



UNIVERSITE
JEAN LOROUGNON GUEDE

UFR ENVIRONNEMENT

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE

Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et
de la Recherche Scientifique

ANNEE : 2021 - 2022

N° D'ORDRE :

.....

THESE DE DOCTORAT

Mention : Ecologie, Biodiversité et Evolution

**Spécialité : Génétique et Epidémiologie
moléculaire**

**Caractérisation génétique des souches
viraux de la mosaïque et criblage de
génotypes de manioc (*Manihot esculenta*
Crantz) impliqués dans la résistance aux
virus en Côte d'Ivoire**

CANDIDAT

Nom : YAO

Prénoms : BLE GBACLA FLORA
DOMINIQUE

Soutenue publiquement
le ..08.juillet.2022....

JURY

Présidente : Mme TIDOU Abiba Sanogo Epse KONE, Professeur Titulaire,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Directeur : M. KOFFI N'Goran Mathurin, Professeur Titulaire,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

Rapporteur : M. N'ZUE Boni, Maître de Recherche, Directeur de Recherche,
Centre National de Recherche Agronomique

Examineur 1 : M. FOFANA Inza Jésus, Maître de Conférences,
Université Pelefolo GON COULIBALY

Examineur 2 : M. GORE Bi Boh Nestor, Maître de Conférences,
Université Jean LOROUGNON GUEDE

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	i
DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ix
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	xii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES ANNEXES	xx
INTRODUCTION	1
PARTIE I : GENERALITES	5
1.1. ZONE D’ETUDE	6
1.2. MANIOC	9
1.2.1. Description du manioc	9
1.2.2. Origine du manioc.....	9
1.2.3. Taxonomie du manioc.....	10
1.2.4. Ecologie du manioc.....	10
1.2.5. Diversité génétique du manioc.....	11
1.2.5.1. Mutations génétiques chez le manioc.....	11
1.2.5.2. Recombinaison génétique chez le manioc	12
1.2.5.3. Facteurs d’influence de la diversité génétique du manioc	12
a. Type de culture	12
b. Mode de reproduction	13
1.2.6. Composition biochimique et utilisations du manioc.....	14
1.2.7. Production du manioc dans le monde	15
1.2.8. Production du manioc en Afrique	16
1.2.9. Amélioration du manioc en Côte d’Ivoire	16
1.2.10. Variétés de manioc cultivées en Côte d’Ivoire	17
1.3. CONSTRAINTES LIEES A LA PRODUCTION DU MANIOC	19
1.3.1. Contraintes abiotiques.....	19

1.3.2. Contraintes biotiques	19
1.3.2.1. Acariens et cochenilles	19
1.3.2.2. Maladies fongiques	20
a. Anthracnose du manioc	20
b. Pourriture racinaire du manioc	20
1.3.2.3. Maladies bactériennes	21
1.3.2.4. Maladies virales.....	22
1.4. MOSAÏQUE DU MANIOC	22
1.4.1. Epidémiologie de la mosaïque du manioc	23
a. Diagnostic de la mosaïque du manioc à partir des symptômes	23
1.4.2. Premières découvertes et expansion de la mosaïque du manioc.....	24
1.4.3. Notions de souches et variantes de virus de la mosaïque du manioc.....	24
1.4.3.1. Premières souches de virus de la mosaïque de manioc	24
1.4.3.2. Autres souches de virus de la mosaïque de manioc	25
1.4.4. Cycle viral.....	25
1.4.5. Structure du génome des virus de la mosaïque de manioc	27
1.4.6. Origine de la diversité génétique des virus de la mosaïque du manioc	29
1.4.6.1. Mutations génétiques.....	29
1.4.6.2. Recombinaison génétique	29
1.4.7. Insectes vecteurs des virus de la mosaïque du manioc	30
1.5. RELATION ENTRE PLANTES HÔTES ET AGENTS PATHOGENES	32
1.6. SÉLECTION DES GÉNOTYPES DE MANIOC RÉSISTANTS AUX VIRUS DE LA MOSAÏQUE	32
1.6.1. Marqueurs génétiques	33
1.6.1.1. Marqueurs cytoplasmiques.....	33
1.6.1.2. Marqueurs nucléaires dominants.....	33
1.6.1.3. Marqueurs nucléaires codominants	34
a. Marqueurs microsatellites	35
1.6.2. Réaction de polymérisation en chaîne	35
1.6.3. Séquençage	36
1.6.3.1. Technique de Maxam-Gilbert	37
1.6.3.2. Technique de Sanger	37
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	41

2.1. SITES D'ECHANTILLONNAGE	42
2.2. MATERIELS	43
2.2.1. Matériel biologique	43
2.2.2. Matériel technique	43
2.2.2.1. Matériel d'échantillonnage.....	43
2.2.2.2. Matériel d'analyse moléculaire et génétique.....	44
2.3. METHODES	47
2.3.1. Approche participative.....	47
2.3.2. Collecte de données	47
2.3.2.1. Epidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire	48
2.3.2.2. Evaluation de la diversité et structuration génétique des variétés améliorées et traditionnelles de manioc	49
2.3.2.3. Identification de génotypes de manioc capables de résister aux mécanismes des virus, à partir du criblage des gènes de résistance à la mosaïque.....	50
2.3.3. Identification des variétés et codification des échantillons.....	50
2.3.4. Analyses moléculaires et génétiques du manioc et des virus de la mosaïque du manioc.....	51
2.3.4.1. Extraction d'ADN	51
2.3.4.1.1. Préparation du gel d'agarose.....	51
2.3.4.1.2. Evaluation de la quantité et de la qualité des ADN extraits.....	52
2.3.4.2. Amplification de l'ADN par PCR.....	52
2.3.4.2.1. Détection des souches virales de la mosaïque.....	53
2.3.4.2.2. Génotypage des échantillons de manioc collectés	55
2.3.4.2.3. Amplification des gènes de résistance aux virus de la mosaïque.....	56
2.3.4.3. Electrophorèse et visualisation des produits d'amplification.....	57
a. Electrophorèse des produits de PCR	57
b. Révélation des fragments d'ADN amplifiés	57
2.3.4.4. Séquençage des souches de virus de la mosaïque du manioc identifiées.....	57
2.3.5. Méthodes d'analyse des données collectées au champ et au laboratoire.....	58
2.3.5.1. Etude de l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire	58
2.3.5.1.1. Prévalence phénotypique de la mosaïque du manioc	58
2.3.5.1.2. Calcul des Odds ratio et intervalles de confiance	58
2.3.5.1.3. Détermination des taux de sévérité de la mosaïque du manioc.....	59

2.3.5.1.4. Identification des variantes du virus ACMV à partir d'une analyse bioinformatique	59
a. Alignement de séquences	59
b. Identification des mutations génétiques entre les séquences requêtes et celles de la banque de données génomiques Genbank.....	60
c. Structuration génétique des virus isolés	62
2.3.5.2. Analyse de la diversité et la structuration génétique des variétés améliorées et traditionnelles de manioc	63
2.3.5.2.1. Diversité génétique intrapopulation	63
2.3.5.2.2. Diversité génétique interpopulation	65
2.3.5.2.3. Structuration génétique de la population de manioc étudiée.....	66
2.3.5.3. Identification de génotypes de manioc résistants aux virus de la mosaïque du manioc à partir du criblage des gènes de résistance.....	66
2.3.5.3.1. Pourcentage d'occurrence (F) des gènes de résistance détectés	66
2.3.5.3.2. Classification des variétés de manioc selon leur degré de résistance à la mosaïque de manioc	66
2.3.5.4. Tests statistiques.....	68
2.3.5.4.1. Test d'indépendance du Khi-carré de Pearson	68
2.3.5.4.2. Test exact de Fisher	68
2.3.5.4.3. Test t de Student.....	68
2.3.5.4.4. Test de comparaison deux à deux des proportions.....	68
2.3.5.4.5. Régression logistique multinomiale	69
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	70
3.1. RESULTATS.....	71
3.1.1. Etude de l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire.....	71
3.1.1.1. Prévalence phénotypique de la mosaïque du manioc.....	71
3.1.1.2. Facteurs de risque associés au développement de la mosaïque du manioc.....	72
3.1.1.3. Sévérité de l'infection à la mosaïque du manioc.....	72
3.1.1.4. Caractérisation moléculaire des virus de la mosaïque du manioc.....	75
3.1.1.5. Proportion des plantes de manioc testées positives aux virus de la mosaïque du manioc après diagnostic moléculaire	75
3.1.1.6. Comparaison des taux d'infection entre les plantes symptomatiques et asymptomatiques	77

3.1.1.7. Proportion des souches de virus observées dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa	79
3.1.1.8. Proportion des virus détectés selon les types de variétés	79
3.1.1.9. Corrélacion entre les virus détectés et la sévérité de la mosaïque du manioc ..	79
3.1.1.10. Variabilité génétique de la souche virale ACMV	82
a. Variantes génétiques du virus ACMV identifiées chez des variétés de manioc dans trois départements de la Côte d’Ivoire	82
b. Détermination des mutations génétiques entre les séquences requêtes de la souche virale ACMV et leurs séquences de référence disponibles dans la banque de données Genbank	86
c. Alignement multiple des séquences	90
d. Phylogénie des isolats de virus ACMV.....	93
3.1.2. Diversité et structuration génétique des variétés de manioc traditionnelles et améliorées	96
3.1.2.1. Polymorphisme des marqueurs génétiques utilisés	96
3.1.2.2. Diversité génétique intrapopulation du manioc	101
3.1.2.2.1. Diversité génétique intrapopulation des variétés traditionnelles.....	101
a. Fréquences des allèles privés détectés chez les variétés traditionnelles.....	101
3.1.2.2.2. Diversité génétique intrapopulation des variétés améliorées	104
3.1.2.3. Diversité génétique interpopulation du manioc	105
3.1.2.3.1. Diversité génétique interpopulation des variétés traditionnelles de manioc	105
3.1.2.3.2. Diversité génétique interpopulation des variétés améliorées de manioc.....	105
3.1.2.4. Structure génétique des populations de manioc étudiées	107
3.1.3. Identification des génotypes de manioc résistants à la mosaïque à partir du criblage des gènes de résistance	114
3.1.3.1. Caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans la résistance à la mosaïque du manioc.....	114
3.1.3.2. Occurrence des gènes de résistance détectés.....	114
3.1.3.3. Classification des différents génotypes de manioc collectés selon leur résistance aux virus de la mosaïque	116
3.1.3.3.1. Génotypes de manioc résistants identifiés à Bouaké	117
3.1.3.3.2. Génotypes de manioc résistants identifiés à Yamoussoukro	117
3.1.3.3.3. Génotypes de manioc résistants identifiés à Daloa	117
3.1.3.4. Répartition des génotypes de manioc selon leur sensibilité à la mosaïque dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa	121

3.1.3.5. Rapport entre la nature des souches virales et le niveau de résistance à la mosaïque des plantes de manioc	121
3.1.3.6. Corrélation entre les allèles privés et la résistance des génotypes de manioc à la mosaïque.....	122
3.2. DISCUSSION.....	125
3.2.1. Etude de l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire...	125
3.2.2. Diversité et structuration génétique des variétés de manioc améliorées et traditionnelles	129
3.2.3. Identification de génotypes de manioc capables de résister aux mécanismes des virus à partir du criblage des gènes de résistance	134
CONCLUSION.....	136
REFERENCES	140
ANNEXES.....	159
PUBLICATIONS	165

DEDICACE

A ma mère DIE Affoué Odile,

Pour tous les efforts fournis et son soutien sans faille tout au long de
mon parcours universitaire.

Que l'honneur et la gloire soient rendus au bon DIEU Qui, dans sa
grande miséricorde, m'a fait don de cette thèse de Doctorat !

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) de l'Université Jean Lorougnon Guédé, Daloa. Il a été financé par le directeur de ce laboratoire dans le but de contribuer à la lutte contre les maladies affectant le manioc, qui est l'une des denrées alimentaires les plus importantes en Côte d'Ivoire. Le dénouement de cette thèse n'aurait pu être possible sans le soutien de personnes physiques et morales auxquelles je tiens à exprimer ici ma profonde gratitude.

Je remercie en premier lieu le Professeur **TIDOU Abiba Sanogo épouse KONE**, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé, par ailleurs Présidente de Jury de cette thèse, d'avoir autorisé mon inscription pour la thèse et aussi pour sa contribution à l'amélioration de la formation des étudiants ainsi qu'au développement de la recherche en Côte d'Ivoire.

Aux Professeurs **KONE Tidiani**, Vice-président chargé de la Pédagogie, de la Recherche, de la Vie Universitaire et de l'Innovation Technologique et **AKAFFOU Doffou Sélastique**, Vice-président chargé de la Planification, de la Programmation et des Relations Extérieures, j'exprime mes remerciements les plus sincères pour leur implication dans la formation des étudiants et dans la recherche au sein de notre université.

Je remercie également les Professeurs **KOUASSI Kouakou Lazare**, Directeur de l'UFR Environnement et **KOFFI Béné Jean Claude**, Directeur du laboratoire Biodiversité et Ecologie Tropicale (BioEcoTrop) d'avoir accepté mon inscription au sein de l'UFR et du laboratoire qu'ils dirigent.

J'exprime mes sincères remerciements au Professeur **KOFFI N'Goran Mathurin** d'avoir accepté de diriger ma thèse. Merci cher Maître pour les moyens matériels et financiers mis à ma disposition pour la réalisation de ce travail. Votre rigueur, votre disponibilité, votre détermination et votre passion pour le travail bien fait ont été un véritable moteur et les clés de l'aboutissement de cette thèse. C'est pour moi un honneur d'être comptée parmi vos étudiants. Veuillez recevoir en ces quelques lignes, ma profonde reconnaissance.

Aux Docteurs **FOFANA Inza Jésus** et **GORE Bi Boh Nestor**, Maîtres de Conférences, je tenais à exprimer mes chaleureux remerciements pour avoir accepté de siéger en tant qu'examineurs au jury de cette thèse, et aussi pour leur contribution à l'avancée de la recherche en Côte d'Ivoire.

J'exprime également ma grande reconnaissance au Docteur **N'ZUE Boni**, Maître de Recherche CAMES et Directeur de Recherche du CNRA de Bouaké, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse en tant que Rapporteur et pour sa pertinence dans les remarques visant son amélioration.

Je remercie les Docteurs **KOUADIO Kouassi Daniel**, Maître de Conférences, **SOUMAHIN Eric** et **YAPI Armel**, Maîtres-Assistants pour leurs conseils avisés.

A Messieurs **KONAN Thomas** et **YAO Mathurin**, Techniciens biologistes, aux Docteurs **AHOUTY Bernardin**, **SIMARO Siriki**, **N'DJETCHI Kassi Martial**, **YEBOUE Félix** et à Monsieur **KASSI Georges**, j'exprime ma profonde gratitude pour leur soutien et leur contribution à l'aboutissement de cette thèse.

Aux Docteurs **ABE Allepo Innocent**, **ASSI Sonan Romuald** et **DOFFOU Richard**, je voudrais exprimer ma profonde reconnaissance pour leur soutien et leur grande implication dans la réussite de ce travail.

Mes remerciements vont également à l'endroit des Doctorantes **SOKOURI Abla Edwige** et **TRAORE Barkissa**. Veuillez trouver ici chères grandes sœurs, l'expression de ma reconnaissance pour votre contribution à la réussite de cette thèse.

Au doctorant **KRA Junias**, je dis un sincère merci pour sa contribution à la réussite de ce mémoire de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements à mon ami **KOUAME Alexis** pour les services rendus au cours de l'élaboration de ma thèse, tu m'as été d'un énorme soutien.

Je remercie également la « **Famille AGRIFOR** » pour l'esprit d'équipe qui règne au sein de notre groupe ; que chaque membre trouve ici l'expression de ma profonde gratitude. Mention particulière à mon ami **KOUASSI Jean-Hugues Martial** pour toute son aide.

Je suis aussi reconnaissante à mes sœurs **ALLOU Larissa**, **YAO Ange-Emma**, **YACOUBA Hanna**, **MEYAN Marie** pour leur soutien et leur affection sans faille.

A mes frères et sœurs biologiques l'abbé **KOFFI Laurent**, **YAO Michel**, **YAO Johanne**, **KOUADIO Félicité**, **BROU Diane** et **KOUAME Dora**, j'exprime ma profonde reconnaissance pour leur enthousiasme, leur amour et leur affection.

Je remercie particulièrement maman **KOFFI Virginie** pour avoir été là pour moi, surtout dans mes moments de doute.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de tous les membres du **Renouveau charismatique**, de la **CEB Saint Michel** et du **groupe liturgique** de la paroisse Saint Luc, pour le soutien et les prières pour l'aboutissement de ma thèse.

Je ne pourrai terminer sans dire un sincère merci à mon père **KOUADIO Yao Dominique** et à ma mère biologique **DIE Affoué Odile** pour leurs prières et tout le sacrifice consentis pour moi. Je prie juste que Dieu nous donne à tous une longue vie.

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

A	: Adenine (<i>Base azotée</i>)
ACMV	: African Cassava Mosaic Virus
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ADNmt	: ADN mitochondrial
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Polymorphismes de longueur de fragments amplifiés)
AGRIFOR	: Agriculture et Foresterie
ANADER	: Agence Nationale d'Appui au Développement Rural
ARN	: Acide ribonucléique
BET	: Bromure d'Ethydium
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool (<i>Outil d'alignement des séquences</i>)
C	: Cytosine (<i>Base azotée</i>)
CAH	: Classification Ascendante Hiérarchique
CBSD	: Cassava Break Streak Disease
CBSV	: Cassava Break Streak Virus
CMD	: Cassava Mosaic Disease (Maladie de la mosaïque du manioc)
CMG	: Cassava Mosaic Geminivirus
CNRA	: Centre National de Recherche Agronomique
dATP	: Désoxyadénosine Triphosphate
dCTP	: Désoxycytidine Triphosphate
ddATP	: Didésoxyadenosine Triphosphate
ddCTP	: Didésoxycytosine Triphosphate
ddGTP	: Didésoxyguanidine Triphosphate

ddNTP	: Didésoxyribonucléotide Triphosphate
ddTTP	: Didésoxythymidine Triphosphate
dGTP	: Désoxyguanidine Triphosphate
DNTP	: Désoxyribonucléotide Triphosphate
EACMV	: East African Cassava Mosaic Virus
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
FAO	: Food and Agriculture Organisation (<i>Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture</i>)
G	: Guanine (<i>Base azotée</i>)
GenBank	: Genetic Sequence Database (<i>base de données des séquences génétiques</i>)
GPS	: Global Positionning System
IITA	: International Institute of Tropical Agriculture (<i>Institut nationale pour l'agriculture tropicale</i>)
INS	: Institut National de la statistique
MgCl₂	: Chlorure de magnésium
MLST	: Multi-Locus sequence Typing
Mt	: Million de tonnes
NaCl	: Chlorure de Sodium
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NJ	: Neighbour Joinning
NW	: New World (nouveau monde)
OR	: Odd Ratio
ORF	: Open Reading Frames (cadre ouvert de lecture)
OW	: Old World (ancien monde)

Pb	: Paire de bases
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Tampon phosphate salin)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
pH	: Potentiel d'hydrogène
PNS	: Plan National Sécheresse
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
RGPH	: Recensement Général de la Population et de l'Habitat
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SSCP	: Single-Stranded Conformational Polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat (<i>Séquence simple répétée</i>)
T	: Thymine (<i>Base azotée</i>)
TA	: Taille d'allèle
Taq	: Thermophilus aquaticus
TBE	: Tris Borate EDTA
TE	: Tris EDTA
µL	: Microlitre
UJLoG	: Université Jean Lorougnon Guédé
URGEM	: Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire
UV	: Ultra-violet

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Quelques variétés de manioc cultivées en Côte d’Ivoire.....	18
Tableau II : Description des niveaux de sévérité de la mosaïque du manioc	49
Tableau III : Marqueurs utilisés pour le diagnostic des souches virales de la mosaïque du manioc.....	54
Tableau IV : Marqueurs utilisés pour le génotypage des échantillons de manioc collectés...	55
Tableau V : Marqueurs d’identification des gènes de résistance à la mosaïque du manioc ...	56
Tableau VI : Caractéristiques des variétés de manioc sensibles, résistantes et hautement résistantes à la mosaïque	67
Tableau VII : Prévalences phénotypiques de la mosaïque du manioc dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa	71
Tableau VIII : Facteurs de risque au développement et à la propagation des virus de la mosaïque du manioc	73
Tableau IX : Proportions des plantes infectées dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.....	76
Tableau X : Taux d’infection des virus chez les plantes asymptomatiques et symptomatiques	77
Tableau XI : Proportions des souches de virus identifiées chez les plantes collectées dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.....	80
Tableau XII : Répartition des souches virales selon le type de variété dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa	81
Tableau XIII : Régression logistique multinomiale de la nature des souches virales sur la sévérité de la mosaïque du manioc	81
Tableau XIV : Caractéristiques des séquences codantes pour les gènes AV1 ou AV2 des variantes du virus ACMV identifiées, selon la banque de données génomique Genbank	85
Tableau XV : Distribution géographique des allèles détectés chez les variétés de manioc traditionnelles et améliorées et leurs fréquences dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.....	97
Tableau XVI : Paramètres de mesure de la diversité génétique intrapopulation des variétés traditionnelles.....	102
Tableau XVII : Allèles spécifiques détectés dans les différentes populations	103

Tableau XVIII : Paramètres de mesure de la diversité génétique intrapopulation des variétés améliorées	104
Tableau XIX : Différenciation génétique des variétés de manioc traditionnelles entre les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.....	106
Tableau XX : Différenciation génétique des variétés de manioc améliorées entre les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.....	106
Tableau XXI : Matrice de dissimilarité génétique des variétés traditionnelles de manioc collectées dans le département de Bouaké.....	108
Tableau XXII : Matrice de dissimilarité génétique des variétés traditionnelles de manioc collectées dans le département de Yamoussoukro.....	109
Tableau XXIII : Matrice de dissimilarité génétique des variétés traditionnelles de manioc collectées dans le département de Daloa.....	110

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Situation géographique des départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa en Côte d'Ivoire.....	7
Figure 2 : Coubes ombrothermiques des départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa .	8
Figure 3 : Plante et racines tubéreuses de manioc.....	9
Figure 4 : Culture alternée entre le mode sexué et le bouturage chez le manioc.....	14
Figure 5 : Productions de manioc dans le monde.....	15
Figure 6 : Pourritures molles des racines du manioc.....	21
Figure 7 : Différences phénotypiques entre une plante de manioc saine et une plante de manioc sévèrement atteinte de la mosaïque.....	23
Figure 8 : Principales étapes du cycle des Geminivirus.....	26
Figure 9 : Organisation du génome des Begomovirus.....	28
Figure 10 : Bemisia tabaci, insecte vecteur des virus de la mosaïque du manioc.....	31
Figure 11 : Séquençage selon la méthode de Maxam-Gilbert.....	39
Figure 12 : Séquençage selon la méthode de Sanger.....	40
Figure 13 : Localisation des sites d'échantillonnage.....	42
Figure 14 : Matériel biologique.....	43
Figure 15 : Quelques matériels d'extraction de l'ADN génomique.....	45
Figure 16 : Quelques matériels d'analyse PCR.....	46
Figure 17 : Exemple d'alignement de séquences nucléotidiques sur une séquence de référence dans NCBI.....	61
Figure 18 : Distribution des taux des niveaux de sévérité de la mosaïque dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.....	74
Figure 19 : Gel électrophorétique montrant la taille des allèles d'identification des virus de la mosaïque du manioc à partir des marqueurs moléculaires JSP001/JSP002, JSP001/JSP003 et ACMV-AL1/F/ACMV-AR0/R.....	75
Figure 20 : Distribution des plantes symptomatiques et asymptomatiques infectées par les virus dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.....	78
Figure 21 : Chromatogramme montrant une portion de la séquence nucléotidique (ADN) d'un virus ACMV, obtenue après séquençage selon la méthode de Sanger.....	84
Figure 22 : Dotplot présentant des identités et des mutations entre une séquence requête ACMV_Dal1 et sa séquence de référence MG250093.....	87

Figure 23 : Mutations observées entre une séquence nucléotidique de la souche de virus ACMV (en noir) et sa séquence de référence de la Genbank MG250093 (en gris)	88
Figure 24 : Comparaison de la séquence peptidique ACMV_Dal1 à la séquence de référence de numéro d'accèsion AXX70370.1	89
Figure 25 : Alignement multiple des 22 séquences nucléotidiques des isolats des souches virales ACMV collectées dans les différents sites d'étude	91
Figure 26 : Alignement multiple des 22 séquences protéiques des isolats de la souche virale ACMV collectés dans les différents sites d'étude	92
Figure 27 : Structure cladistique des séquences nucléotidiques des isolats de la souche virale ACMV selon la méthode Neighbour Joining Tree	94
Figure 28 : Structure cladistique des séquences protéiques des isolats de la souche virale ACMV selon la méthode Neighbour Joining Tree	95
Figure 29 : Comparaison des fréquences alléliques obtenues pour chaque locus dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa selon les marqueurs microsatellites utilisés	99
Figure 30 : Profils électrophorétiques des génotypes de manioc observés à partir du marqueur microsatellite SSRY100	100
Figure 31 : Dendrogramme selon la méthode Neighbour Joining montrant la structure génétique des variétés de manioc traditionnelles collectées dans le département de Bouaké	111
Figure 32 : Dendrogramme selon la méthode Neighbour Joining montrant la structure génétique des variétés de manioc traditionnelles collectées dans le département de Yamoussoukro	112
Figure 33 : Dendrogramme selon la méthode Neighbour Joining montrant la structure génétique des variétés de manioc traditionnelles collectées dans le département de Daloa	113
Figure 34 : Allèles diagnostics des gènes de résistance aux virus de la mosaïque du manioc chez les variétés traditionnelles de manioc	115
Figure 35 : Occurrence des gènes de résistance détectés chez des échantillons de manioc dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa	116
Figure 36 : Classification des génotypes de manioc traditionnels du département de Bouaké en fonction de leurs degrés de résistance à la mosaïque	118

Figure 37 : Classification des géotypes de manioc traditionnels du département de Yamoussoukro en fonction de leurs degrés de résistance à la mosaïque	119
Figure 38 : Classification des géotypes de manioc traditionnels du département de Daloa en fonction de leurs degrés de résistance à la mosaïque	120
Figure 39 : Répartition des souches de virus identifiés chez les variétés de manioc hautement résistantes, résistantes et sensibles à la mosaïque du manioc	123
Figure 40: Régression linéaire de la présence d'allèles rares sur la résistance aux virus de la mosaïque du manioc	124

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Fiche d'enquête

Annexe 2 : Quelques enveloppes étiquetées

Annexe 3 : Images d'un appareil photographique et d'un GPS

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN génomique à partir des feuilles de manioc

INTRODUCTION

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est une plante annuelle, dicotylédone, appartenant à la famille des Euphorbiacées (Oluwasanya *et al.*, 2021). Originaire de l'Amérique latine où il est cultivé depuis près de 9000 ans, il a été introduit en Afrique de l'Ouest dans la seconde moitié du XVI^{ème} siècle par des portugais (Guira *et al.*, 2016). Sa culture s'est ensuite répandue entre les XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècle dans toute l'Afrique. La production du manioc s'est alors accélérée au cours du XX^{ème} siècle le classant comme l'une des principales cultures dans de nombreux pays en particulier les pays tropicaux (Alamu *et al.*, 2019). De plus, au début des années 1980, avec la chute des prix des matières premières agricoles telles que le cacao et le café sur le marché international, le manioc est devenu une source de revenus et d'alimentation très importante contribuant ainsi à la lutte contre la pauvreté et l'insécurité alimentaire (Tize *et al.*, 2021). Il occupe le quatrième rang mondial des productions alimentaires végétales et constitue l'aliment de base de plus de 800 millions de personnes dans le monde (Chavarriaga-Aguirre, 2016). De surcroît, c'est une plante rustique qui supporte les sols acides et les saisons sèches prolongées (Spencer & Ezedinma, 2017). C'est à juste titre que l'on le définit comme une culture polyvalente qui répond aux besoins des pays en développement et au défi du changement climatique (Feleke *et al.*, 2016).

Dans le monde, la production du manioc est estimée à plus de 283 millions de tonnes (Mt) par an dont 145 proviennent de l'Afrique et 87 l'Afrique de l'Ouest. En Côte d'Ivoire, le manioc est produit sur presque toute l'étendue du territoire et occupe le deuxième rang des plantes à racine après l'igname. Ainsi, la Côte d'Ivoire est classée troisième pays producteur de manioc en Afrique de l'Ouest après le Nigéria (45 Mt/an) et le Ghana (12 Mt/an). Cependant, l'on assiste à une baisse du rendement annuel du manioc dans le pays qui est passé de 6,7 Mt en 2010 à environ 5,5 Mt en 2019 (FAO, 2020).

En effet, diverses études ont montré que des maladies et ravageurs présents en Côte d'Ivoire entraînent des pertes de production chez le manioc dans la quasi-totalité des zones agroécologiques (N'Zué *et al.*, 2013 ; Kalyebi *et al.*, 2018; Alicai *et al.*, 2019). L'une des maladies les plus dangereuses est la mosaïque du manioc qui est la virose la plus répandue dans les aires de culture de cette plante. Depuis des décennies, cette maladie entrave sérieusement des champs de manioc, entraînant d'énormes pertes de productions pouvant atteindre 90 % (N'Zué *et al.*, 2013 ; Tize *et al.*, 2021).

Par ailleurs, de nombreux facteurs socio-économiques tels que la croissance démographique, l'insécurité alimentaire et la pauvreté ont conduit l'agriculture vers une forme moderne. Celle-ci tend à favoriser des variétés améliorées aux dépens des nombreuses

variétés traditionnelles, du fait surtout de leurs rendements relativement élevés (Lencucha *et al.*, 2020). Cependant, ces pratiques bien qu'ayant contribué à la lutte contre l'insécurité alimentaire et la pauvreté présentent des limites dont la perte de la diversité génétique du manioc qui est le « moteur » de la vigueur chez les plantes (Singer *et al.*, 2021). Le manioc cultivé pourrait ainsi perdre sa rusticité à cause de sa structure génétique devenu homogène favorisant l'adaptation rapide des agents pathogènes et des insectes vecteurs des maladies (Velásquez *et al.*, 2019).

Le virus de la mosaïque du manioc ou *Cassava Mosaic Viruse* (CMV) se transmet principalement par voie végétative ou à partir de la mouche blanche, *Bemisia tabaci*, qui est un insecte piqueur-suceur polyphage (Sani *et al.*, 2020). Les premières luttes contre la mosaïque du manioc ont porté essentiellement sur la création de variétés de manioc améliorées pour ce qui est de la lutte directe et l'utilisation de produits phytosanitaires contre le vecteur en ce qui concerne la lutte indirecte. Cependant, l'utilisation des variétés améliorées dans la lutte contre cette virose devient peu efficace à cause de la diversité génétique du manioc réduite au fil du temps, augmentant la vulnérabilité des plantes aux agents pathogènes. Actuellement, l'usage de matériel végétal issu de l'assainissement par thermothérapie est la méthode préconisée en plus de la vulgarisation des variétés améliorées.

Malgré la prise de ces mesures, la mosaïque semble encore se développer dans des champs de manioc avec des pertes de productions de plus en plus mentionnées en Côte d'Ivoire (Beugre, 2017). Des études récentes ont montré que cette maladie est en pleine évolution à cause des mutations génétiques qui s'opèrent de façon rapide chez le virus, conduisant au développement incessant de nouveaux variants (Legg *et al.*, 2015). Il paraît donc nécessaire de proposer d'autres solutions correctives pouvant freiner les actions des virus de la mosaïque du manioc. Celles-ci pourraient être basées sur une agriculture durable ayant pour objectif de favoriser des écosystèmes sains et une gestion durable des ressources naturelles, tout en garantissant une sécurité alimentaire mondiale. Il s'agit notamment de l'exploitation de plusieurs variétés traditionnelles résistantes aux viroses du manioc (Houngue *et al.*, 2019). En effet, certaines variétés traditionnelles sont importantes en raison de leurs complexes de gènes adaptés à la tolérance aux maladies et à d'autres conditions écologiques spécifiques. Grâce à l'évolution de la biotechnologie, les gènes de résistance à la mosaïque peuvent être détectés à travers des techniques plus appropriées pour les études génétiques (Kamanda *et al.*, 2020). Par ailleurs, acquérir des connaissances sur la diversité génétique du manioc paraît une condition nécessaire dans la sélection des variétés et la formation des groupes d'intérêt génétique pour

l'amélioration de cette culture (Gmakouba *et al.*, 2018). L'objectif général de la présente étude est de garantir une production durable du manioc en Côte d'Ivoire à travers la lutte contre les virus de la mosaïque du manioc.

De façon spécifique, il s'agit de :

- Etudier l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire ;
- Evaluer la diversité et la structuration génétique des variétés améliorées et traditionnelles de manioc ;
- Identifier des génotypes de manioc capables de résister aux mécanismes des virus, à partir du criblage des gènes de résistance à la mosaïque.

Outre l'introduction, ce mémoire est subdivisé en trois principales parties. Dans la première, il est question de généralités essentiellement sur le manioc, la mosaïque du manioc et les techniques d'identification des variétés résistantes à cette maladie. La deuxième partie détaille le matériel et les méthodes utilisés pour la réalisation de l'étude. Enfin, la troisième partie présente les résultats obtenus suivis de leur discussion. Ce document comporte également une conclusion et quelques perspectives de recherche.

PARTIE I : GENERALITES

1.1. ZONE D'ETUDE

Cette étude a été réalisée dans trois départements de la Côte d'Ivoire à savoir Bouaké, Yamoussoukro et Daloa qui sont des zones de productions du manioc (Perrin *et al.*, 2015). La mosaïque du manioc sévit comme bien d'autres départements du pays dans ces trois départements, choisis pour la phase pilote de lutte contre les viroses du manioc à partir du criblage de génotypes résistants. Les départements de Bouaké et Yamoussoukro sont situés au Centre de la Côte d'Ivoire respectivement entre les latitudes 7°69'N et 6°48'N et les longitudes 5°03'W, 5°17'W tandis que celui de Daloa est situé au Centre-ouest entre la latitude 6°53'N et la longitude 6°27'W (**Figure 1**).

Le climat est de type subtropical avec une dominance de sols ferrallitiques plus ou moins plats, favorables à l'agriculture. La pluviométrie moyenne annuelle oscille autour de 1200 mm avec une température moyenne de 26,2 °C et 26,6 °C respectivement dans les départements de Bouaké et Yamoussoukro. Dans le département de Daloa, on note une pluviométrie moyenne annuelle d'environ 1600 mm avec une température de 28 °C (PNS, 2020). A Daloa, le mois de Février est le mois le plus chaud avec une température moyenne de 33 °C et le mois d'Août le mois le plus froid avec une température moyenne est de 28 °C. De même, dans le département de Yamoussoukro, le mois de Février est le mois le plus chaud avec une température moyenne est de 28,4 °C et le mois d'Août le mois le plus froid avec une température moyenne de 25,2 °C. Des précipitations moyennes de 18,4 mm font du mois de Janvier le mois le plus sec. Enfin, à Bouaké, Février est le mois le plus chaud de l'année avec une température moyenne de 28,0 °C. Le mois d'Août est le mois le plus froid avec une température moyenne de 24,2 °C. Le mois de Décembre est le mois le plus sec et enregistre des précipitations de 18 mm (**Figure 2**). On distingue quatre saisons dont deux saisons des pluies et deux saisons sèches (Dekoula *et al.*, 2018). Ce sont une grande saison de pluies qui s'étend du mois d'Avril au mois de Juin ; une petite saison sèche au mois de Juillet, une petite saison de pluie qui part du mois d'Août au mois d'Octobre et enfin une grande saison sèche allant du mois de Novembre au mois de Mars (PNS, 2020). Cependant, cette répartition est perturbée ces dernières années à cause du changement climatique avec pour corolaire la perturbation du calendrier agricole (Vernier *et al.*, 2018).

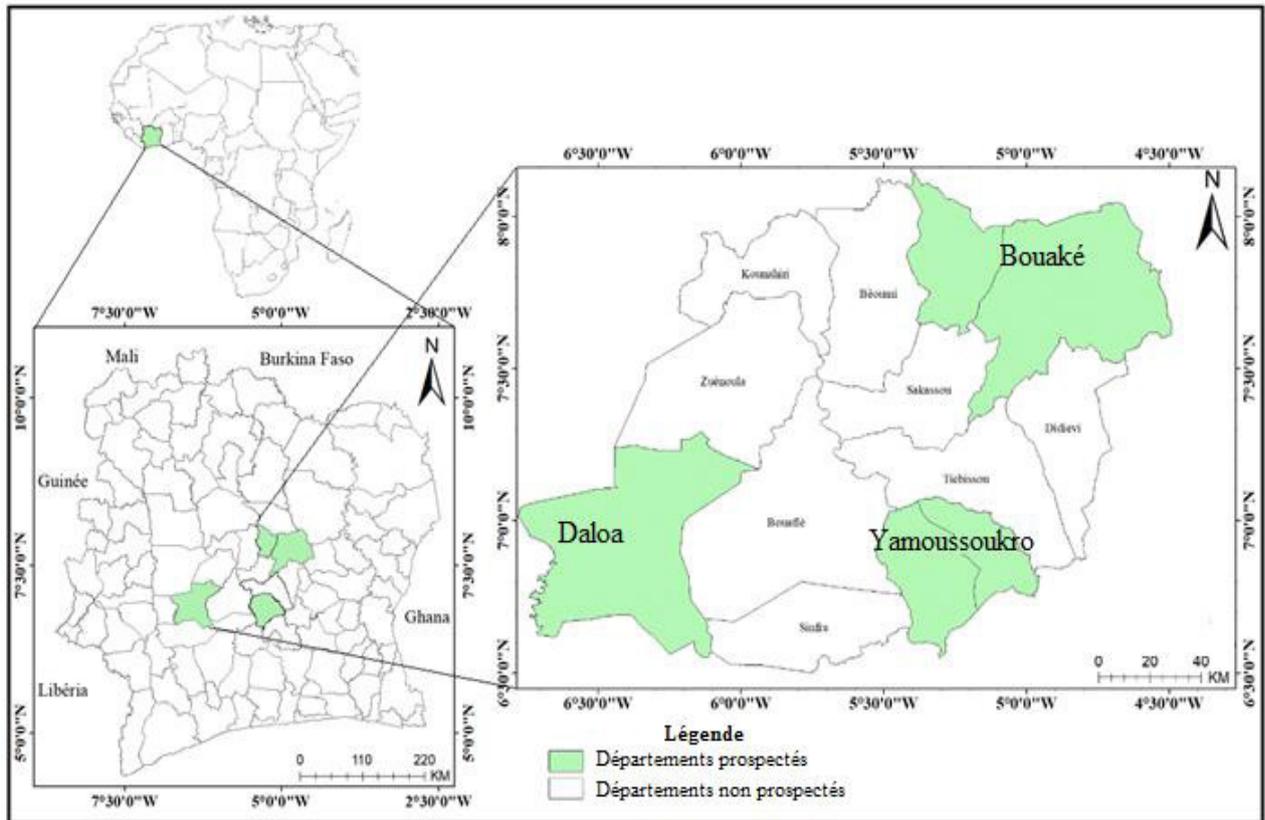
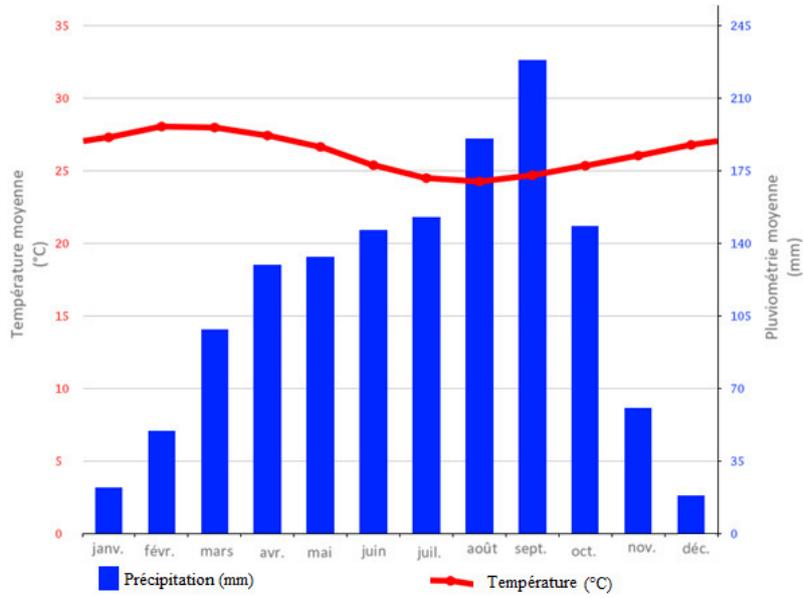
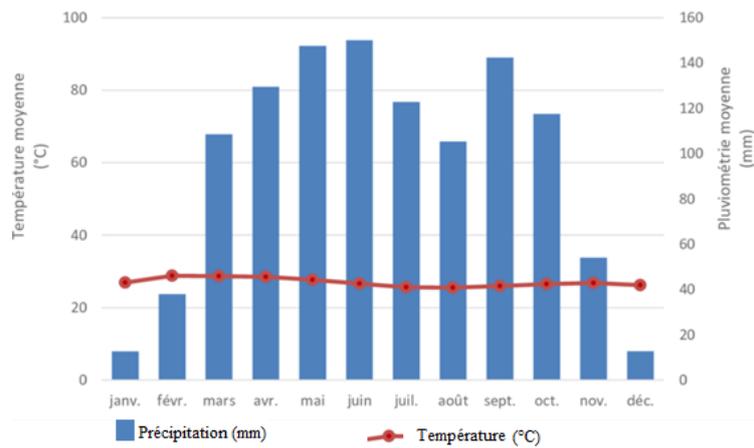


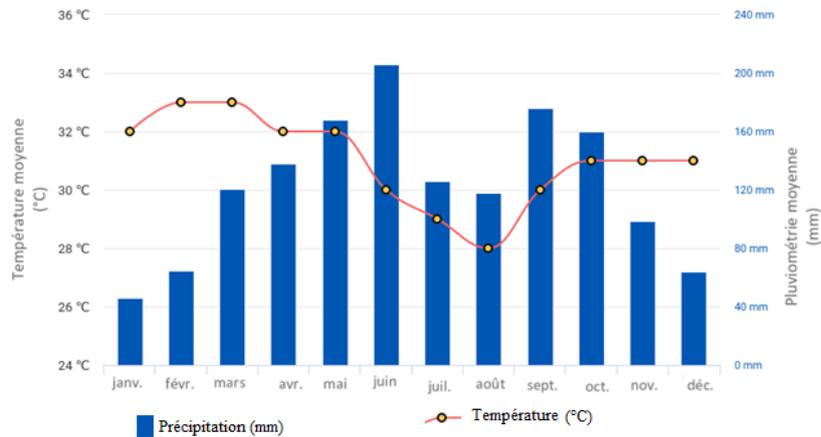
Figure 1 : Situation géographique des départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa en Côte d'Ivoire (INS, 2015).



a : Courbe ombrothermique du département de Bouaké



b : Courbe ombrothermique du département de Yamoussoukro



c : Courbe ombrothermique du département de Daloa

Figure 2 : Courbes ombrothermiques des départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa
(Anonymes 1 & 2 ; Kouassi, 2014)

1.2. MANIOC

1.2.1. Description du manioc

Le manioc est un arbuste qui peut mesurer jusqu'à 6 m de hauteur avec plusieurs types architecturaux liés à ses modes de ramification, avec des feuilles pétiolées (**figure 3a**). La floraison n'existe que chez certaines variétés. Les fleurs mâles sont situées au sommet de la plante alors que les fleurs femelles se retrouvent à la base de la panicule (Ceballos *et al.*, 2017). Le fruit issu de cette floraison est une capsule, déhiscente à maturité et l'endocarpe compte trois loges qui renferment chacune une graine. Le manioc possède deux types de racines à savoir les racines assimilatrices chargées de puiser dans le sol les éléments nutritifs et les racines tubéreuses qui elles, sont consommées (**figure 3b**). Les différentes variétés peuvent se différencier les unes des autres à plusieurs niveaux parmi lesquels la couleur de la tige, des pétioles et du phelloderme de la racine (Amarullah, 2020).



Figure 3 : Plante et racines tubéreuses de manioc

a : Plante de manioc avec des feuilles pétiolées ; b : des racines tubéreuses de manioc.

1.2.2. Origine du manioc

L'espèce de manioc consommée (*Manihot esculenta* Crantz), est issue de deux sous-espèces sauvages notamment *Manihot esculenta* ssp. *flabellifolia* et *Manihot esculenta* ssp. *peruviana* (Kante, 2020). C'est une plante originaire d'Amérique latine précisément du plateau des Guyanes. Il a été importé par les portugais du Brésil à l'île de La Réunion en 1736 puis en Afrique précisément dans la partie Est par Madagascar et l'île de Zanzibar (Guira *et al.*, 2016). Au XVIII^{ème} siècle, le manioc a été diffusé dans certains pays à partir de

Madagascar et les îles mozambicaines. Au XX^{ème} siècle, les gouvernements d'Afrique de l'Ouest ont fait la promotion de cette culture et ont développé des infrastructures routières qui ont favorisé les migrations. En Côte d'Ivoire, le manioc a été introduit au XIX^{ème} siècle par les populations immigrantes Akan (Abouré et Alladjan) à partir du Sud du Ghana (Vernier *et al.*, 2018). Les premières cultures ont été localisées dans la partie littorale du pays avant de se répandre sur l'ensemble du territoire (Del Villar *et al.*, 2017).

1.2.3. Taxonomie du manioc

Le manioc est une plante pérenne monoïque et allogame appartenant à la classe des Dicotylédones et à la famille des Euphorbiacées (Wen *et al.*, 2020). Il fait partie du genre *Manihot*, composé d'environ 99 espèces. Parmi celles-ci, une seule est cultivée surtout pour ses racines tubérisées comestibles ; il s'agit de l'espèce *Manihot esculenta* Crantz (Rosario-Arellano *et al.*, 2020). La taxonomie de cette espèce adoptée dans la plupart des études scientifiques est celle de Rogers et Appan décrite il y a environ cinq décennies précisément en 1973 (Mabossy-Mobouna *et al.*, 2020). Elle se présente comme suit :

Règne	: Plante
Embranchement	: Spermaphyte
Classe	: Dicotylédone
Ordre	: Euphorbiale
Famille	: Euphorbiacée
Genre	: <i>Manihot</i>
Espèce	: <i>Manihot esculenta</i> Crantz

1.2.4. Ecologie du manioc

Le manioc est une culture qui présente des facultés d'adaptation à diverses conditions écologiques. Il est tolérant à la sécheresse, aux sols acides et alcalins (Uarrota *et al.*, 2016). Cette tolérance aux stress abiotiques fait du manioc une culture attrayante pour les cultivateurs à ressources limitées. Cependant, pour une haute productivité, la culture du manioc nécessite des sols profonds à bonne réserve en eau et de texture sablo-limoneuse ou argilo-sableuse, dont le pH varie de 4 et 7,5 (Perrin *et al.*, 2015).

1.2.5. Diversité génétique du manioc

Le manioc est une plante hétérozygote et allotétraploïde avec un nombre de chromosomes égal à 36 soit $2n = 36$, $X = 9$ (Magoon *et al.*, 1969 ; Nassar, 1978). Les premières sélections du manioc ont pu s'opérer aisément grâce au mode de reproduction sexuée, qui facilitait la recombinaison des gènes chez cette plante (Pineda *et al.*, 2020). Au fil des années, les génotypes relativement intéressants issus de cette reproduction ont été multipliés par la reproduction clonale dans les différentes stations de recherche puis vulgarisés (Oliveira *et al.*, 2015).

La diversité génétique chez le manioc peut se définir comme la variation des génotypes existants chez des individus dans une population de manioc considérée. C'est le niveau de dissemblance dans la composition génétique des variétés de manioc (Kante, 2020). De ce fait, sa compréhension est une condition importante dans la sélection des combinaisons parentales et la formation des groupes d'intérêt génétique pour l'amélioration de celle-ci (Kamanda *et al.*, 2020). Aussi, une importante diversité génétique chez la plante, peut faciliter son adaptation à divers facteurs et aux changements climatiques (Ferguson *et al.*, 2019). Elle peut être évaluée grâce aux techniques de la biologie moléculaire telles que la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et le séquençage de l'ADN (Kante, 2020). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la réduction ou l'augmentation de la diversité génétique chez le manioc parmi lesquels les mutations et les recombinaisons génétiques. Toutefois, ces mécanismes génétiques sont en lien avec le mode de reproduction, les facteurs environnementaux et le type de culture appliqué.

1.2.5.1. Mutations génétiques chez le manioc

Les mutations génétiques sont des modifications qui se produisent au niveau de l'ADN génomique de l'individu concerné. Elles peuvent se traduire par une insertion ou délétion ou la substitution (transition ou transversion) des bases azotées dans la séquence nucléotidique de ces variétés. Au cours de l'évolution du manioc, les clones ne sont pas immuables du fait de ces mutations. Ces mutations peuvent être neutres, c'est-à-dire qu'elles entraînent un changement dans la séquence d'ADN qui n'est ni bénéfique ni préjudiciable à la survie et la reproduction de l'individu concerné (Lenormand *et al.*, 2016). Cependant, les mutations à effet négatif sont plus fréquentes chez le manioc (Carmo *et al.*, 2020). En effet, du fait des pressions environnementales et les bioagresseurs, les plantes accumulent de plus en plus des

mutations nuisibles qui constituent le processus appelé « cliquet de Muller » selon Felsenstein (1974). Ce processus concourt à une perte progressive de la diversité génétique avec pour conséquence la diminution des performances et de la qualité agronomique des plantes.

1.2.5.2. Recombinaison génétique chez le manioc

La recombinaison génétique peut se définir comme un brassage génétique issu de la sélection aléatoire d'une partie du patrimoine génétique de deux individus à partir de la reproduction sexuée. Ce brassage peut être intrachromosomique ou interchromosomique. Le manioc est une plante allogame qui, lorsqu'elle est pollinisée, par des insectes ou par l'Homme, génère des individus génétiquement différents. Ce processus peut permettre une augmentation du patrimoine génétique si la recombinaison a lieu entre des individus génétiquement différents. Cependant, la recombinaison peut avoir un impact négatif sur les plantes dans le cas où elle a lieu entre deux individus génétiquement identiques comme c'est le cas lors de la pollinisation du manioc dans les plantations monovariétales. Dans ce cas, elle augmente la consanguinité chez les plantes, réduisant ainsi la vigueur et la diversité génétique (Singer *et al.*, 2021).

