-Urbino* <sup>(1)</sup>, *G. Konate* <sup>(2)</sup> *J. B. Quiot* <sup>(3)</sup>  
and *J. Dubern* <sup>(1)</sup>

(1) L.P.R.C. / CIRAD-ORSTOM, Centre C.I.R.A.D., BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 2, France

(2) I.N.E.R.A., Station de Kamboinse, 01 BP 476, Ouagadougou, Burkina Faso

(3) I.N.R.A., Lab. Biologie et Pathologie Végétale, Place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

**Abstract** *Yam virus diseases were surveyed for three years in Burkina Faso. Mosaic and green vein banding symptoms were observed on two species (*D. cayenensis-rotundata* and *D. alata*) in the south west area as also in the southern area, and on the Pilimpikou Yam cultivar in the central area. Using electron microscopy, ELISA and host-range, it was found that plants were infected with a potyvirus similar to yam mosaic virus in host-range, morphology and serological properties. This virus was not detected in the southern area but it occurred at a low rate (13%) in the south west and more frequently (71.5 %) in the central area. Healthy yam plants were exposed to natural infection during five months in these two areas and checked for virus contamination by ELISA. Tubers from markets were also checked. Disease contamination in natural conditions during crop growth was relatively slight compared to that in tubers from markets. The reliability of virus detection methods is discussed.*

**Keywords** : *Yam mosaic virus, yam, Burkina Faso, etiology, ELISA.*

### Introduction

Yams (*Dioscorea spp.*, Dioscoreaceae) are staple food crops widely cultivated in tropical areas. Their major virus disease is the yam mosaic virus (YMV) described by Thouvenel and Fauquet (1979). This potyvirus is transmitted by aphids in a non persistent manner and by vegetative propagation (tubers). *Nicotiana benthamiana* can be infected with YMV by mechanical inoculation and is a suitable laboratory host.

In Burkina Faso, yams are produced in a small area about 100 km north of Ouagadougou and in a broad band along the borders with Cote d'Ivoire and Ghana. In the southern and south western areas, species such as *D. cayenensis* Lam.-*rotundata* Poir. and *D. alata* L. are widely produced. A cultivar grown only in the central area is Pilimpikou Yam, which differs from the other species cultivated in Burkina Faso as it is a possible hybrid of *D. abyssinica* and of an unknown perennial species of *Dioscorea* (Dumont and Hamon 1985).

In West Africa and in the Caribbean, Terry (1976), Thouvenel and Fauquet (1979), Reckhaus and Nienhaus (1981) and Marchoux (1980), recorded and described potyviruses which infect yam and are serologically related to YMV. As YMV occurs in neighbouring countries and as tuber seeds are exchanged between Burkina Faso and these countries, it was supposed that it occurs in Burkina Faso. This hypothesis has now been investigated.

## Materials and methods

**Survey and sampling** An intensive survey was carried out during 1991, 1992 and 1993, in the three yam producing areas of Burkina Faso (southern, south west and central areas). Six to fifteen fields were surveyed per area and 50% of the yam plants of each field were examined. Samples were collected from (a) all yam plants showing typical yam mosaic symptoms (i.e. mosaic, green vein banding, blistering), and from (b) one yam plant out of ten plants without these symptoms. Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay (DAS-ELISA) and infectivity test were used to detect the virus.

To estimate the importance of tuber seeds in virus spread, 410 tubers (276 of *D. cayenensis-rotundata* and 134 of *D. alata*) were collected respectively from 3, 4 and 5 markets in the central area, the southern area and the south west area; 30 to 35 tubers were collected per market. These tubers, and the plants grown from them, were also tested for virus infection.

**Serology** DAS-ELISA : wells of polystyrene microtitre plates (NUNC microwell) were coated by incubation for 3 h at 37°C with YMV polyclonal antibodies (100 µl/well) at 0.5 µg/ml in coating buffer (0.05 M sodium carbonate buffer, pH 9.6). This antiserum was produced by L.P.R.C./ORSTOM and was shown to detect a typical Cote d'Ivoire YMV isolate but none of the following African potyviruses : groundnut eyespot virus, sugarcane mosaic virus, guinea grass mosaic virus, pepper vein mottle virus, turnip mosaic virus, datura shoestring virus and peanut mottle virus.

Plates were then washed (three washes, each for 3 min) with 0.01M phosphate-buffered-saline (pH 7.4) containing 0.05 % Tween 20 (PBST). Then 3 % non-fat milk powder (Regilait) in PBST was added for 1h at 37°C (200 µl/well). Wells were washed as above. Antigen samples were obtained by grinding 1 g (leaf bled or tuber flesh) in 20 ml of PBST. After 5 min centrifugation at 10 000 g, 100 µl of crude extract were added in wells. After washing, YMV antibody globulin/alkalin phosphatase conjugate (1:4000) in PBST was added to wells (100 µl/well) and incubated 3 h at 37°C or one night at 4°C. The washing was repeated and bound alkaline phosphatase was detected using p-nitrophenyl-phosphate (Sigma) at 5 mg/ml in 10 % (v/v) diethanolamine, pH 9.8 (100 µl/well). Absorbance at 405 nm was recorded after 1 h of enzymatic reaction at 37°C and after subsequent incubation overnight at 4°C. Controls consisted of virus free yam leaf extract. YMV infected *N. benthamiana* were used as positive controls. All samples with O.D. greater than 0.100 and twice the control O.D. were held to be ELISA positive.