1.2.5.3. Facteurs d'influence de la diversité génétique du manioc

a. Type de culture

La polyculture regroupe plusieurs espèces de cultures dans un même champ alors que la monoculture concerne une seule espèce. Dans un champ monovariétal (culture d'une seule variété dans un champ), chaque plante est entourée d'autres plantes qui lui sont génétiquement très proches, voire identiques. Chez le manioc, cette proximité d'individus génétiquement identiques conduit à des croisements consanguins lors du brassage chromosomique, produisant ainsi des plantes aux taux de consanguinité très élevés. Pourtant, selon plusieurs auteurs dont Adu *et al.* (2021), la consanguinité est un facteur de réduction de la diversité génétique chez le manioc qui entraîne très souvent la perte de la vigueur chez cette plante. Pour Dao *et al.* (2021), la polyculture est un moyen de conservation de l'agrobiodiversité et du maintien ou d'augmentation de la diversité génétique chez les plantes.

b. Mode de reproduction

Il existe deux modes de reproduction chez le manioc : la reproduction sexuée et la reproduction asexuée (le bouturage). Le bouturage est un mode de multiplication clonale qui consiste à donner naissance à un nouvel individu à partir d'un fragment de la plante de départ (plante-mère). Les plantes produites sont des copies génétiques identiques, ou parfois peu diversifiées, des plantes de la génération précédente. Ce système conduit à l'accumulation et la propagation de pathogènes et des ravageurs à travers l'utilisation des boutures déjà infectées. En effet, les propagules clonales infectées portent dans leurs tissus des pathogènes systémiques tels que les virus, les champignons ou les bactéries pouvant s'accumuler dans les lignées clonales (Velásquez *et al.*, 2019).

Par ailleurs, reproduction sexuée chez le manioc bien que difficilement réalisable, permet de combiner plusieurs gènes intéressants à travers la sélection conduisant à une augmentation de la diversité génétique. Il contribue également à la lutte contre les maladies étant donné que celles-ci ne passent pas la barrière placentaire chez le manioc (Frimpong *et al.*, 2021). Il ressort que la propagation clonale, si elle est pratiquée à l'exclusion du brassage sexué, conduit à la perte progressive de la diversité génétique (Ferguson *et al.*, 2019). Elle peut ainsi favoriser la diminution de la vigueur des clones existants, l'accumulation et la vulgarisation des maladies systémiques et autres pathogènes et la perte des clones ou de leur potentiel adaptatif. Pour Kholova *et al.*, (2021), le maintien du potentiel adaptatif du manioc est important étant donné que les génotypes adaptés aux conditions environnementales actuelles ne sont pas forcément ceux qui seront adaptés aux environnements futurs, qui elles-mêmes deviennent de plus en plus défavorables pour les cultures. La **figure 4** présente une alternance des modes de culture sexué et asexué chez le manioc.

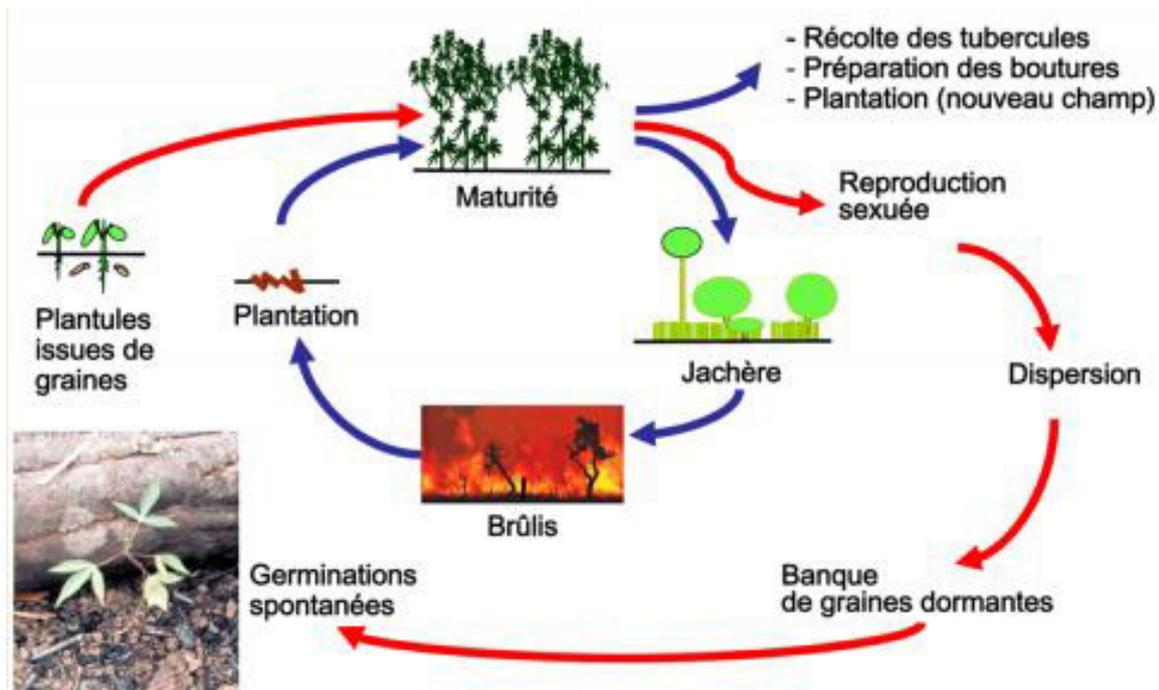


Figure 4: Culture alternée entre le mode sexué et le bouturage chez le manioc (McKey *et al.*, 2012)

1.2.6. Composition biochimique et utilisations du manioc

En raison de sa forte teneur en glucides, le manioc représente une source importante de calories pour les populations dans plusieurs pays. Il est considéré comme la seconde source d'amidon dans le monde après le maïs (Uarrotta *et al.*, 2016). En effet, le manioc est composé en majorité d'hydrates de carbone avec plus de 80 % d'amidon et seulement 4 % de sucres. En plus de ceux-ci, d'autres éléments nutritifs tels que le fer (9,6 mg/kg), le zinc (6,4 mg/kg) et le calcium (590 mg/kg) sont présents dans les racines. Les feuilles sont également très riches en protéines et en vitamines (Chavariaga-aguirre *et al.*, 2016). Cependant, le manioc qui est surtout destiné à l'alimentation humaine, peut contenir de l'acide cyanhydrique toxique pour l'Homme (Ogbonna *et al.*, 2020). En effet, il existe deux types de manioc selon la teneur en composés cyanogéniques. Il s'agit du manioc amer qui contient un fort taux de composés cyanogéniques et du manioc doux qui contient un faible taux de composés cyanogéniques. Du fait de ces composés cyanogéniques, le manioc amer, impropre à la consommation directe, est au préalable mis dans des conditions particulières pour réduire considérablement la toxine. Cela peut se faire de diverses manières à savoir le rouissage, le broyage, le râpage et le séchage qui permettent de détruire les cellules, permettant l'hydrolyse des glucosides et la libération de l'acide cyanhydrique (Perrin *et al.*, 2015).

Plus de 800 millions de personnes dans le monde consomment le manioc et environ 70 % de ces personnes l'utilisent sous forme transformée. En Côte d'Ivoire, le manioc est consommé sous plusieurs formes telles que les racines fraîches bouillies, les feuilles cuites, le gari, l'attiéké, le tapioka, le kongodé, le placali, le foutou, l'attoukou (Yao *et al.*, 2015). Le manioc est utilisé dans des industries telles que la papeterie, le textile, la pâtisserie, la pharmacie, la production d'alcool, de biogaz, de carburant, de produits alimentaires et chimiques (Li *et al.*, 2017). L'amidon de manioc est également utilisé dans la fabrication d'adhésifs pour contreplaqués et placages, de sirops de glucose et de dextrine (Tonukari *et al.*, 2015). Enfin, les déchets générés par la transformation du manioc sont utilisés dans la fabrication d'alimentation des animaux et dans la fertilisation des sols (Oghenejoboha *et al.*, 2021).

1.2.7. Production du manioc dans le monde

Le manioc occupe le deuxième rang mondial des plantes à racine et tubercules après la pomme de terre. Sa production mondiale annuelle est estimée à 283 millions de tonnes (Mt). L'Afrique est le plus grand producteur de manioc avec une production d'environ 145 770 528 tonnes, suivie de l'Asie, l'Amérique et l'Océanie (**Figure 5**). L'Afrique subsaharienne représente 61,1 % de la production mondiale de manioc FAO (2017).

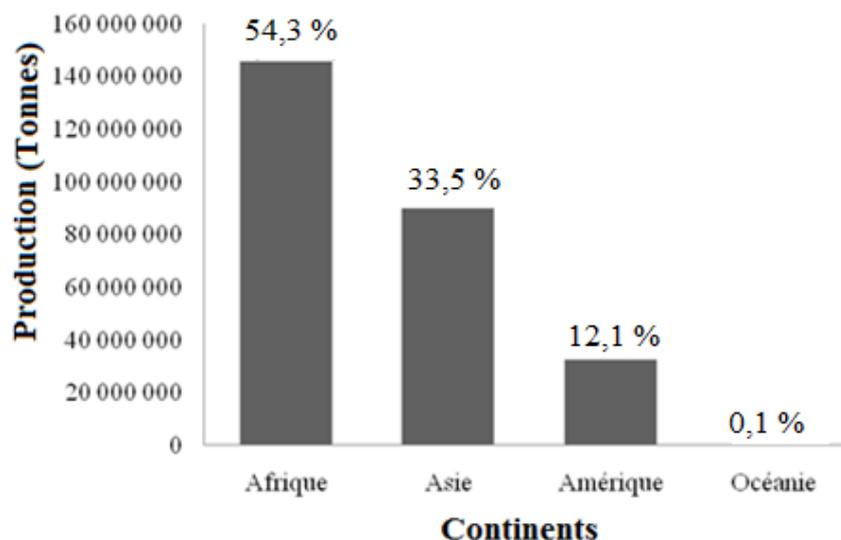


Figure 5 : Productions de manioc dans le monde (FAO, 2017)

1.2.8. Production du manioc en Afrique

Le Nigéria est le premier pays producteur de manioc en Afrique et dans le monde avec une production annuelle atteignant 53 Mt. La Côte d'Ivoire occupe le 23^{ème} rang mondial des pays producteurs de manioc et le 3^{ème} au niveau de l'Afrique de l'Ouest après le Nigéria et le Ghana avec une production de 5,5 Mt (FAO, 2020). Elle est aussi le 3^{ème} pays exportateur de manioc d'Afrique de l'Ouest (Perrin *et al.*, 2015). En Afrique et plus en Afrique de l'Ouest, le manioc est majoritairement produit dans des systèmes de cultures traditionnelles dominées par les femmes et constitue une culture vivrière largement autoconsommée. Sa vente sur les marchés urbains constitue une source de revenus non négligeables. Le principal pays importateur mondial de manioc est la Chine qui l'utilise principalement dans l'agro-industrie.

1.2.9. Amélioration du manioc en Côte d'Ivoire

Initialement basée sur le littoral Est, l'aire de culture du manioc en Côte d'Ivoire s'étend à ce jour à l'ensemble du pays. Cependant, les zones de forte production sont essentiellement le Centre, le Sud et le Centre-Ouest. Dans les années 1930, des chercheurs ont initié la création de variétés améliorées en vue non seulement d'accroître les productions mais également de lutter contre les facteurs nuisibles qui proliféraient davantage. Celles-ci étaient le fruit de croisements répétés entre des variétés de *Manihot esculenta* provenant de divers pays et d'autres espèces dont la plus connue est *Manihot glaziovii*. Sa résistance à certaines maladies, parmi lesquelles les maladies virales, avait été déjà révélée par des travaux antérieurs (Ceballos *et al.*, 2016). Ainsi, un premier programme d'amélioration a été mis en œuvre en Afrique orientale de 1937 à 1957. Vingt-trois années plus tard, un autre programme d'amélioration du manioc a été élaboré à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA) à Ibadan au Nigéria afin d'améliorer davantage la qualité et le rendement (Malik *et al.*, 2020). Celui-ci utilisait le matériel d'Afrique orientale croisé avec des variétés provenant d'Amérique du Sud et de l'Inde. Les variétés issues de ces différents programmes ont été distribuées dans la plupart des pays y compris en Côte d'Ivoire. Depuis 1988, d'autres travaux sur la création variétale sont réalisés en Côte d'Ivoire sur les stations de recherche du CNRA à Bouaké, Man et Adiopodoumé. Ceux-ci consistent à la réalisation de croisements entre des variétés locales productives et des variétés introduites. Le but de cette amélioration était d'augmenter le rendement et de minimiser l'impact des bioagresseurs. Pour la diffusion des boutures, des multiplications rapides par recépage sont faites dans les stations de recherche de Dabou, Man,

Bouaké et Adzopé sous la supervision de l'Agence Nationale d'Appui au Développement Rural (ANADER) et du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA). Ainsi, depuis leur création, les variétés améliorées sont vulgarisées dans toutes les zones de production de manioc en Côte d'Ivoire tout en abandonnant de nombreuses variétés traditionnelles. Pourtant, celles-ci pourraient contenir des gènes intéressants pour la lutte contre divers facteurs biotiques et abiotiques (Kimwanga *et al.*, 2021).

1.2.10. Variétés de manioc cultivées en Côte d'Ivoire

Plusieurs variétés de manioc sont cultivées en Côte d'Ivoire. Ce sont des variétés améliorées pour leurs rendements et quelques variétés traditionnelles possédant chacune des caractéristiques bien distinctes (**Tableau I**). Les variétés traditionnelles encore cultivées sont essentiellement le Yacé, le Zoklo et Bonoua. Concernant les variétés améliorées, les plus répandues sont le Yavo, les Bocou 1 ; 2 ; 3 et le TMS4(2)1425 (Perrin *et al.*, 2015).

Tableau I : Quelques variétés de manioc cultivées en Côte d'Ivoire

Variétés	Types	Rend	Caractéristiques	Usage courant
Yavo	Amélioré	30 t/ha	Taux de matière sèche de 40 %, résistance élevée à la mosaïque ; doux.	Attiéké ; placali, foutou
Bocou1	Amélioré	25 t/ha	Bon couvert végétal, sensible aux acariens, taux de matière sèche de 39 % ; doux	Attiéké ; placali, foutou
Bocou2	Amélioré	25 t/ha	Bon couvert végétal, sensible aux acariens et la pourriture racinaire, récolte facile, taux de matière sèche de 38 % ; amer.	Attiéké
Bocou3	Amélioré	25 t/ha	Bon couvert végétal, tolérante aux viroses, sensible à la pourriture racinaire, taux de matière sèche de 37 % ; amer.	Attiéké ; placali
TMS4(2)1425	Amélioré	30 t/ha	Ramification forte, résistance à la mosaïque, sensibilité aux acariens, récolte facile ; doux.	Attiéké ; foutou
Yacé	Traditionnel	20 t/ha	Taux de matière sèche de 40 %, sensible aux acariens et aux cochenilles ; amer.	Attiéké ; placali
Bonoua	Traditionnel	15 t/ha	Taux de matière sèche élevé d'environ 40 %, sensible aux cochenilles, rendement faible, Très bonne cuisson ; doux.	Foutou
Zoklo	Traditionnel	20 t/ha	Taux de matière sèche élevé d'environ 39 %, sensible aux acariens et aux cochenilles ; amer.	Attiéké placali

1.3. CONTRAINTES LIEES A LA PRODUCTION DU MANIOC

Le manioc est décrit comme étant une culture assez tolérante aux facteurs environnementaux que la plupart des autres cultures vivrières. Cependant, il est confronté à de nombreuses contraintes réduisant les productions. Ces contraintes peuvent être classées en deux grands groupes que sont les facteurs abiotiques et biotiques (Chavarriaga-aguirre *et al.*, 2016). Les facteurs abiotiques concernent surtout les contraintes écologiques et pédoclimatiques tandis que les facteurs biotiques sont liés aux bioagresseurs présents dans les champs de manioc.

1.3.1. Contraintes abiotiques

Les sécheresses prolongées et la pauvreté des sols en nutriments influencent négativement le manioc. Ces facteurs sont très souvent à la base de faibles rendements et de la faible valeur nutritive des racines tubéreuses (Mbanjo *et al.*, 2021). En effet, un déficit en potassium dans les sols peut entraîner la réduction du taux d'amidon et augmenter le potentiel cyanogénique dans ces racines (Wasonga *et al.*, 2021). Aussi, les sécheresses prolongées conduisent à la création de nouvelles niches écologiques pour les mouches blanches, vecteurs de nombreux virus pathogènes impliqués dans les viroses du manioc (Chi *et al.*, 2020).

1.3.2. Contraintes biotiques

1.3.2.1. Acariens et cochenilles

Les ravageurs du manioc sont essentiellement des arthropodes phytophages dont les plus connus sont les acariens verts et les cochenilles. Originaires de l'Amérique du Sud, l'acarien qui est une araignée et la cochenille, un insecte, ont été découverts en Afrique vers 1970. L'espèce d'acarien la plus identifiée est *Monnychellus tanajoa* et l'espèce de cochenille dominante est *Phenacoccus manihoti*. Ces espèces provoquent principalement la déformation des feuilles, des chloroses et en cas de gravité le rabougrissement des plantes. L'abondance des acariens et des cochenilles peut être favorisée par la sécheresse et les hautes températures. Les pertes de racines tubéreuses de manioc associées aux attaques de ces arthropodes varient entre 20 et 80 % (Abderahim *et al.*, 2018).

1.3.2.2. Maladies fongiques

a. Anthracnose du manioc

Plusieurs maladies fongiques ont été identifiées parmi lesquelles l'anthracnose du manioc qui est la plus rencontrée (Vernier *et al.*, 2018). Cette maladie est causée par l'espèce de champignon *Colletotrichum gloeosporioides Manihotis*. L'anthracnose du manioc se manifeste par des chancres et lésions sur la tige, à l'aisselle, les pétioles et le limbe des feuilles ainsi que sur les fructifications. Il s'agit d'une infection des parties aériennes des plantes de manioc singulièrement la tige et les pétioles des feuilles. Cela provoque généralement la défoliation suivie de flétrissements conduisant à des dessèchements du bourgeon apical. L'anthracnose du manioc se transmet par une punaise dénommée *Pseudotheraptus devastans*, à partir de boutures contaminées (Ehui *et al.*, 2019).

b. Pourriture racinaire du manioc

Les pourritures racinaires constituent aujourd'hui un danger pour le manioc. Ce sont de graves maladies provoquées par de nombreuses espèces de champignons pathogènes, qui affectent les racines tubéreuses de manioc. On en distingue deux types : les pourritures molles des racines ou Wet Root Rot et pourriture sèche des racines ou Dry Root Rot (Vernier *et al.*, 2018).

Les pourritures molles sont causées par des espèces de Phytophthora, dont celle rencontrée en Afrique est *P. erythrospetica*. Ces champignons sont généralement associés à d'autres champignons telluriques présents dans le sol, tels que *Pythium spp* et *Fusarium spp*. Ces pourritures apparaissent d'abord sous forme de taches aqueuses à la surface des jeunes racines tubéreuses puis tournent au brun détruisant ces racines nourricières (**Figure 6**). On assiste par la suite à l'effritement des tissus riches en amidon qui dégage une odeur fétide. Cela entraîne le dépérissement de la plante qui revêt une apparence brûlée, la plante se dessèche et meurt. Ces pourritures peuvent causer jusqu'à 80 % de pertes.

Les pourritures sèches des racines sont causées par de nombreux champignons qui agissent séparément ou simultanément. Les plus importants sont *Rosellinia spp*, *Armillariella mellea* et *Botryodiplodia theobromae*. Cette pourriture se rencontre dans les régions ayant des sols lourds, humides et riches en matière organique. Elle est caractéristique des parcelles récemment défrichées et comportant de nombreuses souches d'arbres. Les plantes atteintes flétrissent, se déshydratent et prennent un aspect foncé et brûlé. Le champignon produit des

rhizomorphes, une sorte de réseaux filamenteux de mycélium, qui enveloppent l'extérieur des racines de manioc qui deviennent noires. Les racines infectées exhalent une odeur caractéristique de bois en décomposition.



Figure 6 : Pourritures molles des racines du manioc (Vernier *et al.*, 2018)

en blanc : champignons responsables de la pourriture molle ; **en marron** : racine atteinte de pourriture molle.

1.3.2.3. Maladies bactériennes

La maladie bactérienne la plus répandue en Afrique est la bactériose vasculaire du manioc dont l'agent pathogène est l'espèce bactérienne *Xanthomonas axonopodis manihotis*. Les attaques débutent par des taches anguleuses foliaires huileuses et translucides, avant de s'étendre progressivement aux tiges et aux rameaux, conduisant à la mort de la plante (Affery *et al.*, 2017). Plusieurs facteurs dont les conditions climatiques, les boutures contaminées, les insectes, les outils agricoles, et les éclaboussures de pluies constituent des moyens de dissémination de la maladie. En Côte d'Ivoire, elle a été signalée en 1979 dans la partie septentrionale du pays puis s'est répandue dans la quasi-totalité des régions productrices du manioc (Koné *et al.*, 2015). La conséquence de cette bactériose est la destruction de la qualité

des boutures pour la semence et une baisse de rendement variant de 80 à 90 % de tubercules (Affery *et al.*, 2018).

1.3.2.4. Maladies virales

La striure brune du manioc ou *Cassava Brown Streak Disease* (CBSD) et la mosaïque du manioc ou *Cassava Mosaic Disease* (CMD) sont les deux maladies virales destructrices du manioc les plus répandues en Afrique (Vernier *et al.*, 2018). Elles se transmettent par la mouche blanche *Bemisia tabaci* et aussi par la multiplication végétative à travers les boutures infectées (Rey & Vanderschuren, 2017).

La striure brune du manioc (CBSD) reste jusqu'à ce jour logé seulement en Afrique de l'Est (Legg *et al.*, 2015). Elle a été découverte pour la première fois en Tanzanie en 1936. Elle est causée par le virus de la striure brune ou *Cassava Brown Streak Virus* (CBSV). C'est un virus à ARN dont les particules virales sont allongées et filamenteuses avec une longueur qui varie entre 650 à 690 nm (Tomlinson *et al.*, 2018). Cette maladie se manifeste par des chloroses en plage circulaire ou rugueuse sur les limbes pouvant atteindre toutes les nervures sur les feuilles. Egalement par des lésions nécrotiques brunes à la surface des tissus verts des tiges et des colorations jaune-brunes induisant la pourriture des tubercules (Kawuki *et al.*, 2016). Récemment la CBSD a été détectée dans plusieurs autres pays de l'Afrique. En Afrique centrale, elle est présente dans divers pays dont le Rwanda et la République démocratique du Congo (Muhindo *et al.*, 2020). Heureusement, aucun cas n'a été signifié pour l'heure en Afrique de l'Ouest. Selon les études menées par Kaweesi *et al.* (2014), presque toutes les variétés de manioc seraient sensibles aux virus de la CBSD et les pertes de rendement occasionnées par ces virus peuvent atteindre 100 %. Il convient donc de prendre des mesures drastiques de maîtrise de la CBSD en vue d'éviter le chaos.

1.4. MOSAÏQUE DU MANIOC

La mosaïque du manioc est la maladie virale dévastatrice du manioc la plus répandue en Afrique de l'Ouest (Torkpo *et al.*, 2017). Tout comme la CBSD, cette maladie a été découverte en Afrique de l'Est où elle est endémique, précisément en Tanzanie en 1894. Elle est causée par le virus *Cassava Mosaic Virus* (CMV) encore appelé *Cassava Mosaic Geminivirus* appartenant à la famille des *Geminiviridae* et au genre *Begomovirus*. Ces virus sont propagés par les mouches blanches de l'espèce *Bemisia tabaci* et aussi à travers l'utilisation de boutures provenant de plantes infectées (Eni *et al.*, 2021). En Côte d'Ivoire, les

souches de virus de la mosaïque du manioc identifiées à ce jour sont l'ACMV EACMV (Beugre, 2017). Les pertes de production du manioc dues à cette maladie atteignent parfois 90 % (N'Zue *et al.*, 2013).

1.4.1. Epidémiologie de la mosaïque du manioc

a. Diagnostic de la mosaïque du manioc à partir des symptômes

La mosaïque du manioc se reconnaît facilement par ses symptômes. Elle se manifeste par une forte décoloration le plus souvent associée à une déformation plus ou moins sévère des feuilles. Elle entraîne principalement sur les jeunes feuilles une panachure allant du vert-claire au jaunâtre, du limbe qui se déforme, se boursoufle et croît de manière asymétrique suite à l'arrêt du développement des parties infectées (**Figure 7**). Lorsque l'infection est précoce et sévère, le développement de la plante entière est affecté et conduit au freinage de la croissance avec des feuilles déformées et décolorées avec un retard de croissance (Mulenga *et al.*, 2016). La sévérité de la CMD est fonction des variétés, de l'âge des plantes, des conditions climatiques, de la saison et de la co-infection (Elegba *et al.*, 2020).



Figure 7 : Différences phénotypiques entre une plante de manioc saine et une plante de manioc sévèrement atteinte de la mosaïque

a. Plante apparemment saine ; b. Plante de manioc atteinte de la mosaïque.

1.4.2. Premières découvertes et expansion de la mosaïque du manioc

Suite à sa découverte en 1894 en Afrique de l'Est, la CMD s'est étendue quelques années plus tard dans presque tout le reste de l'Afrique puis dans toutes les zones de production de manioc. Les premières épidémies ont été enregistrées dans les années 1930 au Ghana, en Sierra Leone, au Nigéria, au Madagascar, en Ouganda et en Côte d'Ivoire (Sesay *et al.*, 2021).

La mosaïque du manioc a été détectée pour la première fois au Burkina Faso en 1990 (Eni *et al.*, 2021). Avant ses épidémies, la CMD était considérée comme une maladie relativement peu importante (Al Basir *et al.*, 2021). D'ailleurs, les premiers virus isolés à partir de manioc présentant des symptômes de la CMD causaient moins de dégâts (Zanini *et al.*, 2021). Cependant, au fil des années, les virus ont évolué par de nombreux mécanismes pour atteindre des niveaux d'agressivité plus élevés (Wang *et al.*, 2020). On distingue à ce jour plusieurs souches et variantes du virus de la mosaïque de la mosaïque.

1.4.3. Notions de souches et variantes de virus de la mosaïque du manioc

Les souches de Geminivirus sont des virus appartenant à la même espèce mais ayant des caractères biologiques et/ou génétiques différents. Les variantes de Geminivirus sont définies comme des isolats d'une même souche ayant de très petites différences phénotypiques et qui se manifestent par une différence entre les séquences nucléotidiques (Bowen *et al.*, 2019). Etant donné que la mutation des souches de virus en d'autres isolats se fait de façon plus rapide que celle des autres êtres vivants, il est conseillé d'associer le nom du pays pour chaque nouvelle découverte ainsi que le rang de la découverte pour distinguer les différentes variantes de virus (Rey & Vanderschuren., 2017). En Côte d'Ivoire, les souches identifiées sont l'ACMV et l'EACMV (Toualy *et al.*, 2014).

1.4.3.1. Premières souches de virus de la mosaïque de manioc

Le premier agent pathogène associé à la CMD est le virus de la mosaïque du manioc connu sous le nom de « African cassava mosaic virus (ACMV) ». Dans la seconde moitié des années 90, une autre forme du virus a été identifiée suite à des épidémies dévastatrices qu'elle a causées dans plusieurs pays d'Afrique de l'Est dénommée « East African cassava mosaic virus (EACMV) ». Les caractéristiques physiques des particules virales sont identiques pour ces deux souches de virus. Cependant, les pertes de productions induites par l'ACMV sont moins énormes comparées à celles provoquées par la souche EACMV (Torkpo *et al.*, 2017). En cas

de co-infection associant l'ACMV et l'EACMV, les pertes sont plus élevées et atteignent parfois 100 % (Chikoti *et al.*, 2019).

1.4.3.2. Autres souches de virus de la mosaïque de manioc

Au fil des années, de nombreuses souches de virus ayant des liens génétiques étroits avec les deux autres prédéfinies, ont été identifiées dans divers pays. Les plus sévères résulteraient de la recombinaison génétique entre des variantes d'ACMV et d'EACMV ou entre des variantes d'EACMV (Eni *et al.*, 2021). Selon Lett (2014), en plus de l'ACMV et de l'EACMV, les autres souches de virus identifiées à ce jour sont celles de l'Ouganda (EACMV-UG), du Kenya (l'EACMV-KE), de la Tanzanie (EACMV-TZ), du Cameroun (EACMCV), de Zanzibar (EACMZV), de la Malawi (EACMMV), de l'Afrique du Sud (SACMV), du Burkina Faso (EACMBV) et de la Madagascar (CMMGV). Aussi, deux souches ont été identifiées en Asie principalement l'*Indian cassava mosaic virus* (ICMV) et le *Sri Lanka cassava mosaic virus* (SLCMV) (Siriwan *et al.*, 2020 ; Kwibuka *et al.*, 2021). Toutefois, le virus indien ICMV a été plus tard détecté en Afrique précisément au Togo (Mivedor *et al.*, 2020). Parmi les différentes souches de virus, les plus sévères sont l'EACMV, l'EACMV-UG, l'EACM-KE et l'EACMV-TZ. Ce sont des virus issus de recombinaison génétiques entre les différentes souches (Eni *et al.*, 2021).

1.4.4. Cycle viral

La réplication de l'ADN des Geminivirus se déroule dans le noyau des cellules végétales après multiplication et accumulation des différents composants génomiques nécessaires (**Figure 8**). Lors de leur alimentation, les mouches blanches *Bemisia tabaci* qui sont les vecteurs des virus, transmettent des particules virales à la plante précisément au niveau du phloème. Ces virus traversent plusieurs membranes cellulaires pour atteindre l'hémolymphe de l'insecte et celle des glandes salivaires qui permet leur évacuation par salivation dans la nouvelle plante (Chen *et al.*, 2021). Après cette étape, l'ADN de départ (simple brin) est dépourvu de sa capsid et transporté dans le noyau grâce aux protéines induites. Une fois dans le noyau, des molécules d'ADN double brin sont produites où certaines jouent le rôle de matrice pour la transcription des gènes qui serviront à la réplication en cercle roulant (**Figure 8**) et d'autres pour la production de copies d'ADN simple brin. L'un des deux brins est clivé au niveau de la région commune, la conformation obtenue est dite ouverte circulaire. La protéine Rep est ainsi capable de séparer les brins positifs et négatifs permettant l'élongation

du brin positif en cours de synthèse. Après la synthèse complète du nouveau brin, la réplicase libère l'extrémité 5' du brin néoformé et la lie avec l'extrémité 3' en libérant la molécule complète simple brin. L'encapsidation des formes virales ADN simple brin a lieu dans le noyau et le passage de celui-ci vers le cytoplasme est assuré par la protéine BV1. Une fois dans le cytoplasme, il y a translocation entre l'ADN simple brin et la protéine BV1 formant le complexe ADN-BV1, qui lui est transporté par la protéine BC1 vers les plasmodesmes (Hipp *et al.*, 2016).

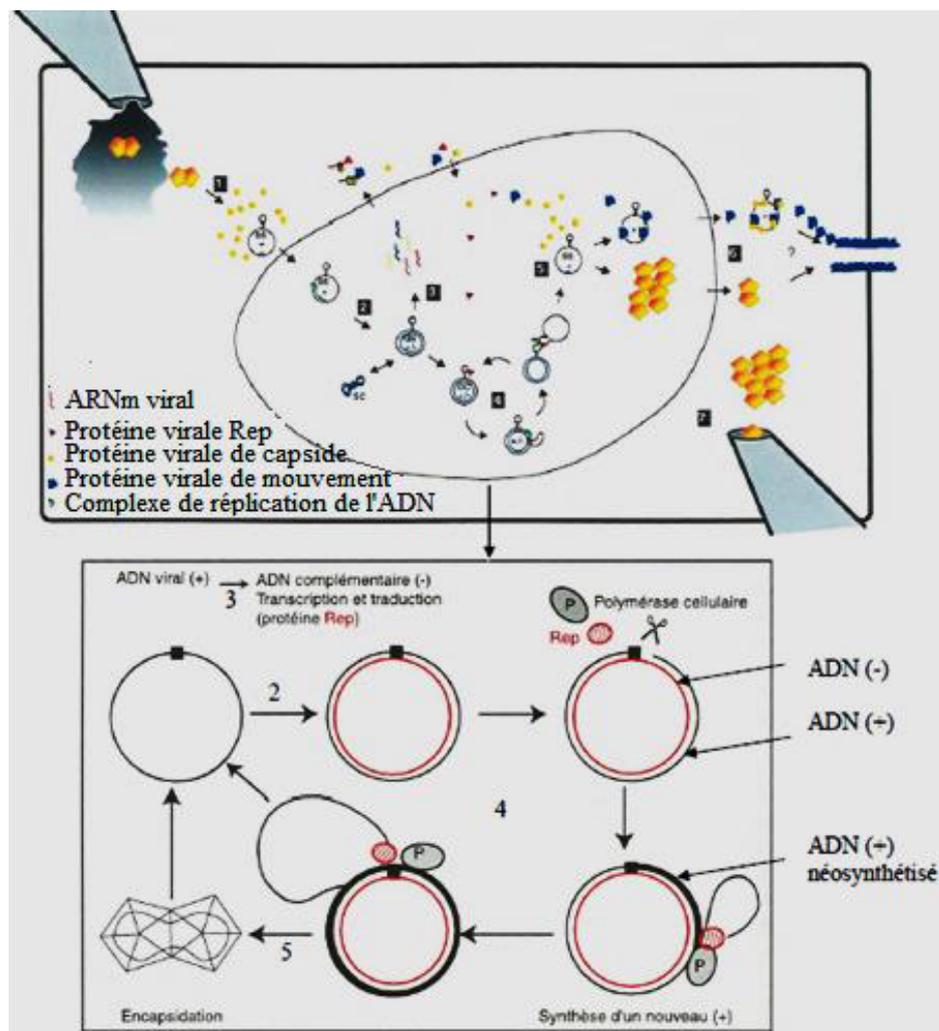


Figure 8 : Principales étapes du cycle des Geminivirus (Hipp *et al.*, 2016).

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

1.4.5. Structure du génome des virus de la mosaïque de manioc

Les virus de la mosaïque du manioc ou Cassava Mosaic Virus (CMV) ou Geminiviruses (CMG) appartiennent au genre des Begomovirus et à la famille des Geminiviridae. Les Geminivirus sont des virus à ADN circulaire simple brin, encapsidé dans une particule icosaédrique associée en doublets. Leur ADN comporte entre 2500 et 5200 bases (Saunders *et al.*, 2020). La famille des Geminivirus compte neuf genres y compris les Begomovirus, repartis selon l'organisation de leur génome et des vecteurs qui les transmettent à leurs plantes hôtes respectives. Les Begomovirus ont un génome de type bipartite ou monopartite et comptent 288 espèces (Brown *et al.*, 2015). Selon leur organisation génomique et de leur origine, ce genre a été divisé en deux groupes à savoir les Begomovirus du nouveau monde ou New World (NW) et les Begomovirus de l'ancien monde ou Old World (OW). Les Begomovirus de l'OW regroupent les Begomovirus originaires d'Asie, du sous-continent Indien et d'Afrique y compris les virus de la mosaïque. Ils sont soit bipartites, soit monopartites (Chiumenti *et al.*, 2021).

Les monopartites ont un unique composant génomique qui est l'ADN-A alors que les bipartites en ont deux à savoir l'ADN-A et l'ADN-B. Ces deux types d'ADN possèdent de nombreux gènes codant pour plusieurs protéines grâce au chevauchement des cadres ouverts de lecture (Open Reading Frames : ORFs), et à la présence de promoteurs bidirectionnels (**Figure 9**).

L'ADN-A porte une région intergénique des cadres ouverts de lecture appelés régions codantes ou Open Reading Frames (ORFs) dont certains sont chevauchants. L'ADN-A code pour six protéines chez les monopartites et les bipartites. Il s'agit des protéines AC1, AC2, AC3, AC4, AV1 et AV2 chez les bipartites et des protéines C1, C2, C3, C4, V1 et V2 chez les monopartites (Brown *et al.*, 2015). L'ADN-B des Begomovirus bipartites code pour 2 protéines à savoir BCl et BV1 (Sun *et al.*, 2020). Ces protéines jouent divers rôles dans le fonctionnement du virus parmi lesquels la reconstitution de la particule virale, la facilitation des mouvements et transports du virus, l'activation de la transcription ou de la réplication et l'expression des symptômes des maladies virales (Ferreira *et al.*, 2021). Les ADN A et B des Begomovirus bipartites possèdent des régions intergéniques d'environ 200 pb (**Figure 9**).

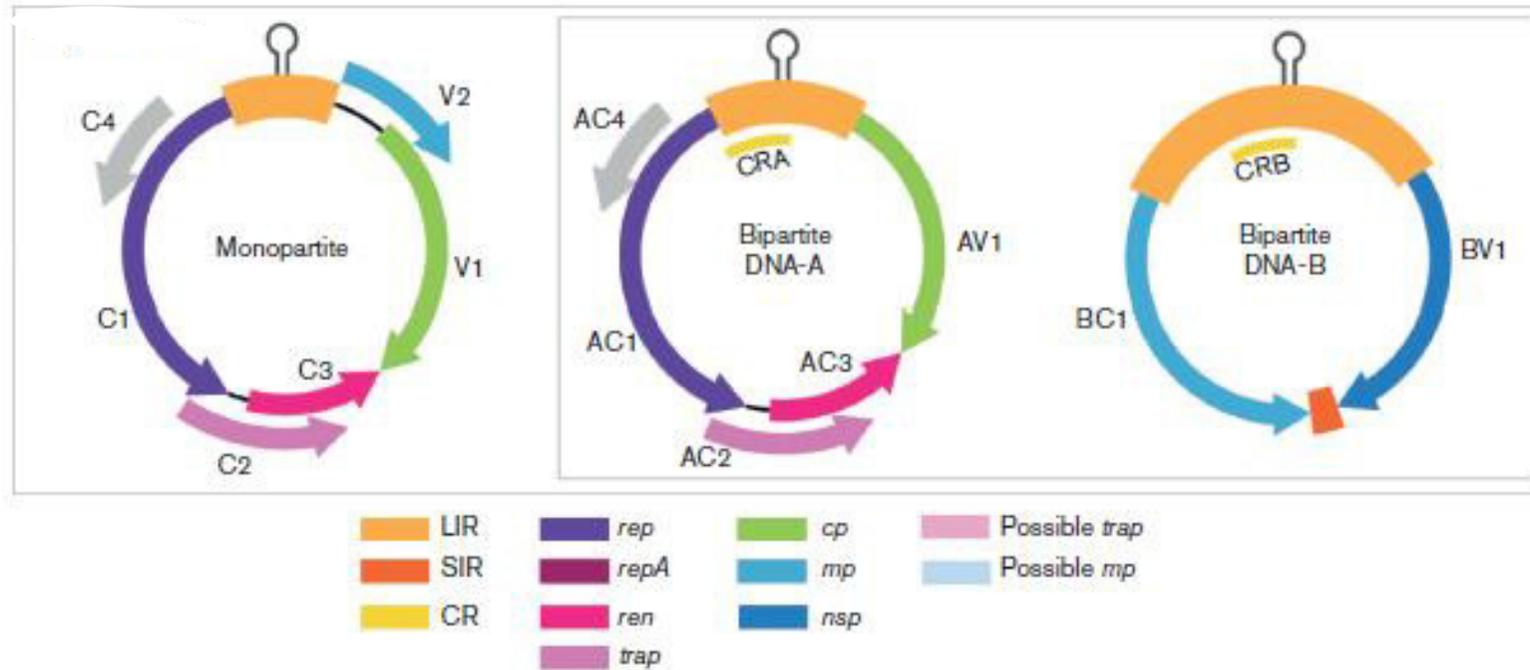


Figure 9 : Organisation du génome des Begomovirus (Brown *et al.*, 2015).

V1, V2, C1, C2, C3, C4, AV1, AC1, AC2, AC3, AC4, BC1 et BV1 : protéines ; **rep** : réplication ; **ren** : amélioration de la réplication ; **trap** : activation de la transcription ; **Cp** : la capside ; **mp** : mouvement du virus ; **nsp** : la navette nucléaire ; **LIR** : région intergénique longue ; **SIR** : région intergénique courte ; **CR** : région commune.

1.4.6. Origine de la diversité génétique des virus de la mosaïque du manioc

1.4.6.1. Mutations génétiques

Les mutations désignent une modification de l'ADN des virus sous l'influence d'un agent mutagène, transmise à la génération suivante. Ces mutations induites se produisent généralement au cours de la réplication, mais également, peuvent résulter de l'édition du matériel génétique ou de dommages spontanés ou ponctuels aux acides nucléiques. L'accumulation de celles-ci contribue fortement à la diversité génétique des virus chez les plantes (Singer *et al.*, 2021). Plus les taux de mutation sont élevés chez une espèce de virus, plus la diversité génétique est élevée chez cette dernière (Sanjuan & Domingo-Calap, 2016). Les mutations peuvent être des insertions/délétions (Indel) ou des substitutions de nucléotide non-complémentaire à l'ADN du virus au cours de sa duplication.

Les substitutions sont des mutations ponctuelles qui consistent au remplacement d'un nucléotide par un autre dans la séquence d'ADN. Elles peuvent être synonymes c'est-à-dire que les modifications de la séquence d'ADN n'affectent pas l'acide aminé traduit, ou non-synonymes lorsque les modifications de la séquence d'ADN entraînent une altération de la séquence d'acides aminés. La plupart des substitutions synonymes sont exemptes de sélection naturelle et fournissent donc un bon indice de mesure du temps de divergence entre deux espèces. Quant aux substitutions non synonymes, elles sont pour la plupart de nature délétère en raison de la sélection positive. La détection de ces deux types de substitutions peut donc fournir des informations sur le degré de sélection exercée sur un gène défini ou sur le niveau évolutif de l'espèce (Moutinho *et al.*, 2020). Les substitutions peuvent entraîner la modification des séquences génomiques des virus voire de l'information génétique pouvant ainsi aboutir à de nouveaux variants.

L'insertion ou la délétion (Indel) est l'intégration ou la suppression de nucléotides d'ADN. L'Indel produite dans une région codante provoque des mutations de décalage de cadre de lecture, qui se traduisent la plupart du temps par la production d'une protéine tronquée avec apparition d'un codon stop ou chimérique (Snyder & Champness, 2007).

1.4.6.2. Recombinaison génétique

La recombinaison génétique des virus est un échange d'information génétique entre deux virus à partir de leurs ADN (Pérez-Losada *et al.*, 2015). Elle aboutit à un individu ayant un nouveau génome dérivé de ceux des deux génomes parentaux. Bien que la recombinaison soit

la principale source d'émergence de nouvelles espèces et souches, la mise en place d'un virus recombinant dépend de son avantage sélectif par rapport à ses populations parentales (Singh & Yi, 2021). La recombinaison homologue entre deux souches défectueuses peut engendrer la naissance d'un virus viable et la recombinaison non-homologue facilite le réarrangement des gènes viraux et l'insertion ou l'acquisition de nouveaux gènes (Toualy *et al.*, 2014). Certains auteurs ont montré que la plupart des virus de la mosaïque du manioc actuels sont issus des composants génomiques A et B recombinants (Kwibuka *et al.*, 2021). En effet certaines régions des virus présentent une plus grande capacité à échanger du matériel génétique. Ces régions sont appelées points chauds ou "*hot spots*" de recombinaison. D'autres régions ont de faibles capacités à échanger le matériel génétique, celles-ci sont appelées points froids ou « *cold spots* » de recombinaison (Wang *et al.*, 2020).

1.4.7. Insectes vecteurs des virus de la mosaïque du manioc

Les mouches blanches sont des aleurodes appartenant aux sous-ordres des homoptères. Ils se nourrissent de la sève élaborée de plusieurs plantes principalement sur les jeunes feuilles en leur injectant les virus qu'ils véhiculent (Sani *et al.*, 2020). Parmi les aleurodes, l'un des plus répandu en Afrique est *Bemisia tabaci* qui le vecteur de nombreux virus pathogènes y compris ceux de la mosaïque du manioc (**Figure 10**). Ces mouches blanches sont répandues en Côte d'Ivoire et leur polyphagie joue un rôle très important dans la propagation des Begomovirus (Diabaté *et al.*, 2017). Les pertes de rendements chez le manioc causées par *Bemisia tabaci* atteignent parfois 65 % (Chavarriga-aguirre *et al.*, 2016). La taxonomie de l'insecte *Bemisia tabaci* selon Dourdaine (2014) est la suivante :

Règne	: Animal
Embranchement	: Arthropode
Ordre	: Nemptère
Sous-ordre	: Homoptère
Famille	: Aleyrodidée
Genre	: <i>Bemisia</i>
Espèce	: <i>Bemisia tabaci</i>



Figure 10 : *Bemisia tabaci*, insecte vecteur des virus de la mosaïque du manioc
(Sani *et al.*, 2020).

1.5. RELATION ENTRE PLANTES HÔTES ET AGENTS PATHOGENES

La manifestation d'une maladie chez la plante est déterminée par une interaction triple qui implique l'agent pathogène, la plante elle-même et le milieu. La plante peut résister aux agents pathogènes de deux manières à savoir par des mécanismes prédéterminés ou par des réponses du système immunitaire induites par l'infection.

La résistance d'une plante à un agent pathogène se définit par la réduction sur celle-ci de la croissance du pathogène, tandis que la tolérance décrit des plantes présentant moins de lésions dues à la maladie malgré des niveaux similaires de croissance du pathogène. On distingue deux types de résistance chez les plantes que sont la résistance passive et la résistance active. La résistance passive implique des barrières préformées ou constitutives dont la plante s'est dotée à la suite d'une adaptation tandis que la résistance active implique des barrières nouvellement formées en réponse à un quelconque stress.

La résistance peut être monogénique c'est-à-dire impactant un seul gène, ou polygénique traduisant l'interaction de plusieurs gènes. Dans le cas des résistances monogéniques, la protection de la plante peut être de courte durée puisque ce type de résistance peut être contournée par le pathogène. Alors que dans le cas des résistances polygéniques, la croissance du pathogène et sa progression sont limitées du fait de l'interaction des gènes résistants (Michel, 2017).

1.6. SÉLECTION DES GÉNOTYPES DE MANIOC RÉSISTANTS AUX VIRUS DE LA MOSAÏQUE

Initialement, les génotypes de manioc dits résistants à la mosaïque étaient ceux n'ayant présenté aucun symptôme de cette maladie pendant une période de culture et d'observation. Malheureusement, cette technique présente des limites car certaines plantes atteintes par les virus peuvent ne pas exprimer de symptômes du fait de leur tolérance à divers virus.

Aujourd'hui, le criblage des génotypes de manioc résistants à la mosaïque peut se faire en se basant sur l'identification des gènes de résistance de ces plantes aux virus à partir d'analyses moléculaires au laboratoire (Kawuki *et al.*, 2019). Plusieurs auteurs ont montré que cette technique est la plus appropriée pour la recherche de variétés résistantes aux différents pathogènes. Parmi les trois gènes de résistance aux virus de la mosaïque du manioc existants, seul le gène CMD2 paraît dominant. De ce fait, une plante de manioc n'est

considérée comme étant résistante à la mosaïque que lorsqu'elle possède ce gène (Houangue *et al.*, 2019). Cependant, cette résistance est plus prononcée chez des plantes possédant en plus du gène CMD2, les autres gènes de résistance CMD1 et/ou CMD3 (Kuria *et al.*, 2017).

1.6.1. Marqueurs génétiques

Un marqueur génétique est une portion d'ADN d'un organisme donné ou un sous-produit de cet ADN (De Meeûs, 2021). Il est également appelé locus du fait de sa position fixe sur le chromosome dans le génome de l'organisme étudié. Un locus peut correspondre à un gène c'est à dire codant pour une fonction quelconque ou correspondre à une zone non codante, à priori non fonctionnelle. Les marqueurs génétiques sont généralement utilisés pour les analyses phylogénétiques ou la recherche de gènes utiles. Pour De Meeûs (2021), un bon marqueur est polymorphe, reproductible et codominant. Celui-ci est régulièrement distribué le long du génome, discriminant donc capable de détecter des différences entre les individus apparentés. Egalement, ce marqueur n'est pas sujet aux influences environnementales. Enfin, le bon marqueur est neutre, économique, facilement manipulable, rapide et peu coûteux pour sa détection sur un grand nombre d'individus.

Il existe plusieurs marqueurs génétiques subdivisés en trois grands groupes à savoir les marqueurs cytoplasmiques, les marqueurs nucléaires dominants et les marqueurs nucléaires codominants.

1.6.1.1. Marqueurs cytoplasmiques

Les marqueurs cytoplasmiques sont des loci présents dans le génome mitochondrial. Ces marqueurs ont fait l'objet de nombreuses études chez les populations naturelles. Cependant, ceux-ci ne sont pas appropriés pour les études de génétique des populations car l'ADN mitochondrial (ou ADNmt) présente généralement une hérédité uniparentale, typiquement maternelle bien qu'une transmission paternelle existe chez certains organismes. De plus, les marqueurs cytoplasmiques sont des marqueurs haploïdes.

1.6.1.2. Marqueurs nucléaires dominants

Les marqueurs nucléaires dominants sont des marqueurs génétiques à partir desquels les individus homozygotes et hétérozygotes ne peuvent être distingués, le phénotype observé ne reflète pas forcément le génotype de l'individu étudié. Seul l'allèle dominant chez l'individu

hétérozygote peut s'exprimer. De ce fait, les marqueurs dominants ne sont pas idéaux pour les études de diversité génétiques des populations naturelles. Seules les fréquences phénotypiques peuvent être estimées. L'un des groupes de marqueurs dominants le plus connu est celui des RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Ils permettent l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe.

1.6.1.3. Marqueurs nucléaires codominants

Les marqueurs codominants offrent théoriquement l'accès à la structure génotypique complète des individus, c'est-à-dire que tous les génotypes (homozygotes et hétérozygotes) sont distinguables. Diverses catégories de marqueurs codominants existent parmi lesquelles les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) ou polymorphismes de longueur de fragments amplifiés, les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) ou polymorphismes de longueur des fragments de restriction, les SNP (Single-Nucleotide-Polymorphism) ou polymorphismes d'un seul nucléotide, les minisatellites et les microsatellites.

Les RFLP sont identifiés en utilisant les enzymes de restriction qui coupent l'ADN uniquement sur des « sites de restriction » déterminés pour détecter les allèles qui diffèrent en séquence à un site de restriction donné.

Les AFLP permettent de détecter les fragments de restriction d'ADN. Les séquences uniques détectées dans le génome sont des séquences d'ADN qui se produisent seulement une fois dans un génome, à une position connue. Les AFLP montrent généralement une dominance de l'hérédité, ce qui les disqualifie lors des études de génétique des populations.

Les SNP sont des variations des nucléotides simples qui ne changent pas la longueur globale de la séquence d'ADN dans la région. Ils se produisent partout dans le génome. Ils sont très abondants. Cependant, la plupart des SNP sont localisés dans les régions non codantes et n'ont aucun impact direct sur le phénotype d'un individu. Certains introduisent des mutations dans des séquences ou des régions d'expression influençant l'expression génique (promoteurs, amplificateurs) et peuvent donner lieu à des changements dans la structure ou la régulation des protéines.