**Infectivity test** For each tested sample, 1 g of yam leaf or tuber flesh was ground in 10 ml of 0.03M sodium phosphate buffer pH 8.3 containing 0.2 % sodium diethyldithiocarbamate. Each crude extract containing 600 mesh carborundum was used to inoculate 5 plants of *Nicotiana benthamiana*. Infection of inoculated plants was checked by recording the eventual symptoms and by DAS-ELISA performed one to two weeks after inoculation. The infected plants were then used for light and electron microscopy and for host range studies.

**Host range** Host range studies were conducted using the following species: *Nicotiana benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa*, *N. megalosiphon*, *N. sylvestris*, *N. tabacum* cv Samsun, *N. tabacum* cv Samsun NN, *N. tabacum* cv Xanthi nc, *Petunia hybrida*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Gomphrena globosa*. Five to ten plants of each species were inoculated with sap from symptomatic yam first, and then in another experiment, with sap from infected *Nicotiana benthamiana*. All inoculated plants were kept in an insect-proof greenhouse at a temperature ranging from 25°C to 28°C, at 70 % relative humidity, and at 16 h photoperiod with a light intensity ranging from 4000 to 5000 lux. Infection of inoculated plants was checked as described above.

**Electron microscopy** Carbon-coated collodion grids were floated on drops containing samples for 2 min, rinsed in water then negatively stained with 2 % uranyl acetate in distilled water. Grids were observed with an electron microscope (Jeol JEM-100 CX II) and pictures were taken at a magnification of 10 000 and 14 000.

**Observation of viral inclusions** Cylindrical inclusions were observed by light microscopy in epidermal strips of infected *N. benthamiana*, stained as described by Christie and Edwardson (1977).

**Virus spread in natural conditions** Virus spread through yam fields was estimated during the 1993 cropping season. Seeds were collected in southern and south western areas and tested for YMV by ELISA. The non-infected checked tuber seeds were planted at random at the beginning of July (when aphid population is known to be important) in infected yam fields, 115 tuber seeds in a field in the south west area, and 230 in a field in the central area. The contamination by the virus of the plants grown from these tuber seeds was checked one, two, three and five months after planting, using leaf observation and DAS-ELISA. The tubers were harvested at the fifth month and checked by DAS ELISA.

## Results

**Etiology** The typical symptoms of yam mosaic (i.e. mosaic and green vein banding) were observed on the main species of yam in the three areas. Other virus-like symptoms like leaf mottling, vein yellowing or leaf deformation were present on some plants. Two groups of samples were distinguished by ELISA: (a) those giving  $A_{405nm}$  not significantly different from healthy control (0.050 O.D.); these samples were classified ELISA-negative; (b) those giving  $A_{405nm}$  significantly higher than control; these samples were classified ELISA-positive. ELISA positive samples were found in central and south west areas but not in the south.

The virus could be detected in 86 of the 97 tubers from the central area and in 25 of the 172 tubers from the south west, but it was not detected in the 141 from the south. In the south west, the virus was then detected only in the seedlings growing from the 25 ELISA positive tubers. On the other hand, all the seedlings grown from the 97 tubers of the central area were found ELISA-positive. No infection was recorded in the seedlings grown from the tubers of the southern area.

Flexuous filaments were observed on negatively stained grids coated with purified virus suspensions. By measuring 165 particles from different electron micrographs, the mean particule was  $753 \pm 27$  nm long and 13 nm wide. Pinwheels were observed by light microscopy in epidermal cells of inoculated *N. benthamiana* .

*N. benthamiana* , *N. clevelandii* and *N. megalosiphon* were easily infected by mechanical rubbing with leaf crude extract from diseased *D. cayenensis-rotundata*, *D. alata* , Pilimpikou Yam plants or infected *N. benthamiana* plants . They showed, after an incubation time of one to two weeks, systemic symptoms (mosaic, mottling). When inoculated with infected *N. benthamiana* extracts, *Chenopodium amaranticolor* developed chlorotic local lesions on inoculated leaves after 10 days; it developed the same symptoms when inoculated with the Cote d'Ivoire-YMV-isolate. The other inoculated species did not show any symptoms and were ELISA-negative.

**Serology** Results of serological tests indicated that four types of samples were distinguished by ELISA and foliage observation : those showing YMV typical symptoms and which were ELISA positive ( E+S+), those showing YMV typical symptoms and ELISA negative ( E-S+), those without YMV typical symptom and ELISA positive ( E+S-) and those without YMV typical symptom and ELISA negative ( E-S-). The percentage of ELISA positive samples was higher in samples showing YMV typical symptoms than in samples without these symptoms (Table 1). Applying the infectivity test to 10 "E-S+" samples of each area, it was obtained infected and ELISA positive *N. benthamiana* with all those from the central area but no infection with those from the other origins.

The geographical distribution of the virus indicates that the rate of infection was higher in the central area (71.5 %) than in the south west area (1.2 to 13.4 %). Although mosaic was observed on foliage in the southern area, no virus was detected there.

### **Virus spread**

Only 92 and 173 tubers sprouted, in the trials of the south west and the central areas respectively. None of the plants was infected in the two areas during the first three months of the assay. The absence of positive detection one month after plantation is evidence that all the tubers planted in the trial were YMV-free. After being exposed for five months to natural infection, YMV could be detected in two yam plants from the south west trial. ELISA tests on harvested tubers revealed four infected tubers (included the two infections previously identified in fields). No plant or tuber from the trial of the central area became infected though it was set in a 100% contaminated field.

## Discussion

Yam plants from the central and the south west areas of Burkina Faso are infected with a filamentous virus which is 750 nm long and 13 nm diameter. Pinwheels are observed in *N. benthamiana* leaves infected with central and south west strains. Consequently this virus belongs to the potyvirus group. It is tuber transmitted and induces typical symptoms of mosaic and green vein banding on yam leaves. The host range is similar to that reported for YMV (Thouvenel and Fauquet, 1979) and it reacts strongly with anti-YMV polyclonal antibodies. It was found that *C. amaranticolor* could be infected with this potyvirus and with YMV though this has not been reported for YMV previously. The conclusion is that the potyvirus infecting yam plants in Burkina Faso is very similar to the one recorded and described as YMV by Thouvenel and Fauquet (1986). Several potyviruses infecting yam were considered to be related to YMV as strains : Yam virus in Nigeria; Dioscorea green banding mosaic virus in Togo ; *D. trifida* virus in Guadeloupe (Porth, *et al.*, 1987; Brunt *et al.*, 1990).

The percentage of infected plants from the central area seems to be underestimated as the virus could be detected in some ELISA negative samples by the infectivity test. These are only the cultivar Pilimpikou Yam, which is not grown elsewhere in Burkina Faso, and the use of infected tuber-seeds, year after year, has probably led to a general contamination of this cultivar in this area.

The south west of Burkina Faso adjoins the yam producing area of the north of Cote d'Ivoire and tubers are often exchanged across the border ; this could explain the occurrence of YMV here.

Although serological tests were applied to 659 samples collected during two years, the virus could not be detected in any sample from the southern area. This suggests that either YMV did not occur in this area or that yam could be infected with a strain of YMV which was not recognized by the polyclonal antiserum used in ELISA tests.

Results of the assay of virus dissemination in natural conditions should be discussed cautiously as it has been done only during one cropping season. The low incidence of virus observed in the south west and the absence of a detected contamination in the central trial after five months could have many causes : the insect vector population may not be efficient during the period of the assays. Thouvenel and Dumont (1990) reported that exterior infection during the crop cycle was relatively low in comparison with the infection rate of the planting material in the north of Cote d'Ivoire. In the central area, it can be imagined the occurrence of a YMV strain adapted

to the Pilimpikou Yam cultivar may not be able to infect the varieties of *D. cayenensis-rotundata* and *D. alata* used in these experiments in the southern and the South west areas. This is supported by the difference of A<sub>405nm</sub> obtained in ELISA tests on samples from the south west and central area and it seems that two strains of the virus are probably occurring in Burkina Faso. Porth *et al.*, (1987) recorded close relations between some yam potyviruses in West Africa but also differences in serology.

Observation of symptoms and results of DAS-ELISA on yam plants has shown that it would be unwise to link the YMV typical symptom expression to the virus presence. The absence of YMV typical symptoms on YMV-infected yam leaves has often been reported in Nigeria (Totthapilly 1981). On the other hand, typical YMV symptoms on ELISA-negative samples could be attributed to other pathogens since several other viruses have been isolated from yam crops : the cucumber mosaic virus (CMV) was identified on edible yam in Guadeloupe (Migliori, 1977) and was responsible of symptom of yellowing on yam leaves; beet mosaic virus infected *D. alata* and induced a leaf mottling on yam leaves ( Porth and Nienhaus, 1983). This virus was found in association with a potyvirus named *D. alata* virus (Porth *et al.*, 1987). Double infection also occurred in *D. alata* with internal brown spot badnavirus and a uncharacterized potyvirus which induced symptom of mosaic ( Harrison and Roberts, 1973) and resembled YMV in Cote d'Ivoire (Thouvenel *et al.*, 1988); *Dioscorea* latent potexvirus was identified on medicinal yams in association with a potyvirus inducing green vein banding symptom (Hearon *et al.*, 1978; Phillips *et al.*, 1986 ); Chinese yam necrotic mosaic carlavirus was also cited on *D. batatas* in Japan (Fukumoto and Tochihara, 1978). In addition, symptoms of chlorosis, shoe string, leaf curl, vein yellowing, were previously observed on edible yam leaves but the causal agents were not identified (Thouvenel and Fauquet, 1982; Thottappilly, 1983).