Les minisatellites ont presque les mêmes caractéristiques que les microsatellites mis à part les répétitions qui s'étendent de dix à quelques centaines de paires de bases. Des études ont révélé que les microsatellites sont les marqueurs les mieux adaptés pour les études de génétique des populations. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils sont répartis sur tout le

génomique des eucaryotes, ont des motifs courts, une taille attendue du fragment, sont stables, spécifiques, reproductibles, abondants, codominants et polymorphes (Rabbi *et al.*, 2012).

a. Marqueurs microsatellites

Les microsatellites ou répétition simple de séquences de l'anglais *Simple sequences repeat* (SSR) sont de séquences d'ADN composées de motifs répétés en tandem. Ils sont de très petites tailles allant de 1 à 6 nucléotides et par conséquent facilement amplifiés par PCR utilisant les ADN extraits de différentes sources (Saeed *et al.*, 2016). Les microsatellites sont largement distribués dans les régions codantes et non codantes des génomes des eucaryotes et des procaryotes (Han *et al.*, 2015). Ils sont codominants, multi-alléliques, reproductibles, hautement polymorphes et possèdent une neutralité sélective (Qi *et al.*, 2020). Les microsatellites sont utilisés dans divers domaines de la biologie moléculaire tels que la biotechnologie et de la biologie évolutive. Ils sont largement utilisés dans les études de la diversité génétique des plantes. Egalement, les microsatellites présentent l'avantage de la détection facile par PCR de certains gènes de résistance aux pathogènes (Kamanda *et al.*, 2020).

1.6.2. Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne ou Polymerase Chain Reaction (PCR) a été inventée en 1987 par Mullis et ses collaborateurs. Elle consiste à amplifier sélectivement à l'aide d'un couple d'amorces ou marqueurs spécifiques, une séquence particulière d'ADN par action répétée d'une ADN Polymérase appelée Taq polymérase. En d'autres termes, la PCR consiste à répliquer *in vitro* des séquences spécifiques d'ADN. Elle permet de générer des dizaines de milliards d'exemplaires, un fragment d'ADN particulier qui est la séquence d'intérêt appelée ADN d'intérêt ou ADN cible, à partir d'un extrait d'ADN appelé ADN matriciel qui peut être de très petite quantité. Cette technique est basée sur l'utilisation de couples d'amorces qui s'hybrident de manière spécifique avec les extrémités 5' de l'ADN matrice.

Les amorces sont de courtes séquences d'ADN complémentaires des deux séquences flanquantes du fragment de l'ADN à étudier. Elles sont aussi appelées locus ou marqueur génétique. Les deux amorces se fixent à l'ADN sur les séquences qui leur sont complémentaires et permettent ainsi le début de la polymérisation. On parle d'ajustement

spécifique. La PCR se déroule en trois étapes caractérisées par des températures différentes. Ce sont la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

La dénaturation de l'ADN consiste en l'ouverture de sa double hélice. Elle se déroule à une forte température de 94°C. A cette température, l'ADN matriciel est dénaturé, les liaisons hydrogène ne pouvant pas se maintenir à une température supérieure à 80 °C, l'ADN double brin se dénature en ADN simple-brins appelés ADN monocaténares.

L'hybridation des amorces sur les ADN simple brin de part et d'autre du fragment cible, l'une avec une séquence située en 3' sur un brin, l'autre avec une séquence également située en 3' sur l'autre brin. Elle permet la fixation des amorces sens et antisens aux séquences d'ADN matrice. La diminution de la température à environ 60 °C permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. La température d'hybridation ou d'annealing dépend des amorces, précisément des bases qui les composent. Cette étape dure environ 1 minute. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.

L'élongation est l'étape au cours de laquelle la Taq polymérase, à une température d'environ 72 °C, se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les dNTP présents dans le mélange réactionnel. L'élongation se fait dans le sens 5'-3'. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées. Cette phase permet à l'enzyme polymérase de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température de 72 °C, dite température d'élongation. Elle dure environ une minute. L'ensemble de ces trois étapes constitue le cycle d'amplification. Ce cycle est répété entre 25 et 60 fois selon l'organisme à amplifier et les marqueurs utilisés.

1.6.3. Séquençage

Le séquençage de l'ADN est la détermination de la succession des nucléotides qui le composent. Il permet en effet, la lecture de l'ADN contenu dans les cellules de chaque échantillon biologique, pour produire un texte numérique composé d'une succession des lettres A ; C ; G ; et T qui ne sont que les initiales des bases Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine. Il existe plusieurs techniques de séquençage de l'ADN. Cependant, les deux premières techniques d'ailleurs les plus connues sont celle de Maxam-Gilbert et celle de Sanger décrites en 1977.

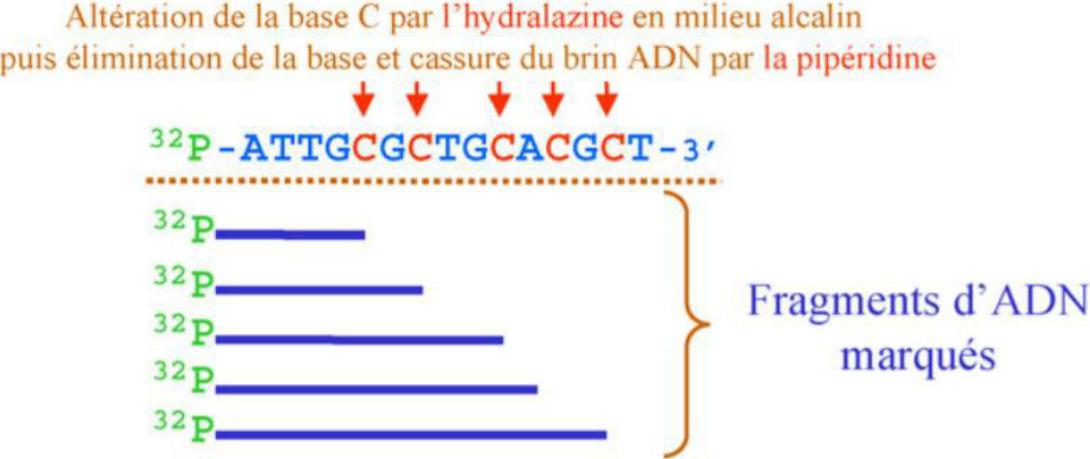
1.6.3.1. Technique de Maxam-Gilbert

Cette technique est basée sur la propriété de certains agents chimiques, l'hydrazine, le diméthylsulfate (DMS) et l'acide formique, de modifier les bases de l'ADN. Dans quatre tubes différents, l'ADN à séquencer est marqué à une extrémité par un marqueur radioactif qui est le phosphore radioactif P32 (**Figure 11a**). Dans un second temps, la pipéridine est ajoutée et « casse » les brins d'ADN au niveau des bases modifiées. Les agents chimiques sont utilisés dans des conditions telles qu'ils n'agissent qu'avec un faible pourcentage des bases de l'ADN étudié. Le DMS agit au niveau des bases « G ». L'acide formique agit au niveau des bases « A+G ». L'hydrazine agit au niveau des bases « C+T » ; en milieu alcalin, l'hydrazine agit uniquement au niveau des « C » (Lamoril *et al.*, 2008). Le produit de séquençage est déposé sur un gel d'acrylamide, puis la séquence lue après autoradiographie dans le sens 5→3 de bas en haut du gel (**Figure 11b**).

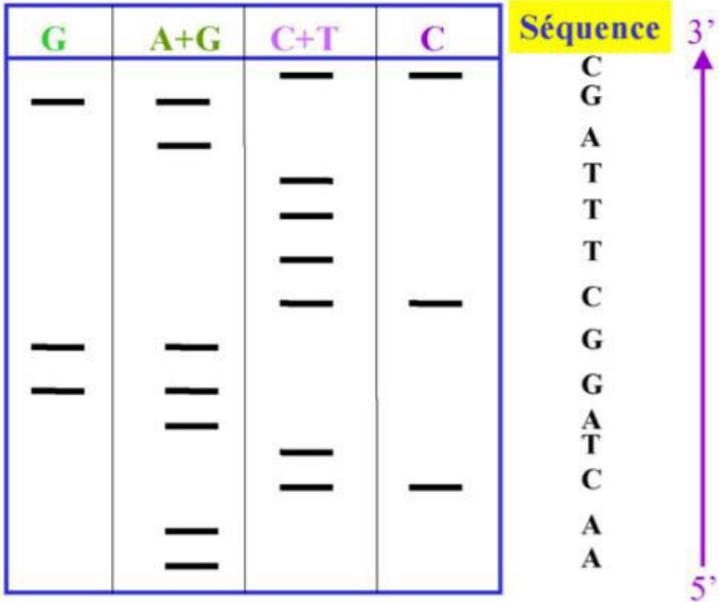
1.6.3.2. Technique de Sanger

Selon le principe de la technique de séquençage de Sanger *et al.* (1977), dans un premier temps, il est nécessaire d'amplifier l'ADN cible par PCR, puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin. Ce principe est basé sur l'incorporation aléatoire par une ADN polymérase de didéoxynucléotides (ddNTP) interrupteurs de chaîne. Ces ddNTP que sont le ddATP, le ddTTP, le ddCTP et le ddGTP diffèrent des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) par la présence d'un hydrogène (H) à leur extrémité 3' à la place d'un groupement hydroxyle (-OH). Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé de façon aléatoire dans la chaîne et le nucléotide à synthétiser, entraînant ainsi l'arrêt de l'allongement de la chaîne. Ainsi, en plus des quatre dNTP (dCTP, dATP, dGTP, dTTP), sont aussi présents dans le milieu des ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP). Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale permet de différencier les fluorochromes, d'associer la base correspondante et donc de définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial ou séquencé. Autrement, les fragments étant de tailles différentes et la résolution allant jusqu'à une base de différence, il sera simple de recueillir ce signal et en déduire la séquence. Une fois la réaction de séquençage terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par électrophorèse (**Figure 12**). La variabilité des nucléotides observés entre les séquences d'un gène ou d'un génome viral entre les individus d'une même espèce ou entre les espèces virales

permet d'étudier leur diversité génétique et d'inférer leurs relations de parenté ou phylogénétiques (Ndunguru *et al.*, 2015). La diffusion de la méthode de Sanger, la commercialisation d'automates utilisant des fluorophores quatre couleurs ainsi que le déploiement de la PCR dans les laboratoires ont considérablement amélioré les procédures de séquençage. Aujourd'hui, la technique de Sanger a révolutionné le monde de la biologie moléculaire en permettant de décrypter différents génomes dont le génome humain. Elle est à ce jour la principale méthode de séquençage utilisée dans les laboratoires.



a : Marquage des fragments d'ADN



Séquence: 5' -AACTAGGCTTTAGC-3'

b : Autoradiogramme des séquences produites

Figure 11 : Séquençage selon la méthode de Maxam-Gilbert (Lamoril *et al.*, 2008).

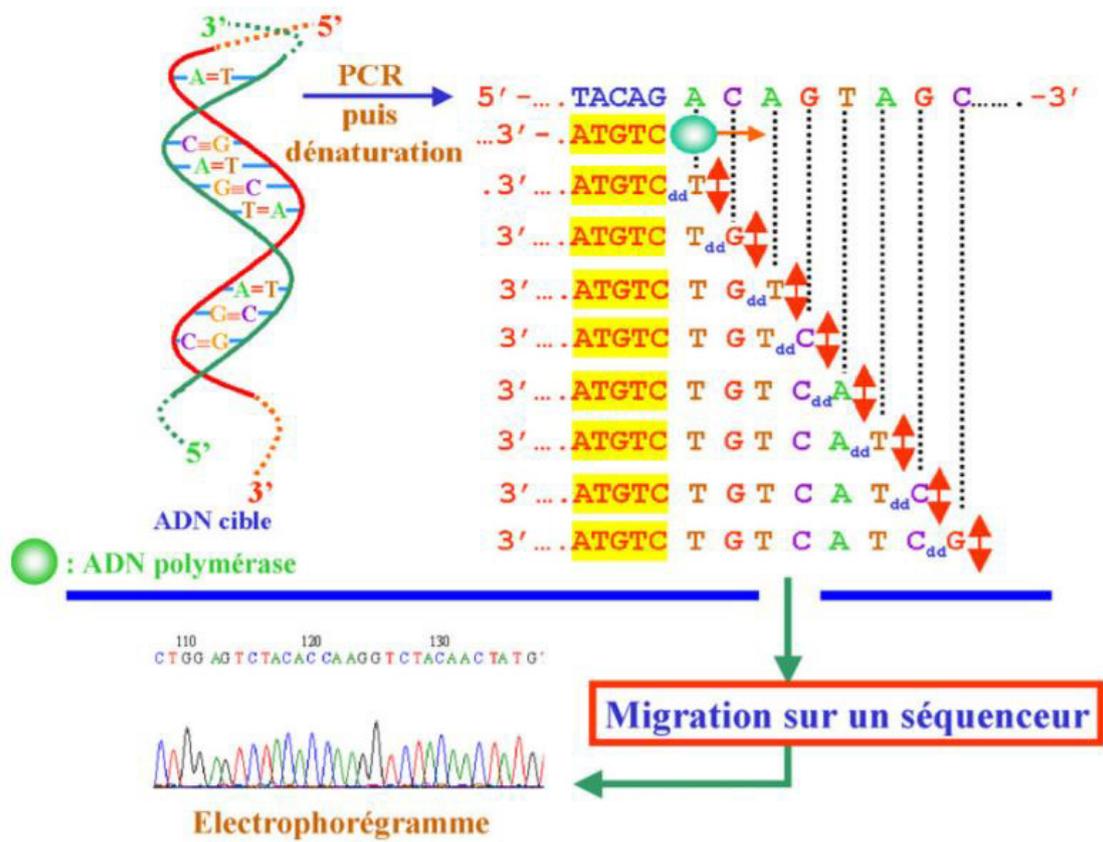


Figure 12 : Séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008).

PARTIE II :
MATERIEL ET METHODES

2.1. SITES D'ÉCHANTILLONNAGE

Après une prospection, cinq (5) villages ont été choisis dans chacun des départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa en tenant compte de l'abondance des variétés cultivées. Au total, 15 villages représentatifs des sites d'échantillonnage ont été retenus pour cette étude. Ce sont Djebonoua, Diabo, Kongodekro, Kouakouyebouekro et Kekrekouakoukro pour le département de Bouaké. Lolobo, Assanou, Oufouediékro, N'gbessou et Akpessékro sont les villages retenus pour le département de Yamoussoukro. Dans le département de Daloa, les villages retenus sont Zakoua, Kibouo, Zaguiguia, Bribouo et Zakaria (**Figure 13**). Dans chaque site, le nombre de champs choisis était compris entre 8 et 15 en tenant compte d'une distance imaginaire d'au moins 300 mètres entre les champs.

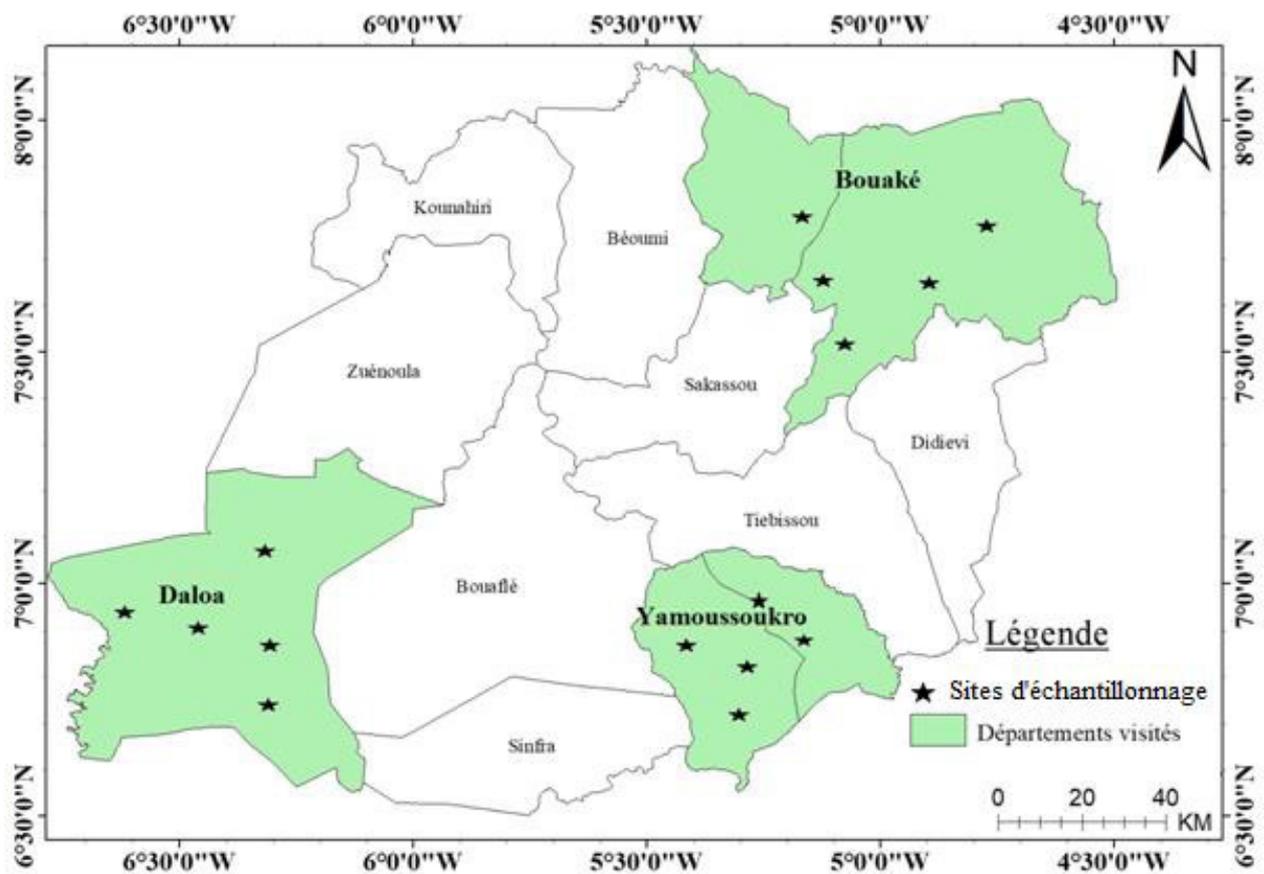


Figure 13 : Localisation des sites d'échantillonnage (INS, 2015)

2.2. MATERIELS

2.2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé dans cette étude est composé de jeunes feuilles de manioc prélevées sur des plantes diagnostiquées *in situ*, en se servant de l'échelle proposée par Cours sur les symptômes de la mosaïque (Bakuzezia, 2019). Ce sont des jeunes feuilles symptomatiques c'est-à-dire présentant des symptômes de la mosaïque du manioc et des feuilles asymptomatiques (**Figure 14**).



Figure 14 : Matériel biologique

a : plante de manioc asymptomatique ; b : plante de manioc symptomatique

2.2.2. Matériel technique

2.2.2.1. Matériel d'échantillonnage

Le matériel d'échantillonnage était composé de fiches d'enquête (**Annexe 1**) préalablement établies pour la collecte d'une partie des données. Ces enquêtes portaient essentiellement sur la provenance des boutures, l'âge du champ, la saison de collecte des échantillons, le nombre de plantes symptomatiques dans un champ circonscrit et le niveau de sévérité de la mosaïque. Le matériel d'échantillonnage comportait également des enveloppes étiquetées pour le

transport des échantillons de feuilles prélevées (**Annexe 2**). Enfin, un appareil photographique a été utilisé pour les prises de vue ainsi qu'un GPS pour la localisation des sites (**Annexe 3**).

2.2.2.2. Matériel d'analyse moléculaire et génétique

Plusieurs matériels ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN génomique (**Figure 15**). Ce sont :

- ✓ Un mortier en porcelaine qui a servi au broyage des échantillons de feuilles prélevées ;
- ✓ Une balance de précision 0,01 g (Adventurer™ Pro AV 212) pour les pesées ;
- ✓ Des tubes Eppendorf de 1,5 ml
- ✓ Des micropipettes (Eppendorf PhysioCare, France) et de cônes (Eppendorf, GERMANY) utilisés pour le prélèvement des solutions ;
- ✓ Un vortex (ERFLAM VM-10, MARSEILLE) pour l'homogénéisation des solutions ;
- ✓ Une fiole erlenmeyer et un agitateur magnétique pour la préparation du gel d'agarose ;
- ✓ Une hotte chimique pour la manipulation des produits volatiles, toxiques et cancérogènes ;
- ✓ Un portoir pour le port des échantillons contenus dans les tubes pendant les manipulations ;
- ✓ Une centrifugeuse (VWR 17R, GERMANY) pour la centrifugation de solutions ;
- ✓ Un bain marie (Fisher Scientific Polytests 12) pour l'incubation des produits ;
- ✓ Un congélateur d'une température de -20 °C et un réfrigérateur de 4°C pour la conservation des échantillons et de certains produits.

Pour les réactions de polymérisation en chaîne ou *Polymerase chain reaction* (PCR), le matériel utilisé se compose de divers appareils (**Figure 16**). Il s'agit essentiellement de :

- ✓ Un thermocycleur (BioRad T100™, SINGAPOUR) pour l'amplification de l'ADN ;
- ✓ Une plaque chauffante (ERFLAM MSH-20D, MARSEILLE) a servi à la préparation du gel d'agarose ;
- ✓ Une cuve à électrophorèse (Consort EV 245) pour la migration de l'ADN ;
- ✓ Un transilluminateur à lumière ultra-violet (Cleaver Scientific Ltd Microdoc) pour la visualisation de l'ADN génomique et les produits PCR après leur migration sur gel d'agarose.

Ces équipements sont disponibles à l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) de l'Université Jean Lorougnon Guédé.

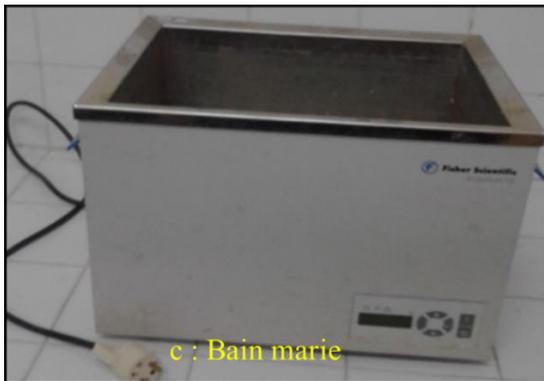
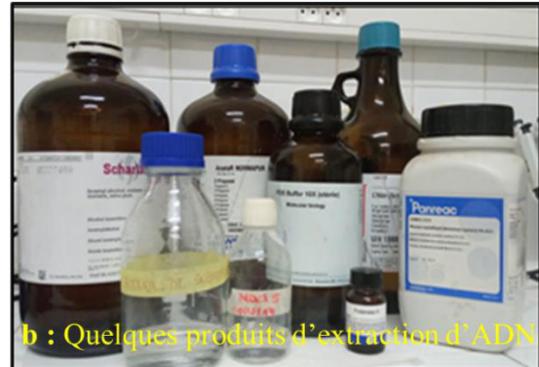


Figure 15 : Quelques matériels d'extraction de l'ADN génomique

a : des micropipettes, des cônes et un mortier; b: des produits d'extraction d'ADN génomique; c: un bain marie; d : des tubes Eppendorf; e : une centrifugeuse.



Figure 16 : Quelques matériels d'analyse PCR

a : un thermocycleur ; **b** : un transilluminateur à rayons ultraviolets ; **c** : une cuve à électrophorèse.

2.3. METHODES

2.3.1. Approche participative

En vue d'obtenir l'approbation des cultivateurs sur le travail à réaliser dans leurs champs et aussi d'identifier un nombre élevé de variétés de manioc, des rencontres ont été organisées d'abord entre l'équipe de recherche de cette thèse et les responsables agricoles des zones prospectées. Il s'agit entre autres du Chef du programme « Plantes à racines et tubercules » du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) de Bouaké, du Sous-directeur chargé des plantes à tubercules de l'Agence National d'Appui au Développement Rural (ANADER) de Yamoussoukro et du Directeur de la Chambre d'Agriculture de Daloa qui ont bien voulu apporter leur contribution à la réalisation de cette étude. A l'issue de ces rencontres, dans chaque département, un technicien a été désigné en tant que guide, pour conduire l'équipe dans les différents villages à prospecter. Des rencontres ont aussi eu lieu avec des Présidents d'Associations ou coopératives et des cultivateurs de manioc pour des entretiens sur la portée de l'étude. Toutes ces personnes rencontrées ont contribué à l'identification des villages et des champs répondant aux critères prédéfinis. Cette phase de sensibilisation a permis de mobiliser les cultivateurs de manioc des zones qui ont favorablement répondu aux requêtes de l'équipe.

2.3.2. Collecte de données

Les données ont été collectées dans les différents villages choisis au cours de deux saisons à savoir la saison sèche et la saison pluvieuse. Concernant la saison sèche, les collectes se sont déroulées du mois de Novembre 2019 à Février 2020 et pour la saison pluvieuse, la collecte a eu lieu d'Avril au mois de Juin 2020 et du mois de Septembre au mois d'Octobre 2020. La méthode utilisée pour l'échantillonnage est celle des diagonales X de Sseruwagi (Sseruwagi *et al.*, 2004). Elle a consisté à circonscrire un champ donné, de préférence dans un carré comportant un total de trente (30) plantes pour les champs dont le nombre de plantes est supérieur ou égal à ce nombre. Ainsi, les plantes considérées pour l'étude étaient celles se trouvant sur les deux diagonales du carré, en raison de 15 plantes par diagonale. La collecte de données a été réalisée en deux étapes ; la première a consisté à renseigner les fiches d'enquête et la deuxième, à prélever des échantillons de jeunes feuilles de manioc. Les échantillonnages se déroulaient les matinées de 7h à 11h dans le but de recueillir des jeunes

feuilles fraîches. Dans un champ donné et pour chaque variété, des échantillons de jeunes feuilles de manioc symptomatique et/ou asymptomatique étaient collectés selon leur existence dans le champ suivant la méthode décrite par Sseruwagi *et al.* (2004).

Un total de 200 champs de manioc a été prospecté. Il s'agit de 65 champs dans le département de Bouaké, 65 champs dans le département de Daloa et 70 dans le département de Yamoussoukro. Parmi ces champs, 130 disposaient à la fois de plantes symptomatiques et asymptomatiques alors que les 70 autres champs ne possédaient que des plantes asymptomatiques à la mosaïque. Un total de 330 échantillons de feuilles de manioc a été collecté pour cette étude. Ce sont 130 échantillons de feuilles symptomatiques et 200 échantillons asymptomatiques.

Tous les échantillons collectés ont été rangés chacun dans une enveloppe étiquetée puis conservés dans des endroits secs à la température ambiante tout le long de la mission d'échantillonnage, qui durait 5 jours maximum. Ceux-ci étaient par la suite transportés au laboratoire de l'Unité de Recherche en Génétique et Epidémiologie Moléculaire (URGEM) de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLoG) pour les analyses moléculaires et génétiques. Une fois au laboratoire, les échantillons étaient rangés au congélateur à -80 °C afin d'éviter leur dégradation puis sortis au fur et à mesure pour les analyses moléculaires et génétiques.

2.3.2.1. Epidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire

Pour répondre à l'objectif spécifique 1 de cette étude, des enquêtes ont été nécessaires ainsi que la collecte de jeunes feuilles de manioc asymptomatiques et symptomatiques. Les enquêtes ont consisté non seulement en des questionnements mais également en des observations faites au champ. Ces données concernaient essentiellement le nombre de plantes apparemment infectées, les niveaux de sévérité de la mosaïque du manioc observés, les noms des variétés présentes dans le champ, l'âge du champ, l'origine des boutures cultivées et la saison au cours de laquelle l'échantillonnage est effectué. Les niveaux de sévérité de la maladie sont décrits suivant l'échelle de « Cours » (Bakuzezia, 2019). Suivant cette échelle, les plantes asymptomatiques sont dites de Niveau de sévérité 1, c'est-à-dire qu'elles ne présentent aucun symptôme et le Niveau 5 désigne le niveau de sévérité le plus élevé (**Tableau II**).

Deux cent (200) échantillons de feuilles ont été utilisés dont 130 provenant des plantes symptomatiques et 70 des plantes asymptomatiques. Parmi ceux-ci, 42 ont été collectés pendant la saison des pluies et 158 échantillons pendant la saison sèche. Les champs étaient composés de quatre variétés de manioc améliorées identifiées dans les trois zones d'étude à savoir Yavo, TMS4(2), Bocou1 et Bocou2, trois variétés étrangères appelées Monrovia, Togolais et Accra-brankye en provenance de Bouaké, Daloa et Yamoussoukro respectivement et des variétés traditionnelles dont les plus répandues sont Yacé, Bonoua et Zoklo.

Tableau II : Description des niveaux de sévérité de la mosaïque du manioc (Bakuzezia, 2019)

Niveaux	Descriptions des symptômes
Niveau 1	Pas de symptômes visibles sur les feuilles
Niveau 2	Apparition de légères plages chlorotiques sur les feuilles
Niveau 3	Plages chlorotiques sur presque toutes les feuilles (2/3 de feuilles de la plante) sans déformation de la surface foliaire
Niveau 4	Plaques chlorotiques couvrant la majeure partie de la feuille, accompagnées de déformation (recroquevillement) et réduction de la surface foliaire
Niveau 5	Mosaïque sévère, feuilles tordues, déformées et pratiquement réduites aux nervures

2.3.2.2. Evaluation de la diversité et structuration génétique des variétés améliorées et traditionnelles de manioc

Pour cet objectif, seulement des jeunes feuilles de manioc ont été nécessaires. Il s'agit des 200 échantillons de feuilles asymptomatiques collectées dans les 200 champs de manioc prospectés au cours de cette étude.

2.3.2.3. Identification de génotypes de manioc capables de résister aux mécanismes des virus, à partir du criblage des gènes de résistance à la mosaïque

Comme pour l'objectif spécifique 2, pour répondre à l'objectif spécifique 3 assigné à l'étude, uniquement les jeunes feuilles asymptomatiques collectées dans les 200 champs de manioc ont été utilisées. Il s'agit de 65 échantillons pour le département de Bouaké, 65 pour le département de Daloa et 70 pour le département de Yamoussoukro.

2.3.3. Identification des variétés et codification des échantillons

Au cours de l'échantillonnage, les variétés améliorées et certaines variétés traditionnelles couramment cultivées telles que Yacé, Bonoua et Zoklo étaient reconnaissables et facilement identifiées. En ce qui concerne les variétés traditionnelles peu cultivées, l'identification a été faite par les producteurs eux-mêmes. Certaines variétés traditionnelles n'ayant pas pu être identifiées et nommées, ont été désignées par le terme « inconnue ». Le code attribué à chaque échantillon était composé du nom de la variété suivi de l'ordre dans lequel cet échantillon a été collecté pour un même village s'il y en a eu plusieurs, l'abréviation du village et la première lettre du département dans lequel cet échantillon a été collecté. A titre d'exemple, on peut citer l'échantillon Trokou2_DjB qui se traduit par la variété Trokou collectée pour la deuxième fois dans le village Djebonoua du département de Bouaké et l'échantillon Patate_ZD qui correspond à la variété Patate collectée dans le village Zakoua dans le département de Daloa. La date de la collecte de l'échantillon figure également sur chaque enveloppe.

2.3.4. Analyses moléculaires et génétiques du manioc et des virus de la mosaïque du manioc

2.3.4.1. Extraction d'ADN

Le principe de l'extraction d'ADN génomique réalisée est basé sur la lyse des membranes cellulaires, l'inactivation des nucléases cellulaires, l'élimination des résidus de contaminant par digestion enzymatique et l'élution ou la sédimentation de l'ADN purifié. Le protocole utilisé est celui de phénol-chloroforme (Rustérucchi *et al.*, 2008)

Pour chaque échantillon, 2 g de feuille ont été découpés en petits morceaux et broyés dans un mortier stérile avec 1g de NaCl cristallisé afin de faciliter cette action et de permettre la dissolution de l'ADN. Ce broyat a été transvasé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL identifié au numéro de l'échantillon, contenant le tampon de lyse des cellules (400 µL PBS + 400 µL ASL). Les tubes ont été incubés à 60°C au bain-marie pendant 45 minutes. Après centrifugation, 500 µL du surnageant ont été prélevés, auxquels l'on a ajouté un volume égal de la composition Phénol Chloroforme alcool-isoamyl, à des proportions 25 : 24 : 1, soit 250 µL de phénol, 240 µL de Chloroforme et 10 µL d'alcool-isoamyl. Cette action a été menée sous une hotte chimique à cause du caractère polluant des produits. Après centrifugation, à la phase aqueuse, un mélange de chloroforme alcool-isoamyl à des proportions 48 : 2, soit 480 µL de chloroforme et 20 µL d'alcool-isoamyl a été ajouté. Au surnageant, il a été ajouté de l'isopropanol préalablement conservé au congélateur à -20°C pour permettre la précipitation des acides nucléiques. Après une centrifugation, le surnageant a été versé et le culot obtenu a été laissé sécher pendant 5 min, auquel l'on a ajouté de l'eau pure et de la protéinase k pour l'élimination des protéines. Ce mélange a été incubé à 37 °C pendant 45 min. Après cette phase, l'étape de phénol chloroforme a été répétée et les tubes ont été conservés à -20°C pendant toute la nuit. Le lendemain, après centrifugation, l'ADN obtenu a été lavé avec de l'éthanol 70 % puis séché à l'air libre pendant 8h. L'ADN a alors été suspendu dans du tampon d'élution (TE) préparé à partir du Tris (50 mM) et de l'EDTA (50 mM) puis conservé à -20°C pour la suite des travaux (**Annexe 4**).

2.3.4.1.1. Préparation du gel d'agarose

Le gel d'agarose était préparé à partir de poudre d'agarose, de tampon TBE 0,5X (45 mM Tris-borate ; 1.0 mM EDTA) et de Bromure d'Ethidium (BET 5 mg/ml). Pour ce faire, 1g

d'agarose était pesé et renversé dans un erlenmeyer contenant un agitateur magnétique, auquel 100 ml du tampon TBE (0,5X) étaient ajoutés. Le mélange était porté à ébullition sur une plaque chauffante réglée à 180 °C et à 150 tours/min. Trente (30) min après, lorsque le milieu devient incolore, la température était arrêtée pour la laisser baisser. Lorsque la solution atteignait 60 °C, 5 µL de BET y était ajoutée. En effet, le BET est un agent chimique qui s'intercale entre les bases azotées permettant ainsi de visualiser l'ADN à travers la fluorescence de la lumière UV du transilluminateur afin d'estimer la taille du fragment amplifié. Après homogénéisation, la solution était coulée dans les cuves à électrophorèse munies de peignes dont les dents servaient à former les puits du gel. Après refroidissement, le gel solidifié était utilisé pour les électrophorèses.

2.3.4.1.2. Evaluation de la quantité et de la qualité des ADN extraits

Après l'extraction, la qualité et la quantité de l'ADN étaient évaluées par électrophorèse, sur du gel d'agarose préparé à 1 %. Pour ce faire, le gel d'agarose était déposé dans la cuve à électrophorèse rempli aux 2/3 de son volume avec le tampon TBE (0,5X). Sept (7) µL de solution d'ADN extrait et 3 µL de Bleu de charge qui est un colorant, étaient mélangées sur du papier parafilm et déposées dans chaque puits du gel. Un volume de 2 µl du marqueur de taille (1 Kb, Quick-Load® DNA ladder) était mélangé au Bleu de charge puis déposé dans l'un des puits, de préférence le premier, du gel d'agarose afin de mesurer la taille des fragments d'ADN obtenus. Enfin, un témoin négatif contenant de l'eau stérile et un témoin positif contenant de l'ADN testé au préalable, étaient déposés dans des puits afin de juger des éventuelles contaminations. La migration se faisait sous une tension de 100 volts pendant 45 minutes. L'ADN total a alors été visualisé au transilluminateur à lumière UV. La qualité de cet ADN est jugée en comparant son intensité à celle du témoin positif.

2.3.4.2. Amplification de l'ADN par PCR

Dans cette étude, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée suivant trois objectifs impliqués respectivement dans les trois objectifs spécifiques de l'étude. Ce sont : (i) la détection de souches virales de la mosaïque du manioc, (ii) le génotypage des variétés de manioc pour l'étude de la diversité génétique et (iii) l'identification des gènes de résistance aux virus de la mosaïque chez les variétés de manioc collectées.

2.3.4.2.1. Détection des souches virales de la mosaïque

L'identification des souches virales de la mosaïque du manioc a été réalisée à partir de trois couples d'amorces à savoir (1) JSP001/JSP002, (2) ACMV-AL1/F/ACMV-AR0/R et (3) JSP001/JSP003. Les couples (1) et (2) sont admis pour la détection du virus ACMV (African Cassava Mosaic Virus) et le couple (3) pour la détection du virus EACMV (East African Cassava Mosaic Virus). Les caractéristiques de ces marqueurs sont consignées dans le **tableau III**. Les réactions d'amplification ont été réalisées dans un volume final de 50 μL contenant : 2,6 μL de chaque amorce de concentration 10 pmol/ μL (Eurogentec, Belgique), 5 μL de tampon MgCl_2 de concentration 1x (Qiagen), 3,2 μL de désoxyribonucléoside-triphosphates (dNTPs, 200 μM), 0,1 μL de *Taq* polymérase (Qiagen), 31,5 μL d'eau ultra pure et 5 μL d'ADN génomique. Deux programmes ont été utilisés. Pour les couples d'amorces JSP001/JSP002 et JSP001/JSP003, le programme d'amplification était le suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C suivie de 35 cycles comprenant une autre dénaturation en 45 secondes à 94 °C, une hybridation pendant 45 secondes à 55°C et une élongation en 55 secondes et 72 °C puis une élongation finale pendant 10 minutes à 72 °C.

Pour l'amplification des virus à partir du couple d'amorce ACMV-AL1/F/ACMV-AR0/R, le programme d'amplification comprenait une dénaturation initiale de 2 minutes à 94 °C, 35 cycles comportant une dénaturation en 30 secondes à 94 °C, une hybridation pendant 30 secondes à 55 °C et une élongation en 1 minute et 72 °C, enfin une élongation définitive de 10 minutes à 72 °C.

Tableau III : Marqueurs utilisés pour le diagnostic des souches virales de la mosaïque du manioc

Amorces	Séquences des amorces (sens et anti-sens)	TA (pb)	Virus détectés	Références
JSP001	5'ATGTCGAAGCGACCAGGAGAT 3'	783	ACMV	Dansou-Kodjo <i>et al.</i> , 2018
JSP002	5'TGTTTATTAATTGCCAATACT 3'			
JSP001	5'ATGTCGAAGCGACCAGGAGAT 3'	780	EACMV	Mivedor <i>et al.</i> , 2020
JSP003	5'CCTTTATTAATTTGTCACACTGC 3'			
ACMV- AL1/F	5'GCGGAATCCCTAACATTAT 3'			
ACMV- AR0/R	5'GCTCGTATGTATCCTCTAAGGCCTG 3'	1030	ACMV	Traoré, 2017

TA : taille attendue du fragment d'ADN ; **pb** : paire de bases, **ACMV** : African Cassava Mosaic Virus ; **EACMV** : East African Cassava Mosaic Virus

2.3.4.2.2. Génotypage des échantillons de manioc collectés

Afin de mettre en évidence la diversité et la structuration génétique des variétés de manioc, des marqueurs microsatellites ont été utilisés. Il s'agit les couples SSRY61F/ SSRY61R, SSRY100F/ SSRY100R, EME20F/ EME20R, EME222F/ EME222R, EME303F/ EME303R. Les caractéristiques de ces marqueurs sont consignées dans le **Tableau IV**. Les réactions PCR ont eu lieu dans un volume final de 25 μL . Ce volume était composé de 1,3 μL de chaque amorce (F et R) à une concentration de 10 pmol/ μL (Eurogentec, Belgique), 2,5 μL de tampon MgCl_2 de concentration 1x (Qiagen), 1,6 μL de désoxyribonucléoside-triphosphates (dNTPs, 200 μM), 0,1 μL de *Taq* polymérase (Qiagen), 15,7 μL d'eau ultra pure et 5 μL d'ADN génomique. Les conditions d'amplification étaient les suivantes : une dénaturation initiale de 5 minutes à 94 °C, 35 cycles composés d'une dénaturation de 45 secondes à 94 °C, une hybridation d'1 minute à 58 °C et une élongation d'une minute à 72 °C. L'amplification se termine par une élongation finale de 10 min à 72 °C.

Tableau IV : Marqueurs utilisés pour le génotypage des échantillons de manioc collectés

Amorces	Séquence des amorces (sens et anti-sens)	TA (pb)
EME20	5'CAGCACCAGTCAACATTCCTG 3' 5'CCTTCTGGCAATGAGCTCATG 3'	Variables
EME303	5'ATTGGGAAGCATTGGTGTAGAA 3' 5'CAAAACAAAACCCTGTGACCT 3'	Variables
EME222	5'CCCACTCTCTGTCCACTTC3' 5'CTTCGACTCTTCTTTACGGG 3'	Variables
SSRY100	5'ATCCTTGCCTGACATTTTGC 3' 5'TTCGAGAGTCCAATTGTTG 3'	Variables
SSRY61	5'GGCTGCTTTACCTTCTACTCAA 3' 5'CAAGAACGCCAATATGCTGA 3'	Variables

TA : tailles d'allèles ; pb : paire de bases

2.3.4.2.3. Amplification des gènes de résistance aux virus de la mosaïque

L'identification des variétés de manioc résistants à la mosaïque a été possible grâce à des marqueurs microsatellites spécifiques (**Tableau V**). Il s'agit des couples d'amorce NS169F/R, NS198F/R, et SSRY40F/R (Carmo *et al.*, 2015). Parmi ces amorces, le couple SSRY40F/R permet d'identifier le gène de résistance CMD1, le couple NS169F/R est spécifique au gène de résistance CMD2 et le couple NS198F/R a servi à la détection du gène de résistance CMD3. Le mix pour la PCR était préparé dans un volume total de 25 µL. Ce mix contenait 1,3 µL de chaque amorce de concentration 10 pmol/µL (Eurogentec, Belgique), 2,5 µL de tampon MgCl₂ de concentration 1x (Qiagen), 1,6 µL de désoxyribonucléoside-triphosphates (dNTPs, 200 µM), 0,1 µL de *Taq* polymérase (Qiagen) et 15,7 µL d'eau ultra pure auxquels l'on ajoutait 2,5 µL d'ADN génomique.

Le programme d'amplification des gènes de résistance aux virus de la mosaïque est le suivant : une dénaturation initiale de 5 minutes à 94 °C, 30 cycles comportant une dénaturation de 40s à 94°C, une hybridation de 40s à 55 °C et une élongation d'une minute à 72 °C. La PCR se termine par une élongation définitive de 5 min à 72 °C.

Tableau V : Marqueurs d'identification des gènes de résistance à la mosaïque du manioc

Amorces	Séquence des amorces (sens et anti-sens)	TA (pb)	Références
SSRY40	5'TGCATCATGGTCCACTCACT 3' 5'CATTCTTTTTTCGGCATTCCAT 3'	293	Carmo <i>et al.</i> , 2015
NS169	5'GTGCGAAATGGAAATCAATG 3' 5'GCCTTCTCAGCATATGGAGC 3'	319	Kuria <i>et al.</i> , 2017
NS198	5'TGCAGCATATCAGGCATTTC 3' 5'TGGAAGCATGCATCAAATGT 3'	196	Beyene <i>et al.</i> , 2016

TA : taille du fragment d'ADN ; pb : paire de bases

2.3.4.3. Electrophorèse et visualisation des produits d'amplification

a. Electrophorèse des produits de PCR

Après chaque amplification, les produits PCR étaient soumis à une migration par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %. Le principe de cette technique est de séparer des fragments d'ADN en fonction de leurs tailles dans un champ électrique. L'électrophorèse était réalisée sous une tension de 100 volts pendant 45 minutes. Pour ce faire, 7 μ L de chaque produit PCR était mélangé à 3 μ L de bleu de charge avant d'être déposé dans l'un des puits. Le marqueur de taille 100 pb a été utilisé. Ce marqueur a servi à mesurer la taille d'allèles des ADN amplifiés.

b. Révélation des fragments d'ADN amplifiés

Après l'électrophorèse, les gels de migration ont été placés dans le transilluminateur photographique à lumière ultraviolet (UV) pour la révélation des tailles des ADN amplifiés. Grâce au BET incorporé au gel d'agarose, ceux-ci étaient visualisés à partir de la fluorescence de la lumière UV du transilluminateur. Les tailles des bandes obtenues ont été déterminées à partir des différentes tailles présentées par le marqueur de poids moléculaire. Les résultats de chaque PCR étaient validés lorsque les empreintes génomiques observées sur l'écran du transilluminateur correspondaient à la taille attendue pour chaque marqueur. Autrement, pour la détection des virus et des gènes de résistance, les échantillons pour lesquels la taille de la bande correspondait à celle du témoin positif ou à la taille attendue sont qualifiés de positifs pour le gène étudié. Les échantillons pour lesquels il n'y avait pas de bandes sont considérés comme étant négatifs. Aussi, les résultats étaient validés lorsque le témoin négatif (ne contenant pas d'ADN) était négatif et le témoin positif était positif.

2.3.4.4. Séquençage des souches de virus de la mosaïque du manioc identifiées

Après l'amplification, des volumes d'environ 45 μ L de 25 échantillons positifs au virus ACMV choisis au hasard ont été transférés à Hong-Kong pour le séquençage. Celui-ci a été réalisé dans le sens forward et reverse par la société BGI TECH SOLUTIONS dans l'automate ABI PRISM 3730 (Applied Biosystem) selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

2.3.5. Méthodes d'analyse des données collectées au champ et au laboratoire

2.3.5.1. Etude de l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire

2.3.5.1.1. Prévalence phénotypique de la mosaïque du manioc

La prévalence phénotypique (P) de la mosaïque du manioc est le rapport entre le nombre de plantes symptomatiques (n) sur le total de plantes observées (N). Elle s'exprime en pourcentage (%) selon la formule suivante :

$$P (\%) = \frac{n}{N} \times 100 \quad (1)$$

2.3.5.1.2. Calcul des Odds ratio et intervalles de confiance

L'Odds-Ratio (OR) est un paramètre utilisé en épidémiologie permettant d'évaluer le risque de contracter une maladie ou une infection d'un groupe d'individus exposés à un facteur étudié. Il se définit par le rapport entre l'Odds (côte) du groupe soumis au facteur de risque (Odds (+/0)) et l'Odds du groupe témoin (Odds (+/1)) (Abe, 2021). Les valeurs des Odds-Ratio (OR) ainsi que l'intervalle de confiance à 95 % qui leur sont associés ont été calculées en utilisant le package EpiR implémenté dans le logiciel R. Sa formule est la suivante :

$$OR = \frac{\text{odds (+/0)}}{\text{odds (+/1)}} = \frac{P(+/0) \times P(-/1)}{P(-/0) \times P(+/1)} \quad (2)$$

Avec :

P (+/1) : probabilité pour une plante d'être positive à l'infection sachant qu'elle appartient au groupe des plantes non exposées au facteur étudié. P (+/0) : probabilité pour une plante d'être positive à l'infection sachant qu'elle est exposée au facteur de risque. P (- /1) : probabilité pour une plante d'être négative à l'infection sachant qu'elle appartient au groupe des plantes non exposées au facteur étudié. P (- /0) : probabilité pour une plante d'être négative à l'infection sachant qu'elle est exposée au facteur de risque. L'interprétation de l'OR est fonction de sa valeur. OR > 1 : signifie que le facteur étudié est un facteur de risque à la maladie ; OR = 1 : signifie que le facteur n'a pas d'effet sur la survenue de la maladie ; OR <

1 : signifie que le facteur est un élément de protection contre la maladie. Lorsque l'intervalle de confiance associé à la valeur de l'Odd ratio contient le chiffre 1, cela signifie que le facteur étudié n'est pas significativement associé à la maladie. Les facteurs de risque de propagation de la mosaïque du manioc considérés dans cette étude sont « la provenance des boutures », « l'âge de la plantation » et « la saison de collecte des échantillons ».

2.3.5.1.3. Détermination des taux de sévérité de la mosaïque du manioc

La proportion du niveau de sévérité ou taux de sévérité S_x est le rapport entre le nombre de plantes de niveau de sévérité de mosaïque (X) et le nombre total de plantes observées, comme l'indique la formule ci-dessous :

$$S_x(\%) = \frac{c}{N} \times 100 \quad (3)$$

Avec c : Nombre de plantes de niveau de sévérité X et N : nombre total de plantes.

a. Représentation des taux des niveaux de sévérité de la mosaïque

Les taux des différents niveaux de sévérité dans les trois départements ont été calculés puis présentés sous forme d'un Heatmap. Il s'agit d'une variation de couleurs allant du rouge foncé au jaune pâle dans une figure renfermant plusieurs cadres. Ainsi, lorsque la coloration du cadre tend vers le jaune pâle, on dit que le taux du niveau de sévérité considéré est relativement élevé. Cette variation de couleurs a été possible grâce au logiciel R version 3.6.2

2.3.5.1.4. Identification des variantes du virus ACMV à partir d'une analyse bioinformatique

a. Alignement de séquences

Après le séquençage, les données obtenues sont présentées sous forme de fichiers ABI. Ceux-ci ont été nettoyés puis convertis en fichiers de format FASTA qui est un format facilement analysable, à l'aide des logiciels Chromas Lite® 2.01 et DNA Baser Assembler 5.15.0. L'analyse des séquences nucléotidiques de virus ACMV a consisté à comparer les séquences converties en fichier FASTA aux séquences de référence existant dans la Genbank, afin d'identifier les zones de concordance ou de discordance. A cet effet, un alignement a été

réalisé pour chaque séquence sur celles disponibles dans la Genbank du *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) à travers son outil BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dont le site internet est <http://www.ncbi.nih.gov>. Ces alignements ont été réalisés à partir du programme BLASTn, qui permet d'aligner une séquence nucléotidique requête (séquences de l'étude) sur une séquence nucléotidique de référence (séquence de la banque de données), et le type d'alignement réalisé est celui de Waterman (*local alignment* de Smith-Waterman). Les séquences obtenues ont été également comparées entre elles à partir d'un alignement global et le model utilisé est le « *global alignment with free and gaps* ». Ces différents alignements ont été réalisés à partir du logiciel Geneious prime version 2021.1.1. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques ont été traduites en séquences protéiques en vue d'observer les différentes mutations chez celles-ci et de juger de la différence proprement dite entre les virus identifiés et ceux de la Genbank. En effet, les mutations nucléotidiques ne permettent pas de conclure directement d'une quelconque modification chez les virus étant donné que les acides aminés fonctionnels issus de ces mutations peuvent être identiques à ceux des virus de la Genbank.

b. Identification des mutations génétiques entre les séquences requêtes et celles de la banque de données génomiques Genbank

Pour chaque alignement étaient calculés le pourcentage d'identité (%Id) et le score d'alignement (S). La séquence de la banque de données retenue est celle pour laquelle le pourcentage d'identité et le score étaient les plus élevés. Ainsi, lorsque le pourcentage d'identité est de 100 %, cela traduit une identité exacte entre la séquence requête et la séquence de référence. On peut donc assigner les caractéristiques de cette séquence à la séquence requête. Le taux de mutation est la différence entre 100 et le pourcentage d'identité. Les mutations se traduisent par des insertions/délétions ou des substitutions ont été observées. L'insertion ou la délétion (gap) se traduit par un décalage du cadre de lecture pouvant entraîner une terminaison anticipée de la chaîne peptidique (**Figure 17, flèche rouge**). La substitution est soit une transition ou une transversion (**Figure 17, flèche jaune**). Au cours de la transition, une purine est remplacée par une autre purine (A par G ou G par A) ou une pyrimidine par une autre pyrimidine (C par T ou T par C). La transversion est le processus par lequel une purine est remplacée par une pyrimidine ou une pyrimidine par une purine. Les substitutions ou dissemblances sont appelées « mismatch ». Lorsque deux bases sont identiques donc parfaitement alignées, on parle d'identité ou match (**Figure 17, flèche vert**).