Some failures of ELISA tests to detect the virus in tubers or leaves, while the infectivity test was positive, indicates that, in our conditions, the serological test was less sensitive than the infectivity test. It is therefore suggested that the two methods need to be used together for a more accurate diagnosis.

### Conclusion

YMV infects yam crops in Burkina Faso. The disease incidence varies strongly, with no contamination in the southern area. Using traditional agriculture practices, it could be possible to keep large areas free of virus disease. This is probably related to the low efficiency of the virus dissemination by vectors observed in the field experiments. Infected tuber seeds seem to be the main source of virus spread. These results need to be confirmed by further field work, but they justify the development of a sanitary selection program to reduce or suppress the virus in defined areas.

## References

- Brunt A., Crabtree K. and Gibbs A. (1990) Viruses of tropical plants. Wallingford, CAB I., 707 pp.
- Christie R. G. and Edwardson J. R. (1977) Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultural Experimental Station. *Monography* **9**, 150 pp.
- Dumont R. and Hamon P. (1985) Une forme originale parmi les Dioscoreacées cultivées en Afrique de l'Ouest : l'igname de Pilimpikou. (Personal communication).
- Fukumoto F. and Tochihara H. (1978) Chinese yam necrotic mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **44**, (1), 1-5.
- Harrison B. D. and Roberts I.M. (1973) Association of virus-like particles with internal brown spot of Yam (*Dioscorea alata*). *Tropical Agriculture (Trinidad)* **50**, 335-340.
- Hearon S.S. , Corbett M.K., Lawson R.H, Gillaspie Jr. A.G., and Waterworth H.E. (1978) Two flexuous-rod viruses in *Dioscorea floribunda* : symptoms, identification, and ultrasructure. *Phytopathology* **68**, 1137-1146.
- Marchoux G. (1980) Pathologie des ignames en Guadeloupe; maladies virales . In : *Les Colloques de l'I.N.R.A., l'Igname*. Séminaire International de Pointe-à-Pitre, 28 July - 02 August 1980, 93-105.
- Migliori A. (1977) Maladie à virus de l'igname (*Dioscorea* spp.). *Nouvelles agronomiques Antilles-Guyane* **3** (3, 4) , 428-435.
- Porth A. and Nienhaus F. (1983) *Dioscorea alata* ring mottle virus , a new potyvirus on yam in Togo. *Zeitschrift Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **90**, 352-362.
- Phillips S., Piggott J. D'A. and Brunt A. A. (1986) Further evidence that dioscorea latent virus is a potexvirus. *Annal of Applied Biology* **109**, 137-145.
- Porth A., Lesemann D. E. and Vetten H. J. (1987) Characterization of potyvirus isolates from West African Yams (*Dioscorea* spp.). *Journal of Phytopathology* **120**, 166-183.

Reckhaus P. and Nienhaus F. (1981) Etiology of a virus disease of white yam *D. rotundata* in Togo. *Journal of Plant Disease and Protection* **88** (8, 9), 492-509.

Terry E. R. (1976) Incidence, symptomatology and transmission of a yam virus in Nigeria. *Proceedings of the Fourth Symposium of the International Society of Tropical Roots Crops*. Cali, Columbia, pp. 170-173.

Thottappilly G. (1981) *Annual Report of IITA*. Ibadan, Nigeria.

Thottappilly G. (1983) *Annual Report of IITA*. Ibadan, Nigeria.

Thouvenel J. C. and Fauquet C. (1979) Yam Mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast. *Annal of Applied Biology* **93** 279-283.

Thouvenel J. C. and Fauquet C. (1980) Utilisation de la technique ELISA dans le diagnostic de la mosaïque de l'igname. *Compte-rendu de la Deuxième Conférence Internationale sur l'Impact des Maladies à Virus sur le Développement des Pays Africains et du Moyen Orient*. Nairobi, Kenya, 02-06 Décembre 1980.

Thouvenel J. C. and Fauquet C. (1982) Les viroses de l'igname en Côte d'Ivoire. In *Yams, Ignames* pp. 245-252 (Miege J. and Lyonga S.N. eds) Clarendon Press, Oxford 411p. Communications presented at the Séminaire International sur l'igname IFS-ONARES, Buea, Cameroun, October 1978.

Thouvenel J. C. and Fauquet C. (1986) Yam mosaic virus. In *Description of Plant Viruses*. Commonwealth Mycological Institute, Association of Applied Biologists, N°314.

Thouvenel J. C., Fargette D. and Fauquet C. (1988) La maladie des taches brunes du tubercule d'igname en Côte d'Ivoire. *Proceedings of the seventh Symposium of the International Society for Tropical Roots Crops*, Gosier, Guadeloupe, 1-6 July 1985.

Thouvenel J. C. and Dumont R. (1990) Perte de rendement de l'igname infectée par le virus de la mosaïque en Côte d'Ivoire. *L'Agronomie Tropicale*. **45** (2), 125-129.