Un match peut être symbolisé par une barre verticale comme présentée sur la **Figure 17**. Les formules du score d’alignement (S) et du pourcentage d’identité (%Id) sont les suivantes :

$$S = \sum Se - \sum Sp \quad (4) \qquad \%Id = \frac{\text{Nombre de match}}{\text{Nombre total d'événements}} \quad (5)$$

Avec Se : score élémentaire ; Sp : pénalité liée à l’introduction de gap.

Les mutations ont été révélées par un Dotplot qui est un diagramme à bandes. Il s’agit d’une technique plus ou moins ancienne de comparaison de deux séquences d’ADN.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1238 bits(670)	0.0	703/719(98%)	1/719(0%)	Plus/Plus
Séq_requête	TCGTCG-AGGCTGAAC	TCGACAGCCCATACAGGAACCGTGCTACTGCCCCCACTGTCCA	59	
Séq_référence	TCGTCGAAGGCTGAAC	TCGACAGCCCATACAGGAACCGTGCTACTGCCCCCACTGTCCA	406	
Séq_requête	CGTCACAAATCGAAAACGGGCCTGGATGAACAGGCCCATGTACAGAAAGCCCATTATGTA	119		
Séq_référence	CGTCACAAATCGAAAACGGGCCTGGATGAACAGGCCCATGTACAGAAAGCCCATTATGTA	466		
Séq_requête	CAGGATGTATAGAAGCCCAGACATACTTAGGGGCTGTGAAGGCCCATGTAAGGTCCAGTC	179		
Séq_référence	CAGGATGTATAGAAGCCCAGACATACCTAGGGGCTGTGAAGGCCCATGTAAGGTCCAGTC	526		
Séq_requête	GTTTGAGCAAAGGGATGATGTGAAGCACTTTGGTATCTGTAAGGTGATTAGTGATGTGAC	239		
Séq_référence	GTTTGAGCAGAGGGATGATGTGAAGCACCTTGGTATCTGTAAGGTGATTAGTGATGTGAC	586		

Figure 17 : Exemple d’alignement de séquences nucléotidiques sur une séquence de référence dans NCBI

Flèche verte : Match ; **Flèche jaune** : Mismatch ; **Flèche orangée** : Gap

c. Structuration génétique des virus isolés

Les isolats de la souche de virus ACMV obtenus ont été regroupés en fonction de leurs liens génétiques à partir d'arbres phylogénétiques par la méthode du plus proche voisin (*Neighbour Joining* ou NJ) avec 1000 répétitions. Cette analyse a été réalisée en utilisant le logiciel MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Le regroupement a concerné aussi bien les séquences nucléotidiques que peptidiques. Cette méthode utilisée fait l'hypothèse d'une évolution indépendante des différents isolats du virus étudié à une vitesse constante. Les distances évolutives ont été générées à partir du même logiciel par la méthode de Jukes-Cantor (1969) en se basant sur le nombre de substitutions de bases. Il s'agit en effet de la dissimilarité entre les séquences. Sa formule est la suivante :

$$d_{ij} = -\frac{3}{4} \text{Ln} \left(1 - \frac{3}{4} D\right) \quad (6)$$

Avec

d_{ij} = dissimilarité entre les séquences i et j ;

D = distance entre les séquences qui est en effet le nombre de nucléotides différents.

Les matrices ainsi obtenues pour les séquences nucléotidiques ont servi à l'élaboration des différents arbres phylogénétiques. La réalisation d'arbres phylogénétiques à partir des séquences protéiques a été nécessaire. En effet, les mutations des nucléotides clés d'une séquence de codage qui sont parfois insignifiantes dans un regroupement chez les séquences nucléotidiques, peuvent modifier la composition aminoacide des protéines et conduire à de nouveaux variants fonctionnels.

Dans cette étude le seuil de similarité de 95 % a été choisi arbitrairement pour regrouper les isolats à partir de leurs séquences nucléotidiques et celui de 99 % pour les séquences protéiques.

2.3.5.2. Analyse de la diversité et la structuration génétique des variétés améliorées et traditionnelles de manioc

Pour mieux comprendre la distribution génotypique du manioc chez les échantillons collectés, l'étude de la diversité génétique a été réalisée aussi bien chez les variétés traditionnelles que chez les variétés améliorées.

Les échantillons de chaque département ont été considérés comme étant une sous-population. La diversité génétique a été évaluée à deux échelles dans chacune des sous-populations suivant la loi de Hardy-Weinberg qui mesure l'équilibre des populations. Il s'agit de la diversité génétique intrapopulation et de la diversité génétique interpopulation. Le modèle utilisé suggère que chaque population est idéale, c'est à dire de taille infinie, sans aucune mutation ou force évolutive sur le génome des individus, sans migration, ni sélection, avec une reproduction sexuée et une rencontre au hasard des gamètes (panmixie) et sans chevauchement entre les différentes générations. Ce modèle est basé sur la disparité entre les génotypes observés et les génotypes attendus. Les paramètres mis en évidence ont été estimés pour chaque locus et la moyenne a été prise sur l'ensemble des loci. Les logiciels utilisés pour l'évaluation de ces paramètres étaient les logiciels Fstat version 2.9.4 et GENETIX version 4.05.2. Le logiciel CREATE a également permis de mettre en forme les fichiers pour ces différents logiciels.

2.3.5.2.1. Diversité génétique intrapopulation

Plusieurs paramètres ont été utilisés pour évaluer la diversité génétique intrapopulation. Il s'agit du nombre moyen d'allèles par locus (A), le taux de polymorphisme (P), le taux moyen d'hétérozygotie observée (H_o), le taux moyen d'hétérozygotie attendue (H_e) et l'indice de fixation F_{IS} . Les fréquences alléliques et les nombres d'allèles rares définis comme ceux ayant une fréquence inférieure à 0,05 ont également été calculés. Finalement, le nombre d'allèles privés ou allèles spécifiques désignant les allèles d'une sous-population donnée, a été calculé pour chaque département à l'aide du logiciel GenAlex version 6.5.

✓ Nombre moyen d'allèles par locus

Le nombre moyen d'allèles par locus (A) évalue la richesse en allèles des loci étudiés dans une population donnée. Il s'agit du rapport entre le nombre d'allèles de l'ensemble des loci et le nombre total de loci dans la population considérée. Sa formule est la suivante :

$$A = \frac{\sum a}{l} \quad (7)$$

Avec **a**, le nombre d'allèles à un locus et **l**, le nombre de loci étudiés.

Lorsque **A** est supérieure à 2 ($A > 2$), on peut dire qu'il y'a une richesse allélique.

✓ Taux de polymorphisme

Le taux de polymorphisme (**P**) désigne le pourcentage de loci polymorphes dans l'échantillon étudié. Ce paramètre dépend des fréquences des allèles respectifs et de la taille de l'échantillon. Un locus est dit polymorphe lorsque son allèle le plus fréquent a une fréquence inférieure ou égale à 0,95. Le taux de polymorphisme se mesure à travers la formule suivante :

$$P = \frac{b}{L} \times 100 \quad (8)$$

b désigne le nombre de locus polymorphes et **L**, le nombre de loci étudiés

✓ Taux d'hétérozygotie observé

C'est la proportion d'individus hétérozygotes au locus **K**. H_o est calculée selon la formule ci-dessous :

$$H_o = \frac{(\sum_{k=1}^{a_k} P_{ij})}{L} \quad (9)$$

où P_{ij} est l'estimation de la fréquence du génotype ij au locus k et a_k le nombre d'allèles au locus k .

✓ Taux d'hétérozygotie attendu (H_e)

Le taux d'hétérozygotie attendu (H_e) se calcule à partir des fréquences alléliques obtenues pour chaque locus à l'aide de la formule suivante :

$$H_e = 1 - \sum (P_i)^2 \quad (10)$$

où p_i est la fréquence du i ème allèle du locus considéré.

✓ Indice de Fixation F_{IS}

L'indice de fixation F_{IS} est l'écart à la structure de Hardy-Weinberg ou encore l'écart à la panmixie. Il permet de quantifier les écarts entre l'hétérozygotie observée et celle attendue. Autrement dit, il permet de mesurer la réduction éventuelle de l'hétérozygotie des individus à l'intérieur de leur sous-population. Ainsi, lorsque la population considérée est à l'équilibre de Hardy-Weinberg, H_o est égal à H_e . Le F_{IS} se calcule selon la formule suivante :

$$F_{IS} = \frac{H_e - H_o}{H_e} \quad (11)$$

Lorsque le F_{IS} est positif ($F_{IS} > 0$), il traduit un déficit en hétérozygotie. Lorsqu'il est égal à zéro ($F_{IS} = 0$), on dit que les sous-populations sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg. S'il est négatif ($F_{IS} < 0$), la population considérée présente un excès d'hétérozygotie.

2.3.5.2.2. Diversité génétique interpopulation

La diversité génétique interpopulation a été évaluée à partir de l'indice de fixation F_{ST} . Cet indice renseigne sur la différenciation génétique entre des sous-populations étudiées. Il mesure également « l'effet Whalund » qui se traduit par la consanguinité des sous-populations due à un excès d'homozygote. Le F_{ST} varie de 0 à 1 et lorsqu'il est égal à 0 ou très proche de 0, on dit qu'il y a une faible différenciation génétique traduisant de nombreux flux géniques entre les sous-populations qui auraient atteint l'état panmictique. A l'inverse, si le F_{ST} est proche de 1, cela se traduit par une forte différenciation génétique entre les sous-populations, suggérant qu'il y'a peu ou pas de flux de gènes entre celles-ci. La formule du F_{ST} est la suivante :

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} \quad (12)$$

H_T = Hétérozygotie de la population totale ; H_S = Hétérozygotie de la sous-population

D'après Wright (1978), lorsque F_{ST} est compris entre 0 et 0,05, il y a une faible différenciation génétique ; lorsque F_{ST} est compris entre 0,05 et 0,15 la différenciation génétique est dite modérée ; lorsque F_{ST} est compris entre 0,15 et 0,25, la différenciation

génétique est dite importante et lorsque F_{ST} est supérieur à 0,25, la différenciation génétique est très importante.

2.3.5.2.3. Structuration génétique de la population de manioc étudiée

Le regroupement génétique des variétés de manioc collectés dans chaque département a été réalisé à partir de dendrogrammes en se basant sur les liens génétiques entre ceux-ci selon la méthode du *Neighbour Joining* basée sur les matrices de dissimilarité entre les individus avec 1000 répétitions. Ces matrices, qui regroupent les individus suivant les distances génétiques qui les séparent, ont été générées en utilisant les génotypes obtenus par PCR, à l'aide du logiciel FreeNa et les arbres ont été générés à partir du logiciel MEGA X.

2.3.5.3. Identification de génotypes de manioc résistants aux virus de la mosaïque du manioc à partir du criblage des gènes de résistance

2.3.5.3.1. Pourcentage d'occurrence (F) des gènes de résistance détectés

L'occurrence d'un facteur génétique ou d'un gène est la présence ou l'absence de ce facteur dans un échantillon donné. Le pourcentage d'occurrence F a été calculé afin de mettre en évidence le gène le plus impliqué dans la résistance des variétés de manioc aux virus de la mosaïque. Il convient donc d'énumérer le nombre de variétés (n_i) contenant le gène i détecté et le nombre d'échantillons considérés (N_t). La formule du pourcentage d'occurrence est la suivante :

$$F (\%) = \frac{n_i}{N_t} \times 100 \quad (13)$$

2.3.5.3.2. Classification des variétés de manioc selon leur degré de résistance à la mosaïque de manioc

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) a été utilisée dans cette étude afin de regrouper les individus selon leurs degrés de résistance aux virus de la mosaïque du manioc. Pour ce faire, des matrices de distance ont été générées entre les individus selon le modèle de Gower à partir de la fonction daisy de l'extension cluster. Les dendrogrammes colorés selon ce modèle, ont ensuite été générés à partir de la fonction A2Rplot disponible au sein de

l'extension *JLutils*. Cette extension permet de regrouper les individus en diverses classes selon leurs niveaux de résistance respectifs. Ces différentes fonctions ont été appliquées en utilisant le logiciel R version 3.6.2. Les paramètres considérés pour cette classification sont les niveaux de sévérité de la mosaïque observés et la présence des différents gènes de résistance. Trois groupes génétiques distincts ont ainsi été formés (**Tableau VI**).

Le groupe 1 est composé d'individus de niveau de sévérité 3 ou 4. Ces individus ne présentent aucun gène de résistance aux virus. Ce sont des variétés de manioc « Sensibles » à la mosaïque (S).

Le groupe 2 comporte les plantes de niveau de sévérité 1 ou 2 à la mosaïque et qui possède le gène de résistance CMD2. Il s'agit d'une résistance verticale ou monogénique. Les variétés appartenant à ce groupe sont dites « Résistantes » à la mosaïque du manioc (R).

Enfin, le groupe 3 est composé uniquement de plantes apparemment saines (plantes asymptomatiques) présentant les trois gènes de résistance à la mosaïque que sont CMD1, CMD2 et CMD3. On parle de résistance horizontale ou polygénique. Les individus de ce groupe sont dits « Hautement résistants » à la mosaïque du manioc (HR). Cette méthode a déjà fait l'objet d'étude pour la recherche de moyens de lutte contre les virus du manioc, à l'instar de celle de Houangue *et al.* (2019) réalisée au Bénin.

Tableau VI : Caractéristiques des variétés de manioc sensibles, résistantes et hautement résistantes à la mosaïque

Statuts	Caractéristiques
Variétés sensibles (S)	- Niveau de sévérité ≥ 3 - Aucun gène de résistance à la mosaïque
Variétés résistantes (R)	- Niveau de sévérité 1 ou 2 - gène détecté : CMD2 uniquement
Variétés hautement résistantes (HR)	- Plantes asymptomatiques - gènes détectés : CMD1, CMD2 et CMD3 simultanément

2.3.5.4. Tests statistiques

2.3.5.4.1. Test d'indépendance du Khi-carré de Pearson

Le test d'indépendance du Khi-carré de Pearson permet de déterminer l'existence ou non d'une relation entre deux caractères qualitatifs au sein d'une population, en comparant les différentes proportions des modalités des caractères. L'hypothèse nulle formulée pour ce test est l'absence de relation entre les deux caractères étudiés. Ce test est applicable lorsque les effectifs théoriques sont supérieurs ou égaux à 5. Dans cette étude, le test du Khi-carré a été utilisé pour évaluer l'impact de l'origine des boutures, l'âge des plantes et la saison sur l'infection des virus de la mosaïque.

2.3.5.4.2. Test exact de Fisher

Le test exact de Fisher est le test alternatif utilisé lorsque l'approximation du test d'indépendance du Khi-carré de Pearson n'est pas applicable c'est-à-dire lorsque les effectifs théoriques sont inférieurs à 5. Ce test est réalisé à partir d'un tableau de contingence en utilisant le logiciel R version 3.6.2. Il a permis de comparer les niveaux d'infection des virus de la mosaïque entre les plantes symptomatiques et les plantes asymptomatiques.

2.3.5.4.3. Test t de Student

Le test t de Student des échantillons indépendants est une analyse de variance. Il s'agit d'un test paramétrique, réalisé dans les conditions d'une distribution normale des résidus d'un caractère quantitatif et d'une égalité de variance. Il permet de mettre en exergue l'effet ou non d'un facteur sur un caractère quantitatif en comparant les moyennes de deux échantillons indépendants, sous l'hypothèse nulle d'égalité de moyennes. Le test t de Student a été utilisé dans cette étude pour étudier l'influence du site de collecte sur la variation de la prévalence de la mosaïque et sur le taux d'infection des virus. Le test t de Student a été réalisé en utilisant le logiciel R version 3.6.2.

2.3.5.4.4. Test de comparaison deux à deux des proportions

Le test de comparaison deux à deux ou *prop.test* a permis de comparer les prévalences de la mosaïque du manioc entre les plantes âgées d'un à deux mois, de trois à six mois et les plantes dont l'âge est supérieur à 7 mois. Ce test a été réalisé à partir de la fonction *pairwise.prop.test* du logiciel R version 3.6.2.

2.3.5.4.5. Régression logistique multinomiale

Le modèle linéaire généralisé (Glm) à caractère logistique multinomial a été réalisé en vue d'identifier les facteurs associés à la sévérité de la mosaïque du manioc. Cette analyse a été réalisée en utilisant le package lme4. Les facteurs testés étaient la souche virale EACMV, la souche virale ACMV et la corrélation entre ces deux souches.

Les différents tests ont été réalisés à partir de tableaux de contingence en utilisant le logiciel R version 3.6.2. La différence entre les facteurs comparés est significative lorsque la valeur de la probabilité (P) associée au test est strictement inférieure à 0,05.

PARTIE III :
RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. RESULTATS

3.1.1. Etude de l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire

3.1.1.1. Prévalence phénotypique de la mosaïque du manioc

Sur un total de 5896 plantes observées dans les 200 champs, en raison de 30 plantes environ par champ, 2557 présentaient des symptômes de la mosaïque tandis que 3339 étaient apparemment saines. La prévalence phénotypique apparente globale de la mosaïque du manioc dans cette étude est donc de 43,65 %. Elle varie de 42,04 % à 44,74 % respectivement pour le département de Yamoussoukro et celui de Daloa (**Tableau VII**). Les tests statistiques d'ANOVA réalisés ont révélé qu'il n'y a aucune différence significative entre les prévalences de la maladie dans ces trois départements ($X^2 = 2,93$; $p = 0,23$).

Tableau VII : Prévalences phénotypiques de la mosaïque du manioc dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Départements	N	Phénotypes		P (%)
		Asymptomatique	Symptomatique	
Bouaké	1946	1102	844	43,37
Yamoussoukro	2010	1165	845	42,04
Daloa	1940	1072	868	44,74
Total	5896	3339	2557	43,37
X²				2,93
p				0,23

N : nombre total d'échantillons de feuilles collectées ; P : Prévalence de la mosaïque ; X² : Constante du test de Student ; p : probabilité associée au test de Student.

3.1.1.2. Facteurs de risque associés au développement de la mosaïque du manioc

En considérant les facteurs épidémiologiques tels que l'origine des boutures, l'âge de la plantation et la saison, les résultats montrent que ceux-ci ont une influence significative sur l'infection. Pour le facteur « Origine des boutures », une différence significative ($p < 0,001$) est observée entre le taux d'infection chez les plantes dont les boutures sont issues des plantations villageoises (77,46 %) et celui des plantes dont les boutures proviennent des structures agricoles telles que le CNRA et l'ANADER (34,48 %). La provenance des boutures influence significativement le développement de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire avec une probabilité inférieure à $< 0,001$ (**Figure VIII**). Autrement, les plantes dont les boutures proviennent des plantations villageoises sont plus susceptibles d'étendre la propagation des virus de la mosaïque comparativement à celles reçues des structures agricoles, avec un Odd ratio de 6,53. Aussi, cette étude a révélé que le développement de la mosaïque est fortement dépendante de l'âge des plantes ($p < 0,05$). En effet, les plantes dont l'âge est compris entre 3 à 6 mois sont environ 6 fois plus infectées que celles de 0 à 2 mois puis environ 2 fois plus infectées que les plantes âgées de plus de 7 mois (**Tableau VIII**).

Enfin, les résultats révèlent que pendant la saison sèche, les plantes de manioc sont plus à risque d'infection aux virus de la mosaïque que pendant la saison pluvieuse, avec un Odd ratio de 5,86. Le taux d'infection des plantes collectées pendant la saison sèche était de 74 % tandis qu'il était de 33,56 % pour la saison des pluies (**Tableau VIII**).

3.1.1.3. Sévérité de l'infection à la mosaïque du manioc

Les niveaux de sévérité observés dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa sont les niveaux 1 ; 2 ; 3 et 4. Les proportions de ces niveaux de sévérité sont présentées sur un graphe montrant une variation de couleurs allant du rouge foncé au jaune pâle (**Figure 18**). Sur cette figure, plus la couleur du cadre considéré tend vers le jaune pâle, plus le pourcentage du niveau de sévérité étudié est élevé. Inversement, plus la couleur du cadre tend vers le rouge foncé, plus le pourcentage du niveau de sévérité est faible. Sur l'ensemble des champs prospectés dans les trois départements, le niveau de sévérité le plus observé est le niveau 2 avec une fréquence élevée à Yamoussoukro (62,86 %), à Bouaké (44,62 %) et à Daloa (36,92 %). Les fréquences du niveau 3 sont comprises entre 20 % à Yamoussoukro et 29,23 % à Daloa. Quelques plantes de niveaux 4 ont été observées dans les départements de Daloa et Yamoussoukro avec des fréquences de 3,08 % et 1,43 % respectivement.

Tableau VIII : Facteurs de risque au développement et à la propagation des virus de la mosaïque du manioc

Facteurs	N	Symptomatiques (%)	Asymptomatiques (%)	p	OR (IC_{95%})
Provenance					
CNRA/ANADER	58	20 (34,48)	38 (65,52)	< 0,001	6,53 (3,34 -12,76)
Village	142	110 (77,46)	32 (22,54)		
Age (mois)					
1-2	28	4 (14,29)	24 (85,71)	< 0,001 0,04	6,38 (2,58 -15,80) 2,52 (1,02 - 6,22)
3-6	100	78 (78)	22 (22)		
≥ 7	72	42 (58,33)	30 (41,67)		
Saison					
Pluie	43	14 (32,56)	29 (67,44)	< 0,001	5,86 (2,82 -12,17)
Sèche	157	116 (73,88)	41 (26,12)		
Total	200	130 (65)	70 (35)		

N : Nombre d'échantillons de feuilles collectés ; p : probabilité associée au test d'indépendance du Khi2 de Pearson ; OR (IC_{95%}) : Odds Ratio à un intervalle de confiance à 95 %.

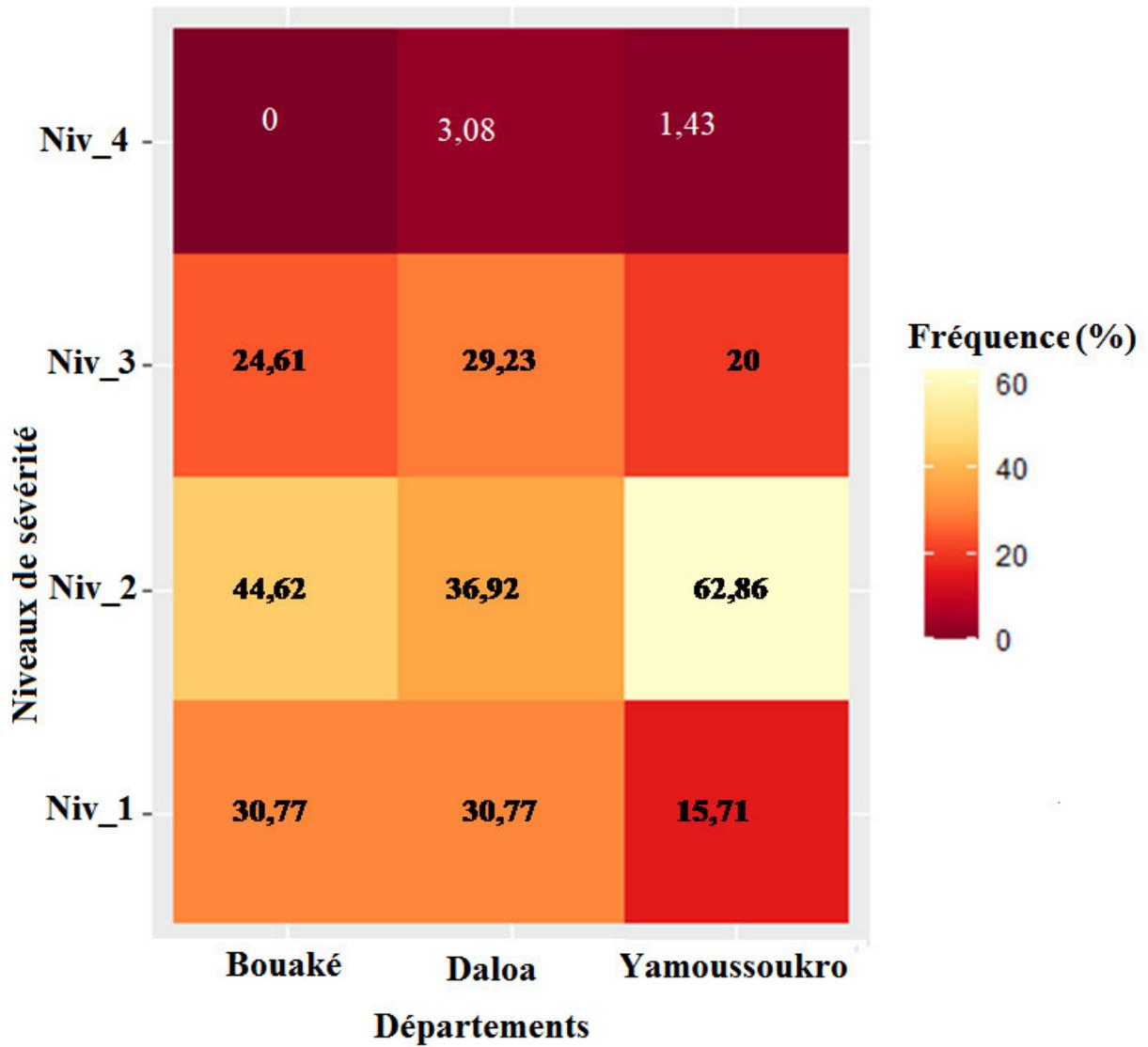


Figure 18 : Distribution des taux des niveaux de sévérité de la mosaïque dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

3.1.1.4. Caractérisation moléculaire des virus de la mosaïque du manioc

L'identification des virus de la mosaïque du manioc a été effectuée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ainsi, le virus ACMV testé par les marqueurs JSP001/JSP002 ou ACMV-AL1/F/ACMV-AR0/R a été détecté par les allèles de tailles 783 pb et 1030 pb respectivement. Quant à la souche de virus EACMV testé par le marqueur JSP001/JSP003, elle a été détectée par la taille d'allèles 780 pb (**Figure 19**).

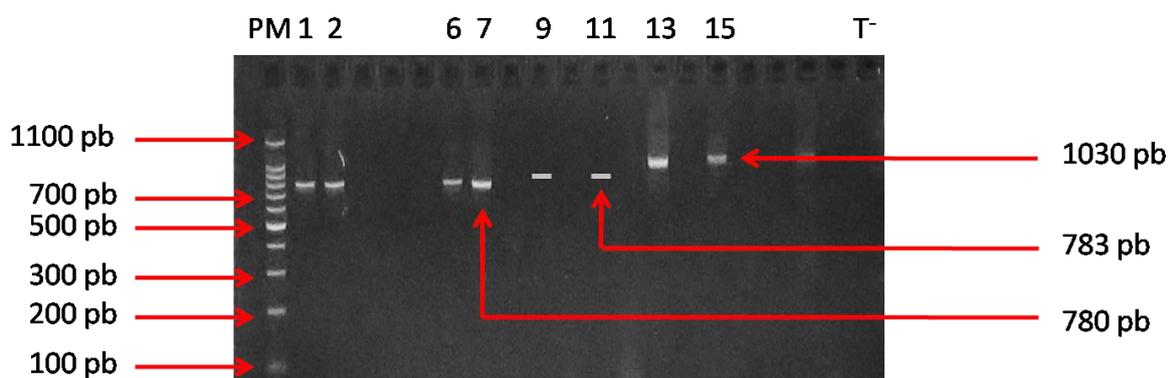


Figure 19 : Gel électrophorétique montrant la taille des allèles d'identification des virus de la mosaïque du manioc à partir des marqueurs moléculaires JSP001/JSP002, JSP001/JSP003 et ACMV-AL1/F/ACMV-AR0/R

PM : Marqueur de poids moléculaires de 100 paires de bases (100 Pb) ; **1 ; 2 ; 6 ; 7** : échantillons positifs à la souche de virus EACMV identifiée à partir du marqueur J1/3 avec pour taille d'allèle caractéristique 780 pb ; **9 et 11** : échantillons positif à la souche de virus ACMV identifiée à partir du marqueur J1/2 avec pour taille d'allèle caractéristique 783 pb ; **13 et 15** : échantillons positif à la souche de virus ACMV identifiée à partir des couples d'amorces avec pour taille d'allèle caractéristique 1030 pb ; **T-** : Témoin négatif .

3.1.1.5. Proportion des plantes de manioc testées positives aux virus de la mosaïque du manioc après diagnostic moléculaire

Sur un total de 200 échantillons de plantes, le taux global d'infection des virus de la mosaïque du manioc est de 66,5 %. Aucune différence significative n'a été observée entre les départements avec une valeur de probabilité égale à 0,93 (**Tableau IX**). Ce taux d'infection est de 70,71 % ; 62,88 % et 66,15 % respectivement pour les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.

Tableau IX : Proportions des plantes infectées dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Départements	N	Test de virus		T (%)
		Infecté (+)	Non infecté (-)	
Bouaké	65	46	19	70,71
Yamoussoukro	70	44	26	62,86
Daloa	65	43	22	66,15
Total	200	133	67	66,5
X²	-	-	-	0,14
p	-	-	-	0,93

N : nombre total d'échantillons ; **+** : présence de virus ; **-** : absence de virus ; **T** : proportion des plantes infectées ; **X²** : constante du test du test de Student réalisé ; **p**: probabilité associée au test statistique.

3.1.1.6. Comparaison des taux d'infection entre les plantes symptomatiques et asymptomatiques

Le taux global d'infection des virus évalué chez l'ensemble des plantes asymptomatiques est de 35,29 % et celui des plantes symptomatiques est de 77,18 %. En comparant les plantes symptomatiques et les plantes asymptomatiques entre les trois départements prospectés à savoir Bouaké, Yamoussoukro et Daloa, il ressort que le taux d'infection des plantes symptomatiques est largement supérieur à celui des plantes asymptomatiques avec une valeur de probabilité égale à 0,01 (**Tableau X**).

Dans le département de Bouaké, 35 % des échantillons asymptomatiques étaient infectés alors que le taux d'infection chez les individus symptomatiques était de 77,78 %. Dans le département de Yamoussoukro, le taux d'infection était de 27,27 % et 74,57 % respectivement pour les individus symptomatiques et asymptomatiques. Enfin, dans le département de Daloa, le taux d'infection obtenu chez les échantillons symptomatiques était de 40 % alors que ce taux était de 80 % chez les individus symptomatiques (**Figure 20**).

Tableau X : Taux d'infection des virus chez les plantes asymptomatiques et symptomatiques

Etat sanitaire des plantes	N	Test de virus		T (%)
		Infecté (+)	Non infecté (-)	
Asymptomatiques	51	18	33	35,29
Symptomatiques	149	115	34	77,18
Total	200	133	67	66,5
X²	-	-	-	0,91
p	-	-	-	0,01

N : nombre total d'échantillons ; + : présence de virus ; - : absence de virus ; X² : constante du test réalisé ; p : probabilité associée au test statistique du Khi deux d'indépendance

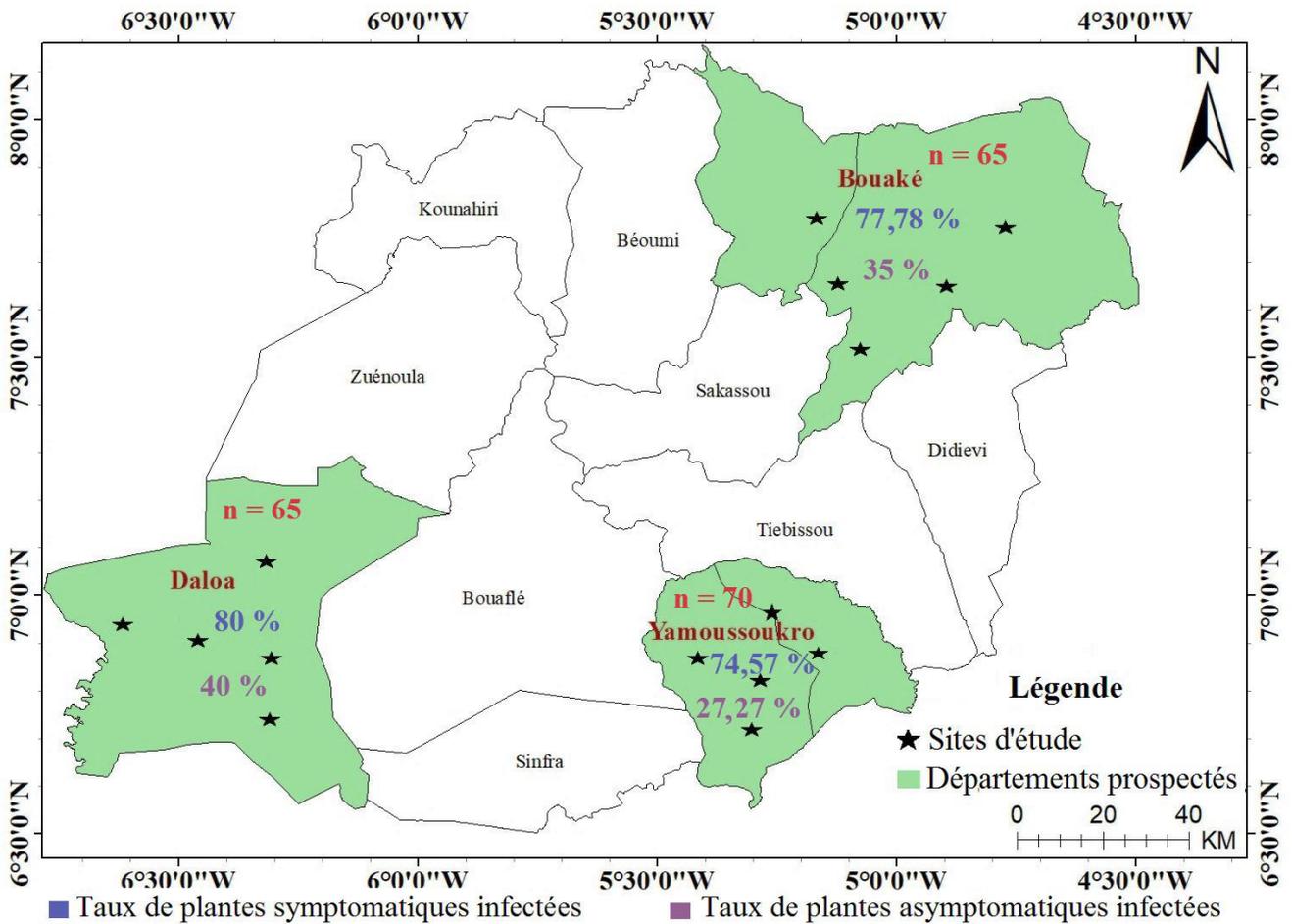


Figure 20 : Distribution des plantes symptomatiques et asymptomatiques infectées par les virus dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

n : Nombre total d'échantillons ; **en bleu :** pourcentage de plantes symptomatiques infectées ; **en violet :** pourcentage de plantes asymptomatiques infectées

3.1.1.7. Proportion des souches de virus observées dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Les souches virales ACMV, EACMV et la coïnfection ACMV-EACMV sont celles identifiées dans cette étude. Dans chacun des départements, le virus dominant est l'ACMV avec des proportions de 58,82 % ; 69,86 % et 62% pour les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa respectivement (**Tableau XI**). Les taux de coïnfection observés varient entre 12 % pour Daloa et 19,66 % Bouaké. Une valeur de probabilité inférieure à 0,01 montre qu'il y a une différence significative entre les départements prospectés en ce qui concerne la répartition des virus de la mosaïque du manioc détectés.

3.1.1.8. Proportion des virus détectés selon les types de variétés

Les virus identifiés dans cette étude sont différemment repartis entre les types de variétés dans chaque département. L'ACMV est le virus dominant chez les deux types de variétés. Sa fréquence est plus élevée chez les variétés améliorées que chez les variétés traditionnelles dans tous les départements étudiés. Les proportions du virus ACMV sont comprises entre 57,78 et 67,39 % chez les variétés traditionnelles et entre 75 et 85,71 % chez les variétés de manioc améliorées (**Tableau XII**). En comparant les proportions de la souche de virus EACMV entre les types de variétés dans chaque département, il ressort que le taux le plus élevé est obtenu chez les variétés traditionnelles. De même, les fréquences de la coïnfection sont plus élevées chez les variétés traditionnelles à Bouaké et à Daloa avec les taux de 20 % 19,57 % respectivement contre 10,67 et 14,29 % chez les variétés améliorées. A Daloa, le taux de coïnfection ACMV-EACMV est plus élevé chez les variétés améliorées que chez les variétés traditionnelles avec les taux de 16,67 % et 10,53 % respectivement. En somme, la répartition des virus de la mosaïque du manioc détectés dans cette étude diffère entre les types de variétés dans les départements étudiés avec des probabilité inférieures à 0,01 (**Tableau XII**).

3.1.1.9. Corrélation entre les virus détectés et la sévérité de la mosaïque du manioc

Le **tableau XIII** montre que la corrélation ACMV/EACMV et la souche de virus EACMV influencent positivement le niveau de sévérité de la mosaïque chez le manioc ($p < 0,05$) avec des valeurs d'Odd ratio respectifs de 9,034 et 17,619 (**Tableau XIII**). Inversement, les niveaux de sévérité identifiés chez les plantes infectées par l'ACMV sont généralement faibles ($p = 0,787$).

Tableau XI : Proportions des souches de virus identifiées chez les plantes collectées dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Départements	N	Virus détectés			X ²	p
		ACMV+ (%)	EACMV+ (%)	ACMV&EACMV+ (%)		
Bouaké	51	30 (58,82)	11 (21,56)	10 (19,61)	6,45	0,01
Yamoussoukro	53	37 (69,86)	6 (11,32)	10 (18,87)		
Daloa	50	31 (62)	13 (26)	6 (12)		
Total	154	98 (63,64)	30 (19,48)	26 (16,88)		

ACMV+ : Echantillons positifs seulement à la souche de virus ACMV ; EACMV+ : Echantillons positifs seulement à la souche de virus EACMV ; ACMV&EACMV+ : Echantillons positifs aux deux souches de virus ACMV et EACMV, X² : constante du test réalisé ; P : probabilité associée au test du Khi-2 de Pearson.

Tableau XII : Répartition des souches virales selon le type de variété dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Départements	Types	Virus détectés			<i>p</i>
		ACMV	EACMV	ACMV-EACMV	
Bouaké	Traditionnel	57,78	22,22	20	0,006
	Amélioré	78,67	10,66	10,67	
Yamoussoukro	Traditionnel	67,39	13,04	19,57	0,0003
	Amélioré	85,71	0	14,29	
Daloa	Traditionnel	57,89	31,58	10,53	0,0002
	Amélioré	75	8,33	16,67	

Type : type de variété de manioc, *p* : probabilité associée au test du Khi-2 de Pearson.

Tableau XIII : Régression logistique multinomiale de la nature des souches virales sur la sévérité de la mosaïque du manioc

Facteurs	Coeff	ES	OR (IC _{95%})	<i>p</i>
Cor ACMV/ EACMV	2,201	0,933	9,034	0,018*
Virus EACMV	2,869	1,276	17,619	0,0245*
Virus ACMV	0,430	1,596	1,537	0,787

Coeff : Coefficient du model utilisé ; ES : Erreur standard ; P : probabilité associée au model ; OR (IC_{95%}) : Odd Ratio avec intervalle de confiance à 95 %. * : effet significatif.

3.1.1.10. Variabilité génétique de la souche virale ACMV

Les variantes géniques de la souche de virus ACMV issues des mutations ont été recherchées par l'analyse des séquences nucléotidiques obtenues après le séquençage selon la méthode de Sanger. Au total vingt-deux (22) produits PCR positifs à cette souche ont été utilisés pour cette phase d'analyse. Les données fournies par la structure de séquençage sont des séquences génomiques constituées d'un enchaînement de nucléotides représentés par les initiales des noms de ceux-ci en fichiers de format ABI pour Applied Biosystems. Il s'agit des lettres A, C, G et T représentant respectivement les bases azotées Adénine, Cytosine, Guanine et Thymine (**Figure 21**).

a. Variantes génétiques du virus ACMV identifiées chez des variétés de manioc dans trois départements de la Côte d'Ivoire

L'analyse des séquences nucléotidiques a permis de mettre en évidence une diversité génétique chez la souche de virus ACMV qui démontre l'évolution de cette souche en Côte d'Ivoire. Les séquences nucléotidiques des isolats étaient proches de celles identifiées au Kenya, Cameroun, Ghana, Madagascar, Nigeria et en Côte d'Ivoire, disponibles dans la banque de données génomique Genbank. La séquence de référence choisie pour chaque séquence requête était celle dont le pourcentage d'identité était le plus élevé. Sur cette base, une seule séquence était comparable à la variante ivoirienne ACMV-[Ivory Coast] de numéro d'accèsion AF259894 avec un pourcentage d'identité de 96,5. Il s'agit de l'isolat ACMV_Bke5. Six (6) échantillons soit 27,27% étaient plus proches de la variante ACMV_GH:AK4A:13 du Ghana de numéro d'accèsion MG250093. Ce sont les isolats ACMV_Dal1, ACMV_Bke2, ACMV_Yak3, ACMV_Yak5, ACMV_Bke4 et ACMV_Yak6. Cette variante a été détectée chez 4 variétés de manioc traditionnelles (Kondou, Bonoua, Boyofé et Motocross), une variété améliorée (Yavo) et une variété étrangère originaire du Ghana (Accra-brankye). Les séquences nucléotidiques correspondantes étaient identiques à la séquence requête avec des pourcentages d'identité compris entre 97,8 et 98,9 (**Tableau XIV**). Cinq (5) isolats soit 22,73 % étaient identiques à la variante ACMV_CM/YA de numéro d'accèsion AY211463, originaire du Cameroun avec des pourcentages d'identité compris entre 97,3 et 98,3. Il s'agit des isolats ACMV_Dal5, ACMV_Dal7, ACMV_Bke6, ACMV_Bke7 et ACMV_Dal8. Ces virus ont été détectés chez les variétés de manioc Yacé, Monrovia et Hévéa qui sont des variétés traditionnelles et chez Bocou2 et Bocou3 qui sont des variétés améliorées.

Trois isolats de virus ACMV soit 13,64% étaient plus proches de la variante du Cameroun ACMV_CM/AK de numéro d'accèsion AY211461 avec des pourcentages d'identité allant de 98,1 à 98,3. Il s'agit des isolats ACMV_Bke1, ACMV_Dal4 et ACMV_Yak4. Les variétés de manioc à partir desquelles ces virus ont été isolés sont les variétés améliorées TMS4(2) et Yavo et la variété traditionnelle de nom vernaculaire Kobosse. Deux (2) isolats étaient identiques à la variante du Cameroun ACMV_CM/39 de numéro d'accèsion AY211462 avec des pourcentages d'identité de 98,4. Ceux-ci ont été isolés chez deux variétés améliorées que sont Yavo et Bocou1. Ce sont les isolats ACMV_Dal6 et ACMV_Yak7. Deux isolats issus des variétés traditionnelle et améliorée Yacé et Bocou2 respectivement, étaient comparables à la variante ACMV_CF:CF4AB de numéro d'accèsion KJ887756, originaire de Madagascar, avec des pourcentages d'identité de 98,6 et 98,5. Il s'agit de ACMV_Dal2 et ACMV_Dal3. Un isolat (ACMV_Yak1) issu de la variété Bonoua était à 98,6% identique à la variante ACMV_CF:CF72AB de numéro d'accèsion KJ887780, originaire de Madagascar. Un isolat (ACMV_Bke3) issu de la variété Kassim était comparable à la variante ACMV_GH:FM14A du Kenya avec un pourcentage d'identité de 98,3. Un autre (ACMV_Yak2) issu de la variété Zoklo-rouge était proche de la variante ACMV-[NG:So:03] de numéro d'accèsion EU685322, originaire du Nigeria avec un pourcentage d'identité de 98,3. Toutes ces variantes ont été détectées au niveau de l'ADN-A du génome du virus de la mosaïque du manioc et codent pour le gène AV2, sauf les variantes ACMV_CM/YA et ACMV_CM/AK du Cameroun qui codent pour le gène AV1.

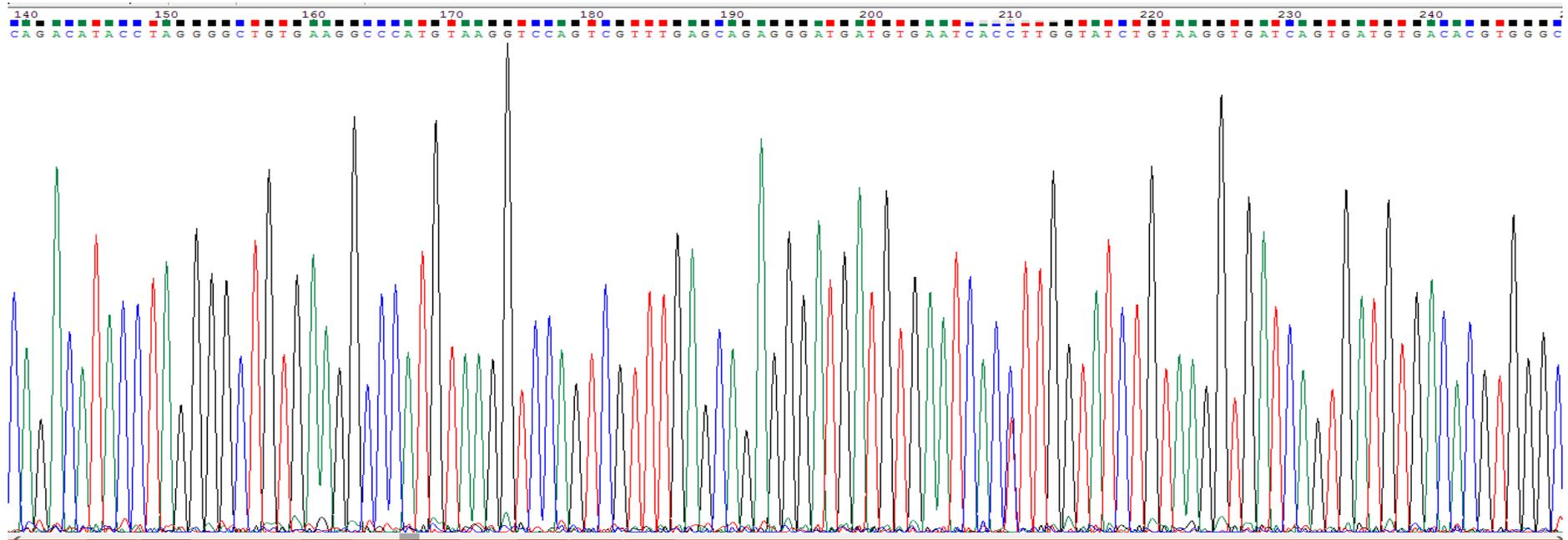


Figure 21 : Chromatogramme montrant une portion de la séquence nucléotidique (ADN) d'un virus ACMV, obtenue après séquençage selon la méthode de Sanger

Adénine : en vert ; **Thymine** : en rouge ; **Cytosine** : en bleu ; **Guanine** : en noir

Tableau XIV : Caractéristiques des séquences codantes pour les gènes AV1 ou AV2 des variantes du virus ACMV identifiées, selon la banque de données génomique Genbank

Id	Départements	Référence Genbank	Accession	% Id	Origine	Variétés	Nucléotides (pb)
ACMV_Bke1	Bouaké	ACMV_CM/AK	AY211461	98.1	Cameroun	TMS4(2)	728
ACMV_Dal1	Daloa	ACMV_GH:AK4A:13	MG250093	97.8	Ghana	Kondou	719
ACMV_Dal2	Daloa	ACMV_CF:CF4AB	KJ887756	98.6	Madagascar	Yacé	730
ACMV_Dal3	Daloa	ACMV_CF:CF4AB	KJ887756	98.5	Madagascar	Bocou2	723
ACMV_Yak1	Yamoussoukro	ACMV_CF:CF72AB	KJ887780	98,6	Madagascar	Bonoua	708
ACMV_Dal4	Daloa	ACMV_CM/AK	AY211461	98.1	Cameroun	Yavo	728
ACMV_Bke2	Bouaké	ACMV_GH:AK4A:13	MG250093	98.7	Ghana	Accra-brankye	720
ACMV_Yak2	Yamoussoukro	ACMV-[NG:So:03]	EU685322	98.3	Nigeria	Zoklo rouge	708
ACMV_Dal5	Daloa	ACMV_CM/YA	AY211463	97.3	Cameroun	Hevea	708
ACMV_Yak3	Yamoussoukro	ACMV_GH:AK4A:13	MG250093	98.9	Ghana	Bonoua	708
ACMV_Yak4	Yamoussoukro	ACMV_CM/AK	AY211461	98.3	Cameroun	Kobosse	708
ACMV_Dal6	Daloa	ACMV_CM/39	AY211462	98.4	Cameroun	Bocou1	741
ACMV_Yak5	Yamoussoukro	ACMV_GH:AK4A:13	MG250093	98.3	Ghana	Boyofe	708
ACMV_Bke3	Bouaké	ACMV_GH:FM14A	MG250159	98.3	Kenya	Kassim	708
ACMV_Dal7	Daloa	ACMV_CM/YA	AY211463	97.3	Cameroun	Yace	708
ACMV_Bke4	Bouaké	ACMV_GH:AK4A:13	MG250093	98.4	Ghana	Yavo	749
ACMV_Yak6	Yamoussoukro	ACMV_GH:AK4A:13	MG250093	98.6	Ghana	Motocross	732
ACMV_Bke5	Bouaké	ACMV-[Ivory Coast]	AF259894	96.5	Côte d'Ivoire	Bouaké	707
ACMV_Bke6	Bouaké	ACMV_CM/YA	AY211463	98,3	Cameroun	Monrovia	719
ACMV_Bke7	Bouaké	ACMV_CM/YA	AY211463	98.3	Cameroun	Bocou2	708
ACMV_Dal8	Daloa	ACMV_CM/YA	AY211463	97.3	Cameroun	Bocou3	707
ACMV_Yak7	Yamoussoukro	ACMV_CM/39	AY211462	98.4	Cameroun	Yavo	741

Id : Identifiant attribué aux échantillons collectés ; **Accession** : Numéro d'accèsion dans la banque de données Genbank ; **%Id** : Pourcentage d'identité entre la séquence requête et la séquence référence de la Genbank ; **Nucléotides** : Nombre de nucléotide de l'ADN du virus comparés.

b. Détermination des mutations génétiques entre les séquences requêtes de la souche virale ACMV et leurs séquences de référence disponibles dans la banque de données Genbank

L'alignement des vingt-deux (22) séquences requêtes sur les séquences de référence de la Genbank, a permis d'observer des identités et des mutations entre celles-ci, tant au niveau des séquences nucléotidiques qu'au niveau des séquences peptidiques. Les discordances ou mutations observées sont comprises entre 1,1% et 2,7%. A titre d'exemple, l'alignement de l'isolat ACMV_Dal1 sur la séquence de référence de la banque de données génomiques Genbank est présenté par un diagramme à bandes encore appelé Dotplot (**Figure 22**). Les similitudes sont représentées par une ligne droite (en rouge) tandis que les discordances sont représentées par les interceptions sur cette ligne droite (en bleu) traduisant ainsi des modifications chez la séquence d'origine. La **figure 23** présente les mutations observées après alignement de la séquence requête nucléotidique ACMV_Dal1 sur la séquence de référence de numéro d'accèsion MG250093. On peut alors observer une délétion (en vert) dans la séquence requête en position 7. Aussi, des mutations de type transversion (en bleu) sont observées en positions 115 (G115T), 304 (T304G), 640 (T640G) et 705 (G705T). Cette figure présente également des mutations de type transition (en jaune) en positions 147 (C147T), 190 (G190A), 209 (C209T), 276 (A276G), 328 (T328C), 367 (C367T), 646 (C646T) et 670 (C670T).

Cependant, malgré les faibles taux de mutation observés dans les séquences nucléotidiques, les séquences traduites étaient largement différentes des séquences de référence. Seulement quelques similitudes pouvaient être observées (**Figure 24, en rouge**). Cette figure illustre en effet les mutations observées après alignement de la séquence protéique requête 'ACMV_Dal1_trad' sur la séquence protéique de référence AXX69912.1. En somme, de nombreuses mutations ont été observées dans les séquences protéiques requêtes après l'alignement sur celles de la Genbank pouvant ainsi aboutir à de nouvelles variantes du virus.

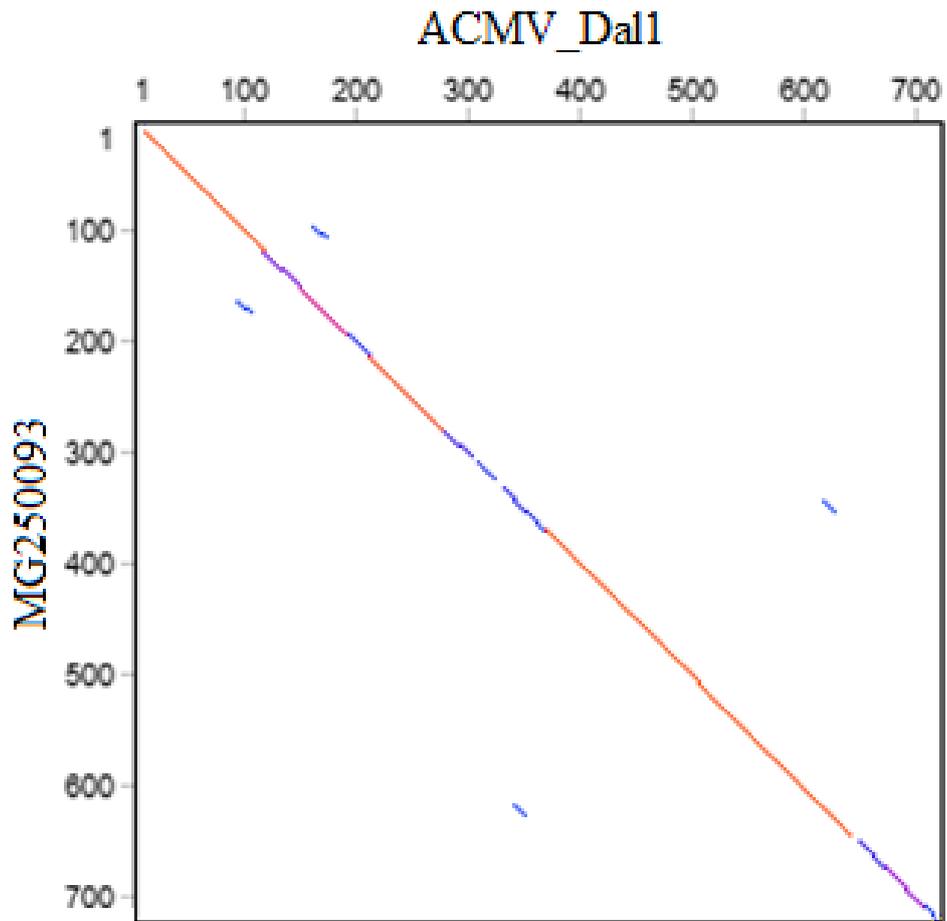


Figure 22 : Dotplot présentant des identités et des mutations entre une séquence requête ACMV_Dal1 et sa séquence de référence MG250093

en rouge : les identités ; **en bleu** : les mutations.

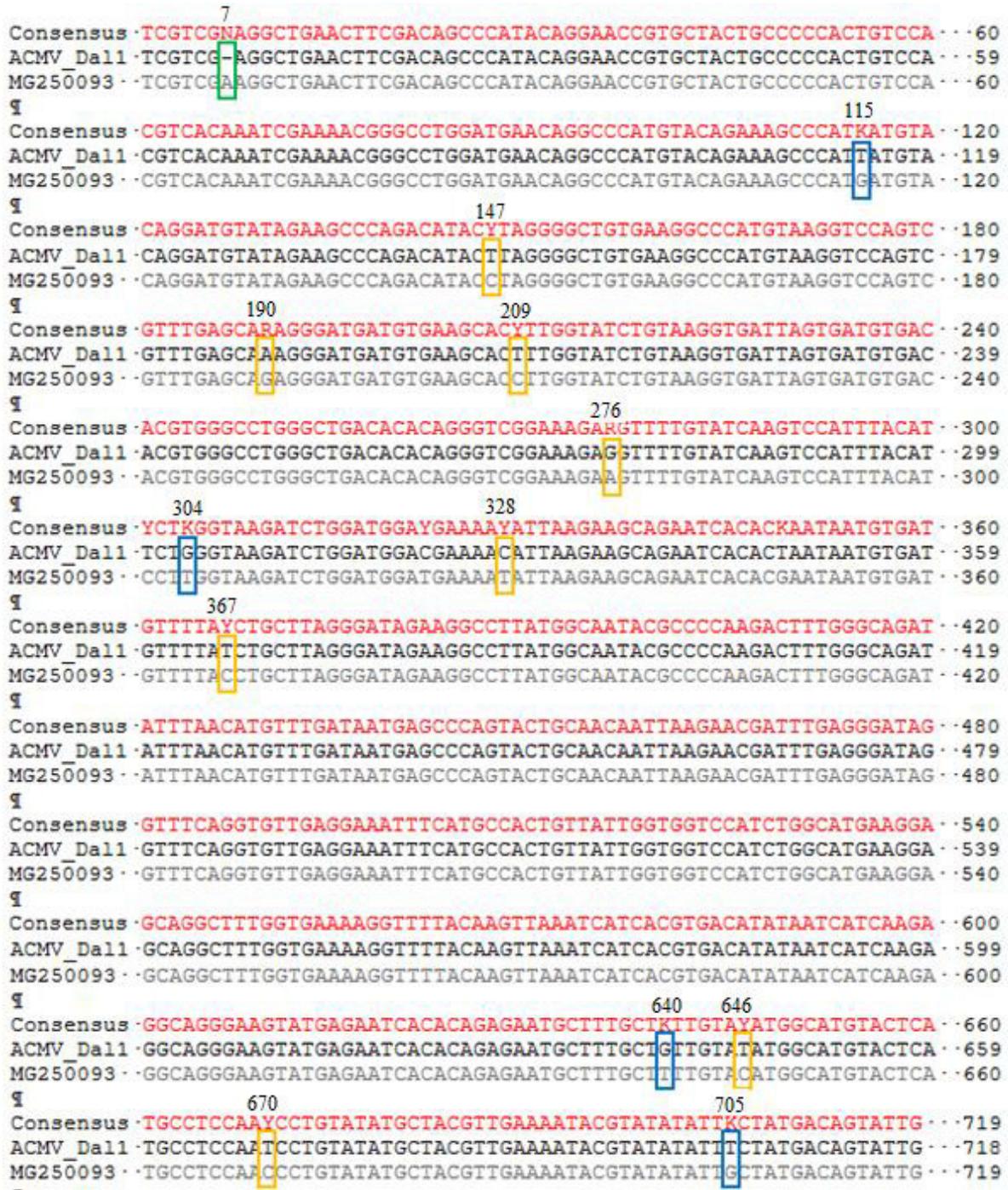


Figure 23 : Mutations observées entre une séquence nucléotidique de la souche de virus ACMV (en noir) et sa séquence de référence de la Genbank MG250093 (en gris)

Séquence en rouge : Séquence consensus ; encadré en vert: Délétion; encadré en jaune : Transition; encadré en bleu : Transversion.

ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Ser Ser Arg Leu Asn Phe Asp Ser Pro Tyr Arg Asn Arg Ala Thr Ala Pro Thr Val His Ser Ser Lys Ala Glu Leu Arg Gln Pro Ile Gln Glu Pro Cys Tyr Cys Pro His Cys Pro	30	40
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Val Thr Asn Arg Lys Arg Ala Trp Met Asn Arg Pro Met Tyr Arg Lys Pro Ile Met Tyr Arg His Lys Ser Lys Thr Gly Leu Asp Glu Gln Ala His Val Gln Lys Ala His Asp Val	50	60
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Arg Met Tyr Arg Ser Pro Asp Ile Leu Arg Gly Cys Glu Gly Pro Cys Lys Val Gln Ser Gln Asp Val * Lys Pro Arg His Thr * Gly Leu * Arg Pro Met * Gly Pro Val	70	80
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Phe Glu Gln Arg Asp Asp Val Lys His Phe Gly Ile Cys Lys Val Ile Ser Asp Val Thr Val * Ala Glu Gly * Cys Glu Ala Pro Trp Tyr Leu * Gly Asp * * Cys Asp	90	100
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Arg Gly Pro Gly Leu Thr His Arg Val Gly Lys Arg Phe Cys Ile Lys Ser Ile Tyr Ile Thr Trp Ala Trp Ala Asp Thr Gln Gly Arg Lys Glu Val Leu Tyr Gln Val His Leu His	110	120
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Leu Gly Lys Ile Trp Met Asp Glu Asn Ile Lys Lys Gln Asn His Thr Asn Asn Val Met Pro Trp * Asp Leu Asp Gly * Lys Tyr * Glu Ala Glu Ser His Glu * Cys Asp	130	140
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Phe Tyr Leu Leu Arg Asp Arg Arg Pro Tyr Gly Asn Thr Pro Gln Asp Phe Gly Gln Ile Val Leu Pro Ala * Gly * Lys Ala Leu Trp Gln Tyr Ala Pro Arg Leu Trp Ala Asp	150	160
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Phe Asn Met Phe Asp Asn Glu Pro Ser Thr Ala Thr Ile Lys Asn Asp Leu Arg Asp Arg Ile * His Val * * * Ala Gln Tyr Cys Asn Asn * Glu Arg Phe Glu Gly *	170	180
ACMV_Dal1 trad AXX70370.1	Phe Gln Val Leu Arg Lys Phe His Ala Thr Val Ile Gly Gly Pro Ser Gly Met Lys Glu Val Ser Gly Val Glu Glu Ile Ser Cys His Cys Tyr Trp Trp Ser Ile Trp His Glu Gly		

Figure 24 : Comparaison de la séquence peptidique ACMV_Dal1 à la séquence de référence de numéro d'accèsion AXX70370.1

ACMV-Dal1 : séquence requête ; **AXX70370.1** : séquence de référence ; **Encadré rouge** : zones d'identités ; **Zones non encadrées** : zones de mutations ; * : codons stop

c. Alignement multiple des séquences

L'alignement multiple des 22 séquences nucléotidiques de la souche de virus ACMV isolées, a été réalisé en vue d'observer les éventuelles mutations entre ces séquences. Un extrait de cet alignement présenté par la **figure 25** montre quelques zones de mutations entre ces séquences. Cependant, malgré les 98,3 % d'identité obtenus en comparant les séquences nucléotidiques, l'alignement des séquences peptidiques montre que les isolats diffèrent largement les uns des autres traduisant une importante diversité génétique de la souche de virus ACMV dans les départements prospectés. La **figure 26** présente des mutations observées entre les séquences peptidiques sur un extrait de l'alignement. Par ailleurs, certains isolats tels que ACMV_Yak4 et ACMV_Yak5 semblent être identiques, il en est de même pour les isolats codés ACMV_Bke1, ACMV_Dal4 et ACMV_Yak6. Ces différents groupes ne présentent aucune variation tant au niveau des séquences nucléotidiques qu'au niveau des séquences peptidiques.

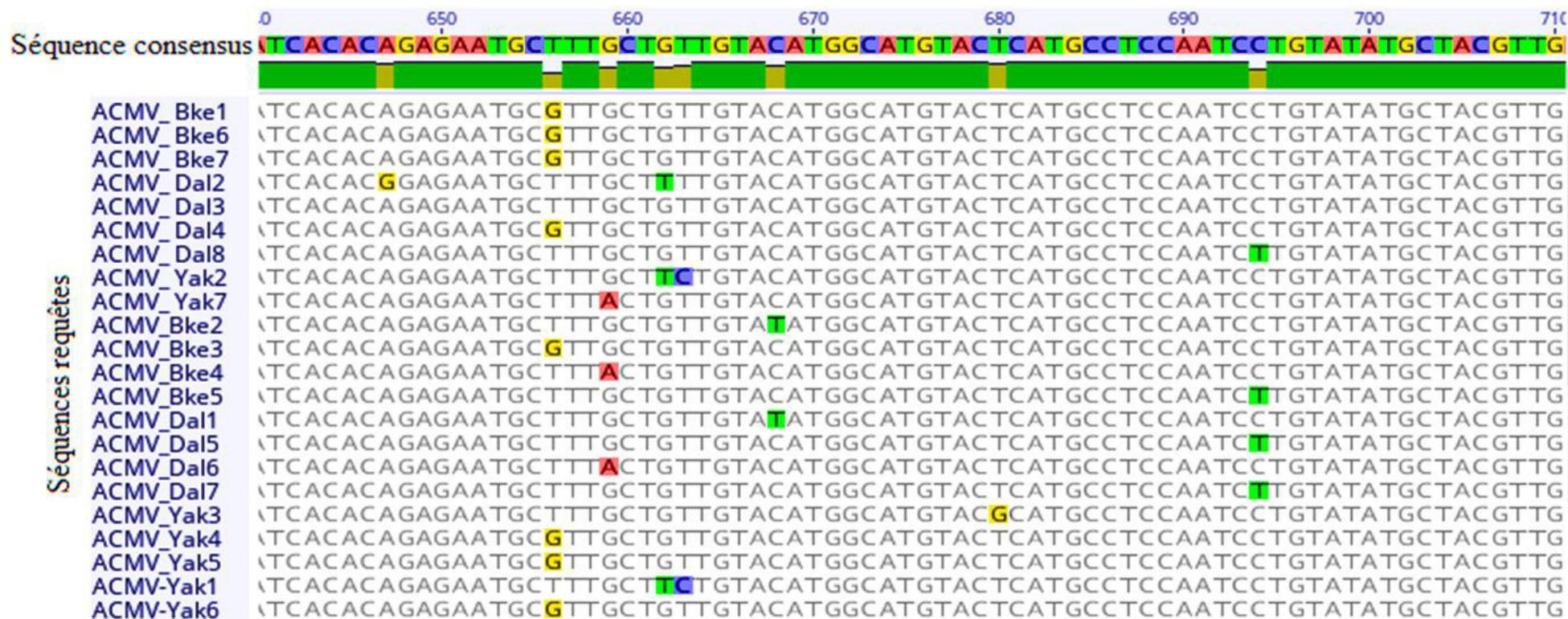


Figure 25 : Alignement multiple des 22 séquences nucléotidiques des isolats des souches virales ACMV collectées dans les différents sites d'étude

Colorations jaune, verte, bleue et rouge : couleurs choisies pour chacune des bases azotées pour la séquence consensus; Elles montrent les zones de mutation dans l'alignement multiple réalisé.

d. Phylogénie des isolats de virus ACMV

L'analyse phylogénétique des isolats de la souche de virus ACMV a été réalisée à partir d'arbres sur la base de matrices de distances génétiques générées par le logiciel MEGA X. Les séquences nucléotidiques ont été réparties en 5 groupes génétiques et 5 singletons en considérant le seuil de ressemblance de 95 % (**Figure 27**). Le groupe 2 est composé de trois isolats de virus dont un provient de Bouaké (ACMV_Bke1), un autre de Daloa (ACMV_Dal4) et le troisième de Yamoussoukro (ACMV_Yak6). Il en est de même pour le groupe 3 qui renferme les isolats ACMV_Yak7, ACMV_Bke4 et ACMV_Dal6 provenant respectivement de Yamoussoukro, Bouaké et Daloa. Les groupes 1 et 5 par contre renferment chacun des isolats provenant de deux départements à savoir Yamoussoukro et Bouaké pour le groupe 1 (ACMV_Yak4, ACMV_Bke6, ACMV_Yak5, ACMV_Bke3 et ACMV_Bke7), puis Daloa et Bouaké pour le groupe 5 (ACMV_Dal8, ACMV_Bke5, ACMV_Dal7 et ACMV_Dal5). Enfin, le groupe 4 est composé uniquement d'isolats de virus ACMV provenant du département de Yamoussoukro (ACMV_Yak2 et ACMV_Yak1). Parmi les cinq virus en singleton observés sur l'arbre phylogénétique, trois sont issus du département de Daloa (ACMV_Dal1, ACMV_Dal2 et ACMV_Dal3), un seul provient du département de Bouaké (ACMV_Bke2) et le dernier isolat provient de Yamoussoukro (ACMV_Yak3). Cependant, ces regroupements sont différents de ceux obtenus à partir des séquences peptidiques.

Sur l'arbre phylogénétique réalisé à partir des séquences protéiques des isolats d'ACMV, en tenant compte du seuil de regroupement 99 %, on distingue quatre singletons et trois groupes génétiques du virus (**Figure 28**). Deux groupes sont composés d'isolats d'un même département et l'autre groupe, qui comporte le plus grand nombre d'isolats, regorge des isolats provenant des trois départements étudiés. Aucun groupe spécifique n'a été formé pour le département de Yamoussoukro alors que les groupes 2 et 3 sont spécifiques aux départements de Daloa et Bouaké respectivement. Parmi les quatre singletons de virus identifiés, trois proviennent du département de Daloa et un seul provient du département de Bouaké. Tous les isolats du département de Yamoussoukro sont contenus dans le groupe 1. Ainsi, sept (07) variantes de la souche de virus ACMV sont identifiées à partir des 22 isolats étudiés. Ces variantes sont représentées par les groupes 1 ; 2 ; 3 et les singletons ACMV_Dal8, ACMV_Bke5, ACMV_Dal5 et ACMV_Dal7.

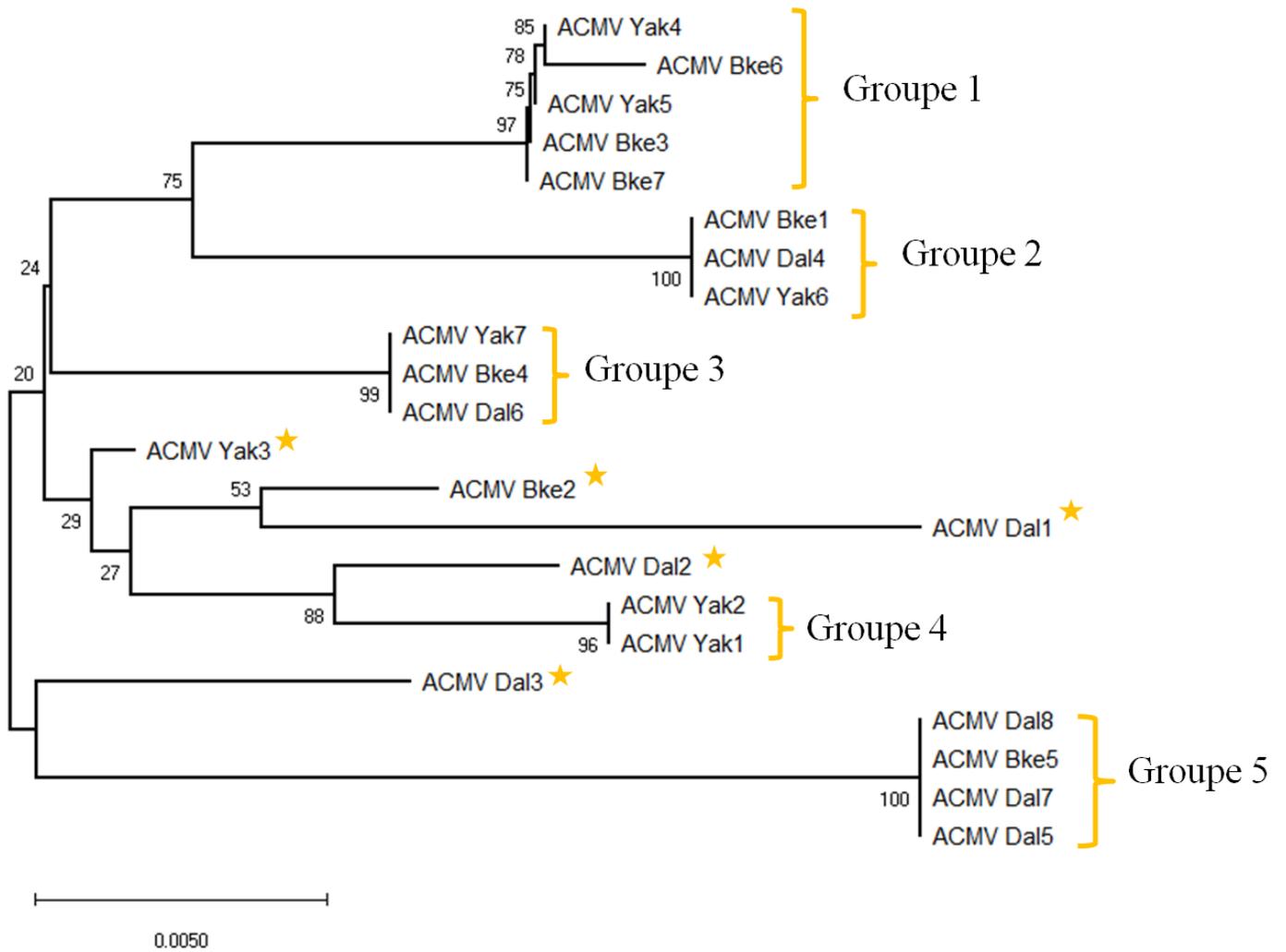


Figure 27 : Structure cladistique des séquences nucléotidiques des isolats de la souche virale ACMV selon la méthode Neighbour Joining Tree

Groupe 1 à Groupe 5 : groupes génétiques formés ; * : les singletons ; **Bke :** département de Bouaké ; **Yak :** département de Yamoussoukro ; **Dal :** département de Daloa ; **20 ; 24 ; ... : 100 :** pourcentage d'identité entre les groupes formés.

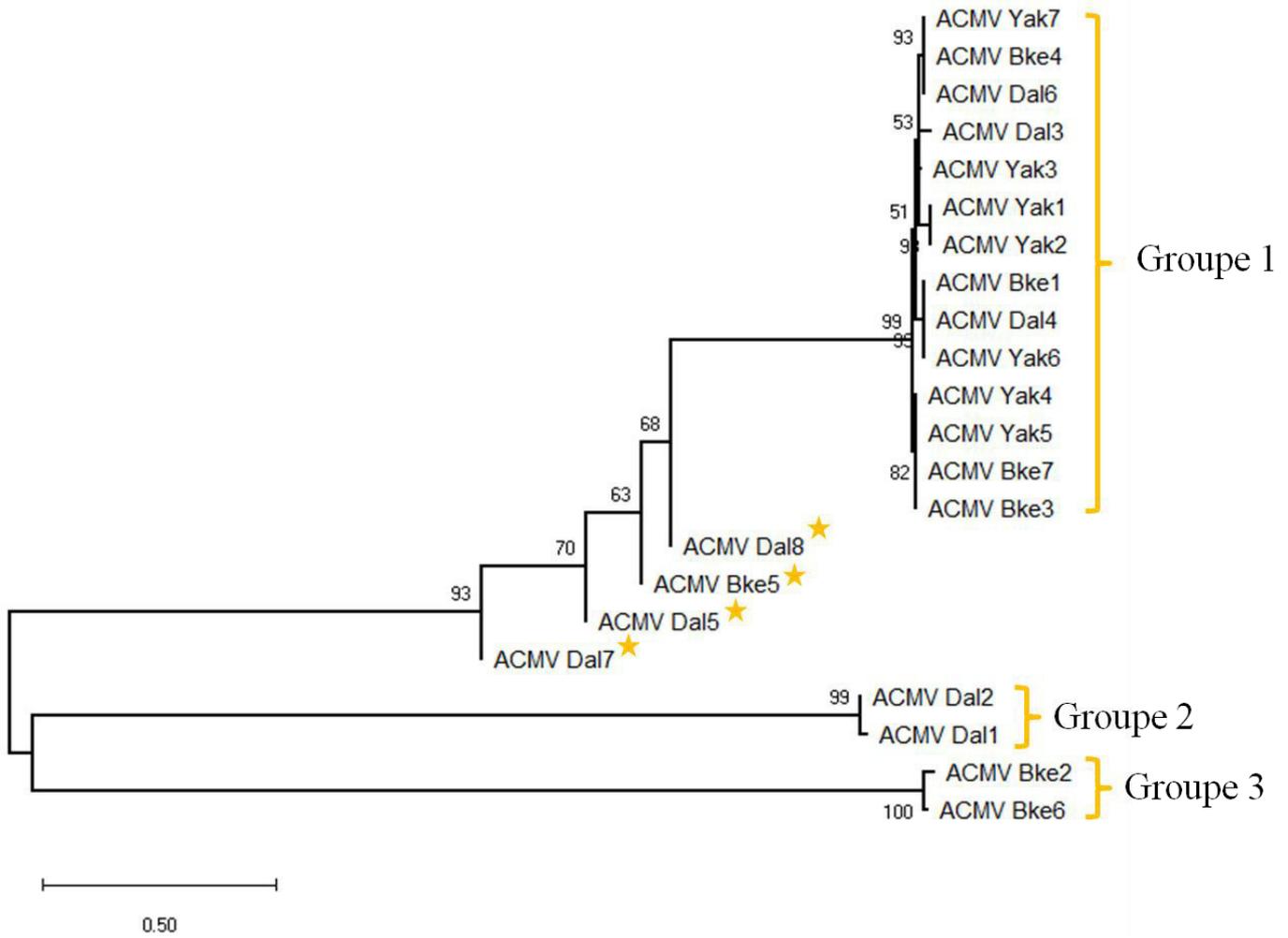


Figure 28 : Structure cladistique des séquences protéiques des isolats de la souche virale ACMV selon la méthode Neighbour Joining Tree

51 ; 53 ; ... : 100 : pourcentage d'identité entre les groupes formés.

3.1.2. Diversité et structuration génétique des variétés de manioc traditionnelles et améliorées

3.1.2.1. Polymorphisme des marqueurs génétiques utilisés

Deux cent (200) échantillons de feuilles de manioc prélevées dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa ont été génotypés à partir des marqueurs microsatellites EME20, SSRY61, SSRY100, EME222 et EME303. Trente-cinq (35) allèles ayant des fréquences variables ont été identifiés dans toute la population étudiée (**Tableau XV**). Parmi ces allèles, 24 ont été détectés à Bouaké, 23 à Yamoussoukro et 25 à Daloa. Les fréquences alléliques varient de 0,007 à 0,5 pour le marqueur EME20, de 0,014 à 0,493 pour le marqueur SSRY61, de 0,015 à 0,478 pour le marqueur SSRY100, de 0,022 à 0,451 pour le marqueur EME222 et de 0,025 à et 0,397 pour le marqueur EME303 (**Figure 29**). Le nombre moyen d'allèles par locus est de 7. Huit allèles de tailles comprises entre 150 et 270 pb ont été détectés chez le marqueur EME20. Huit autres avec des tailles allant de 120 à 265 pb chez le marqueur SSRY61. Huit allèles avec des tailles allant de 190 à 257 ont été également détectés chez le marqueur SSRY100. Sept avec des tailles comprises entre 110 et 225 pb et 4 dont les tailles varient de 155 à 190 pb ont été obtenus respectivement chez les marqueurs EME222 et EME303 (**Tableau XV**). En prenant les départements individuellement, au marqueur EME20, 6 allèles ont été obtenus à Bouaké ainsi qu'à Yamoussoukro, tandis que 5 allèles ont été obtenus dans le département de Daloa. Pour ce qui est du marqueur SSRY61, il a permis d'obtenir 5 allèles à Bouaké et à Daloa, puis 4 à Yamoussoukro. Au marqueur SSRY100, 6 allèles ont été obtenus à Daloa tandis que 5 allèles ont été identifiés à Bouaké et à Yamoussoukro. Le marqueur EME222 a permis d'obtenir 4 allèles à Bouaké et à Yamoussoukro puis, 5 allèles à Daloa. Finalement, avec le marqueur EME303, 4 allèles ont été détectés dans chaque département. Les 5 marqueurs utilisés étaient polymorphes avec un taux de polymorphisme de 100 %. Cependant, le marqueur EME303 a permis d'identifier seulement 4 allèles alors que le nombre d'allèles obtenu était compris entre 7 et 8 pour les autres marqueurs. Les fréquences alléliques les plus élevées chez les marqueurs EME20 et SSRY61 ont été obtenues à Yamoussoukro avec des valeurs respectives de 0,5 et 0,493. Chez les marqueurs SSRY100, EME222 et EME303, les fréquences les plus élevées ont été obtenues à Bouaké et à Yamoussoukro (**Figure 29**). Les différents allèles ainsi décrits ont été détectés à partir des profils génétiques obtenus par PCR sur gel d'agarose. La **figure 30** présente quelques profils génétiques obtenus avec le marqueur microsatellite SSR100.

Tableau XV : Distribution géographique des allèles détectés chez les variétés de manioc traditionnelles et améliorées et leurs fréquences dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Marqueurs	Tailles des allèles	Départements		
		Bouaké (n = 68)	Yamoussoukro (n = 72)	Daloa (n = 60)
EME20	150	0	0,007	0
	200	0,074	0,007	0,025
	220	0,088	0	0,050
	237	0,213	0,243	0,283
	250	0,419	0,500	0,442
	255	0,103	0	0
	260	0,103	0,215	0,200
	270	0	0,028	0
	Na 8	6	6	5
SSRY61	120	0,250	0,194	0,250
	180	0	0	0,017
	195	0,015	0	0
	210	0	0,014	0
	247	0,287	0,299	0,333
	257	0,434	0,493	0,367
	260	0,015	0	0
	265	0	0	0,033
	Na 8	5	4	5
SSRY100	190	0,051	0,194	0,283
	200	0,478	0,292	0,200
	210	0	0	0,067
	220	0,257	0,264	0,267
	230	0,199	0,208	0,142
	250	0	0,042	0
	253	0	0	0,042
	257	0,015	0	0
	Na 8	5	5	6
EME222	110	0,022	0	0
	140	0	0	0,042
	147	0	0	0,025
	150	0,279	0,222	0,267
	190	0,390	0,299	0,350
	200	0	0,028	0
	225	0,309	0,451	0,317
Na 7	4	4	5	

Tableau XV (Suite) : Distribution géographique des allèles détectés chez le manioc et leurs fréquences dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Marqueurs	Tailles des allèles	Départements		
		Bouaké (n = 68)	Yamoussoukro (n = 72)	Daloa (n = 60)
EME303	155	0,309	0,389	0,342
	160	0,397	0,208	0,292
	170	0,029	0,069	0,025
	190	0,265	0,333	0,342
Na	4	4	4	4
	Total	24	23	25
	Np	5	5	5
	P (%)	100	100	100

Na : nombre d'allèles non nuls ; **n** : nombre d'individus ; **P** : taux de polymorphisme des marqueurs ; **Np** : nombre de loci polymorphes.

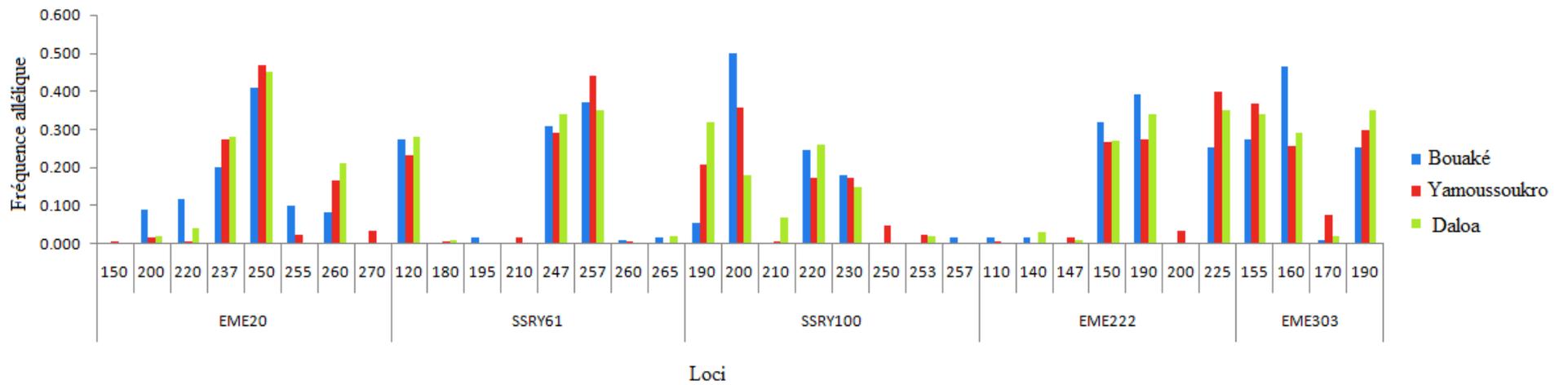


Figure 29 : Comparaison des fréquences alléliques obtenues pour chaque locus dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa selon les marqueurs microsatellites utilisés

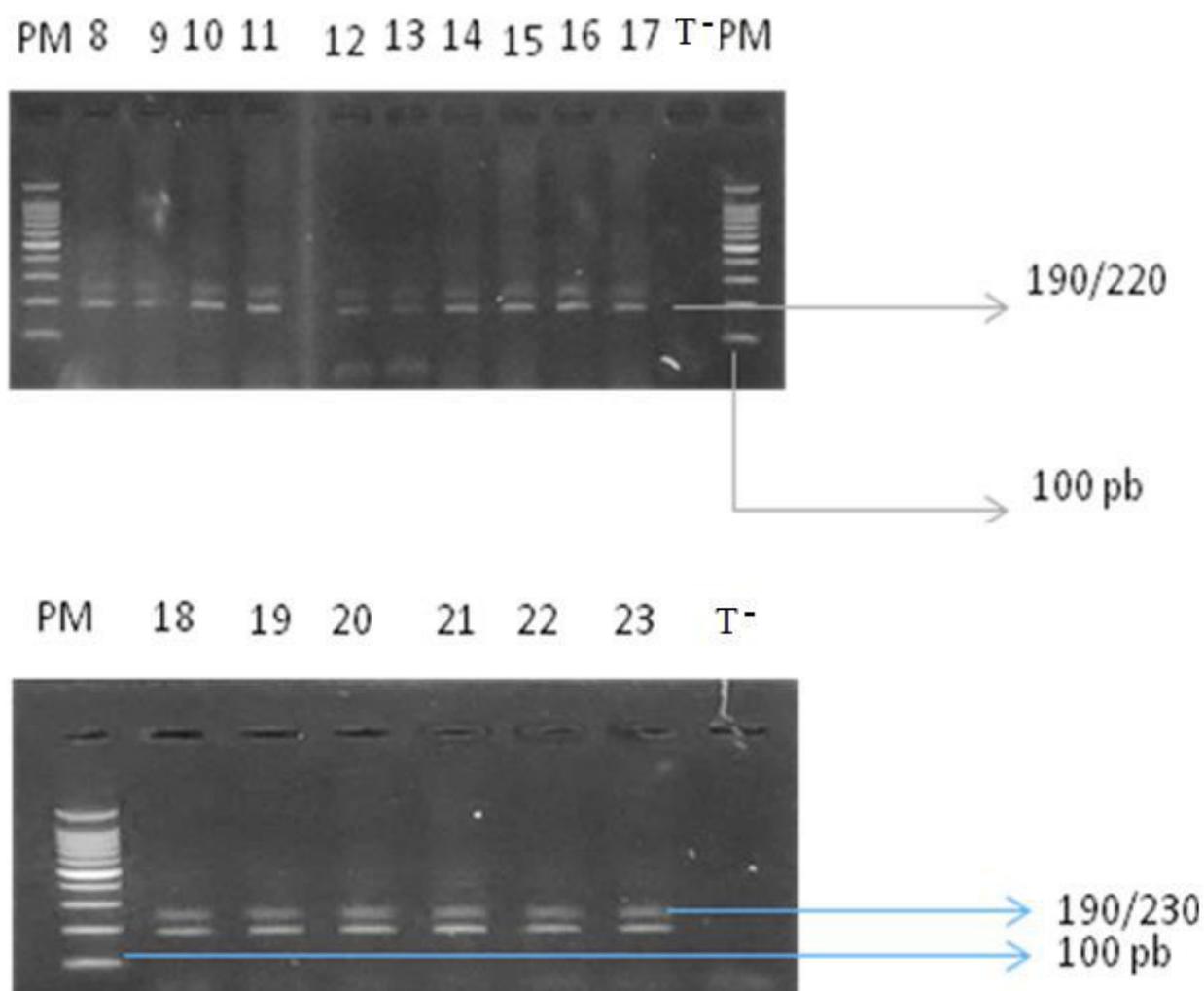


Figure 30 : Profils électrophorétiques des génotypes de manioc observés à partir du marqueur microsatellite SSRY100

PM : poids moléculaire (100 pb) ; **T⁻** : témoin négatif ; **1 à 33** : codes des échantillons

3.1.2.2. Diversité génétique intrapopulation du manioc

3.1.2.2.1. Diversité génétique intrapopulation des variétés traditionnelles

A l'échelle du type de variété, la variabilité génétique des variétés traditionnelles pour l'ensemble des loci est caractérisée par un nombre moyen d'allèle (A) global de 5,47. Dans chacune des sous-populations, le nombre moyen d'allèles A est de 5,2 ; 6,2 et 5 respectivement pour les sous-populations Bouaké, Yamoussoukro et Daloa (**Tableau XVI**). L'hétérozygotie observée légèrement plus élevée que celle attendue dans les trois sous-populations ($H_o > H_e$) ont conduit à une valeur moyenne du F_{IS} de -0,274 qui traduit un excès d'individus hétérozygotes. En moyenne, six allèles rares et cinq allèles privés ont été obtenus dans chaque sous-population (**Tableau XVI**). Les valeurs relativement élevées du nombre d'allèles, le F_{IS} négatif et la présence d'allèles rares et privés traduisent une diversité génétique non négligeable chez les variétés traditionnelles dans les départements prospectés. La diversité génétique intrapopulation des variétés traditionnelles ne diffère pas significativement entre les départements prospectés ($p = 0,803$).

a. Fréquences des allèles privés détectés chez les variétés traditionnelles

Un allèle privé est un allèle détecté uniquement dans une sous-population d'où le nom d'allèle spécifique. Les marqueurs microsatellites utilisés ont permis de détecter chez les variétés traditionnelles de manioc, 15 allèles privés (ou spécifiques) dont 5 à Bouaké soit un taux de 20,83 % ; 4 à Yamoussoukro soit un taux de 17,39 % et 6 dans la sous-population Daloa soit un taux de 24 % confirmant la grande diversité génétique chez les variétés traditionnelles (**Tableau XVII**). Les allèles privés du marqueur EME20 sont de tailles 150 et 255 pb et les fréquences alléliques sont comprises entre 0,007 et 0,103. Concernant le marqueur SSRY61, les tailles des allèles sont 180 ; 195 ; 210 ; 260 et 260 avec des fréquences comprises entre 0,015 à Bouaké et 0,033 à Daloa. Les allèles privés du marqueur SSRY100 sont de tailles 210 ; 250 ; 253 et 257 pb avec des fréquences allant de 0,015 à 0,067. Enfin, les tailles des allèles privés détectés chez le marqueur EME222 sont 110 ; 140 ; 147 et 200 pb avec des fréquences alléliques allant de 0,022 à 0,042. Aucun allèle spécifique n'a été identifié chez le marqueur EME303.

Tableau XVI : Paramètres de mesure de la diversité génétique intrapopulation des variétés traditionnelles

Sous-populations	Paramètres de diversité génétique intrapopulation						P-value
	A	Ar	Ap	He	Ho	F _{IS}	
Bouaké (n= 55)	5,2	5	5	0,617	0,738	-0,196	
Yamoussoukro (n = 65)	6,2	6	4	0,567	0,750	-0,323	0,803
Daloa (n= 50)	5	7	6	0,610	0,800	-0,311	
Moyenne	5,47	6	5	0,598	0,762	-0,274	

n : nombre d'individus; **A** : nombre moyen d'allèles ; **Ar** : nombre d'allèles rares ; **Ap** : nombre d'allèles privés ; **He** : taux d'hétérozygotie attendue ; **Ho** : taux d'hétérozygotie observée ; **F_{IS}** : indice de fixation .

Tableau XVII : Allèles spécifiques détectés dans les différentes populations

Locus	Allèles privés	Départements		
		Bouaké (Na = 24)	Yamoussoukro (Na = 23)	Daloa (Na = 25)
EME20	150	0,000	0,007	0,000
	255	0,103	0,000	0,000
NAp	2	1	1	0
SSRY61	180	0,000	0,000	0,017
	195	0,015	0,000	0,000
	210	0,000	0,014	0,000
	260	0,015	0,000	0,000
	265	0,000	0,000	0,033
NAp	5	2	1	2
SSRY100	210	0,000	0,000	0,067
	250	0,000	0,042	0,000
	253	0,000	0,000	0,042
	257	0,015	0,000	0,000
NAp	4	1	1	2
EME222	110	0,022	0,000	0,000
	140	0,000	0,000	0,042
	147	0,000	0,000	0,025
	200	0,000	0,028	0,000
NAp	4	1	1	2
Total	15	5 (20,83 %)	4 (17,39 %)	6 (24 %)

NAp : nombre d'allèles privés par locus ; **Na** : Nombre d'allèles détectés pour l'ensemble des marqueurs

3.1.2.2.2. Diversité génétique intrapopulation des variétés améliorées

Sur 35 échantillons analysés, le nombre moyen d'allèle chez les variétés améliorées est de 3,2 pour l'ensemble des marqueurs génétiques étudiés. Les valeurs du F_{IS} étaient négatives dans l'ensemble des sous-populations, ce qui traduit un excès d'individus hétérozygotes dans cette population. Cependant, la valeur moyenne du F_{IS} est plus proche de zéro chez les variétés améliorées ($F_{IS} = -0,118$). Aucun allèle rare n'a été détecté chez les variétés améliorées ainsi que d'allèles privés. La diversité génétique intrapopulation des variétés améliorées ne diffère pas significativement entre les départements selon le test exact de Fisher réalisé comme l'indique la probabilité $p = 0,735$ (Tableau XVIII).

Tableau XVIII : Paramètres de mesure de la diversité génétique intrapopulation des variétés améliorées

Sous-populations	Paramètres de diversité génétique intrapopulation						<i>p</i>
	A	Ar	Ap	He	Ho	F_{IS}	
Bouaké (n= 12)	3,4	0	0	0,685	0,760	-0,109	0,735
Yamoussoukro (n = 12)	3	0	0	0,700	0,787	-0,124	
Daloa (n= 11)	3,2	0	0	0,698	0,780	-0,117	
Moyenne	3,2	0	0	0,694	0,776	-0,118	

n : nombre d'individus ; **A** : nombre moyen d'allèles ; **Ar** : nombre d'allèles rares ; **Ap** : nombre d'allèles privés ; **He** : taux d'hétérozygotie attendue ; **Ho** : taux d'hétérozygotie observée ; **F_{IS}** : indice de fixation, **p** : probabilité associée au test exact de Fisher.

3.1.2.3. Diversité génétique interpopulation du manioc

Les résultats de l'évaluation de la diversité génétique interpopulation montrent une différenciation génétique qui diffère entre les variétés améliorées et les variétés traditionnelles.

3.1.2.3.1. Diversité génétique interpopulation des variétés traditionnelles de manioc

Les valeurs de F_{ST} moyennes entre les sous-populations de variétés traditionnelles sont comprises entre 0,126 et 0,154 traduisant ainsi une différenciation génétique modérée entre les départements (**Tableau XIX**). Si l'on considère les loci individuellement, il ressort que sur les cinq marqueurs microsatellites utilisés, le F_{ST} le plus élevé est obtenu avec le marqueur SSRY61 ($F_{ST} = 0,164$) traduisant une différenciation génétique importante. Pour les quatre autres marqueurs génétiques, la différenciation génétique est modérée avec des valeurs de F_{ST} égales à 0,151 ; 0,140 ; 0,123 et 0,120 respectivement pour les marqueurs SSRY100, EME303, EME123 et EME222.

3.1.2.3.2. Diversité génétique interpopulation des variétés améliorées de manioc

Concernant les variétés améliorées, on note une faible différenciation génétique entre les sous-populations avec des valeurs de F_{ST} comprises entre 0,018 et 0,02. Le F_{ST} le plus élevé est obtenu entre les départements de Bouaké et Daloa ($F_{ST} = 0,02$). Egalement, la différenciation génétique entre les sous-populations est faible pour chaque locus pris individuellement (**Tableau XX**).

Tableau XIX : Différenciation génétique des variétés de manioc traditionnelles entre les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Paramètre de diversité génétique interpopulation F_{ST}						
Départements	Loci					Moyenne
	EME20	SSRY61	SSRY100	EME222	EME303	
Bouaké/Yamoussoukro	0,154	0,096	0,102	0,168	0,128	0,129
Yamoussoukro/Daloa	0,159	0,132	0,132	0,142	0,112	0,126
Bouaké/Daloa	0,057	0,266	0,220	0,050	0,181	0,154
Moyenne	0,123	0,164	0,151	0,120	0,140	0,136

F_{ST} : indice de différenciation génétique

Tableau XX : Différenciation génétique des variétés de manioc améliorées entre les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Paramètre de diversité génétique interpopulation F_{ST}						
Départements	Loci					Moyenne
	EME20	SSRY61	SSRY100	EME222	EME303	
Bouaké/Yamoussoukro	0,022	0,032	0,008	0,004	0,025	0,018
Yamoussoukro/Daloa	0,008	0,002	0,03	0,04	0,01	0,018
Bouaké/Daloa	0,016	0,014	0,06	0,008	0,008	0,021
Moyenne	0,015	0,016	0,033	0,017	0,014	0,02

F_{ST} : indice de différenciation génétique

3.1.2.4. Structure génétique des populations de manioc étudiées

La structuration génétique des variétés de manioc traditionnelles échantillonnées dans chaque sous-population a été réalisée à partir des matrices de dissimilarité générées par le logiciel FreeNa. Des extraits de ces matrices de dissimilarité basée sur les fréquences des génotypes différents pour chacune des sous-populations sont présentés dans les **Tableaux XXI ; XXII et XXIII**. Les arbres phylogénétiques générés ont permis de montrer que plusieurs groupes génétiques se distinguent clairement dans chaque sous-population. Dans le département de Bouaké, 6 groupes et 11 singletons ont été obtenus (**Figure 31**). Dans celui de Yamoussoukro 12 groupes distincts ont été formés avec 6 singletons (**Figure 32**). Finalement, 6 groupes génétiques et 9 singletons ont été observés dans le département de Daloa (**Figure 33**). Les résultats phylogénétiques montrent une variabilité génétique à l'intérieur des variétés traditionnelles Yacé, Bonoua et Zoklo collectées dans différents villages

Par ailleurs, des individus dont les noms vernaculaires diffèrent d'un site à un autre ont formé des groupes génétiques hétérogènes pour certains et homogènes pour d'autres. A titre d'exemple, les variétés de noms vernaculaires Adjou et Manioc noir (Mnoir) collectées dans le village Assanou (AsY), celles de nom vernaculaire Abouagba et Tradi2 collectées à Oufouédiekro (OY), Icône et Agbapka collectées à Lolobo (LY) constituent le groupe génétique 1 du département de Yamoussoukro.