**Table 1** : Virus detection in yam plants showing YMV typical symptoms or without symptom in three yam producing areas of Burkina Faso

AREAS	PLANTS SHOWING YMV TYPICAL SYMPTOMS		PLANTS WITHOUT YMV TYPICAL SYMPTOM		% TOTAL INFECTED PLANTS
	Number tested	ELISA-positive %	Number tested	ELISA-positive %	
<b>SOUTH-WEST</b>					
<i>COMOE</i>	228	30.2	391	3.58	13,4
<i>GAOUA</i>	18	11.1	240	0.41	1,2
<b>SOUTH</b>	41	0	654	0	0
<b>CENTER</b>	143	90.9	78	16.6	71,5

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADSUAR, J. (1955) A mosaic disease of the yam *Dioscorea rotundata* in Puerto-Rico. *J. Agric P.R.* **39**, 111-144.

ANONYME (1982) Rapport annuel IITA.

ANONYME (1990) Statistiques du Ministère de l'Agriculture et des Ressources Animales, M.A.R.A., Burkina Faso.

ATREYA, C.D., RACCAH, B., & PIRONE, T.P. (1990) A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus. *Virology*, **178**, 161-165.

BALAGNE, M. (1985) Le microbouturage *in vitro* de l'igname cousse-couche *D. trifida* en vue de son application pour la guérison de variétés atteintes de viroses. Thèse; Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.

BODE, L., BEUTIN, L., & KOHLER, H., (1984) Nitrocellulose enzyme linked immunosorbent assay (NC-ELISA) - A sensitive technique for the rapid visual detection of both viral antigens and antibodies. *Journal of Virological Methods* **8**, 111-121.

BOEGLIN, M., LABONNE, G., DEGRAS, L. QUIOT-DOUINE, L. & QUIOT, J.B. (1993) Mise en évidence de la présence du Virus de la Mosaïque de l'Igname sur Igname (*Dioscorea trifida*) en Guyane. Communication au congrès de la Caribbean Food Crop Society, Martinique, Juillet 1993.

BRUNT, A.A., CRABTREE, K., & GIBBS, A. (1990) Viruses of tropical plants. Wallingford, CAB I., 707 pp.

BRUNT, A. A. (1992) The general properties of potyviruses. In Potyvirus taxonomy , Springer Wien and New York (Archives of Virology, Suppl 5), 3-16.

BURKILL, I.H. (1960) The organography and the evolution of *Dioscoreaceae*, The family of Yams. *J. Linn. Soc. (Bot)* **56** **367**, 319-420

CALDER , V. L., & INGERFELD, M. (1990) The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. *Journal of Structural Biology* **105**, 62-66.

- CHANT, S.R. (1957) Annual report. Nigerian Federal Department of Agricultural Research, 1954-1955
- CHRISTIE, R. G., & EDWARDSON, J. R. (1986) Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. *Plant Disease*, **70**, 273-279.
- CLARK, M.F., & ADAMS, A. N. (1977) Characteristics of the microplates method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* **34**, 475-483.
- COLINET, D., KUMMERT, J., LEPOIVRE, P., & SEMAL, J. (1993) Identification of distinct potyviruses in mixedly-infected sweetpotato by the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Phytopathology*, **84** (1) 65-69.
- COURSEY, D. G. (1967) Yams, Longmans, London 230 p.
- COURSEY, D.G., & MARTIN, F. W. (1970) The past and future of yams as crop plants. Proceedings of the second International Symposium on Root Crops, Hawaiï, 87-90; 99-101.
- DEGRAS, L. (1986) L'igname, plante à tubercule. Techniques agricoles et productions tropicales ; Ed. Maisonneuve et Larose. ACCT, 408pp.
- DOUGHERTY, W. G., & CARRINGTON, J.C. (1988) Expression and fonction of potyviral gene products. *Annual Review of Phytopathology* **26**, 123-143.
- DUMONT, R. (1977) Rapport annuel IRAT-HV.
- DUMONT, R., & HAMON, P. (1985) Une forme originale parmi les Dioscoréacées cultivées en Afrique de l'Ouest : l'Igname de Pilimpikou. Rapport annuel IRAT.
- EDWARDSON J. R. (1974) Some properties of the potato virus Y group. Fla; Agric; Exp; Stn. Monogr. Ser. 4, 398 p.
- ERLICH, H.A. (Ed) (1989) PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. M Stockton Press New York, London, Tokyo.
- FAO, (1993) Annuaire des productions.N° 47.

FAUQUET, C., FARGETTE, D., & THOUVENEL, J.C. (1988) Sélection de manioc sains obtenus par réversion dans les champs de manioc. Actes du Séminaire "La mosaïque africaine du manioc et son contrôle", Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, 04-08 Mai 1987. ORSTOM (Ed.)135-137.

FAZEKAS DE ST GROTH, S., & SCHEIDEGGER, D. (1980) Production of monoclonal antibodies : strategy and tactics. *Journal of Immunological Methods* **35** : 1-21

FENNER, F.F. (1976) Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* **7**, 4-115.

FUKUMOTO, F., & TOCHIHARA, H. (1978) Chinese yam necrotic mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **44**, (1), 1-5.

FRANCKI, R.I.B., FAUQUET, C.M., KNUDSEN, D.L., & BROWN, F. (ed) (1991) Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer Wien New York, Archives of Virology Suppl. 2.