Tableau XXI : Matrice de dissimilarité génétique des variétés traditionnelles de manioc collectées dans le département de Bouaké

	Agbakloa_DjB	Golou_DjB	Agnrin_DB	Tradi_KeB	Zoklo_DjB	Attodi_KoB	Bahagba_KeB	Benda_DjB	Kobosse_DjB	Bonon_KoB
Agbakloa_DjB	-									
Golou_DjB	0,9003	-								
Agnrin_DB	0,4872	0,9003	-							
Tradi_KeB	0,9003	0,0000	0,9003	-						
Zoklo_DjB	0,9003	0,9003	0,9003	0,9003	-					
Attodi_KoB	0,4872	0,9003	0,0000	0,9003	0,9003	-				
Bahagba_KeB	0,4872	0,9003	0,0000	0,9003	0,9003	0,0000	-			
Benda_DjB	0,0000	0,9003	0,4872	0,9003	0,9003	0,4872	0,4872	-		
Kobosse_DjB	0,6366	0,9003	0,4872	0,9003	0,6366	0,4872	0,4872	0,6366	-	
Bonon_KoB	0,4872	0,9003	0,0000	0,9003	0,9003	0,0000	0,0000	0,4872	0,4872	-

Tableau XXII : Matrice de dissimilarité génétique des variétés traditionnelles de manioc collectées dans le département de Yamoussoukro

	Aleda_LY	Pklognon_LY	Baffi_NY	Agbapka_LY	Agbegre_LY	Bondoukou_LY	Bonoua_ApY	Yace_AsY	Baseline_AsY	Yace_ApY
Aleda_LY	-									
Pklognon_LY	0,9003	-								
Baffi_NY	0,9003	0,9003	-							
Agbapka_LY	0,9003	0,6366	0,9003	-						
Agbegre_LY	0,6366	0,6366	0,9003	0,9003	-					
Bondoukou_LY	0,6366	0,9003	0,6366	0,9003	0,6366	-				
Bonoua_ApY	0,9003	0,6366	0,6366	0,6366	0,9003	0,6366	-			
Yace_AsY	0,9003	0,6366	0,9003	0,6366	0,9003	0,9003	0,6366	-		
Baseline_AsY	0,9003	0,6366	0,6366	0,9003	0,6366	0,6366	0,6366	0,9003	-	
Yace_ApY	0,9003	0,6366	0,9003	0,6366	0,9003	0,9003	0,6366	0,0000	0,9003	-

Tableau XXIII : Matrice de dissimilarité génétique des variétés traditionnelles de manioc collectées dans le département de Daloa

	6mois_ZkD	Inco1_ZD	Bonoua_KD	Bonoua_BD	Assan_KD	Mjaune_BD	Patate_ZD	Patate_ZgD	Mandou_ZD	Israel_ZkD
6mois_ZkD	-									
Inco1_ZD	0,9003	-								
Bonoua_KD	0,6366	0,9003	-							
Bonoua_BD	0,6366	0,9003	0,0000	-						
Assan_KD	0,4872	0,9003	0,4872	0,4872	-					
Mjaune_BD	0,6366	0,6366	0,6366	0,6366	0,4872	-				
Patate_ZD	0,4872	0,9003	0,9003	0,9003	0,9003	0,9003	-			
Patate_ZgD	0,4872	0,9003	0,9003	0,9003	0,9003	0,9003	0,0000	-		
Mandou_ZD	0,0000	0,9003	0,6366	0,6366	0,4872	0,6366	0,4872	0,4872	-	
Israel_ZkD	0,6366	0,6366	0,9003	0,9003	0,9003	0,9003	0,4872	0,4872	0,6366	-

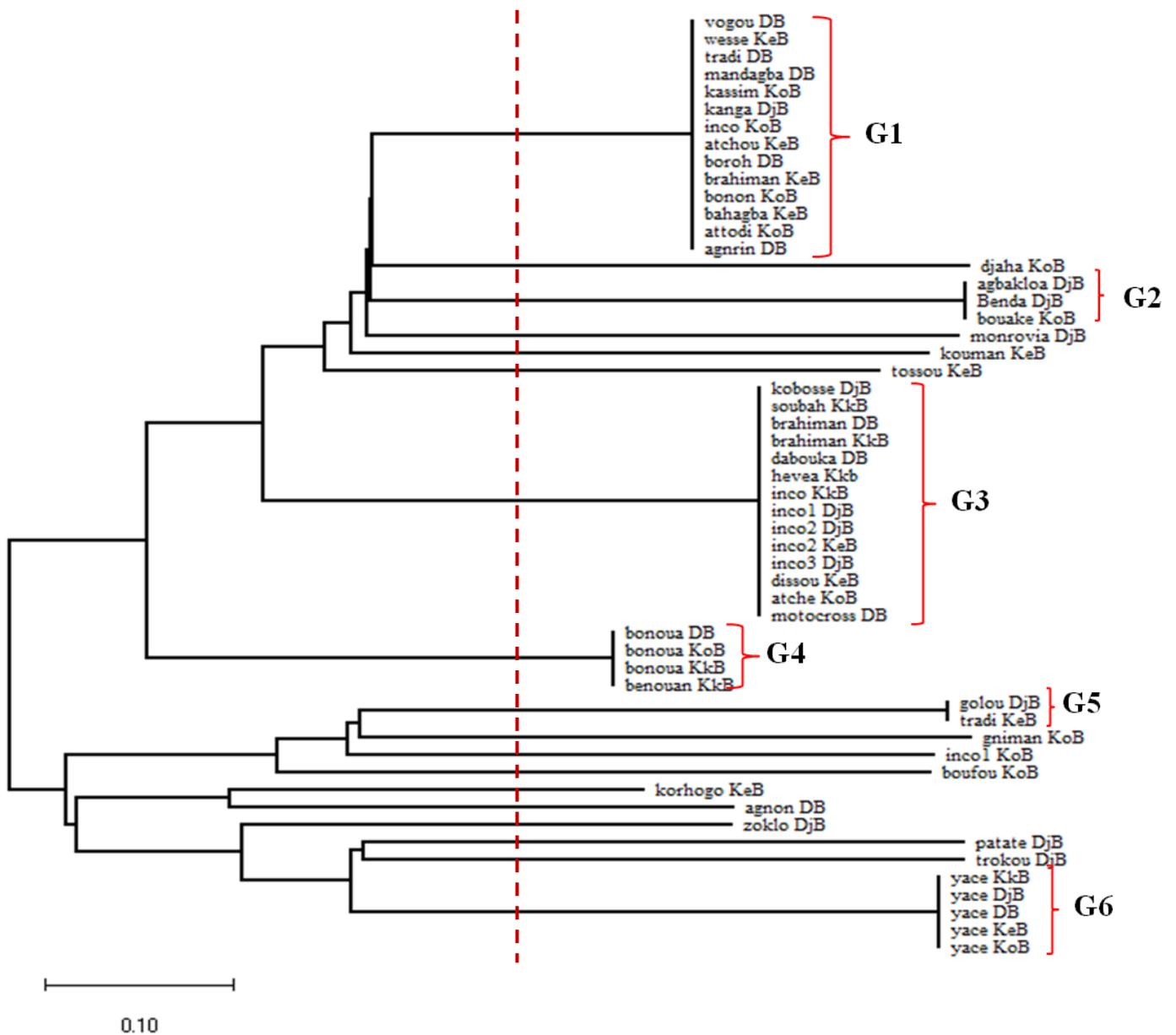


Figure 31 : Dendrogramme selon la méthode Neighbour Joining montrant la structure génétique des variétés de manioc traditionnelles collectées dans le département de Bouaké

G1, G2, ..., G6 : Groupe 1, Groupe2, ..., Groupe 6.

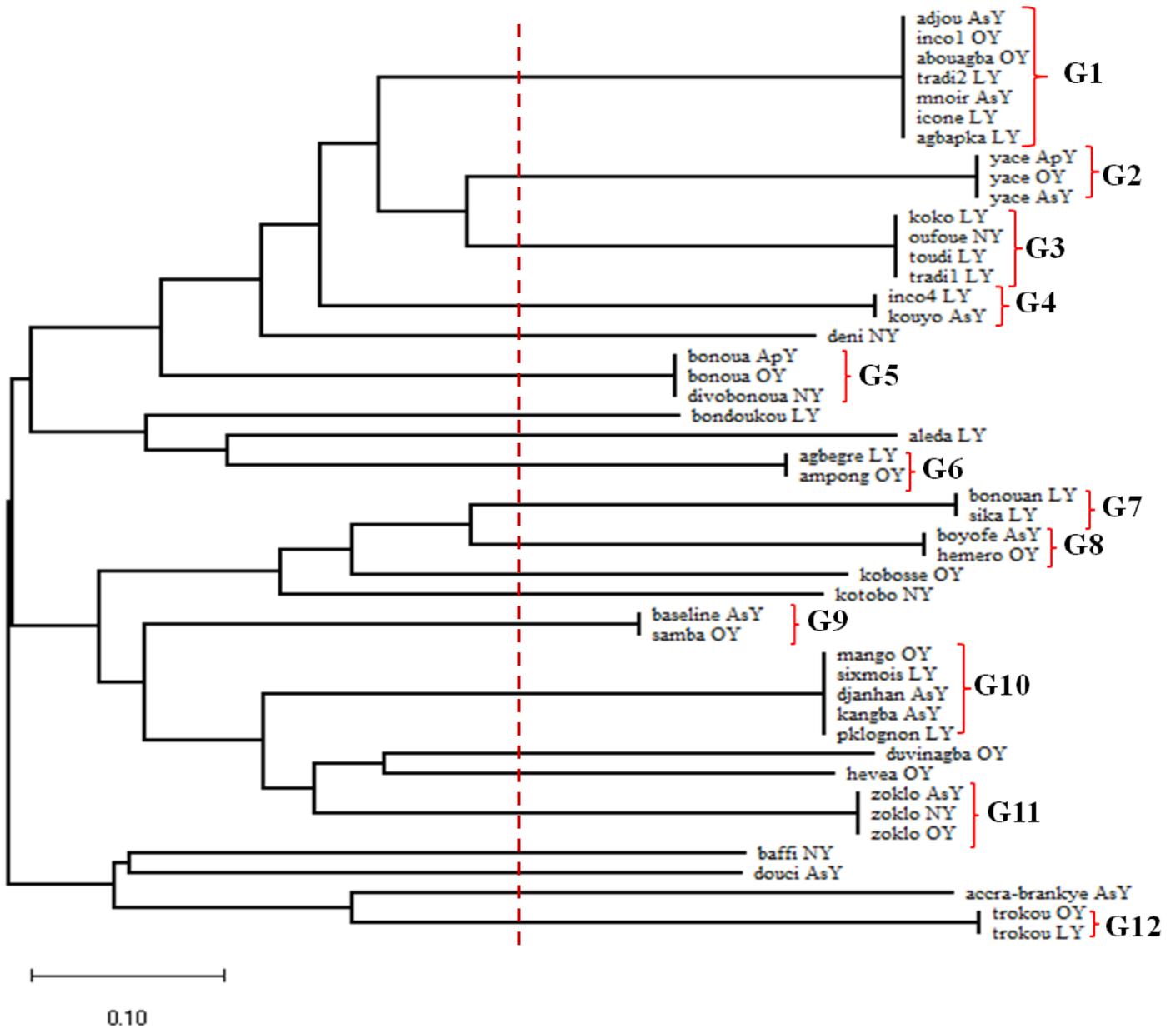


Figure 32 : Dendrogramme selon la méthode Neighbour Joining montrant la structure génétique des variétés de manioc traditionnelles collectées dans le département de Yamoussoukro

G1, G2, ..., G12 : Groupe 1, Groupe2, ..., Groupe 12.

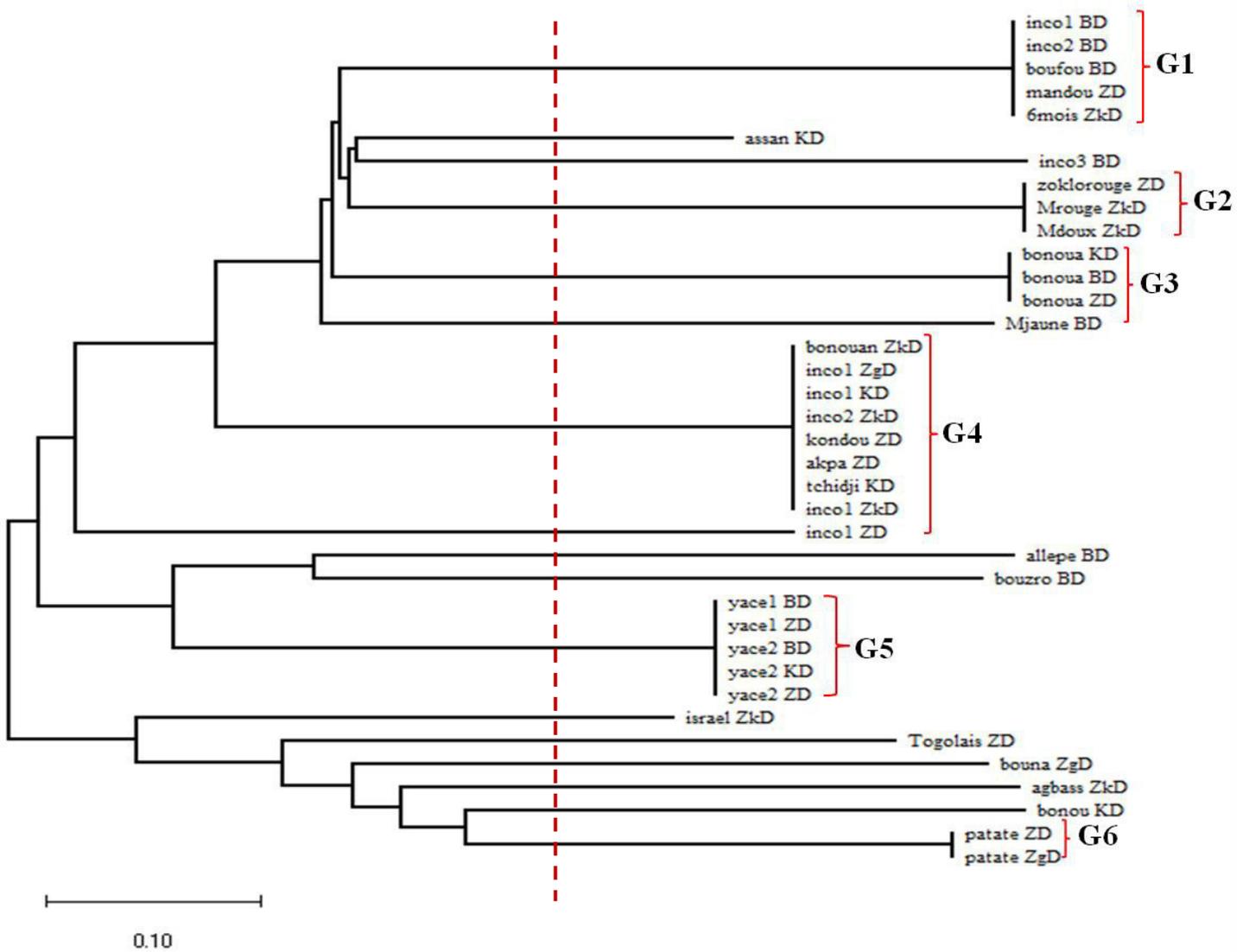


Figure 33 : Dendrogramme selon la méthode Neighbour Joining montrant la structure génétique des variétés de manioc traditionnelles collectées dans le département de Daloa

G1, G2, ..., G6 : Groupe 1, Groupe2, ..., Groupe 6.

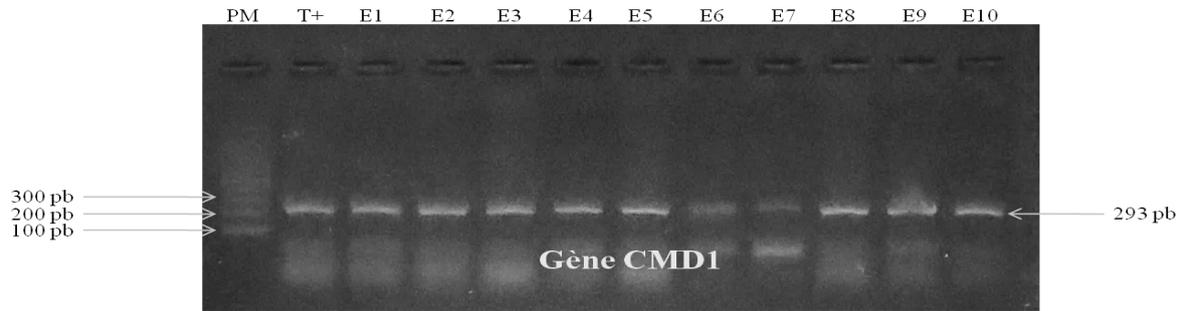
3.1.3. Identification des génotypes de manioc résistants à la mosaïque à partir du criblage des gènes de résistance

3.1.3.1. Caractérisation moléculaire des gènes impliqués dans la résistance à la mosaïque du manioc

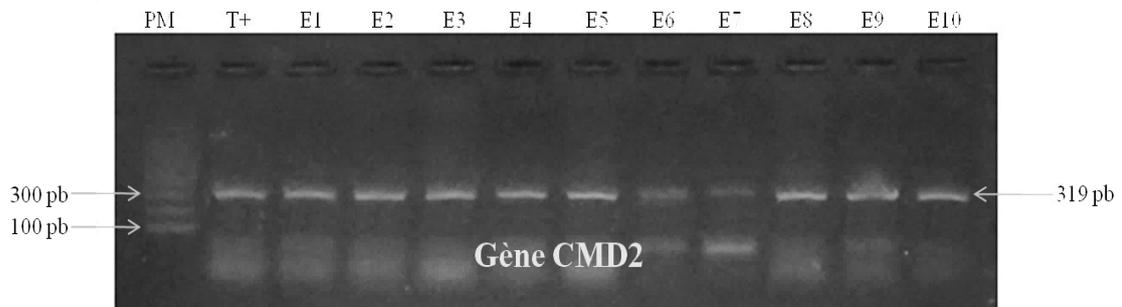
Cette étude a été réalisée en vue de cribler des génotypes de manioc non vulgarisées résistants à la mosaïque du manioc. Ainsi, les variétés sensibles et résistantes aux virus de la mosaïque ont été identifiés après une amplification par PCR des gènes de résistance existant ou non chez ceux-ci (**Figure 34**). Le gène de résistance CMD1 a été détecté par le marqueur SSRY40 à la taille d'allèle 293 pb (**Figure 34a**). Le gène CMD2 par contre a été détecté par le marqueur NS169 à la taille d'allèle 319 pb (**Figure 34b**). Enfin, le gène de résistance à la mosaïque CMD3 a été détecté par le marqueur NS198 à la taille d'allèle 196 pb comme le présente la **Figure 36c**.

3.1.3.2. Occurrence des gènes de résistance détectés

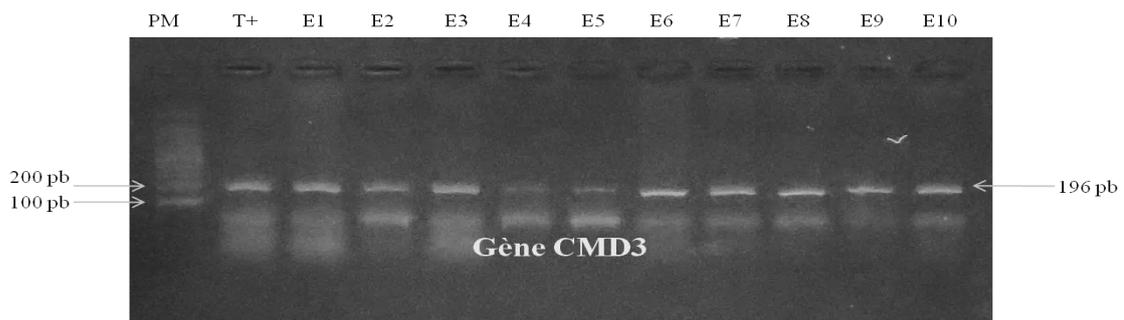
L'analyse moléculaire réalisée pour l'identification des gènes de résistance aux virus de la mosaïque de manioc s'est faite sur 101 échantillons de variétés traditionnelles collectées dans les trois départements prospectés. Les résultats obtenus ont permis de classer ces individus selon leurs niveaux de résistance aux virus. Quarante-trois (43) individus ne possédaient aucun gène de résistance à la mosaïque. Sur les 58 autres individus possédant au moins l'un des gènes de résistance, 50 % disposaient simultanément des trois gènes étudiés notamment CMD1, CMD2 et CMD3. Un pourcentage de 31,03 des individus a présenté les gènes CMD2 et CMD3. Cependant, aucun individu ne possédait simultanément les gènes CMD1 et CMD2 ainsi que les gènes CMD1 et CMD3. Par ailleurs, 12,1% des individus ont présenté uniquement le gène CMD2 tandis que seulement 5,17 et 1,7 des variétés disposaient uniquement des gènes CMD3 et CMD1 respectivement (**Figure 35**).



a : Allèle diagnostique du gène CMD1 à partir du marqueur SSRY40



b : Allèle diagnostique du gène CMD2 à partir du marqueur SSRY169



c : Allèle diagnostique du gène CMD3 à partir du marqueur SSRY198

Figure 34 : Allèles diagnostiques des gènes de résistance aux virus de la mosaïque du manioc chez les variétés traditionnelles de manioc

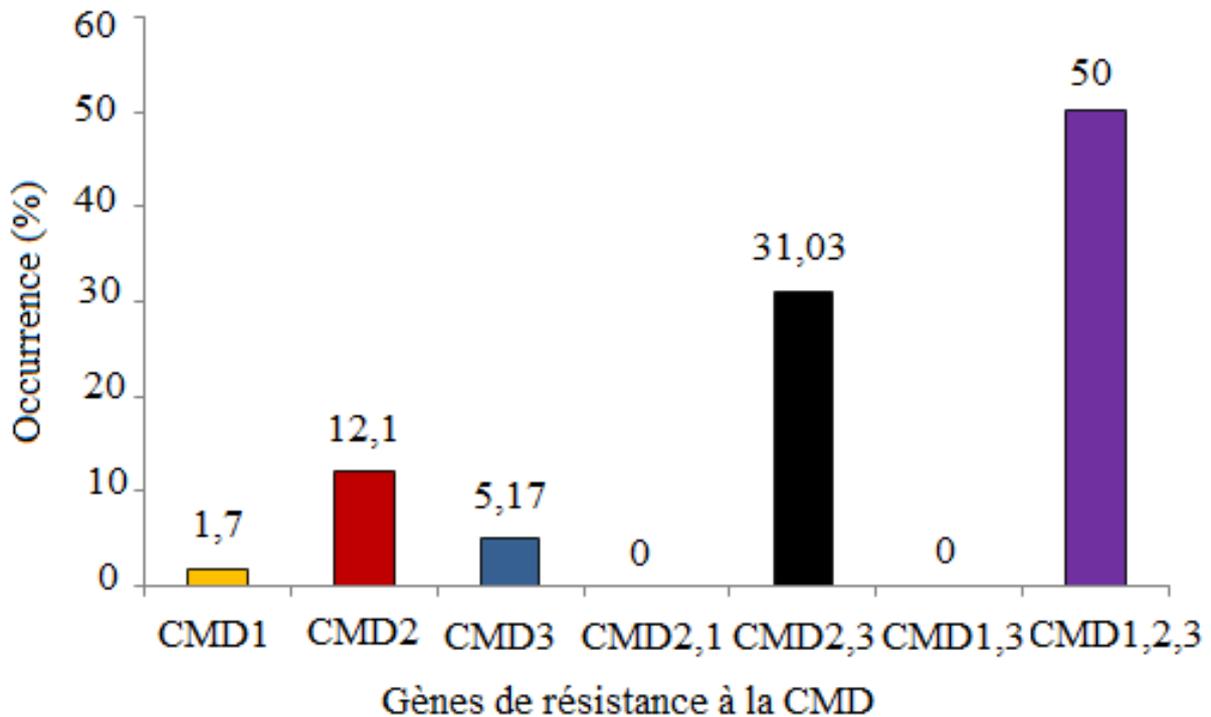


Figure 35 : Occurrence des gènes de résistance détectés chez des échantillons de manioc dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

CMD1 : présence du gène de résistance CMD1

CMD2 : présence du gène de résistance CMD2

CMD3 : présence du gène de résistance CMD3

CMD2,1 : présence simultanée des gènes de résistance CMD2 et CMD1 ;

CMD2,3 : présence simultanée des gènes de résistance CMD2 et CMD3 ;

CMD1,2,3 : présence simultanée des gènes de résistance CMD1, CMD2 et CMD3.

3.1.3.3. Classification des différents génotypes de manioc collectés selon leur résistance aux virus de la mosaïque

La classification ascendante hiérarchique réalisée à partir des différents niveaux de sévérité observés de la mosaïque et des différents gènes de résistance a permis de regrouper les génotypes en trois groupes distincts dans chaque département. Ce sont les groupe1 (C1), groupe 2 (C2) et groupe 3 (C3). Le groupe 1 est composé d'individus de niveau de sévérité 3

ou 4 et ne présentent aucun gène de résistance. Ces géotypes sont dits sensibles à la mosaïque (S). Les individus du groupe 2 ont un niveau de sévérité de 1 ou 2 et portent le gène de résistance CMD2. Ce sont les géotypes dits résistants à la mosaïque de manioc (R). Le groupe 3 quant à lui est composé uniquement de plantes asymptomatiques présentant les gènes de résistance CMD1, CMD2 et CMD3. Ces géotypes sont dits hautement résistants à la mosaïque du manioc (HR). Les résultats obtenus montrent que les variétés Yacé, Bonoua et Zoklo peuvent être présentes dans les trois groupes définis pour la résistance aux virus de la mosaïque selon la classification réalisée dans les trois départements prospectés (**Figures 36, 37 & 38**).

3.1.3.3.1. Géotypes de manioc résistants identifiés à Bouaké

Sur trente-six (36) géotypes traditionnels de manioc testés pour le département de Bouaké, dix-sept (17) étaient sensibles (S) à la mosaïque du manioc, douze (12) étaient résistants (R) et sept (07) hautement résistants (HR). Les sept (07) géotypes HR obtenus à Bouaké sont Agrin, Mandagba, Brahiman, Motocross, Monrovia et deux géotypes non identifiés (**Figure 36**).

3.1.3.3.2. Géotypes de manioc résistants identifiés à Yamoussoukro

Dans le département de Yamoussoukro, trente-neuf (39) géotypes traditionnels ont été utilisés pour l'évaluation de la résistance. Parmi ceux-ci, onze (11) étaient hautement résistants (HR), douze (12) étaient résistants (R) et seize (16) étaient sensibles à la mosaïque. Les onze (11) géotypes HR sont Toudi, Sika, Kotobo, Kouyo, Kangba, Icône, Bonouan, Boyofe, Zoklo, Tradi et Yacé (**Figure 37**).

3.1.3.3.3. Géotypes de manioc résistants identifiés à Daloa

Dans le département de Daloa, sur vingt-six (26) géotypes traditionnels testés, seulement six (06) étaient hautement résistants (HR). Il s'agit de Agbass, Bonoua, Patate, M.jaune (Manioc jaune), Bouna et Brahiman. Huit (08) étaient résistants tandis que douze (12) étaient sensibles (**Figure 38**).

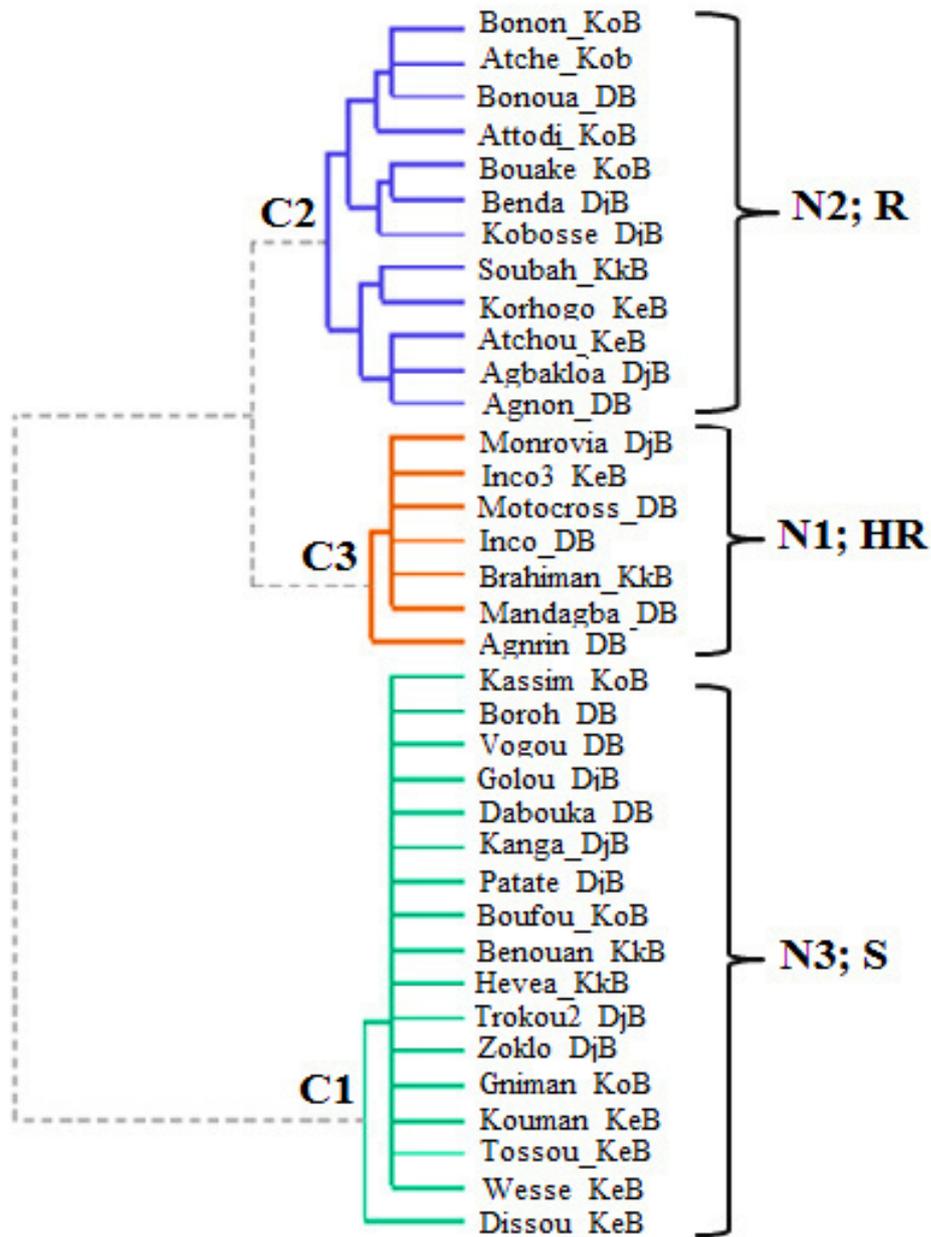


Figure 36 : Classification des génotypes de manioc traditionnels du département de Bouaké en fonction de leurs degrés de résistance à la mosaïque

C1 : groupe1 ; **C2** : groupe2 ; **C3** : groupe3 ; **N1** : niveau de sévérité 1 ; **N2** : niveau de sévérité 2 ; **N3** : niveau de sévérité 3 ; **N4** : niveau de sévérité 4 ; **S** : génotypes de manioc sensibles à la mosaïque ; **HR** : génotypes de manioc hautement résistants à la mosaïque ; **R** : génotypes de manioc résistants à la mosaïque.

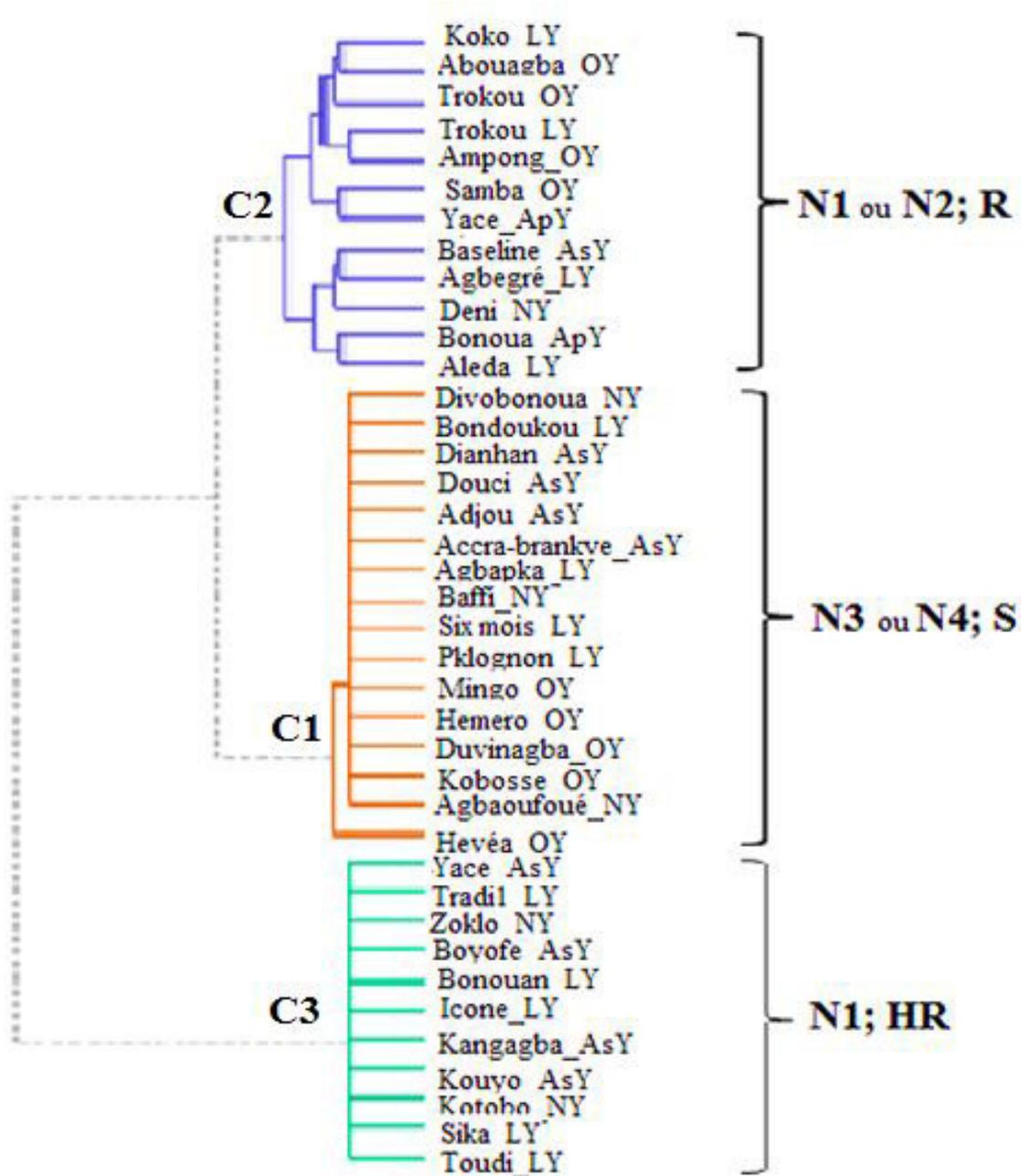


Figure 37 : Classification des génotypes de manioc traditionnels du département de Yamoussoukro en fonction de leurs degrés de résistance à la mosaïque

C1 : groupe1 ; **C2** : groupe2 ; **C3** : groupe3 ; **N1** : niveau de sévérité 1 ; **N2** : niveau de sévérité 2 ; **N3** : niveau de sévérité 3 ; **N4** : niveau de sévérité 4 ; **S** : génotypes de manioc sensibles à la mosaïque ; **HR** : génotypes de manioc hautement résistants à la mosaïque ; **R** : génotypes de manioc résistants.

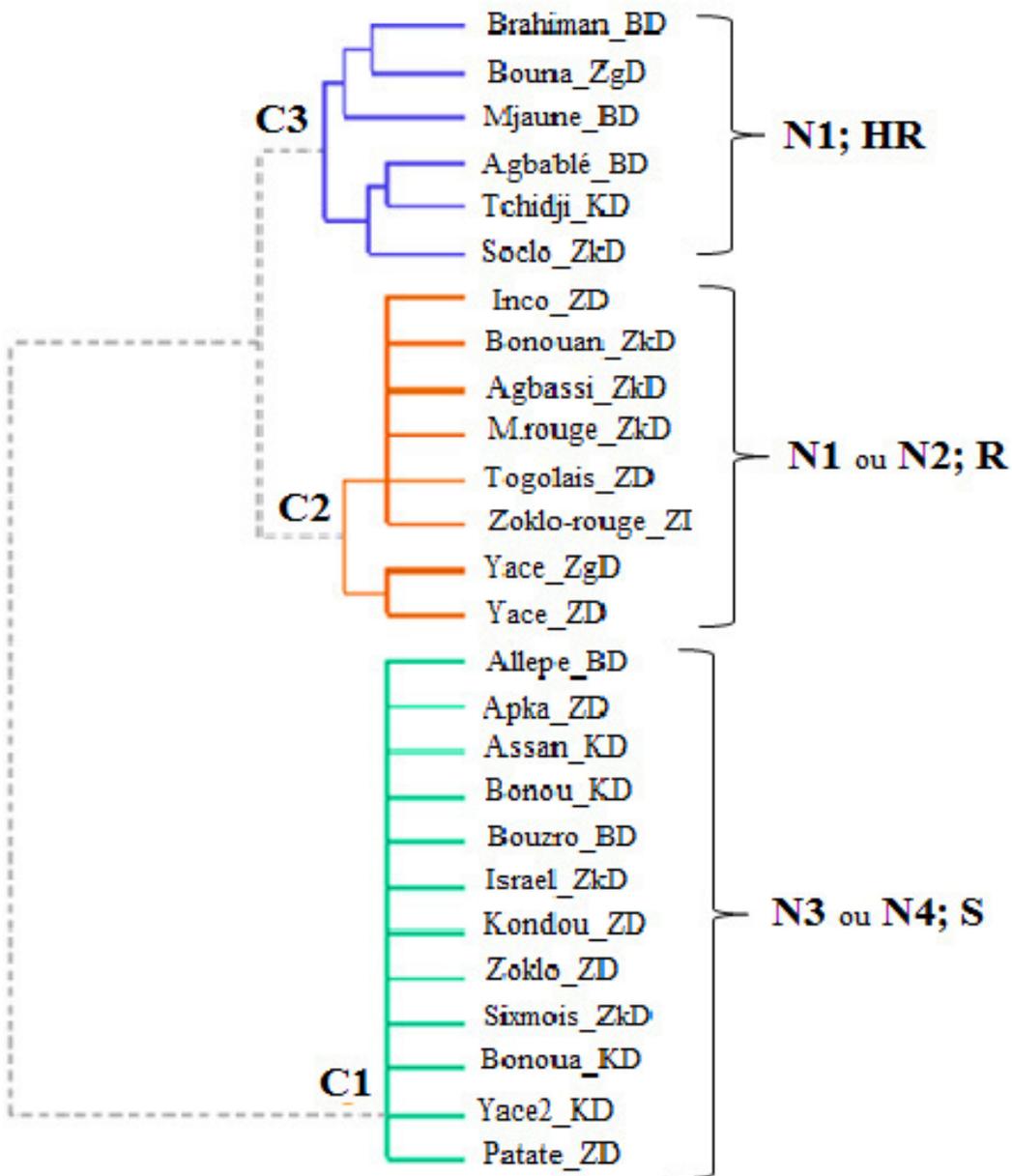


Figure 38 : Classification des génotypes de manioc traditionnels du département de Daloa en fonction de leurs degrés de résistance à la mosaïque

C1 : groupe1 ; **C2** : groupe2 ; **C3** : groupe3 ; **N1** : niveau de sévérité 1 ; **N2** : niveau de sévérité 2 ; **N3** : niveau de sévérité 3 ; **N4** : niveau de sévérité 4 ; **S** : génotypes de manioc sensibles à la mosaïque ; **HR** : génotypes de manioc hautement résistants à la mosaïque ; **R** : génotypes de manioc résistants à la mosaïque.

3.1.3.4. Répartition des génotypes de manioc selon leur sensibilité à la mosaïque dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa

Dans cette étude, 24 génotypes traditionnels de manioc hautement résistants ont été identifiés ainsi que 32 résistants et 45 sensibles. Le nombre de génotypes hautement résistants est plus important dans le département de Yamoussoukro (45,83 %) suivi du département de Bouaké (29,17 %) et celui de Daloa avec un taux de 25 %. Concernant les génotypes résistants, la proportion la plus élevée (37,5 %) est observée aussi bien dans le département de Bouaké que celui de Yamoussoukro. Enfin, les résultats de cette étude révèlent que le département de Bouaké regorge le taux le plus élevé de génotypes de manioc sensibles à la mosaïque (37,78 %) suivi du département de Yamoussoukro (35,55 %) et Daloa (26 %).

3.1.3.5. Rapport entre la nature des souches virales et le niveau de résistance à la mosaïque des plantes de manioc

La **figure 39** présente les proportions des virus identifiés chez les différents groupes de manioc selon leur sensibilité à la mosaïque. Elle montre également l'impact de chaque souche de virus sur la sensibilité ou la résistance des plantes de manioc à cette maladie. Une différence significative est observée entre les proportions d'individus possédant chacune des souches de virus, chez les génotypes sensibles, résistants et hautement résistants à la CMD ($p < 0,001$). Chez les variétés hautement résistantes, aucun virus EACMV et aucune coïnfection ACMV-EACMV n'a été observée. Seulement 11 % de ces individus possédaient la souche ACMV. En d'autres termes, 89 % des individus hautement résistants ne possédaient aucun virus de la mosaïque. En considérant les variétés résistantes uniquement, les résultats montrent que 28 % possédaient le virus ACMV, 7 % possédaient la souche EACMV et 2% étaient coïnfectées par les virus ACMV et EACMV. Enfin, 63 % des individus résistants n'ont présenté aucun virus. En ce qui concerne les génotypes sensibles, les résultats révèlent que 35,2 % étaient infectés par la souche EACMV tandis que 29,5 % portaient le virus ACMV et 31,7 % étaient infectés concomitamment par les virus ACMV et EACMV (**Figure 39**). Enfin, un taux de 3,6 % des échantillons analysés n'a présenté aucun virus parmi ceux étudiés.

3.1.3.6. Corrélation entre les allèles privés et la résistance des géotypes de manioc à la mosaïque

Cette étude a consisté à expliquer la relation entre les allèles privés que sont les allèles spécifiques à une sous-population donnée identifiés chez des géotypes de manioc et la résistance de ceux-ci aux virus de la mosaïque. Ainsi, une régression linéaire simple de la résistance des individus à la mosaïque sur les individus possédant un allèle privé a été réalisée. Sur la base des résultats obtenus, l'hypothèse nulle selon laquelle ces deux variables (individus possédant des allèles privés et la résistance à la mosaïque) ne sont pas liées a été rejetée ($p < 0,05$). La valeur du coefficient de corrélation ($r = 0,63$) révèle que la présence d'allèles privés et la résistance à la mosaïque sont positivement associées. Environ 40 % de la résistance des variétés traditionnelles s'expliquent par la présence d'allèles privés (**Figure 40**).

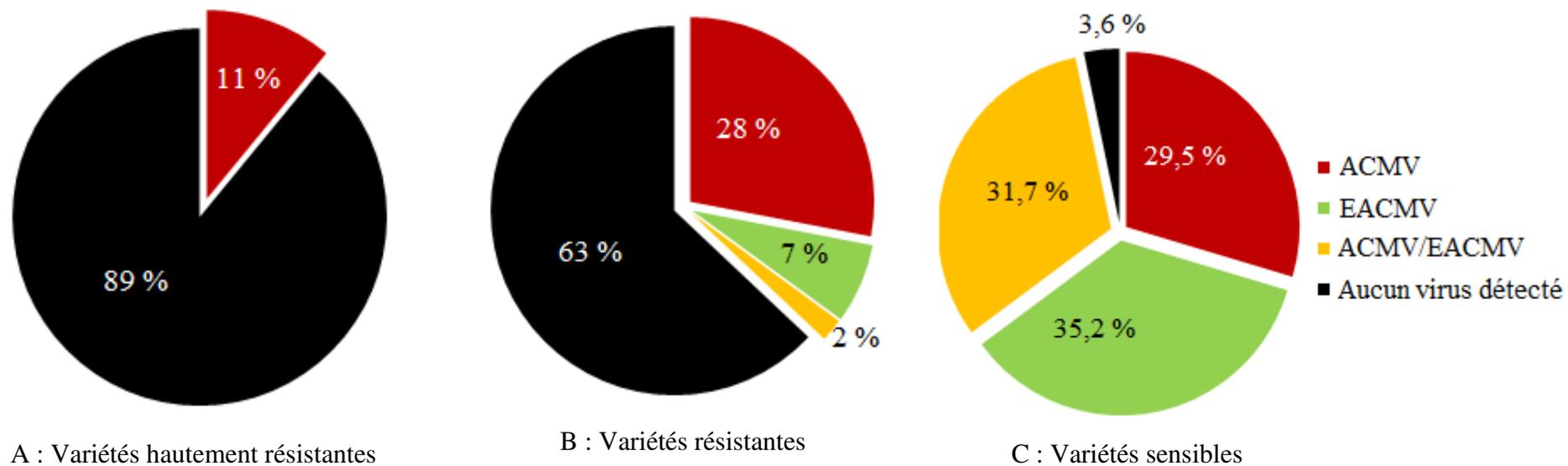


Figure 39 : Répartition des souches de virus identifiés chez les variétés de manioc hautement résistantes, résistantes et sensibles à la mosaïque du manioc

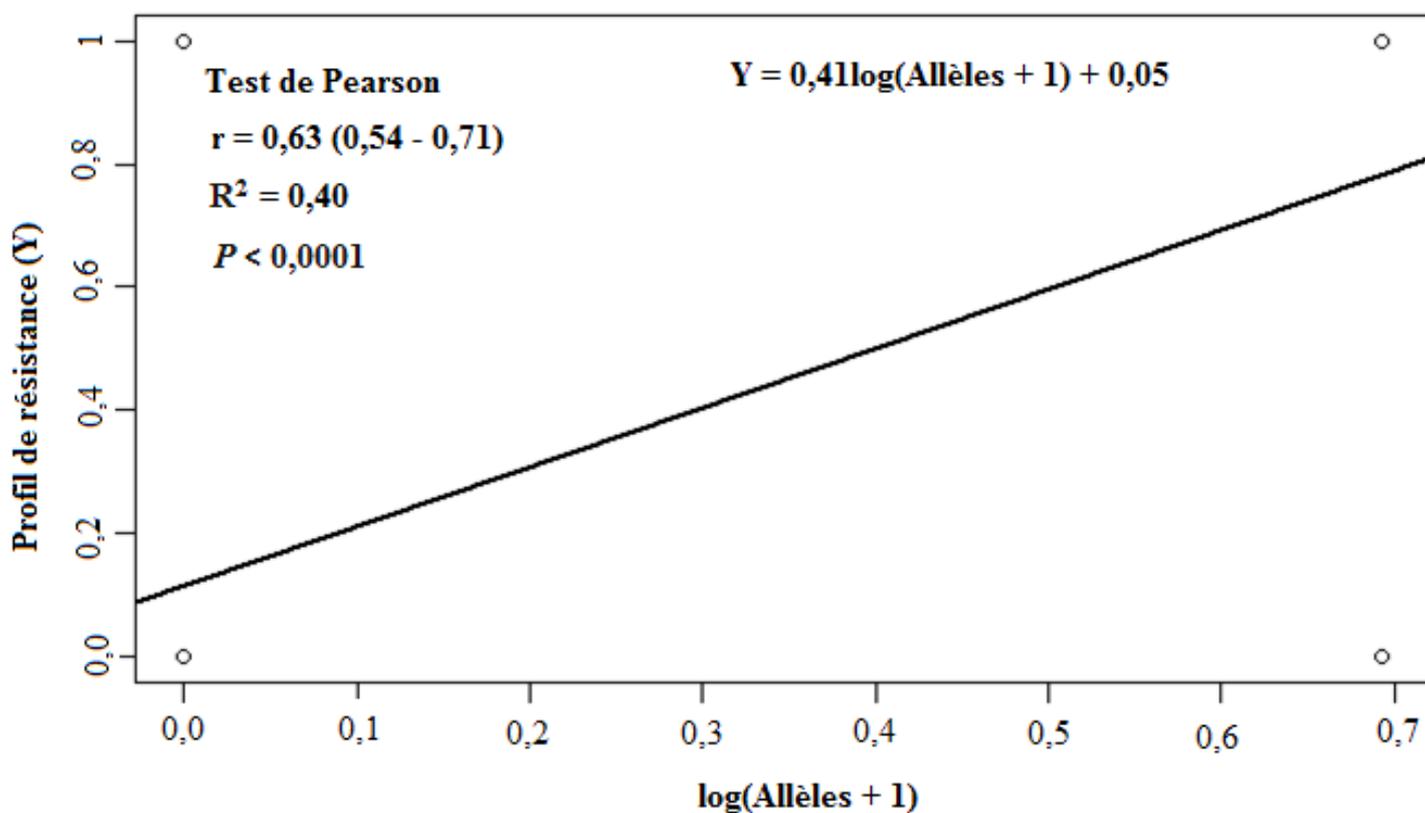


Figure 40: Régression linéaire de la présence d'allèles rares sur la résistance aux virus de la mosaïque du manioc

R^2 : coefficient de détermination ; r : coefficient de corrélation

3.2. DISCUSSION

Dans l'optique de lutter contre la pauvreté et l'insécurité alimentaire, l'objectif de cette étude est de garantir une production durable du manioc en Côte d'Ivoire à travers la lutte contre la mosaïque du manioc. Les objectifs spécifiques traités sont (1) l'étude de l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire, (2) l'évaluation de la diversité et la structuration génétique des variétés améliorées et traditionnelles de manioc et (3) l'identification de variétés de manioc capables de résister aux mécanismes des virus, à partir du criblage des gènes de résistance à la mosaïque.

3.2.1. Etude de l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire

La prévalence phénotypique globale de la mosaïque du manioc évaluée dans cette étude est de 43,65 %. Cette prévalence est statistiquement identique dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa avec des niveaux de sévérité allant de 1 à 4, ce qui montre une évolution de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire. Ces valeurs identiques des prévalences obtenues pourraient se justifier par les échanges continus de boutures de manioc entre les départements prospectés à savoir Bouaké, Yamoussoukro et Daloa. Les études de Beugre (2017) réalisées dans le Nord-est du pays ont aussi révélé l'existence de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire avec une prévalence de 48,9 %. Une autre étude réalisée en 2009 par Toualy *et al.* (2014) a montré que cette maladie était présente dans plusieurs régions du pays avec des prévalences variables allant de 41,9 à 51,4 %.

Divers facteurs de risque de développement de la mosaïque ont été identifiés au cours de cette étude, parmi lesquels l'âge des plantations, la saison et l'origine des boutures. Les champs dont l'âge était compris entre 3 et 6 mois étaient les plus infectés. En effet, à partir de trois (3) mois d'âge jusqu'à cinq (5) mois, les plantes de manioc sont en croissance active et de ce fait, plus vulnérables à l'attaque des pathogènes. Ces résultats sont soutenus par les travaux de Frimpong *et al.* (2021). La prévalence phénotypique élevée de la mosaïque en saison sèche pourrait être due au stress hydrique (manque d'eau) que pourraient subir les jeunes plants en cette période, qui aurait augmenté leur vulnérabilité aux pathogènes, notamment aux virus (Kapoor *et al.*, 2020). Cependant, l'effet de certains ravageurs tels que les acariens qui pullulent pendant les saisons sèches sur les plantes peuvent parfois être confondu aux symptômes de la mosaïque. C'est pourquoi une analyse moléculaire de détection des virus chez les plantes est nécessaire pour conclure qu'une plante est atteinte de mosaïque ou non. Par ailleurs, il est

ressorti des enquêtes réalisées que les plantes les plus infectées proviennent des boutures déjà infectées dont l'état sanitaire n'a pas été contrôlé. Les échanges de boutures entre champs de manioc infectés seraient le principal moyen de propagation des viroses dont la mosaïque. Cette assertion est soutenue par plusieurs auteurs dont Kwibuka *et al.* (2021) selon lesquels les boutures infectées constituent le premier moyen de dissémination des maladies d'origine virale dans diverses zones de cultures du manioc. Aussi, la propagation des virus et le maintien de la mosaïque du manioc dans les champs pourraient se justifier par la présence dans les champs de manioc de mauvaises herbes qui favorisent l'hébergement des mouches blanches *B. tabaci*. Nos résultats corroborent ceux de Nazarov *et al.* (2020) qui ont montré que la propagation des virus de la mosaïque est corrélée avec les facteurs tels que l'âge des plantes, les conditions climatiques, la sensibilité de la variété, l'entretien du champ et la nature de la souche virale présente dans le champ.

Les souches de virus de la mosaïque de manioc identifiées dans les trois zones prospectées sont l'ACMV, l'EACMV et les coïnfections des souches ACMV et EACMV. L'ACMV était le virus le plus détecté avec un taux d'environ 64 %. Les résultats de cette étude sont similaires à ceux de Toualy *et al.* (2014), qui ont aussi identifié ces deux souches de virus, ACMV et EACMV, dans diverses zones de culture du manioc de la Côte d'Ivoire avec une dominance de la souche ACMV. D'autres travaux ont également révélé une dominance de la souche ACMV dans des pays affectés par cette maladie notamment le Burkina Faso et la Madagascar (Harimalala *et al.*, 2015). Cependant, les symptômes induits par la souche ACMV seule étaient moins graves alors que les plantes infectées par l'EACMV ou par la coïnfection ACMV/EACMV présentaient des sévérités plus élevées. Selon Eni *et al.* (2021), il existe une corrélation positive entre la nature de la souche virale et l'intensité de symptômes sur les feuilles. Ces résultats sont en accord avec ceux de Traoré (2017) qui a montré que la sévérité élevée des symptômes de la CMD est due soit à la souche de virus EACMV ou à la synergie entre deux souches de virus.

En tenant compte du type de variétés, il a été montré que comme certaines variétés traditionnelles, les variétés améliorées étaient aussi infectées par les virus de la mosaïque du manioc. Cela révèle que certaines variétés améliorées perdent au cours du temps une bonne partie de leur vigueur. La réduction de la résistance chez certaines variétés améliorées pourrait être due à la faible diversité génétique observée chez celles-ci comparativement à celle des variétés traditionnelles (Ocampo *et al.*, 2021). La faible diversité variétale du manioc en Côte d'Ivoire serait l'une des causes majeures de sa diversité génétique réduite donc de sa

vulnérabilité à diverses maladies dont la mosaïque. Dietzgen *et al.* (2016) ont révélé dans une étude que du fait de la faible diversité variétale du manioc, le contact permanent entre insecte-virus-hôte peut transformer les variétés en des hôtes favorables pour les virus et ainsi faciliter leur propagation.

Le taux d'infection des virus était significativement plus élevé chez les plantes symptomatiques que chez les plantes asymptomatiques. Cependant, 35,29 % des plantes asymptomatiques étaient positifs aux virus. En effet, certaines variétés sont des réservoirs pour les virus sans être affectées par ceux-ci. Lorsque ces virus sont transmis à d'autres variétés plus sensibles par l'intermédiaire des mouches blanches, ils peuvent être virulents. Cela confirme que l'absence de symptômes chez une plante n'est pas suffisante pour conclure de l'absence de virus chez celle-ci, un diagnostic par PCR reste nécessaire (Mivedor *et al.*, 2020). Selon Were *et al.* (2016), la PCR est le moyen le plus fiable pour la différenciation des Begomovirus. Sur l'ensemble des échantillons analysés par PCR, une proportion de 22,82 % des plantes symptomatiques était négative aux virus de la mosaïque. Les symptômes observés chez ces plantes pourraient être liés à d'autres variantes de virus non testés dans cette étude ou encore à d'autres types de virus ou à des ravageurs tels que les acariens dont les symptômes sont proches de ceux des virus de la mosaïque. D'ailleurs, la plupart des plantes symptomatiques non virosées utilisées dans cette étude ont été collectées pendant la saison sèche qui est une période à laquelle pullulent les acariens.

L'évolution rapide des virus de la mosaïque pourrait favoriser des recombinaisons entre les diverses souches engendrant de nouveaux individus ayant les mêmes symptômes que ceux déjà identifiés. L'exemple le plus remarquable est l'attaque de la CMD en Ouganda dans les années 1990. Cette grave maladie virale avait été causée par le virus recombinant, résultant de la recombinaison entre une variante d'ACMV et d'EACMV (Jones, 2020). Des travaux de recherche ont également montré que la recombinaison était possible entre deux espèces virales en occurrence le virus de la mosaïque et celui de la striure brune du manioc (Elegba *et al.*, 2020; Kwibuka *et al.*, 2021).

Dans la présente étude, une diversité génétique de la souche virale ACMV a été observée. En effet, les variantes identifiées étaient plus proches de certaines variantes identifiées dans six pays de l'Afrique y compris en Côte d'Ivoire. Selon la banque de données génomiques Genbank, il s'agit du Ghana, de Madagascar, du Cameroun, du Kenya et du Nigéria. Les pourcentages d'identité observés étaient très élevés allant de 96,5 à 98,9 % pour les séquences nucléotidiques. Ces identités élevées pourraient se justifier par le fait que ces variantes auraient

été transportées de ces différents pays jusqu'en Côte d'Ivoire, soit par les échanges de boutures entre pays, soit à travers les mouches blanches, vectrices des virus. En effet, plusieurs auteurs ont montré que le mode principal de multiplication du manioc en Afrique, qui est le bouturage, joue un rôle primordial dans la dissémination à longue distance des virus (Harimalala *et al.*, 2015 ; Mulenga *et al.*, 2016). D'autres auteurs ont rapporté que le manque de sensibilisation des agriculteurs sur le risque de propagation des souches virales par le matériel végétal non certifié, l'accès difficile au matériel végétal exempt de virus et les préférences à certaines variétés contribue également à la propagation des virus d'un pays à un autre (Kumar *et al.*, 2021 ; Maruthia *et al.*, 2019). A ce sujet, on note qu'une variante de virus proche à 98,7 % de celle du Ghana de numéro d'accession MG250093, a été identifiée chez la variété de nom vernaculaire « Accra-brankye », originaire du Ghana. Par ailleurs, les aleurodes vecteurs de virus ont pour hôtes plusieurs végétaux et peuvent fournir des vols à grande distance capables de les véhiculer d'une zone à une autre transportant ainsi les virus (Simmons & Riley, 2021).

Malgré les faibles taux de mutation observés en comparant les séquences nucléotidiques des isolats de virus ACMV testés, la traduction en séquences peptidiques a montré qu'elles diffèrent largement des séquences de référence. En effet, une mutation dans le génome d'un virus, quel qu'elle soit peut entraîner une transformation totale de l'individu de départ. Trois grands groupes assimilables à des variantes de la souche ACMV ont été mis en évidence dans cette étude, traduisant la présence en Côte d'Ivoire de nouvelles variantes de virus de la mosaïque. L'étude a aussi montré que ces variantes sont issues des phénomènes de mutations chez les variantes préexistantes. Selon Deom (2021), les mécanismes de mutations sont fortement à la base de l'évolution rapide des *Geminivirus*. Celles-ci favorisent l'acquisition d'une grande variabilité génétique chez ces virus et facilitent ainsi la création de nouveaux arrangements au sein de leurs génomes. Elles peuvent être nuisibles pour les plantes lorsqu'elles se produisent au niveau des régions codantes de la séquence (Kostyrka, 2018). Les mutations constituent ainsi l'un des moteurs de la diversification et de l'évolution des virus (Elegba, 2018).

L'arbre phylogénétique réalisé à partir des 22 séquences protéiques des isolats du virus ACMV a permis de mettre en évidence sept variantes traduisant une forte diversité génétique de cette souche en Côte d'Ivoire. Cette variabilité moléculaire de la souche ACMV pourrait jouer un rôle important dans le nouveau développement de la maladie de la mosaïque en Côte d'Ivoire et avoir des répercussions plus graves sur les productions du manioc (Elegba, 2018). Aussi, parmi les groupes génétiques formés, certains étaient composés uniquement d'isolats

d'un même département tandis que d'autres renfermaient des isolats des trois départements. Cela suppose que la diversité des virus ACMV peut être liée aux facteurs environnementaux de chaque département.

La forte variabilité génétique de la souche ACMV observée dans cette étude devrait interpellier les parties prenantes sur la prise de mesures de lutte fermes contre la mosaïque du manioc, en l'occurrence la recherche et l'intégration de variétés plus résistantes à cette maladie (Mivedor *et al.*, 2020). Cependant, l'identification de variétés de manioc résistantes aux virus nécessite auparavant une évaluation de la diversité génétique chez cette plante afin de s'assurer de la disponibilité d'une importante base génétique du matériel végétal.

3.2.2. Diversité et structuration génétique des variétés de manioc améliorées et traditionnelles

Plusieurs facteurs interviennent dans la variation de la diversité et la structuration génétique du manioc entre les départements. Quelques-uns sont les introductions diverses des variétés dans les régions, les sélections des agriculteurs, les facteurs biotiques ou abiotiques et les variations du matériel génétique de l'espèce étudiée.

Cinq marqueurs microsatellites ont été utilisés pour l'évaluation de la diversité génétique du manioc dans cette étude et se sont révélés polymorphes avec un taux de polymorphisme de 100 %. Cela traduit l'efficacité de ces marqueurs dans les études de distinctions adéquates entre les génotypes étudiés. Cependant, bien qu'étant tous polymorphes, le marqueur EME303 reste le moins discriminant comparé aux quatre autres marqueurs utilisés à savoir EME20, SSRY61, SSRY100 et EME222. Seulement quatre allèles ont été détectés chez ce marqueur tandis que sept ou huit allèles ont été obtenus avec les autres marqueurs microsatellites utilisés. Ces résultats sont similaires à ceux de Meye (2013) qui a montré dans une étude sur la diversité génétique du manioc en Afrique Centrale, que parmi les marqueurs microsatellites utilisés, EME303 était le moins polymorphe, avec seulement trois allèles identifiés.

Sur les 200 échantillons analysés dont 164 sont issus des variétés traditionnelles et 36 des variétés améliorées, un excès d'individus hétérozygotes a été obtenu pour l'ensemble des départements. Cela pourrait être lié aussi bien aux variétés composant la population de manioc qu'à l'hétérozygotie naturelle du manioc ou encore aux marqueurs génétiques utilisés. En effet, le manioc est une plante possédant naturellement un grand nombre de gènes hétérozygotes et cette nature joue un rôle important dans la diversification de cette plante. Selon van Frank *et al.* (2020), l'hétérozygotie du manioc lui confère la possibilité de produire des plantes spontanées

diversifiées pouvant faciliter l'augmentation de sa diversité génétique. Cependant, les variations génétiques dues surtout aux facteurs environnementaux et aux sélections, peuvent modifier le patrimoine génétique et ainsi réduire l'hétérogénéité (Singer *et al.*, 2021). D'ailleurs, les valeurs de F_{IS} négatives et très proches de zéro, surtout chez les variétés améliorées, laissent croire que celles-ci tendent vers l'effet Wahlund, du fait de la consanguinité qu'aurait entraîné la sélection, dû au nombre de plus en plus limité de variétés cultivées. Concernant le nombre d'allèles, la valeur moyenne obtenue chez les variétés traditionnelles ($A = 5,47$) est largement supérieure à celle des variétés améliorées ($A = 3,2$). Aucun allèle spécifique n'a été obtenu chez les variétés améliorées alors que chez les variétés traditionnelles, 15 allèles privés ont été détectés. Ces résultats montrent une diversité génétique relativement faible des variétés améliorées due à plusieurs facteurs dont le processus d'amélioration, au cours duquel de nombreux gènes sont éliminés. On note également la place importante à accorder aux variétés locales dans la conservation des ressources génétiques naturelles et la production durable du manioc. Des résultats similaires ont été présentés dans les travaux de Lamprecht *et al.* (2015) au Vietnam. Ces auteurs ont également montré la grande importance du maintien des variétés endémiques dans les champs.

La faible diversité génétique observée chez les variétés améliorées dans cette étude pourrait se justifier par le nombre relativement réduit de ces variétés disponibles. En effet, seulement quatre (04) variétés améliorées ont été collectées dans les trois départements prospectés. Ce sont les variétés Bocou1, Bocou2, Yavo et TMS4(2). La création des variétés améliorées a abouti certes à une augmentation de la productivité répondant à la demande alimentaire croissante mais crée aussi un goulot d'étranglement chez le manioc entraînant ainsi la réduction de la diversité génétique (Mbanjo *et al.*, 2021).

Aussi, un constat fait au cours de cette étude est que la culture des variétés améliorées se fait par culture monovariétale malgré que cela soit pratiqué sur de grandes surfaces. Pourtant, ce système de culture encouragé par l'agriculture moderne, pourrait réduire considérablement la diversité génétique chez le manioc. En effet, l'inflorescence naturelle du manioc favorise l'accouplement entre les plantes proches dans un champ donné. Ainsi, la culture monovariétale pourrait réduire fortement l'hétérozygotie et surestimer les niveaux de consanguinité voire la diversité génétique chez les repousses issues de ces croisements (Ceballos *et al.*, 2020). Comme le signifieraient Ocampo *et al.* (2021), l'agriculture traditionnelle qui consistait à cultiver plusieurs variétés de manioc dans un même champ permettait la conservation, voire l'augmentation de sa diversité génétique.

De plus, la faible diversité génétique observée chez les variétés améliorées pourrait être due aux différents processus de leur création. En effet, les variétés améliorées sont créées à partir de rétrocroisements d'un nombre réduit de variétés sélectionnées à la recherche d'un caractère bien précis, le plus souvent l'augmentation de la production (Lagace, 2015). La vulgarisation de ces variétés au détriment des variétés traditionnelles aurait occasionné la réduction de l'agrodiversité qui conduit à l'érosion des ressources génétiques qui existaient chez de nombreuses variétés traditionnelles. Il convient donc de rehausser le niveau de diversité génétique chez le manioc afin d'éviter sa « double raréfaction génétique » définie par Marchenay (1987). Pour cet auteur, moins il y a de variétés cultivées, moins il y a de polymorphisme génétique au sein de la population et à l'intérieur des variétés.

La perte de la diversité génétique chez les variétés améliorées pourrait favoriser leur sensibilité aux divers facteurs environnementaux et aux maladies. D'ailleurs dans cette étude, il a été montré que les variétés améliorées étaient comme certaines variétés traditionnelles, infectées par les virus de la mosaïque du manioc avec des cas de coïnfection détectés. La prolifération de ces virus serait en majorité due à la diminution de plus en plus de la diversité génétique chez cette plante (Nakabonge *et al.*, 2020 ; Kwibuka *et al.*, 2021). Sur ce point, il a été montré qu'un système agricole durable ne peut être établi sans la conservation de l'agrodiversité (Peano *et al.*, 2021). Par ailleurs, la faible différenciation génétique observée chez ces variétés entre les départements se traduit par les échanges fréquents des variétés entre les départements. Cela concourt à un important flux de gènes entre les zones qui au cours du temps les stabiliseraient à un équilibre de diversité génétique. Il faut noter que dans ce contexte, les échanges de boutures entre les départements paraissent favorables. Cependant, le problème qu'il faudra résoudre est celui du nombre de variétés cultivées qui, s'il est grand, pourrait contribuer à réduire la consanguinité et augmenter la diversité génétique, qui est en effet, le moteur de la solidification des espèces (Karim *et al.*, 2020). En d'autres termes, les échanges de variétés entre les différentes zones contribuent à une diffusion des variétés de base et celle des éventuels nouveaux morphotypes, qui sont les repousses issues des croisements entre les plantes proches dans un champ.

D'ailleurs, certains auteurs soutiennent que les échanges de variétés entre différentes localités est nécessaire pour une bonne diversité génétique. Pour Alves-Pereira *et al.* (2017), à travers la reproduction sexuée du manioc, les variétés provenant de régions diverses peuvent contribuer à la production de nouvelles variétés capables de renforcer la diversité génétique.

Cependant, malgré l'abandon de plus en plus accentué des variétés traditionnelles, certains cultivateurs maintiennent encore près de leurs champs ou de leurs habitations certaines de ces variétés. En effet, au cours de cette étude 164 échantillons de variétés traditionnelles ont été collectées dans les trois départements prospectés. Ces variétés bien que cultivées sur des petites parcelles, étaient diversifiées dans chaque département.

Le nombre moyen d'allèles obtenu était de 5,2 ; 6,2 et 5 respectivement dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa. La valeur globale du nombre moyen d'allèles est de 5,47. Ce nombre moyen d'allèle associé à la présence des allèles rares et privés confirment l'existence d'une forte diversité variétale et génétique chez les variétés traditionnelles dans les départements prospectés. Cependant, ces variétés traditionnelles sont souvent peu utilisées dans les cultures. Leur utilisation est plutôt axée sur la création des variétés améliorées (N'Zué *et al.*, 2009 ; N'Zué *et al.*, 2014). Aussi, le manioc étant allogame sexué, les plantes spontanées issues des graines de diverses variétés sont capables de renforcer la diversité variétale donc génétique. En effet, la multiplication du manioc par les graines constitue une source de nouvelles variétés donc de nouveaux génotypes (Olasanmi *et al.*, 2021 ; Pineda *et al.*, 2020 ; Wongnoi *et al.*, 2020).

L'abondance des variétés traditionnelles offre diverses opportunités aux programmes de sélection et de création de variétés améliorées à travers du fait de leur grande base génétique. Autrement dit, plus il y a une grande diversité génétique, plus le choix des variétés pour la création des variétés élites est diversifié et ces variétés peuvent contenir plusieurs gènes leur conférant des caractères de résistance (Djaha *et al.*, 2017). De ce fait, une diversité génétique élevée est souhaitable pour toute culture car elle augmente sa valeur adaptative et réduit la probabilité d'une extinction locale (Govindaraj *et al.*, 2015).

Contrairement aux variétés améliorées chez lesquelles la différenciation génétique entre les départements était faible, la différenciation génétique chez les variétés traditionnelles était modérée entre les départements. Cela pourrait s'expliquer par de faibles échanges entre les départements dans lesquels des allèles spécifiques ont été identifiés. Selon Ahmed *et al.* (2018), la présence d'allèles spécifiques dans un département est un indice d'originalité génétique et démontre que ces allèles n'existent que dans ce département à l'exclusion des autres départements.

Les groupes variétaux Yacé, Bonoua et Zoklo étaient présents dans l'échantillon de chacune des trois départements prospectés. Cela pourrait être dû au fait qu'en plus des variétés

améliorées diffusées par les structures de recherches agronomiques en Côte d'Ivoire, certaines variétés traditionnelles font l'objet d'échanges entre les producteurs de manioc.

Par ailleurs, la structuration génétique des variétés traditionnelles réalisée à partir d'arbres phylogénétiques a permis d'identifier 6 à 11 groupes génétiques à partir des variétés traditionnelles dans chaque département, ce qui confirme leur variabilité. Aussi, certains individus de noms vernaculaires différents collectés dans des sites distincts étaient génétiquement proches voire identiques. Selon certains cultivateurs de manioc interrogés, les noms attribués aux variétés traditionnelles sont souvent les noms des personnes par qui les boutures ont été obtenues. Aussi, les noms de certaines variétés sont liés à la morphologie et/ou la couleur des tiges ou des feuilles. C'est le cas de « Hévéa » qui est une variété de manioc dont les feuilles ressemblent à celles de l'hévéa. Il y'a aussi « Duvinagba » qui signifie en baoulé « manioc de vin », dont la couleur des feuilles et de la tige est semblable à celle du vin rouge. Ces résultats corroborent ceux de Delaquis *et al.* (2018) qui stipulent que les noms des variétés traditionnelles de manioc peuvent changer d'une zone à une autre après les échanges de boutures entre paysans.

Par ailleurs, la diversité génétique du manioc pourrait être plus élevée si les deux modes de reproduction du manioc, à savoir l'allogamie et le bouturage, étaient alternés. D'abord, la multiplication sexuée faciliterait la recombinaison de nombreux gènes pour la production de nouveaux génotypes intéressants, puis la multiplication végétative permettrait la culture clonale de ces variétés néo-générées (Beovides *et al.*, 2015). Cette technique bien que fastidieuse est pratiquée dans certains pays, en Amazonie afin de favoriser l'augmentation de la diversité génétique chez le manioc (McKey *et al.*, 2012). Malheureusement, seule la multiplication végétative est mise en œuvre par les producteurs dans la majeure partie des pays africains. Dans la pratique en Côte d'Ivoire, la production sexuée du manioc est utilisée par la recherche agronomique, uniquement pour la création de variétés améliorées, à cause de sa pratique difficile. Selon Lefèvre (1989), les difficultés liées à la production du manioc, en l'occurrence les maladies telles que la mosaïque, auraient été réduites si le niveau de diversité génétique était rehaussé par ces pratiques.

D'autres auteurs soutiennent en effet que le moyen de lutte efficace contre la mosaïque du manioc est l'utilisation de variétés résistantes aux virus. Selon Kalyebi *et al.* (2018), la sélection classique de variétés résistantes est efficace et semble être la méthode de choix, si celles-ci sont disponibles, dans la lutte contre les viroses.

3.2.3. Identification de génotypes de manioc capables de résister aux mécanismes des virus à partir du criblage des gènes de résistance

L'un des objectifs de cette thèse était de recenser des génotypes de manioc résistants et hautement résistants disponibles dans les départements prospectés en vue éventuellement de les intégrer à la culture du manioc en Côte d'Ivoire. Les gènes recherchés chez ces génotypes sont les gènes de résistance à la mosaïque à savoir CMD1, CMD3 et surtout CMD2 qui est le gène de résistance dominant dans la lutte contre les virus de la mosaïque (Ferguson *et al.*, 2019 ; Rey & Vanderschuren, 2017). Du fait de son efficacité dans la lutte contre les virus du manioc, le gène CMD2 tout seul fait souvent l'objet d'étude portant sur la recherche des génotypes de manioc résistants à la mosaïque (Houangue *et al.*, 2019).

Dans cette étude, la quasi-totalité des individus possédant le gène CMD1 (97 %) ou CMD3 (96 %) avaient également dans leur patrimoine génétique, le gène CMD2. Des études antérieures ont montré la nécessité des trois gènes de résistance à la mosaïque dans la sélection des variétés hautement résistantes. Beyene *et al.* (2016) ainsi que Kuria *et al.* (2017) ont réalisé la sélection de variétés de manioc hautement résistantes à la mosaïque en recherchant les gènes CMD1, CMD2 et CMD3, respectivement en Ethiopie et au Kenya.

Vingt-quatre (24) génotypes de manioc soit 43 % de l'ensemble des individus possédant au moins un gène de résistance ont exprimé la présence des trois gènes étudiés. Ce sont des génotypes hautement résistants à la mosaïque du manioc. Par ailleurs, il a été montré que les génotypes hautement résistants ne présentaient aucun symptôme de l'infection montrant ainsi l'efficacité des marqueurs de résistance utilisés dans cette étude. Ces résultats sont similaires à ceux de Elegba *et al.* (2020) qui ont montré que les variétés traditionnelles identifiées comme étant hautement résistantes à la maladie de la striure brune du manioc (CBSD) ne présentaient aucun symptôme de la maladie au cours des essais réalisés. Trente-deux (32) génotypes sont résistants (R). Parmi ceux-ci, quelques-uns (11 %) présentaient un niveau de sévérité 2 de la mosaïque du manioc. Cependant, les virus détectés chez ceux-ci n'étaient que le virus le moins sévère qui est la souche ACMV. Ces plantes seraient alors des « porteurs sains » qui constituent des réservoirs pour les virus. Des résultats similaires ont été obtenus dans des études sur le criblage des génotypes de manioc résistant aux virus de la mosaïque du manioc en Afrique du Sud et au Ghana (Bizabani *et al.*, 2021 ; Elegba *et al.*, 2020).

La répartition des variétés Yacé, Bonoua et Zoklo dans les trois groupes de résistance aux virus de la mosaïque pourrait s'expliquer par l'existence d'une diversité génétique à l'intérieur de ces différentes variétés (Yao *et al.*, 2019). Selon N'Zué (2009), Yacé, Bonoua et Zoklo sont

des groupes variétaux comportant plusieurs variétés distinctes. Une analyse génétique de ces groupes variétaux paraît nécessaire pour distinguer les variétés sensibles des variétés résistantes et hautement résistantes aux virus de la mosaïque.

Par ailleurs, il a été montré qu'il y a une corrélation positive entre la présence d'allèles spécifiques dans un département et le nombre de génotypes résistants aux virus de la mosaïque. La majorité des allèles spécifiques obtenus dans cette étude semblent être liés à la résistance aux virus de la mosaïque du manioc.

CONCLUSION

CONCLUSION

Cette thèse a été réalisée suivant les objectifs du développement durable précisément l'agriculture durable qui vise une sécurité alimentaire et la lutte contre la pauvreté. Elle avait pour objectif général de garantir une production durable du manioc en Côte d'Ivoire, à travers la lutte contre la mosaïque du manioc. De façon spécifique, il était question d'étudier l'épidémiologie actuelle de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire, d'évaluer la diversité et la structuration génétique du manioc et d'identifier des variétés traditionnelles capables de résister aux virus de la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire, particulièrement dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa.

Une prévalence phénotypique élevée de la mosaïque du manioc a été révélée (43,65 %) avec un taux d'infection très élevé soit de 66,5 %. Ces taux étaient statistiquement identiques dans les trois départements prospectés. Deux souches virales de la mosaïque à savoir l'ACMV et l'EACMV ont été détectées avec des cas de coinfection. L'étude a montré que les niveaux de sévérité les plus élevés étaient induits par la souche EACMV et la coinfection entre les deux virus identifiés, aussi bien chez les variétés améliorées que chez les variétés traditionnelles, bien que la souche ACMV soit la plus abondante. Par ailleurs, 35,29 % des plantes asymptomatiques étaient infectées et 22,82 % des plantes symptomatiques étaient négatifs aux virus testés. Cette étude a aussi montré que les plantes de manioc les plus atteintes par la mosaïque étaient celles dont l'âge est compris entre 3 et 6 mois et aussi que la saison sèche favorisait le développement de la mosaïque du manioc.

Une importante diversité génétique a été révélée chez le virus ACMV du fait des nombreuses mutations génétiques, dans les trois départements étudiés. Les séquences nucléotidiques des isolats testés étaient quasiment identiques à celles des variantes déjà détectées au Ghana, au Kenya, à Madagascar, au Cameroun, au Nigeria et en Côte d'Ivoire avec des pourcentages d'identité allant de 95 à 98 %. Après analyse phylogénétique, sept (07) groupes ont été formés chez le virus ACMV sur la base de la forte similarité entre les séquences protéiques des isolats. Cette importante diversité des virus de la mosaïque du manioc est une condition idéale pour l'émergence d'autres variantes plus sévères issues de recombinaisons intra ou interspécifiques, présentant ainsi un risque épidémiologique majeur pour la culture du manioc en Côte d'Ivoire.

Par ailleurs, on note une faible diversité génétique des variétés améliorées avec une faible différenciation génétique entre les départements causées par la perte de la rusticité due à leur

structure génétique homogène qui pourrait favoriser l'adaptation des agents pathogènes. A l'opposé, une importante diversité génétique a été observée chez les variétés traditionnelles montrant leur intérêt pour une agriculture durable. Cependant, celles-ci sont de plus en plus abandonnées au profit des quelques variétés améliorées cultivées. Cette diversité se traduisait par un nombre moyen d'allèles de 5,47 avec la présence d'allèles rares et d'allèles privés. Elle était soutenue par une différenciation génétique modérée entre les départements et une structuration en plusieurs groupes génétiques.

En dépit de certaines variétés traditionnelles sensibles aux virus de la mosaïque identifiées, d'autres parmi elles semblent résistants. Trente-deux (32) variétés traditionnelles résistantes ont été identifiées dont douze (12) dans le département de Bouaké, douze (12) à Yamoussoukro et huit (8) dans le département de Daloa. Vingt-quatre (24) variétés hautement résistantes ont été identifiées dont sept (7) dans le département de Bouaké, onze (11) dans le département de Yamoussoukro et six (6) dans celui de Daloa. Celles-ci pourraient être vulgarisées dans toutes les aires de culture de la Côte d'Ivoire afin de rehausser le niveau de diversité génétique qui, dit-on est le moteur de la vigueur chez les plantes et ainsi réduire l'impact des virus sur le manioc.

Ainsi, face aux phénomènes de changements climatiques et la baisse continue de la vigueur chez les variétés améliorées, les résultats de cette étude devraient attirer l'attention de toutes les parties prenantes qui, devraient adopter les mesures correctives proposées afin de réduire les actions des virus de la mosaïque et ainsi assurer une production durable du manioc en Côte d'Ivoire et dans le monde.

RECOMMANDATIONS

Les recommandations qui découlent des résultats obtenus dans cette étude sont entre autres :

- Intégrer les variétés résistantes et hautement résistantes de manioc aux virus de la mosaïque à la culture du manioc en Côte d'Ivoire ;
- Promouvoir le type de culture multivariétale dans les champs de manioc en vue de minimiser les dégâts causés par les virus et de favoriser la hausse de la diversité génétique ;
- Sensibiliser les cultivateurs sur les risques d'émergence des virus de la mosaïque du manioc et les autres risques d'insécurité alimentaire associés ;

- Etablir une politique ferme de contrôle de l'état sanitaire des boutures de manioc provenant d'autres pays.

PERSPECTIVES

En perspectives, il est souhaitable de :

- Etendre l'étude à l'échelle nationale en vue d'identifier d'autres variétés traditionnelles résistantes et hautement résistantes pour mener plus efficacement la lutte contre la mosaïque du manioc en Côte d'Ivoire ;
- Réaliser le séquençage génomique de la souche virale EACMV ainsi que toutes les autres souches éventuelles existantes en Côte d'Ivoire, afin d'identifier les variantes de virus de la mosaïque et leur répartition dans le pays pour mieux orienter la lutte contre ces virus.
- Réaliser des tests de confirmation au champ des variétés résistantes et hautement résistantes aux virus de la mosaïque du manioc identifiées.

REFERENCES

-
- Abderahim M., Diatte M., Labou B., Sow G. & Diarra K. (2018). Inventaire et distribution des principaux arthropodes ravageurs du manioc (*Manihot esculenta* CRANTZ) au Tchad. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(6) : 2589-2601.
- Abe A.I. (2021). Diversité génétique et analyse génomique de la résistance aux bêtalactamines à spectre élargi des souches d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae* impliquées dans les infections du tractus urinaire des patients à Abidjan et à Daloa (Côte d'Ivoire). Thèse de Doctorat, Génétique et amélioration des espèces animales, Université Félix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire, 212 p.
- Adu B.G., Akromah R., Amoah S., Nyadanu D., Yeboah A., Aboagye L.M., Amoah R.A. & Owusu E.G. (2021). High-density DArT-based SilicoDArT and SNP markers for genetic diversity and population structure studies in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *PLoS ONE* 16(7): 255290-255309.
- Affery A.M., Abo K., Wonni I., Tuo S., Kassi F.M., Camara B. & Koné D., 2017. Assessment of the NECO's effectiveness against Cassava Bacterial Blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in Côte d'Ivoire. *International Journal of Agricultural Research*, 12 :190-198.
- Ahmed O.H., Fatnassi M., Ferchichi H., Baccouche R., Lasfar F., Zaouia M., Younes A.B., Haddad M. & Trimeche A. (2018). Caractérisation moléculaire par microsatellites de trois races chevalines en Tunisie. *Médecine Vétérinaire*, 169 (6) : 103-109.
- Al Basir F., Kyrychko Y.N., Blyuss K.B. & Ray S. (2021). Effects of Vector Maturation Time on the Dynamics of Cassava Mosaic Disease. *Bulletin of Mathematical Biology*, 83: 87-108.
- Alamu E., Ntawuruhunga O.P., Chibwe T., Mukuka I. & Chiona M. (2019). Evaluation of cassava processing and utilization at household level in Zambia. *Food Security*, 11:141-150.
- Alicai T., Szyniszewska A.M., Omongo C.A., Abidrabo P., Okao-Okuja G. & Baguma Y. (2019). Expansion of the Cassava Brown Streak pandemic in Uganda revealed by annual field survey data for 2004 to 2017. *Sciences Data*, 6: 327-335.

-
- Alves-Pereira A., Peroni N., Cavallari M.M., Lemes M.R., Zucchi M.I. & Clemen C.R. (2017). High genetic diversity among and within bitter manioc varieties cultivated in different soil types in Central Amazonia. *Genetics and Molecular Biology*, 40 (2) 468-479.
- Amarullah (2020). Evaluation of quality and variety of Indonesian cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*, 10(1) : 108-116.
- Bakuzesia M.M. (2019). The impact of African Cassava Mosaic in Kindu and its surroundings (Dr Congo). *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 2 : 445-456.
- Beovides Y., Fregene M., Gutiérrez J.P., Milián M.D., Coto O., Buitrago C., Cruz J.A., Ruiz E., Basail M., Rayas A., Rodríguez D., Santos A., López J. & Medero V. (2015). Molecular diversity of Cuban cassava (*Manihot esculenta* Crantz) variétés assessed by simple sequences repeats (SSR). *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 19(4): 364-377.
- Beugre N. (2017). Étude épidémiologique des maladies virales du manioc [*Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae)] dans les régions du Nord-Est de la Côte d'Ivoire. Mémoire de Master 2, Productions Végétales, Université Nangui Abrogoua (Côte d'Ivoire), 58 p.
- Beyene G., Chauhan R.D., Wagaba H., Moll T., Alicai T., Miano D., Carrington J.C., Taylor N.J. (2016). Loss of CMD2-mediated resistance to Cassava Mosaic Disease in plants regenerated through somatic embryogenesis. *Molecular Plant Pathology*. 17: 1095-1110.
- Bhandari G., Atreya K., Scheepers P.T.J. & Geissen V. (2020). Concentration and distribution of pesticide residues in soil: Nondietary human health risk assessment. *Chemosphere*, 253: 126594-126607.
- Bizabani C., Rogans S.J. & Rey M.E. (2021). Differential miRNA profiles in South African Cassava Mosaic Virus-infected cassava landraces reveal clues to susceptibility and tolerance to cassava mosaic disease. *Virus Research*, 303: 198400-198414.

- Bowen C.D., Paavilainen H., Renner D.W., Palomäki J., Lehtinen J., Vuorinen T., Norberg P., Hukkanen V. & Szparaa M.L. (2019). Comparison of Herpes Simplex Virus 1 Strains Circulating in Finland Demonstrates the Uncoupling of Whole-Genome Relatedness and Phenotypic Outcomes of Viral Infection. *Journal of Virology*, 93 (8) 1824-1842.
- Brown J.K., Zerbini F.M., Navas-Castillo J., Moriones E., Ramos-Sobrinho R., Silva J.C., Fiallo-Olive E., Briddon R.W., Hernandez-Zepeda C., Idris A., Malathi V.G., Martin D.P., Rivera-Bustamante R., Ueda S. & Varsani A. (2015). Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160: 1593 - 1619.
- Carmo C., Silva M., Oliveira G. & Oliveira E. (2015). Molecular-assisted selection for resistance to Cassava Mosaic Disease in *Manihot esculenta* Crantz. *Scientia Agricola*, 72 (6): 520-527.
- Carmo C.D., Sousa M.B., Silva P.P., Oliveira G.A.F., Ceballos H. & Oliveira E.J. (2020). Identification and validation of mutation points associated with waxy phenotype in cassava. *Plant Biology*, 20:164-176
- Ceballos H., Jaramillo J.J., Salazar S., Pineda L.M., Calle F. & Setter T. (2017). Induction of flowering in cassava through grafting. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 9(2): 19-29.
- Ceballos H., Pérez J.C., Barandica O.J., Lenis J.I., Morante N., Calle F., Pino L. & Hershey C.H. (2016). Cassava breeding I: The value of breeding value. *Frontiers Plant Science*, 7: 1227-1239.
- Ceballos H., Rojanaridpiched C., Phumichai C., Becerra L.A., Kittipadaku P., Iglesias C. & Gracen V.E. (2020). Excellence in Cassava Breeding: Perspectives for the Future. *Crop Breeding, Genetics and Genomics*, 2(2): 200008-200039.
- Chavarriga-aguirre P., Brand A., Medina A., Prías M., Escobar R., Martinez J., Díaz P., López C., Roca W. & Tohme J. (2016). The potential of using biotechnology to improve cassava: a review. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 45 : 461-478.

-
- Chen Q., Liu Y., Long Z., Yang H. and Wei T. (2021). Viral Release Threshold in the Salivary Gland of Leafhopper Vector Mediates the Intermittent Transmission of Rice Dwarf Virus. *Frontiers in Microbiology*, 12 : 639445-639456.
- Chi Y., Pan L-L, Bouvaine S., Fan Y., Liu Y., Liu S., Seal S. & Wang X-W. (2020). Differential transmission of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus by three cryptic species of the whitefly *Bemisia tabaci* complex. *Virology*, 540: 141-149.
- Chikoti C.P., Rabson C., Mulenga M., Tembo M. & Sseruwagi P. (2019). Cassava Mosaic Disease: a review of a threat to cassava production in Zambia. *Journal of Plant Pathology*, 101(3) : 467- 477.
- Chiumenti M., Greco C., De Stradis A., Loconsole G., Cavalieri V., Altamura G., Zicca S., Saldarelli P. & Saponari M. (2021). *Olea Europaea* Geminivirus : A Novel Bipartite Geminivirid Infecting Olive Trees. *Viruses*, 13 : 481-499.
- Dansou-Kodjo K.A., Mivedor A.S., Adjata D.K., Duclercq J, Muller E, Gumedzoe Y.M.D. (2018). Diagnostics de Begomovirus associés aux systèmes de cultures à base du manioc (*Manihot esculenta* Crantz) par la PCR (Polymerase Chain Reaction) au Togo. *African Journals Online*, 19 (4) :73-84.
- Dao B.P., Abotsi K.E., Kargbo A., Kokou K. & Kone D. (2021). Diversity of Agroecosystems and Ecosystem Services Gain for Agrobiodiversity Conservation in Agricultural Landscape in Northern Togo. *Agronomie Africaine*, 33 (1) : 21-32.
- De Meeûs T. (2021). Initiation à la génétique des populations naturelles ; Application aux parasites et à leurs vecteurs. 2^e édition revue et augmentée, 393 p.
- Dekoula C.S., Kouame B., N’Goran E.K., Yao F.G., Ehounou J.N. & Soro N. (2018). Impact de la variabilité pluviométrique sur la saison culturale dans la zone de production cotonnière en Côte d’Ivoire. *European Scientific Journal*, 14(12) : 143-160.
- Del Villar P.M., Tran T., Adayé A., Bancal V. & Allagba K. (2017). Analyse de la chaîne de valeur du Manioc en Côte d’Ivoire. Rapport CIRAD, 169 p.
- Delaquis E., Andersen K.F., Minato N., Cu T.T., Karsenberg M.E., Sok S., Wyckhuys K.A.G., Newby J.C., Burra D.D., Srean P., Phirun I., Le N.D., Pham N.T., Garrett K.A.,

-
- Almekinders C.J.M., Struik P.C. & de Haan S. (2018). Raising the Stakes : Cassava Seed Networks at Multiple Scales in Cambodia and Vietnam. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2: 1-7.
- Deom C.M., Brewer M.T. & Severns P.M. (2021). Positive selection and intrinsic disorder are associated with multifunctional C4(AC4) proteins and geminivirus diversification. *Scientific Reports*, 11 : 11150-11161.
- Diabaté D., Ochou G.O. & Tano Y. (2017). Impact des méthodes d'application insecticides sur *Bemisia Tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae), *Aphis Gossypii* (Glover) (Homoptera : Aphididae) et sur le Rendement du Cotonnier en Côte d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research*, 147 (1): 65-74.
- Dietzgen R.G., Mann K.S. & Johnson K.N. (2016). Plant Virus-Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions. *Viruses*, 8 (11) : 303-324.
- Djaha K.E., Abo K., Bonny B.S., Kone T., Amouakon J.L., Kone D. & Kone M. (2017). Caractérisation agromorphologique de 44 accessions de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) cultivés en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(1) : 174-184.
- Dourdaine A. (2014). Etude de l'évolution de l'isolement reproducteur au sein d'un complexe d'espèces *Bemisia tabaci*. Rapport de stage Master 2 - Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux, CIRAD-Université de La Réunion, 60p.
- Ehui K.J., Kouame K.G. & Howele M.T. (2019). Caractérisation pathogénique et structuration morphoculturale des populations de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz manihotis agent causal de l'antracnose du manioc en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 40(1): 6514 - 6525.
- Elegba W. (2018). Engineering Cassava Mosaic Disease (CMD) Resistance in a Ghanaian Cassava Variety. These de Doctorat, University of Ghana, Ghana, 170 p.
- Elegba W., Gruissem W. & Vanderschuren H. (2020). Screening for Resistance in Farmer-Preferred Cassava Varieties from Ghana to a Mixed Infection of CBSV and UCBSV. *Plants*, 9: 1026-1042.

- Eni A.O, Efekemo O.P., Onile-ere O.A. & Pita J.S. (2021). South West and North Central Nigeria: Assessment of cassava mosaic disease and field status of African cassava mosaic virus and East African Cassava Mosaic Virus. *Annals of Applied Biology*, 178: 466- 479.
- FAO (2017). Production/Rendement de Manioc : www.fao.org/faostat/fr/. Visité le 19 Janvier 2021.
- FAOSTAT (2020). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Visité le 23 Février 2022.
- Feleke S., Manyong V., Abdoulaye T., & Alene A. D. (2016). Assessing the impacts of cassava technology on poverty reduction in Africa. *Studies in Agricultural Economics*, 118 (2): 101-111.
- Felsenstein J. (1974). The evolutionary advantage of recombination. *Genetics*, 78(2):737-756.
- Ferguson M.E., Shah T., Kulakow P. & Ceballos H. (2019). A global overview of cassava genetic diversity. *PLoS One*, 14 (11) : 224763-224779.
- Ferreira M.A., Teixeira R.M. & Fontes E.P. (2021). Geminivirus-Host Interactions: Action and Reaction in Receptor-Mediated Antiviral Immunity. *Viruses*, 13: 840-851.
- Frimpong B.N, Oppong A., Prempeh R., Appiah-Kubi Z., Abrokwah L.A., Mochiah M.B., Lamptey J.N., Manu-Aduening J. & Pita J. (2021). Farmers' knowledge, attitudes and practices towards management of cassava pests and diseases in forest transition and Guinea savannah agro-ecological zones of Ghana. *Gates Open Research*, 4: 101-124.
- Gmakouba T., Koussao S., Traore E. R., Kpemoua K. E. & Zongo J. D. (2018). Analyse de la diversité agromorphologique d'une collection de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) du Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 12(1) : 402-421.
- Govindaraj M., Vetriventhan M. & Srinivasan M. (2015). Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genetics Research International*, 2015: 431487- 431501.

-
- Guira F., Some K., Kabore D., Sawadogo-Lingani H., Traore Y. & Savadogo A. (2016). Origins, production, and utilization of cassava in Burkina Faso, a contribution of a neglected crop to household food security. *Food Science & Nutrition*, 5(3): 1-9.
- Han B., Wang C., Tang Z., Ren Y., Li Y., Zhang D., Dong Y. & Zhao X. (2015). Genome wide analysis of microsatellite markers based on sequenced database in Chinese spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLOS ONE*, 10 (11): 1-16.
- Harimalala M., Chiroleu F., Giraud-Carrier C., Hoareau M., Zinga I., Randriamampianina J. A., Velombola S., Ranomenjanahary S., Andrianjaka A., Reynaud B., Lefeuvre P. & Lett J.-M. (2015). Molecular epidemiology of Cassava Mosaic Disease in Madagascar. *Plant Pathology*, 64:501-507.
- Hipp K., Schäfer B., Kepp G. & Jeske H. (2016). Properties of African Cassava Mosaic Virus Capsid Protein Expressed in Fission Yeast. *Viruses*, 8: 190-204.
- Houngue J.A., Zandjanakou-Tachin M., Ngalle H.B., Pita J.S., Cacai G.H.T., Ngatat S.E., Bell J.M. & Ahanhanzo C. (2019). Evaluation of resistance to Cassava Mosaic Disease in selected African cassava variétés using combined molecular and greenhouse grafting tools. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 105: 47-53.
- INS (2015). Rapport de l'Institut National de la Statistique, 11 p. http://www.ins.ci/documents/rapport_activite/rap_act_ins_2015. Visité le 25 Janvier 2021.
- Jones R.A. (2020). Disease Pandemics and major epidemics arising from New encounters between indigenous viruses and introduced crops. *Viruses*, 12 (12): 1388-1412.
- Jukes T.H., & Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian protein metabolism* 3, 21-132.
- Kalyebi A., Macfadyen S., Parry H., Tay W.T., De Barro P. & Colvin J. (2018). African cassava whitefly, *Bemisia tabaci*, cassava colonization preferences and control implications. *PLoS ONE*, 13(10): 204862-204876.
- Kamanda I., Blay E.T., Asante I.K., Danquah A., Ifie B.E., Parkes E., Kulakow P., Rabbi I., Conteh A., Kamara J.S., Mensah H.K., Whyte J.B.A. & Sesay S. (2020). Genetic

- diversity of provitamin-A cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in Sierra Leone. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 67 : 1193-1208.
- Kante M. (2020). Diversité des populations de *Xanthomonas phaseoli* pv. *Manihotis* au Mali et recherche de sources de résistance durables chez le manioc. Thèse de Doctorat, Sciences agricoles. Université Montpellier, Institut Supérieur de Formation et de Recherche Appliquée, 292 p.
- Kapoor D., Bhardwaj S., Landi M., Sharma A., Ramakrishnan M. & Sharma A. (2020). The Impact of Drought in Plant Metabolism: How to Exploit Tolerance Mechanisms to Increase Crop Production. *Applied Sciences*, 10 (16): 5692-5711.
- Karim K.Y., Ifie B., Dzidzienyo D., Danquah E.Y., Blay E.T., Whyte J.B., Kulakow P., Rabbi I., Parkes E., Omoigui L., Norman P.E. & Iluebbey P. (2020). Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genotypes using agro-morphological and single nucleotide polymorphism markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(2): 317-330.
- Kaweesi T., Kawuki K., Kyaligonza V., Baguma Y., Tusiime G. & Ferguson M.E. (2014). Field evaluation of selected cassava genotypes for Cassava Brown Streak Disease based on symptom expression and virus load. *Virology Journal*, 11:216-230.
- Kawuki R.S., Esuma W., Ozimati A., Kayondo I.S., Nandudu L. & Wolfe M. (2019). Alternative approaches for assessing Cassava Brown Streak Root Necrosis to guide resistance breeding and selection. *Frontiers in Plant Science*. 10:1461-1474.
- Kawuki R.S., Kaweesi T., Esuma W., Pariyo A., Kayondo I.S., Ozimati A., Kyaligonza V., Abaca A., Orone J., Tumuhimbise R., Nuwamanya E., Abidrabo P., Amuge T., Ogwok E., Okao G., Wagaba H., Adiga G., Alicai T., Omongo C., Bua A., Ferguson M., Kanju E. & Baguma Y. (2016). Eleven years of breeding efforts to combat Cassava Brown Streak Disease. *Breeding Science*, 66: 560-571.
- Kholová J., Urban M.O., Cock J., Arcos J., Arnaud E., Aytekin D., Azevedo V., Barnes A. P., Ceccarelli S., Chavarriaga P., Cobb J.N., Connor D., Cooper M., Craufurd P., Debouck D., Fungo R., Grando S., Hammer G.L., Jara C.E., Messina C., Mosquera G., Nchanji E., Ng E.H., Prager S., Sankaran S., Selvaraj M., Tardieu F., Thornton P.,

- Valdes-Gutierrez S.P., Etten J.V., Wenzl P. & Xu Y. (2021). In pursuit of a better world: crop improvement and the CGIAR. *Journal of Experimental Botany*, 72 (14): 5158-5179.
- Kimwanga P.S., Kabuita M., Siwako J-P. L., Nzawe B. D. & Mussam I. (2021). Rentabilité et obstacles à l'adoption des variétés améliorées du Manioc (*Manihot esculenta*) chez les paysans en RD Congo. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 9(2) : 286-292.
- Kone D., Dao S., Tekete C., Doumbia I., Koita O., Abo K., Wicker E. & Verdier V. (2015). Confirmation of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* Causing Cassava Bacterial Blight in Ivory Coast. *Plant Pathology*, 16 (2) : 73-81.
- Kostyrka G. (2018). La place des virus dans le monde vivant. Mémoire de Doctorat en Philosophie. Université Panthéon Sorbonne - Paris I, France, 845 p.
- Kouassi J.L. (2014). Suivi de la dynamique de l'occupation du sol à l'aide de l'imagerie satellitaire et des systèmes d'informations géographiques: cas de la direction régionale des eaux et forêts de Yamoussoukro (Côte d'Ivoire). Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du Diplôme d'Agronomie Approfondie (DAA), Option: Eaux et Forêts. Institut national polytechnique Félix Houphouët-Boigny (INP-HB), 74p.
- Kumar P.L., Cuervo M., Kreuze J. F., Muller G., Kulkarni G., Kumari S.G., Massart S., Mezzalama M., Alakonya A., Muchugi A., Graziosi I., Ndjiondjop M-N., Sharma R. & Negawo A.T. (2021). Phytosanitary Interventions for Safe Global Germplasm Exchange and the Prevention of Transboundary Pest Spread: The Role of CGIAR Germplasm Health Units. *Plants*, 10(2) : 328-357.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35: 1547-1549.
- Kuria P., Ilyas M., Ateka E., Miano D., Onguso J., Carrington J.C. & Taylor N.J. (2017). Differential response of cassava genotypes to infection by Cassava Mosaic Geminiviruses. *Virus Research*, 227: 69-81.

- Kwibuka Y., Bisimwa E., Blouin A.G., Bragard C., Candresse T., Faure C., Filloux D., Lett J-M., Maclot F., Marais A., Ravelomanantsoa S., Shakir S., Vanderschuren H. & Massart S. (2021). Novel Ampeloviruses Infecting Cassava in Central Africa and the South-West Indian Ocean Islands. *Viruses*, meye13 : 1030-1047.
- Lagace M. (2015). La valorisation des variétés sous-utilisées dans un contexte de changements climatiques ; potentiel et intégration stratégique. Mémoire de biologie de maître en écologie internationale (M.E.I.), faculté des sciences, université de Sherbrooke (Québec, Canada), 135 p.
- Lamoril J., Ameziane N., Deybach J-C., Bouizegarène P., Bogard M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Science Direct* 23, 260-279.
- Lamprecht M. (2015). Genetic diversity and farmers' selection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties on small-scale farms in Northern and Central Vietnam. European Master in Environmental Science, University of Agricultural Sciences, Uppsala (Suede), 55 p.
- Lefèvre F. (1989). Ressources génétiques et amélioration du manioc, *Manihot esculenta* Crantz, en Afrique. Thèse de Doctorat de l'Institut National Agronomique, Université Paris-Grignon de France, 176 p.
- Legg J.P., Kumar P.L., Makesh Kumar T., Tripathi L., Ferguson M., Kanju E., Ntawuruhunga P. and Cuellar W. (2015). Cassava Virus Diseases: Biology, Epidemiology, and Management. *Advances in Virus Research*, 91 (4): 85-142.
- Lencucha R., Pal N.E., Appau A., Thow A-M & Drope J. (2020). Government policy and agricultural production: a scoping review to inform research and policy on healthy agricultural commodities. *Global Health*, 16: 11-26.
- Lenormand T., Rode N., Chevin L-M & Rousset R (2016). Valeur sélective : définitions, enjeux et mesures. Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, 658 p.
- Lett J-M. (2014). *Diversité, Evolution et Emergence des phytovirus à transmission vectorielle: La chronique des Geminivirus*. Université de La Réunion, 85 p.