FRENKEL, M.J., WARD, C;W., & SHUKLA, D.D. (1989) The use of non coding nucleotid sequence in the taxonomy of potyviruses : application to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus. *Journal of General Virology* **70** , 2775-2783.

GOUDOU-SINHA, C. (1990) Etude épidémiologique multilocale de la contamination virale de trois espèces d'igname par le virus de la mosaïque de l'igname à la Guadeloupe. Mémoire d'ESAT 2 CNEARC Montpellier, 48p.

HAMON, P. (1983) Structure, origine génétique des ignames cultivées du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* et domestication des ignames en Afrique de l'Ouest. Thèse de Doctorat ès -sciences naturelles. Editions ORSTOM, Paris, France, TDM n° 47, 223p.

HAMON, P., HAMON, S., & TOURE, B. (1986) Les ignames du complexe *Dioscorea cayenensis-rotundata* de Côte d'Ivoire et description des cultivars traditionnels. IBPGR/FAO, Rome, Italie, 63p.

HARRISON, B. D., & ROBERTS, I.M. (1973) Association of virus-like particles with internal brown spot of Yam (*Dioscorea alata*). *Tropical Agriculture (Trinidad)* **50**, 335-340.

HARRISON, B. D. & ROBINSON, D.J. (1988) Molecular variation in vector borne plant viruses; epidemiological significance. *Philosophical Transaction of the Royal Society London, Serie B* **321**, 447-462.

- HEARON, S.S. , CORBETT, M.K., LAWSON, R.H, GILLASPIE, Jr. A.G., & WATERWORTH, H.E. (1978) Two flexuous-rod viruses in *Dioscorea floribunda* : symptoms, identification, and ultrastructure. *Phytopathology* **68**, 1137-1146.
- HOLLINGS, M., & BRUNT, A.A. (1981) Potyvirus group. CMI/AAB, Description of Plant Viruses N°245.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LAIN, S., RIECHMANN, J.L., & GARCIA, J.A. (1989) The complete nucleotide sequence of potyvirus RNA. *Virus research* **13**, 157-172.
- LAIN, S., RIECHMANN, J.L., & GARCIA, J.A. (1990) RNA helicase : a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic acids research* **18**, 7003-7006.
- LANGEVELD, S.A., DORE, J.M., MEMELINK, J., DERKS, A.F.L.M., VAN DER GLUGT, C.I.M., ASJES, C.J. & BOL, J.F. (1991) Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *Journal of general Virology* **72**, 1531-1541.
- LAWSON, R.H., HEARON, S.S., SMITH, F.F., & KAHN, R.P. (1973) Electron microscopy and separation of viruses in *Dioscorea floribunda* . *Phytopathology*, **63** , 1435 (Abstr.).
- LECOQ, H., & PURCIFULL, D.E. (1992) Biological variability of potyviruses : an example, zucchini yellow mosaic virus. In Barnett, O.W.(ed.), Potyvirus Taxonomy, Springer Wien and New York (Archives of Virology, Suppl 5), 229-234.
- MALAUURIE, B., PUNGU, O., DUMONT, R., & TROUSLOT, M-F (1992) The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation. *Euphytica* **65** , 113-122.
- MANTELL, S. H., & HAQUE, S.Q. (1978) Incidence of Internal Brown Spot disease in White Lisbon (*D. alata*) during storage. *Experimental Agriculture* **14**, 167-172.
- MANTELL, S. H., & HAQUE, S.Q. (1979 a) Disease-free yams, their production, maintenance and performances. Caribbean Agricultural Research and Development Institute. Trinidad, Yams virus; Bull N° 2.

- MANTELL, S. H., & HAQUE, S.Q. (1979 b) Internal Brown Spot disease of Yams. Yam virus project, Bulletin 3.
- MARCHOUX, G. (1980) Pathologie des ignames en Guadeloupe; maladies virales . *In : Les Colloques de l'I.N.R.A., l'Ignome*. Séminaire International de Pointe-à-Pitre, 28 July - 02 August 1980, 93-105.
- MARTIN, F. W. & RHODES, A. M. (1978) The relationship of *Dioscorea cayenensis* and *Dioscorea rotundata*. *Tropical Agriculture* **55**, 3, 193-206.
- MARTIN, F. W. & SADIK, S., (1976) Tropical yams and their potential . Part.4 . *Dioscorea rotundata* and *Dioscorea cayenensis*. *Agriculture Handbook* N° 502, p.36.
- MATTHEWS R.E.F., *Plant virology*, Third Ed. Academic press New York Chapter 10, 338-378.
- MESSIAEN, C.M. (1988) Les plantes à tubercules et l'arbre à pain. 434-465 *In* Le potager tropical (2e Ed).ACCT, .
- MIGLIORI, A. (1977) Maladies à virus de l'igname (*Dioscorea* spp.). *Nouvelles Agronomiques Antilles-Guyane* **3** (3, 4) , 428-435.
- MIGLIORI, A. & CADHILAC, B. (1976) Contribution à l'étude de la maladie du virus de l'igname *Dioscorea trifida* en Guadeloupe. *Ann. Phytopatol.* **8**, (1) 73-78.
- MOHAMED, N. (1976) Incidence of virus symptoms in Yam (*Dioscorea* sp.) foliage in the Commonwealth Caribbean. *Tropical Agriculture*, **53**, 255-261.
- MVILA, A. C. (1991) Identification du virus de la mosaïque de l'igname dans les principales espèces d'igname cultivées dans deux régions du Cameroun. Mémoire de D.E.A. Centre Africain de Recherche et Formation phytosanitaire, Congo.
- PAPPU, S.S., BRAND, R. PAPPU, H.R. RYBICKI, E.P., GOUGH, K.H., FRENKEL, M.J., & NIBLETT, C.L. (1993) Universal primers for the amplification and cloning of 3' sequences of potyviral genomes. *Journal of Virological Methods*, **41**, 9-20.
- PHILLIPS S., PIGGOTT J. D'A., & BRUNT A. A. (1986) Further evidence that *Dioscorea* latent virus is a potexvirus. *Annal of Applied Biology* **109**, 137-145.

- PORTH, A., & NIENHAUS, F. (1983) *Dioscorea alata* ring mottle virus , a new potyvirus on yam in Togo. *Zeitschrift Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **90**, 352-362.
- PORTH, A., LESEMANN D. E. & VETTEN H. J. (1987) Characterization of potyvirus isolates from West African Yams (*Dioscorea* spp.). *Journal of Phytopathology* **120**, 166-183.
- QUEMADA, H. SIEU, L.C., SIEMIENAK, D.R., GONSALVES D., & SLIGHTON, J.L. (1990) Watermelon mosaic virus 2 and zucchini yellow mosaic virus : cloning of 3' terminal regions, nucleotide sequences and phylogenetic relationships. *Journal of general Virology* **71**, 1451-1460.
- QUIOT-DOUINE, L., LECOQ, H., QUIOT, J.B. , PITRAT, M. & LABONNE, G. (1990) Serological and biological variability of virus isolates related to strains of papaya ring spot virus. *Phytopathology*, **80**, 256-263.
- RECKHAUS, P. & NIENHAUS, F. (1981) Etiology of a virus disease of white yam *D. rotundata* in Togo. *Journal of Plant Disease and Protection* **88** (8, 9), 492-509.
- RESTREPO, M. A., FREED, D. D., & CARRINGTON, J.C. (1990) Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* **2**, 987-998.
- RIECHMANN, J. L., LAIN, S., & GARCIA, J.A. (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* **73**, 1-16.
- ROBAGLIA C., DURAND-TARDIF, M., TRONCHET, M., BOUDAZIN, G., ASTIER-MANIFACIER, S., & CASSE-DELBART, F. (1989) Nucleotide sequence of potato virus Y (N strain) genomic RNA. *Journal of general Virology* **70**, 935-947.
- ROBERTSON, D.G., (1961) Annual report, Nigerian federal department of Agricultural research 1959/1960.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., & ARNHEIM, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- SALEIL, V., DEGRAS, L., & JONARD, R. (1990) Obtention de plantes indemnes du virus de la mosaïque de l'igname (YMV) par culture *in vitro* des apex chez l'igname américaine *Dioscorea trifida* L. *Agronomie*, **10**, 605-615.

SHUKLA D.D., STRIKE, P.M., TRACY, S.L., GOUGH, K.H., & WARD, C.W. (1988) The N and C termini of the coat proteins of the potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus specific epitopes. *Journal of general Virology* **69**, 1497-1508.

SHUKLA, D.D., FRENKEL, M.J., McKERN, N.M., WARD, C.W., JIKLA, J., TOSIC, M., & FORD, R.E. (1992) Present status of the sugarcane mosaic subgroup of potyviruses. In Barnett, O.W.(ed.), *Potyvirus Taxonomy*, Springer Wien and New York (Archives of Virology, Suppl 5), 363-373.

SHUKLA, D.D., WARD, C.W., & BRUNT, A.A. (1994) *The potyviridae*, CAB International, Wallingford Oxon.

STOKER, J.W., FOSTER, H.K., MIGGIANO, V., STAHLI, C., STAIGER, G., TAKACS, B., & STAEHELIN, Th. (1982) Generation of two new myeloma cell lines "PAI" and "PAI-O" for hybridoma production. *Research Disclosure*, **217**, 155-157

TERRY, E. R. (1977) Incidence, symptomatology and transmission of a yam virus in Nigeria. *Proceedings of the Fourth Symposium of the International Society of Tropical Roots Crops*. Cali , Columbia, pp. 170-173.

THOTTAPPILLY, G. (1981) *Annual Report of IITA*. Ibadan, Nigeria.

THOTTAPPILLY, G. (1983) *Annual Report of IITA*. Ibadan, Nigeria.

THOUVENEL, J. C. & FAUQUET, C. (1977) Une mosaïque de l'igname causée par un virus filamenteux en Côte d'Ivoire. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **284**, 1947-1949.

THOUVENEL, J. C. & FAUQUET, C. (1979) Yam Mosaic, a new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivory Coast . *Annal of Applied Biology* **93** 279-283.

THOUVENEL, J. C. & FAUQUET, C (1980) Utilisation de la technique ELISA dans le diagnostic de la mosaïque de l'igname. *Compte-rendu de la Deuxième Conférence Internationale sur l'Impact des Maladies à Virus sur le Développement des Pays Africains et du Moyen Orient* . Nairobi, Kenya, 02-06 Décembre 1980.

THOUVENEL, J. C. & FAUQUET, C. (1982) Les viroses de l'igname en Côte d'Ivoire. *In* Yams, ignames, Miegé J. and Lyonga (Ed.) S.N., Oxford Science, Publication Clarendon Press Oxford.

THOUVENEL, J. C. & FAUQUET, C. (1986) Yam mosaic virus. *In* *Description of Plant Viruses*. CMI/AAB, N° 314.

THOUVENEL, J. C. FARGETTE, D. & FAUQUET, C. (1988) La maladie des taches brunes du tubercule d'igname en Côte d'Ivoire. *Proceedings of the seventh Symposium of the International Society for Tropical Root Crops*, INRA (Ed.) Gosier, Guadeloupe, 1-6 july 1985.

THOUVENEL, J.C., BORG-OLIVIER, O., & DUMONT, R.(1989) Epidemiology of Yam mosaic virus. Importance of Aphid transmission. IVème Colloque international. Epidémiologie des virus des plantes. Montpellier, 3-8 Septembre 1989.

THOUVENEL, J. C. & DUMONT, R. (1990) Perte de rendement de l'igname infectée par le virus de la mosaïque en Côte d'Ivoire. *L'Agronomie Tropicale*. **45** (2), 125-129.

TORIBIO, A. (1980) Principales maladies des ignames en Guadeloupe. Colloque INRA Séminaire sur l'igname, 40-45.

TOWBIN, H., STAEHELIN, T., & GORDON, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

TURPEN, J. (1989) Molecular cloning of a potato virus Y genome : nucleotid sequence homology in non coding regions of potyviruses. *Journal of general Virology* **70**, 1951-1960.

VAN DJIK, P. (1993 a) Carlavirus isolates from cultivated Allium species represent three viruses. Netherthelands *Journal of Plant Pathology* **99**, 233-259.

VAN DJIK, P. (1993 b) Survey and characterization of potyviruses and their strains of Allium species. Netherthelands *Journal of Plant Pathology* **99**, Supplement 2, 1-48.

VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E., CLARK, M.F., & ADAMS, A. N. (1976) The detection of viruses by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* **33**, 165-167.

WEST, J. (1938) A preliminary list of plant diseases in Nigeria. *Kew. Bull.* 17-23.

WETZEL, T., CANDRESSE, T., MACQUAIRE, G., RAVELONANDRO, M., & DUNEZ, J. (1992) A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological. Methods* **39**, 27-37.

## Résumé

L'igname, culture importante de régions tropicales est sensible au virus de la mosaïque de l'igname (yam mosaic virus, YMV, potyvirus), propagé par tubercules et transmis par pucerons.

Au Burkina Faso, des isolats de potyvirus biologiquement semblables au virus de la mosaïque de l'igname ont été identifiés dans les plantes d'igname (*D. cayenensis-rotundata* et *D. alata*) par la présence de symptômes de mosaïque et de surcoloration nerveaire, et ont été détectés par des anticorps polyclonaux dirigés contre ce virus. Des homologies, de séquences situées à l'extrémité 3' du génome, ont été révélées entre ces isolats et le YMV par immunocapture-RT-PCR et hybridation moléculaire. Les taux de prévalence de la maladie étaient de 10% dans la région Sud-Ouest et de 80% pour le seul cultivar de *D. cayenensis-rotundata* présent dans la région Centre : "Igname de Pilimpikou". Le virus n'a jamais été détecté dans la région Sud. Dans les régions Sud-Ouest et Centre, la transmission du virus par pucerons apparaît moins importante que la propagation de la maladie par les tubercules infectés.

La variabilité des potyvirus d'igname a été étudiée en comparant 69 isolats provenant d'origines géographiques et de variétés d'igname différentes, pour la symptomatologie sur *N. benthamiana*, la mobilité électrophorétique de la protéine de capsid et la réactivité vis à vis d'anticorps monoclonaux anti-YMV. Six variants ont été différenciés. La variabilité ne semble liée ni à l'origine géographique des isolats ni à la variété d'igname infectée. Le variant infectant l'Igname de Pilimpikou n'est pas transmissible par pucerons et n'est pas reconnu par un anticorps monoclonal spécifique de l'YMV, suggérant un potyvirus différent du YMV.

Un nouveau test de détection sérologique utilisant des anticorps monoclonaux et polyclonaux anti-YMV a été mis au point. L'ensemble des résultats permettent d'envisager des méthodes de lutte intégrée par sélection sanitaire : production de plants sains par sélection et multiplication dans un environnement écologique à faible pression d'inoculum.

Mots clés : Virus de la mosaïque de l'igname, Potyvirus, Burkina Faso, Epidémiologie, Variabilité, ELISA.