- Li S., Cui Y., Zhou Y., Luo Z., Liu J. & Zhao M. (2017). The industrial applications of cassava: current status, opportunities and prospects. *Journal of Sciences Food Agriculture*, 97(8): 2282-2290.
- Mabossy-Mobouna G., Koya-Lobouaka R. & Malaisse F. (2020). Socio-economical study of the factors influencing the prices of cassava pods (*Manihot esculenta* Crantz) in the town of Brazzaville (Congo Republic). *International journal of tropical geology, geography and ecology*, 44 (3) : 467-485.
- Magoon M.L., Krishnan R., & Bai R.K.V. (1969). Morphology of the pachytene chromosomes and meiosis in *Manihot esculenta* Crantz. *Cytologia*, 34, 612-626.
- Malik A.I., Kongsil P., Nguyễn V.A., Ou W., Sholihin, Srean P., Sheela M.N., Becerra López-Lavalle L.A., Utsumi Y., Lu C., Kittipadakul P., Nguyễn H.H., Ceballos H., Nguyễn T.H., Selvaraj M., Gomez, Aiemnaka P., Labarta R., Chen S., Amawan S., Sok S., Youabee L., Seki M., Tokunaga H., Wang W., Li K., Nguyễn H.A., Nguyễn V.D., Hâm L.H. & Ishitani M. (2020). Cassava breeding and agronomy in Asia: 50 years of history and future directions. *Breeding Science*, 70 : 145-166.
- Marchenay P. (1987). A la recherche des variétés locales de plantes cultivées, guide méthodologique. Paris, 125 p.
- Maruthia M.N., Whitfield E.C., Otti G., Tumwegamire S., Kanju E., Legg J.P., Mkamilo G., Kawuki R., Benesi I., Zacarias A., Munga T., Mwatuni F. & Mbuguai E. (2019). A method for generating virus-free cassava plants to combat viral disease epidemics in Africa. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 105: 77-87.
- Mbanjo E.G.N., Rabbi I.Y., Ferguson M.E., Kayondo S.I., Eng N.H., Tripathi L., Kulakow P. & Egesi C. (2021). Technological Innovations for Improving Cassava Production in Sub-Saharan Africa. *Frontiers in Genetics*, 11 : 623736-623757.
- Mckey D., Emperaire L., Elias M., Pinton F., Robert T., Desmoulière S. & Rival L. (2012). Gestions locales et dynamiques régionales de la diversité variétale du manioc en Amazonie. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 33 : 465-490.

-
- Meye C. A. (2013). Contribution à l'étude de la diversité Génétique du manioc cultivé (*Manihot esculenta*) en Afrique Centrale (Zone CEMAC). Mémoire de master II d'Agronomie et Agroalimentaire, Université de Montpellier, France 145 p.
- Michel V. (2017). Durabilité de la résistance et mécanisme de tolérance au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez *Nicotiana tabacum*. Biologie végétale. Université de Bordeaux. Archives ouvertes HAL, 276 p.
- Mivedor A.S, Dansou-Kodjo K.A., Adjata D.K. & Pita J.S. (2020). Identification and incidence of Cassava Mosaic Begomoviruses in Togo. *Asian Journal of Plant Pathology*, 14: 11-20.
- Moutinho A.F., Bataillon T. & Dutheil J.Y. (2020). Variation of the adaptive substitution rate between species and within genomes. *Evolutionary Ecology*, 34 :315 -338.
- Muhindo H., Yasenge S., Casinga C., Songbo M., Dhed'a B., Alicai T., Pita J. & Monde |G. (2020). Incidence, severity and distribution of Cassava Brown Streak Disease in northeastern Democratic Republic of Congo. *Cogent Food & Agriculture*, 6(1) 1789422-1789436.
- Mulenga R.M., Legg J.P., Ndunguru J., Miano, D.W., Mutitu E.W., Chikoti P.C. & Alabi O.J. (2016). Survey, molecular detection, and characterization of geminiviruses associated with cassava mosaic disease in Zambia. *Plant Disease*, 100: 1379-1387.
- Mullis K.B, Erlich H.A., Arnheim N., Horn G.T., Saiki R.K, Scharf S.J. (1987). Process for amplifying, detecting and/or cloning nucleic acid sequences. United States Patent and Trademark Office, 31 p.
- Nakabonge G., Nangonzi R., Tumwebaze B.S., Kazibwe A., Samukoya C. & Baguma Y. (2020). Production of virus-free cassava through hot water therapy and two rounds of meristem tip culture. *Cogent Food & Agriculture*, 6 (1): 1800923-1800938.
- Nassar N.M. (1978). Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta*): Determination of wild species localities with emphasis on probable origin. *Economy and Botany*, 26: 352-360.

-
- Nazarov P.A., Baleev D. N., Ivanova M.I., Sokolova L.M. & Karakozova M.V (2020). Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection. *Acta Naturae*, 12(3): 46-59.
- Ndunguru J., Sseruwagi P., Tairo F., Stomeo F., Maina S., Djinkeng A, Kehoe M. & Boykin L.M. (2015). Analyses of Twelve New Whole Genome Sequences of Cassava Brown Streak Viruses and Ugandan Cassava Brown Streak Viruses from East Africa: Diversity, Supercomputing and Evidence for Further Speciation. *PLOS ONE*, 10 (10) : 141939-141957.
- N'Zué B., Okoma M.P., Kouakou A.M., Dibi K.E.B., Zohouri G.P., Essis B.S. & Dansi A.A. (2014). Morphological Characterization of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Accessions Collected in the Centre-west, South-west and West of Côte d'Ivoire. *Greener Journal of Agricultural Sciences*, 4 (6): 220-231.
- N'Zué B., Sangare A., Letourmy P., Zohouri G.P. & Vernier P. (2009). Morphological characterization of the national cassava (*Manihot esculenta* Crantz) collection in Côte d'Ivoire. *African Journal of Root and Tuber Crops*, 7 (1) : 32 -38.
- N'Zué B., Zohouri G., Djédji C. & Tahouo O. (2013). Bien cultiver le manioc en Côte d'Ivoire. Rapport CNRA, Abidjan, 4 p.
- Ocampo J., Ovalle T., Labarta R., Le D.P., de Haan S., Vu N.A., Kha L.Q. & Lopez-Lavalle L.A. (2021). DNA fingerprinting reveals varietal composition of Vietnamese cassava germplasm (*Manihot esculenta* Crantz) from farmers' field and genebank collections. *Plant Molecular Biology*, 21: 11-24.
- Ogbonna A. C., de Andrade L. R., Rabbi I. Y., Mueller L. A., de Oliveira E. J. & Bauchet, G. J. (2020). Genetic architecture and gene mapping of cyanide in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *BioRxiv*, 19(6) : 159160-159196.
- Oghenejoboha K.M., Orugbaa H.O., Oghenejobohb U.M. & Agarryc S.E. (2021). Value added cassava waste management and environmental sustainability in Nigeria: A review. *Environmental Challenges*, 4: 100127-100141.
- Olasanmi B., Kyallo M. & Yao N. (2021). Marker-assisted selection complements phenotypic screening at seedling stage to identify Cassava Mosaic Disease-resistant genotypes in African cassava populations. *Scientific Reports*, 11: 2850-2858.

- Oliveira E.J., Santana F.A., Oliveira L.A. & Santos V.S. (2015). Genotypic variation of traits related to quality of cassava roots using affinity propagation algorithm. *Scientia Agricola*, 72 (1): 53-61.
- Oluwasanya D., Esan O., Hyde P.T., Kulakow P. & Setter T.L. (2021). Flower Development in Cassava Is Feminized by Cytokinin, While Proliferation Is Stimulated by Anti-Ethylene and Pruning: Transcriptome Responses. *Frontiers in Plant Science*, 12: 666266-666283.
- Peano C., Caron S., Mahfoudhi M., Zammel K, Zaidi H. & Sottile F. (2021). A Participatory Agrobiodiversity Conservation Approach in the Oases: Community Actions for the Promotion of Sustainable Development in Fragile Areas. *Diversity*, 13: 253-269.
- Pérez-Losada M., Arena M., Galán J.C., Palero F. & González-Candelas F. (2015). Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infection, Genetics and Evolution*, 30: 296-307.
- Perrin A., Ricau P. & Rabany C. (2015). Etude de la filière Manioc en Côte d'Ivoire. Rapport Rongead, Ocvp, Chigata, CFSI 87 p.
- Pineda M., Morante N., Salazar S., Cuásquer J., Hyde P.T., Setter T.L. & Ceballos H. (2020). Induction of Earlier Flowering in Cassava through Extended Photoperiod. *Agronomy*, 10: 1273-1292.
- PNS (2020). Plan national sécheresse de Côte d'Ivoire 2021-2025. Convention des Nations Unies pour la lutte contre la désertification, 143 p.
- Qi W., Lu T., Zheng C., Jiang X., Jie H., Zhang X, Yue B. & Zhao G. (2020). Distribution patterns of microsatellites and development of its marker in different genomic regions of forest musk deer genome based on high throughput sequencing. *Aging*, 12 (5): 4445-4462.
- Rabbi I.Y., Kulembeka H.P., Masumba E., Marri P.R. & Ferguson M. (2012). An EST-derived SNP and SSR genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theoretical and Applied Genetics*, 125 : 329-342.

- Rey C. & Vanderschuren H. (2017). Cassava Mosaic and Brown Streak Diseases: Current Perspectives and Beyond. *Annual Review of Virology*, 4: 429-52.
- Rogers D.J. & Appan S.G. (1973). *Manihot* and *Manihotoides* (*Euphorbiaceae*). A Computer-Assisted Study. Flora Neotropica, Monograph No. 13. Hafner Press, New York, 274 p.
- Rosario-Arellano J.L., Meneses-Márquez I., Leyva-Ovalle O.R., Aguilar-Rivera N., Bolio-López G.I. & Andrés-Meza P. (2020). Morpho-agronomic and industrial performance of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm for the production of starch and solid by products. *AIMS Agriculture and Food*, 5(4): 617- 634.
- Rustérucci C., Montillet J. L., Agnel J. P., Battesti C., Alonso B., Knoll A., Bessoule J., Sardos J. D., Mckey R., Malapa J. L., & Lebot V. (2008). Evolution of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) after recent introduction into a South Pacific Island system: The contribution of sex to the diversification of a clonally propagated crop. *Genome* 51: 912-921.
- Saeed A. F., Wang R. & Wang S. (2016). Microsatellites in pursuit of microbial genome evolution. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-15.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74 (12): 5463-5467.
- Sani F.I., Ismail S.I., Abdullah S., Jalinas J., Jamian S. & Saad N. (2020). A Review of the Biology and Control of Whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), with Special Reference to Biological Control Using Entomopathogenic. *Insects*, 11: 619-637.
- Sanjuan R. & Domingo-Calap P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cellular and Molecular Life Science*, 73: 4433- 4448.
- Saunders K., Richardson J., Lawson D.M. & Lomonosov G.P. (2020). Requirements for the Packaging of Geminivirus Circular Single-Stranded DNA: Effect of DNA Length and Coat Protein Sequence. *Viruses*, 12: 1235-1254.
- Sesay J.V., Lebbie A. & Wadsworth R.A. (2021). Incidence and characterization of cassava mosaic viruses in improved and local varieties in Sierra Leone. *African Journal of Plant Science*, 15(2): 64-70.

-
- Simmons A.M. & Riley D.G. (2021). Improving Whitefly Management. *Insects* 12: 470-474.
- Singer S.D., Laurie J.D., Bilichak A., Kumar S. & Singh J. (2021). Genetic Variation and Unintended Risk in the Context of Old and New Breeding Techniques. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40(1): 68-108.
- Singh D. & Yi S.V. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. *Experimental & Molecular Medicine*, 53: 537-547.
- Siriwan W., Jimenez J., Hemniam N., Saokham K., Lopez-Alvarez D., Leiva A.M., Martinez A., Mwanzia L., Lopez-Lavalle L.A. & Cuellar W.J. (2020). Surveillance and diagnostics of the emergent Sri Lankan cassava mosaic virus (Fam. Geminiviridae) in Southeast Asia. *Virus Research*, 285:197959-197964.
- Snyder L. & Champness W. (2007). Molecular mechanisms of homologous recombination. In : Molecular genetics of bacteria, 3ème édition, ASM press, Washington DC, pp : 430-452.
- Spencer D.S.C. & Ezedinma C. (2017). Culture du manioc en Afrique sub-saharienne. *Achieving sustainable cultivation of cassava*, 1 : 123-148.
- Sseruwagi P., Sserubombwe W. S., Legg J.B., Ndunguru J. & Thresh J.M. (2004). Methods of surveying the incidence and severity of Cassava Mosaic Disease and whitefly vector populations on cassava in Africa: A review. *Virus Research*, 100: 129-142.
- Sun R., Han J., Zheng L. & Qu F. (2020). The AC2 Protein of a Bipartite Geminivirus Stimulates the Transcription of the BV1 Gene through Abscisic Acid Responsive Promoter Elements. *Viruses*, 12: 1403-1416.
- Tize I., Fotso A. K., Nukenine E. N. Nchiwan, Masso C., Ngome F. A, Suh C., Venasius Lenzemo V. W., Nchoutnji I., Manga G., Parkes E., Kulakow P., Kouebou C., Fiaboe K. & Hanna R. (2021). New cassava germplasm for food and nutritional security in Central Africa. *Scientific Reports*, 11: 7394-7406.
- Tomlinson K.R., Bailey A.M., Alicai T., Seal S. & Foster G.D. (2018). Cassava Brown Streak Disease: historical timeline, current knowledge and future prospects. *Molecular Plant Pathology*, 19(5): 1282-1294.

- Tonukari N.J., Tonukari N. J., Ezedom T., Enuma C. C., Sakpa S.O., Avwioroko O.J., Eraga L. & Odiyoma E. (2015). White gold: Cassava as an industrial base. *American Journal of Plant Sciences*, 6, 972-979.
- Torkpo S.K., Offei K., Danquah E.Y. & Gafni Y. (2017). Status of cassava mosaic begomoviruses in farmers' fields in Ghana. *AIMS Agriculture and Food*, 2(3): 279-289.
- Toualy M. N. Y., Akinbade S., Koutoua S., Diallo H. & Kumar P.L. (2014). Incidence and Distribution of Cassava mosaic begomoviruses in Côte d'Ivoire. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 4 (6): 131-139.
- Traore T. E. (2017). Diversité des virus de la Mosaïque Africaine du Manioc au Burkina Faso. Mémoire de master, Biologie Moléculaire et de Génétique Moléculaire Appliquées, INERA, Burkina-Faso, 59 P.
- Uarrotta V.G., Nunes E., Peruch L.A., Neubert E., Coelho B., Moresco R., Domínguez M.G., Sánchez T., Meléndez J.L., Dufour D., Ceballos H., Lopez-Lavalle L.A., Hershey C., Rocha M. & Maraschin M. (2016). Toward better understanding of postharvest deterioration: biochemical changes in stored cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Food Science & Nutrition* 2016; 4(3): 409-422.
- van Frank G., Rivière P., Pin S., Baltassat R., Berthelot J-F., Caizergues F., Dalmasso C., Gascue J-S, Hyacinthe A., Mercier F., Montaz H., Ronot B. & Goldringer I. (2020). Genetic Diversity and Stability of Performance of Wheat Population Varieties Developed by Participatory. Breeding. *Sustainability*, 12: 384-405.
- Velásquez A.C., Castroverde C.D.M & He S.Y. (2019). Plant and pathogen warfare under changing climate conditions. *Current Biology*, 28(10): 619-634.
- Vernier P., N'Zué B. & Zakhia-Rozis N. (2018). Le manioc, entre culture alimentaire et filière agro-industrielle. Presses agronomiques de Gembloux, Centre technique de coopération agricole et rurale, 235 p.
- Wang D., Huang G., Shi T., Wang G., Fang R., Zhang X. & Ye J. (2020). Surveillance and distribution of the emergent Sri Lankan Cassava Mosaic Virus in China. *Phytopathology Research*, 2: 18-27.

-
- Wasonga D.O., Kleemola J., Alakukku L. & Mäkelä P.A. (2021). Potassium Fertigation With Deficit Irrigation Improves the Nutritive Quality of Cassava. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 11: 623736-623748.
- Wen F., Su W., Zheng H., Yu B., Ma Z., Zhang P. & Guo W. (2020). Plant regeneration via protoplast electrofusion in cassava. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(3): 632-642.
- Were M.N., Mukoye B., Osogo A.K., Mangeni B.C., Nyamwamu P.A., Ogemah V.K., Muoma J.V., Winter S. & Were H.K. (2016). Occurrence and Distribution of Begomoviruses Infecting Cassava in Western Kenya. *Plant*, 4(6): 108-113.
- Wongnoi S., Banterng P., Vorasoot N., Jogloy S. & Theerakulpisut P. (2020). Physiology, Growth and Yield of Different Cassava Genotypes Planted in Upland with Dry Environment during High Storage Root Accumulation Stage. *Agronomie* 10(4): 576-593.
- Wright S. (1978). Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. *Evolution*, 19, 395-420.
- Yao A.K., Koffi D.M., Blei S.H., Irié Z.B. & Niamke S.L. (2015). Propriétés biochimiques et organoleptiques de trois mets traditionnels ivoiriens (attiéké, placali, attoukpou) à base de granulés de manioc natifs. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 9(3) : 1341-1353.
- Yao F., Koffi M., Abe I., Ahouty B., Simaro S., Konaté I., Traore B., Sokouri E., N'Djetchi M., Konan T. & Sanogo T.A. (2019). Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties grown in Daloa district in Central-Western Côte d'Ivoire. *African Journal of Agricultural Research*, 14(31): 1341-1348.
- Zanini A.A., Feo L.D., Luna D.F., Paccioretti P., Collavino A. & Rodriguez M.S. (2021). Cassava common mosaic virus infection causes alterations in chloroplast ultrastructure, function, and carbohydrate metabolism of cassava plants. *Plant Pathology*, 70: 195-205.

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche d'enquête

**FICHE D'ENQUÊTE D'ÉTUDE SUR LA MOSAÏQUE DU MANIOC EN CÔTE
D'IVOIRE**

1-Date :

2-Département :

3-Code d'identification :

4-Nom du village :

5-Champ N° :

6-Coordonnées GPS :

7-Code photo :

8-Nom du cultivateur :

9-Type de variété de manioc :

10-Nom des variétés de manioc :

10-Origin des boutures :

11-Type de culture :

12-Age de la plantation :

13-Mode de traitement des champs (Cochez la ou les cases correspondantes)

Application d'herbicide

Désherbage mécanique

14-Prévalence de la CMV dans le champ :

15-Niveau de sévérité (Cochez la ou les cases correspondantes.)

Niveau1

Niveau2 :

Niveau3 :

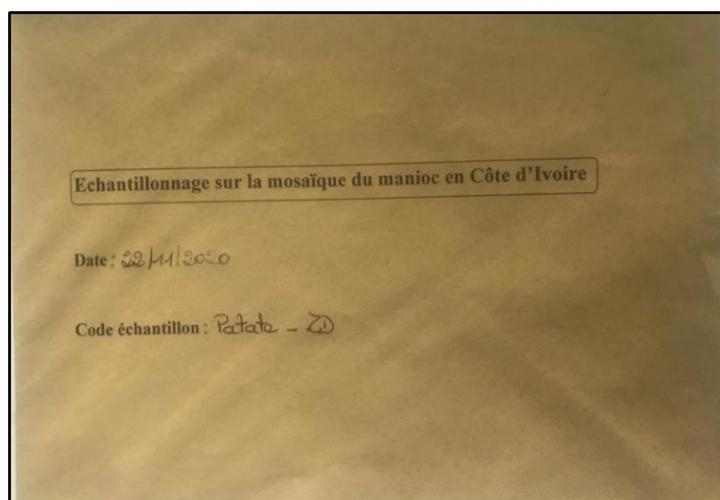
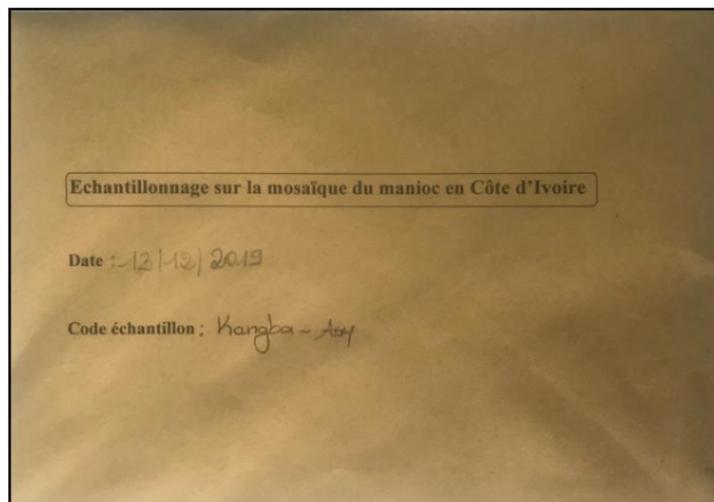
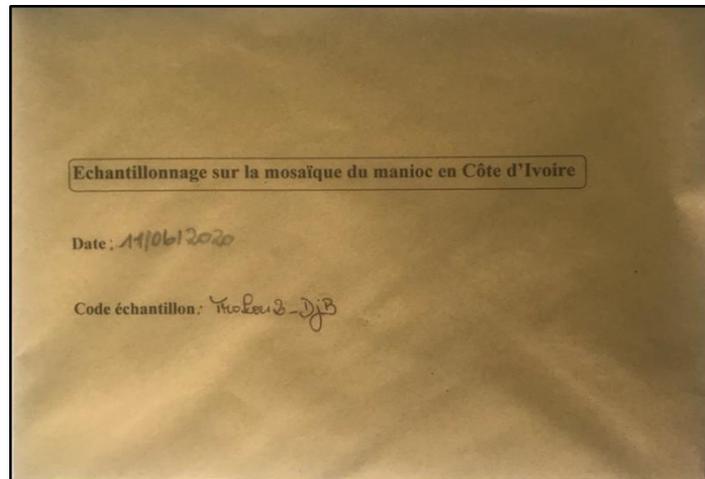
Niveau4 :

Niveau5 :

16-A quelle étape de la plantation constatez-vous la présence de CMV :

17-Attitude face à la présence de CMV :

Annexe 2 : Quelques enveloppes étiquetées



Annexe 3 : Images d'un appareil photographique et d'un GPS



a : Appareil photographique



b : GPS

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN génomique à partir des feuilles de manioc

1. Verser 800 μL de tampon (mélange 400 μL PBS+ μL ASL) dans des tubes Eppendorf.
2. Les porter à la température 65°C pendant 15min (pour chauffage du tampon)
3. Broyer 0.2g de jeune feuille avec environ 1g de NaCl
4. Verser le broyat dans le tampon
5. Vortexer une fois et incuber à 65°C pendant 30min
6. Centrifuger à 12000 tours pendant 20min
7. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube
8. Ajouter 500 μL du mélange phénol-chloroforme-alcoolisoamyl dans les proportions 25 : 24 : 1
9. Agiter par inversion jusqu'à homogénéiser la solution puis centrifuger à 12000 tours pendant 30min
10. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube
11. Ajouter 500 μL de chloroforme alcoolisoamylique (24 : 1)
12. Agiter par inversion, centrifuger pendant 15min puis récupérer le surnageant dans un nouveau tube
13. Ajouter un volume égal d'isopropanol (conservé au préalable à -20°C), agiter doucement par inversion jusqu'à obtention de la pelote
14. Mettre au congélateur à -20 °C pendant 2h au moins puis centrifuger pendant 10min à 12000tours
15. Verser le surnageant et retourner le tube sur la paillasse pour sécher l'ADN à la température de la salle pendant 2h
16. Dissoudre la pelote dans 100 μL d'eau pure
17. Ajouter 10 μL de protéinase k dans le mélange
18. Incuber le tout à 37°C pendant 30min
19. Ajouter 500 μL du mélange phénol-chloroforme-alcoolisoamyl dans les proportions (25 :24 :1 v/v)
20. Récupérer délicatement (environ 400 μL) de la phase aqueuse dans un nouveau tube
21. Ajouter un volume égal d'isopropanol préalablement conservé à -20°C
22. Remuer doucement les tubes à la main jusqu'à la formation d'une pelote et la conserver à -20°C toute la nuit

23. Centrifuger à 12000 tours pendant 30min
24. Verser le surnageant et ajouter 500ul d'éthanol absolu 70 % pour laver la pelote
25. Centrifuger à 12000tours pendant 1min
26. Eliminer le surnageant et retourner rapidement les tubes
27. Laisser sécher l'ADN à la température ambiante pendant 5H au moins
28. Suspendre l'ADN dans 100 µL de tampon TE.

PUBLICATIONS

Publication 1

Full Length Research Paper

Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties grown in Daloa district in Central-Western Côte d'Ivoire

Flora Yao¹, Mathurin Koffi^{1*}, Innocent Abe^{1,2}, Bernardin Ahouty^{1,2}, Siriki Simaro³, Ibrahim Konaté³, Barkissa Traore¹, Edwige Sokouri¹, Martial N'Djetchi, Thomas Konan¹ and Tidou A. Sanogo¹

¹Research Unit in Genetics and Molecular Epidemiology (URGEM), UFR Environment, Laboratory of Biodiversity and Sustainable Management of Tropical Ecosystems, Jean Lorougnon Guédé University, BP 150 Daloa, Ivory Coast.

²Laboratory of Genetics, UFR Biosciences, Félix Houphouët-Boigny University, 22 BP 582 Abidjan 22, Ivory Coast.

³Laboratory of agro valorization, UFR Agroforestry, University Jean Lorougnon Guédé, BP 150 Daloa, Ivory Coast.

Received 24 January, 2019; Accepted 17 May, 2019

Cassava is an important staple food in Côte d'Ivoire produced in several areas including the Daloa district in Central-Western Region. However, this plant experiences biotic and abiotic constraints that strongly limit its productivity. Proper knowledge of genetic diversity is important to mitigate these constraints and select resistant and well adapted genotypes to increase the productivity. This study assesses the genetic diversity of four varieties of cassava (Bocou 1, Bonoua, Yace and Yavo) cultivated in Daloa. A total of 266 samples of leaves were collected and genomic DNA was genotyped with 5 simple sequence repeats (SSR) microsatellite markers. In all, 28 alleles were recorded from all the loci with an average number of alleles ranging from 2.6 to 2.9. The average heterozygosity obtained for all loci was higher than expected ($p = 0.008$) and significant genetic diversity was observed within all the varieties ($F_{is} = -0.43$, $p=0.02$) for Bocou1, ($F_{is} = -0.59$, $p = 6.10^{-4}$) for Bonoua, ($F_{is} = -0.32$, $p = 0.05$) for Yace and ($F_{is} = -0.38$, $p=0.02$) for Yavo. A strong genetic differentiation were also observed between varieties, except between varieties Bocou1 and Bonoua where differentiation was moderate ($F_{st} = 0.13$). Genetic structure of the population exhibited two or three clusters depending of the variety which might be due to the continuous exchange of plant materials among farmers, selection-base varieties, and use of several varieties in the same fields. This study provides improved understanding of the genetic basis of the varieties which can be exploited to fight against biotic and abiotic stresses in this area.

Key words: Cassava, Côte d'Ivoire, Daloa, genetic diversity, *Manihot esculenta*, microsatellite, population structure.

INTRODUCTION

Cassava is a Euphorbiaceae native to Central America. This plant is the staple food for more than 500 million people in the tropics and subtropics (EL-Sharkawy,

2004). According to FAO (2013), cassava is the world's fourth largest vegetable food behind maize, rice and wheat. In Côte d'Ivoire, cassava is produced mainly in the

south, west and center regions. Average annual production is about 2.41 MT, with an average yield of 6.5 t/h (N'zué et al., 2004, 2013); though of strategic importance for food security and poverty reduction, this crop experiences many abiotic and biotic constraints that limit its production in areas such as the district of Daloa located in Central-Western part of Côte d'Ivoire. In order to mitigate these constraints, cassava breeding programs are being considered (N'Zué et al., 2001, 2013; Kabeya et al., 2012). They consist of responding to the emergence of pests, adapting to abiotic conditions, increasing yields and reducing the level of cyanogenic compounds (Piero et al., 2015). To better understand the genes involved in traits of agronomic interest against pests and for selecting better genotypes that are resistant to pathogens, knowledge on the genetic diversity of cassava become crucial. This study aims to evaluate the genetic potential of four varieties of cassava; Bocou1, Bonoua, Yacce and Yavo, the most profitable and the most cultivated in the district of Daloa.

MATERIALS AND METHODS

Study site and sample collection

The study was carried out in the Daloa district located in the forest zone in Central-West region of Côte d'Ivoire (6° 53' N, 6° 27' W). This area is covered with dense semi-deciduous forest, has ferrallitic soil, a tropical climate with two rainy seasons and two dry seasons (Koffie-bikpo and Kra, 2013). Sampling was conducted throughout January 2018 and consisted of harvesting apparently healthy young cassava leaves belonging to four varieties at each selected site in the four cardinal points of the city area, taking into account the availability of the desired varieties. Samples were conserved in coded plastic bags and sent to URGEM laboratory for molecular analyzes. A total of 266 fresh leaf samples were collected, including 58 for Bocou1, 74 for the Bonoua, 70 for Yacce and 64 for Yavo varieties as illustrated in Table 1.

DNA extraction

DNA was extracted using standard procedures according to Risterucci et al. (2000) with slight modifications as follow; 800 µL of MATAB were substitute by 400 µL of PBS and 400 µL of ASL. The concentration and DNA quality were check on 3% agarose gel in 0.5X of TBE buffer stained with ethidium bromide and visualized with a gel viewer before polymerase chain reaction (PCR) implementation.

Polymerase chain reaction analysis

PCR was carried out in thermal Cycler BIO-RAD T100™ using microsatellite primers listed in Table 2. These primers were chosen according to their good distribution on the cassava genome (Sraphet et al., 2011; Whankaew et al., 2011) and their high

polymorphism (Kawuki et al., 2013). The PCR amplification mixture (mix) was carried out in a final volume of 25 µL comprising 2.5 µL of DNA solution, 2.5 µL of 10X buffer, 1.5 µL of MgCl₂ (0.5 mM), 1.6 µL of dNTP (200 µM), 1.3 µL of each of forward and reverse primers (10 µM), 0.3 µL of Taq polymerase (5U/µL) and 15.4 µL of ultra-pure water. PCR conditions included an initial denaturation of 45 sec at 94°C, followed by hybridization of 1 min at the annealing temperature defined for each primer used as shown in Table 2. The final extension included 1 min at 72°C completed in 35 cycles and final hold at 4°C. The PCR products were checked for amplification product on 3% agarose gel stained with ethidium bromide in 0.5X of TBE buffer at 100 V for 45 min and visualized under UV gel viewer.

Microsatellite markers reliability test

Quality and neutrality of markers used to evaluate the genetic diversity of different cassava varieties were calculated per locus (De Meeûs et al., 2007).

Genetic analysis

The data generated were analyzed for genetic diversity parameters. These parameters are estimated for each locus and the average on all the loci. The CREATE software made it possible to format the database for FSTAT and GENETIX software. The average number of alleles per locus reflects the richness of alleles in the studied population ($A = \sum(a/L)$, where a is the number of alleles at a given locus and L number of loci studied). The polymorphism (P) is the percentage of polymorphic loci in the study population. A locus is considered polymorphic when the frequency of the most common allele is less than 0.95. The heterozygosity observed (H_o) and expected (H_e) defined by Nei (1978) and the fixation index F_{IS} ($F_{IS} = (H_e - H_o)/H_e$) made it possible to evaluate within-population diversity. The allelic frequency and the number of rare alleles defined as those having a frequency less than 0.05 were also calculated for each locus. Genetic differentiation was examined with F_{ST} based on the formula: $F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$, where H_S is the expected heterozygosity of an individual within subpopulation and H_T the expected heterozygosity of an individual in the total population (Wright, 1978).

Genetic structure of cassava cultivars

Population structure of cassava cultivars were visualized based on dendrogram using Nei's method (Nei, 1978). This method is based on the dissimilarity matrix between individuals using Darwin software version 6.0. Similarity index is calculated between two individuals according to the following formula: $D_{ij} = \left(1 - \frac{1}{L} \sum_{l=1}^L \left(\frac{ml}{\pi}\right)\right)$, where D_{ij} , the dissimilarity between the individuals i and j ; L , the number of loci; π = ploidy and ml the number of matched alleles per locus. In addition, a model-based approach was also applied to confirm the genetic structure. The number of groups (K) in each cassava cultivar was determined with the STRUCTURE software using the admixture model (Pritchard and Donnelly, 2001). The statistic ΔK , which is based on the rate of change in the log probability of the data between successive K -values, was then used to detect the true number of K populations in the dataset (Evanno et al., 2005). This test was performed using the correlated model of

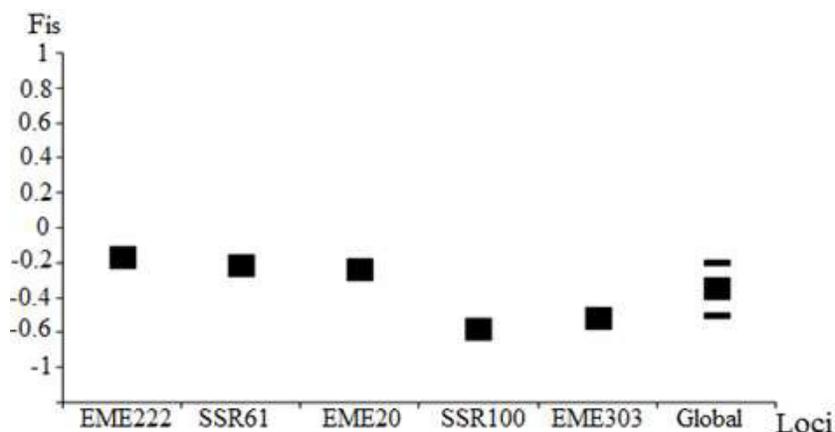
*Corresponding author. Email: m9koffi@yahoo.fr

Table 1. Sites where cassava samples were collected.

Site	Variety				Total
	Bocou1	Bonoua	Yace	Yavo	
Site 1	14	18	16	17	65
Site 2	14	19	19	15	67
Site 3	11	17	16	16	60
Site 4	19	20	19	16	74
Total	58	74	70	64	266

Table 2. Microsatellite markers used to assess genetic diversity.

Name	Type of repeat	Primers (forward and reverse)	Annealing temperature (°C)	Reference
EME20	(ATG)9	5'-CAG-CAC-CAG-TCA-ACA-TTC-CTG-3' 5'-CCT-TCT-GGC-AAT-GAG-CTC-ATG-3'	58	Sraphet et al. (2011)
EME303	(CT)11	5'-ATT-GGG-AAG-CAT-TGG-TGT-AGA-A-3' 5'-CAC-AAA-CAA-AAC-CCT-GTG-ACC-T-3'	58	Whankaew et al. 2011
EME222	(GAT)6	5'-CCC-ACT-CTC-TGT-CCA-CTT-C-3' 5'-CTT-CGA-CTC-TTC-TTT-ACG-GG-3'	58	Sraphet et al. (2011)
SSRY100	(CT)17TT(CT)7	5'-ATC-CTT-GCC-TGA-CAT-TTT-GC-3' 5'-TTC-GCA-GAG-TCC-AAT-TGT-TG-3'	58	Kawuki et al. (2013)
SSRY61	(CA)12	5'-GGC-TGC-TTT-ACC-TTC-TAC-TCA-A-3' 5'-CAA-GAA-CGC-CAA-TAT-GCT-GA-3'	58	Whankaew et al. (2011)

**Figure 1.** F_{IS} estimation per microsatellite locus.

allelic frequencies based on the clustering of individuals with similar allelic frequencies.

RESULTS

Microsatellite markers reliability test

The 5 microsatellite markers have good congruence and variances quite homogeneous regarding F_{IS} calculated per locus as illustrated in Figure 1. Therefore, all these

markers were used for subsequent analysis.

Genetic diversity parameters

Genetic diversity parameters were assessed with 5 microsatellites markers, and the results are presented in Table 3. All these markers were polymorphic for the four varieties. A total of 28 alleles were observed. The number of alleles varied from four to seven throughout loci with an average number of 5.6 alleles. The rate of rare alleles

Table 3. Mean of genetic diversity parameters across all loci.

Locus	No. of allele	Rare allele	H _o	H _e	F _{IS}	F _{ST}	P-value
EME222	7	2	0.752	0.645	-0.166	0.15	0,05
SSRy61	5	1	0.688	0.574	-0.199	0.10	0.05
EME20	5	1	0.721	0.597	-0.208	0.13	0.04
SSRy100	7	0	0.985	0.625	-0.576	0.19	0.004
EME303	4	0	0.909	0.599	-0.517	0.19	0.007
Mean	5.600	0.800	0.811	0.608	-0.333	0.15	0,008

He = expected heterozygosity, Ho = observed heterozygosity, F_{IS} = fixation index, F_{ST} = genetic differentiation index.

Table 4. Mean of genetic diversity parameters for each variety across all loci.

Population	No. of allele	Rare allele	H _o	H _e	F _{IS}	P-value
Bocou1	2.6	1	0.76	0.53	-0.43	0.02
Bonoua	2.75	1	0.92	0.58	-0.59	0.0006
Yacé	2.75	0	0.74	0.56	-0.32	0.05
Yavo	2.9	2	0.80	0.58	-0.38	0.02

Table 5. Estimated F_{ST} between pairs of the four varieties of cassava.

Population	Bocou1	Bonoua	Yace	Yavo
Bocou1	-	0.13	0.24	0.24
Bonoua	0.13	-	0.25	0.23
Yace	0.24	0.25	-	0.25
Yavo	0.24	0.23	0.25	-

in the overall population is 14.28%. The EME222 marker recorded the highest number of rare alleles as shown in Table 3. The mean number of alleles across all loci obtained for varieties Bocou1, Bonoua, Yace and Yavo were 2.6, 2.75, 2.75 and 2.9 respectively. Of the 28 alleles revealed by these 5 markers across loci and varieties, only one rare allele occurred in variety Bocou1 and Bonoua, and 2 occurred in variety Yavo. The average expected heterozygosity (He) across all the varieties and loci ranged from 0.574 in SSRy61 to 0.645 in EME222 with an average of 0.608, while observed heterozygosity ranged from 0.688 to 0.985 in SSRy61 and SSRy100, respectively, with an average of 0.811. The average heterozygosity obtained for all loci was higher than expected ($p=0.008$). A significant genetic diversity was observed within all the varieties (F_{IS}=-0.43, $p=0.02$) for Bocou1, (F_{IS}=-0.59, $p=6.10^{-4}$) for Bonoua, (F_{IS}=-0.32, $p=0.05$) for Yace and (F_{IS}=-0.38, $p=0.02$) for Yavo as illustrated in Table 4.

Genetic differentiation between varieties

F_{ST} values indicate good genetic differentiation between

varieties except between varieties Bocou1 and Bonoua where there is moderate genetic differentiation with a F_{ST} value equal to 0.13 as described in Table 5.

Population structure of cassava cultivars

Genetic structure within cassava varieties is described by radial style dendrograms based on dissimilarity matrices between individuals. These graphs shapes testify the existence of a spatial structuring of the diversity within these varieties. Thus, samples from different sites are grouped together to form distinct genetic groups within the four varieties as shown in Figure 2.

According to admixture model, varieties Bocou1, Bonoua and Yavo comprised of 2 clusters (K = 2) each, with a maximum likelihood for value $\Delta K = 696, 106$ and 98 for these varieties respectively. Variety Yacé comprised 3 clusters (K = 3) with a maximum likelihood for a value of $\Delta K = 16$. For variety Bocou1, there are 37 individuals (64%) in cluster 1 and 21 individuals (36%) in cluster 2. Variety Bonoua has 39 individuals (53%) in cluster 1 and 35 individuals (47%) in cluster 2. Concerning variety Yavo, individuals are distributed evenly over 2

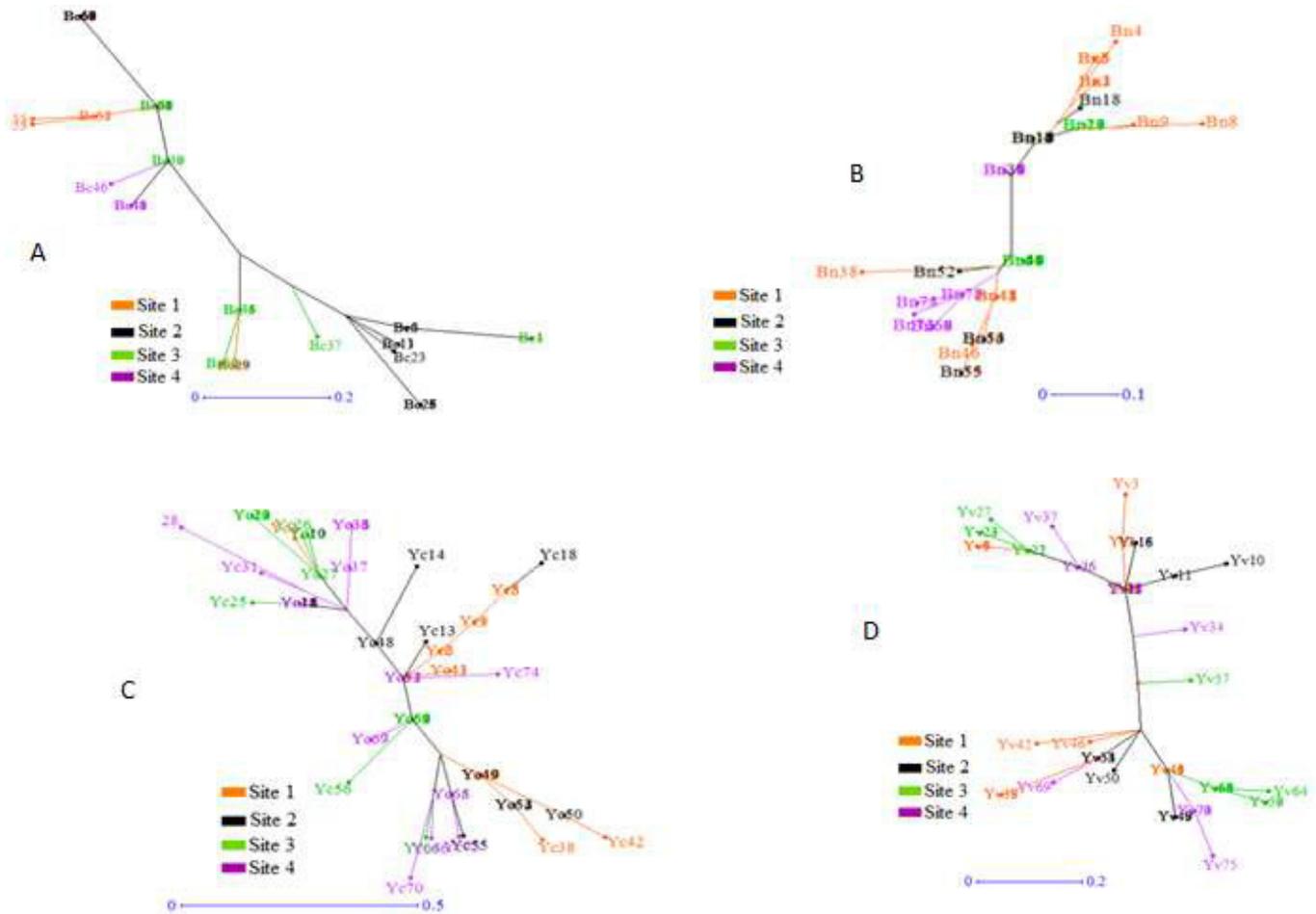


Figure 2. Dendrograms describing the genetic structure of cassava populations according to dissimilarity between individuals (A, B, C and D represent varieties Bocou1, Bonoua, Yacé and Yavo respectively).

clusters (50% each). Variety Yacé has 21 individuals (30%) in cluster 1, 35 individuals (46%) in cluster 2 and 14 individuals (24%) in cluster 3 as shown in Figure 3.

DISCUSSION

Genetic diversity and structure within and between 4 cassavas varieties cultivated in Daloa region were assessed with five microsatellite markers considered adequate to give reliable results on genetic parameters of cassava (Moyib et al., 2007). These markers were all polymorphic. Low levels of rare alleles were observed in these varieties, indicating the good quality of the markers (Meye, 2013).

Genetic diversity paramerters

The average numbers of allele obtained in the different varieties analyzed are greater than 2 and reveal a good allelic richness within these varieties but less than an

average number of alleles of 4.76 observed by Kizito et al. (2005) in Uganda. The highest average number of allele from these authors may be due to the fact that their study was carried out on unselected traditional varieties with more diversity than selected variety used in our study. This mean that the varietal selection lost alleles and therefore genetic diversity contained in wild collections is higher than selected variety observed (Nassar, 1978). Low genetic variability among the cassava varieties was also observed by other authors in Nigeria using the same molecular markers (Kabeya et al., 2012; Afonso et al., 2019). This narrow variability is a drawback from the point of view of breeders, because they need high genetic variability to improve agronomic traits and the genotypes are selected only based on very few agronomic traits such as maturation time, height and yield. Increasing genetic variability is crucial for breeding programs (Kabeya et al., 2012). This shows the need to always maintain an ever more diverse wild core that is referred to when the varietal selection has led to the loss of some interesting trait in the wildlife species.

The average values of FIS are negative for all loci in the

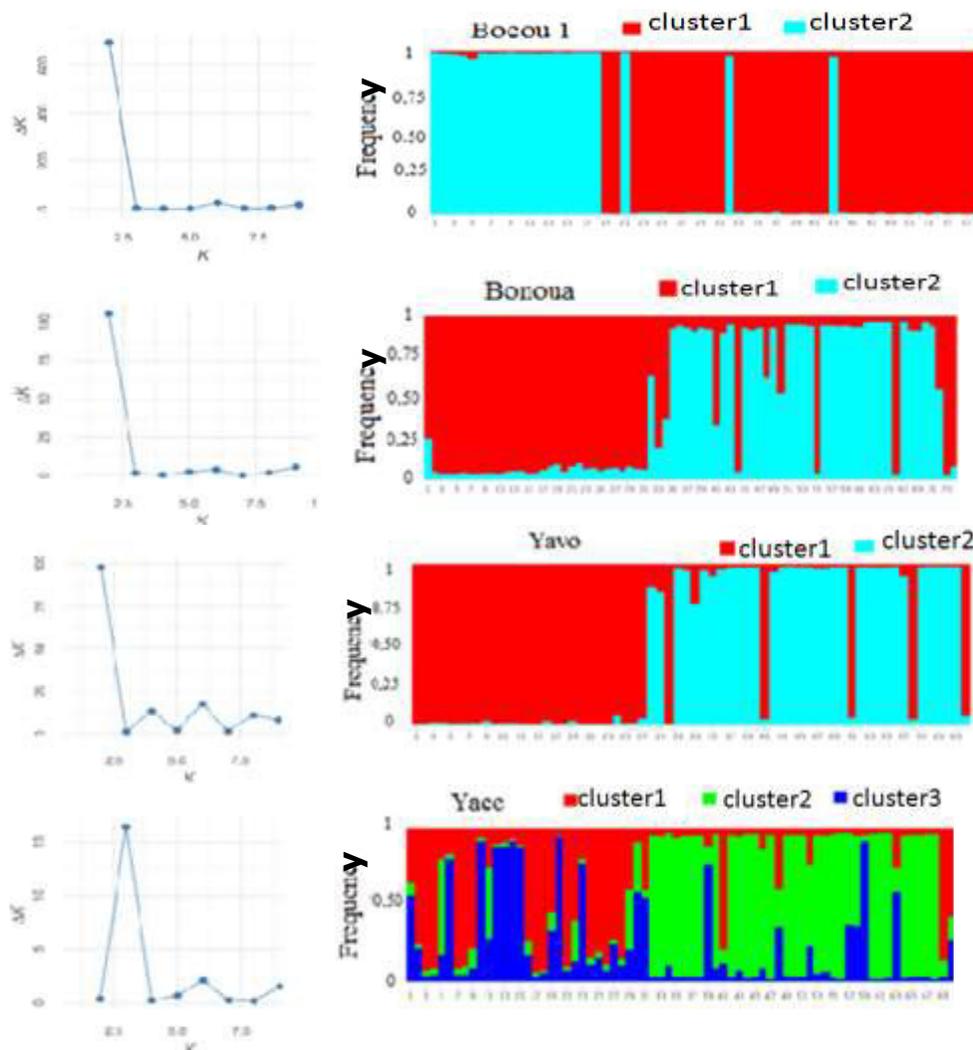


Figure 3. Clusters within cassava varieties using the admixture model (each color is representative of a cluster).

different varieties of cassava. There is therefore an excess of heterozygotes within the varieties that could be explained accordingly. One could think of the clonal reproduction of cassava which results in identical individuals to the original one. Otherwise, the excess of heterozygotes could be due to the natural sex-based reproduction systems of cassava. This argument is supported by Silva et al. (2003) who showed a pollen rate of cassava greater than 0.6 which reveals high levels of pollination with varying levels of selfing in this plant. The average number of alleles greater than 2 and the strong heterozygosity reflect the existence of genetic diversity within the varieties of cassava considered.

Let us note that the varieties studied (Yacé, Yavo, Bocou1 and Bonoua) are already improved (selected) varieties from the National Center for Agricultural Research (CNRA) and therefore from several crosses between landraces (N'Zué et al., 2013). This could explain the high number of heterozygosity and therefore

the no-equilibrium situation of Hardy-Weinberg (Beninga, 1992).

Chromosomal mutations due to environmental pressures might arise and thus contribute to genetic diversity. One of the factors behind this diversity is the continuous exchange of plant material with interesting agronomic traits among farmers in different localities (Missihoun et al., 2012). It could also be due to cultural practices based on the use of several varieties in fields that by gene exchange which creates genetic variability (Meye, 2013). In fact, the genetic diversity of cassava in a locality increases with varietal diversity (Adriano et al., 2013). In addition, when several varieties are grown by many households over large areas, they are minimally threatened and may simply be subject to in situ conservation of genetic diversity (Jarvis et al., 2000). Furthermore, it is noted that the clonal spread of cassava leads to an accumulation of pests, reducing yields. Thus, the higher the genetic diversity, the higher is the

resistance to pathogens (McKey et al., 2012).

However, many varieties are abandoned because of the adoption of higher-yielding varieties and only few are maintained in cultivation which could thus favor genetic erosion (Kombo et al., 2012). Indeed, genetic diversity is higher in Amerindian villages (Elias et al., 2000) because, farmers of these areas exploit seedlings from seeds to enhance the diversity of their plant material (Peroni et al., 2007). Seed multiplication is therefore source of new genotypes (Rival and McKey, 2008) but is unfortunately unknown in Côte d'Ivoire.

Genetic differentiation between varieties

Moderate genetic differentiation between cassava varieties observed ($F_{ST} = 0.19$) could be explained by a low gene flow between varieties because of few gene exchange between the improved varieties (Lokko et al., 2006). However, when the varieties are considered two by two, the genetic differentiation is strong except varieties Bocou1 and Bonoua which present a moderate genetic differentiation. We can say that gene flow is higher between these two varieties than between the others.

Population structure of cassava cultivars

The analysis carried out with STRUCTURE presented two main clusters for Bocou1, Bonoua and Yavo varieties and three genetic clusters for the Yacé variety. There is thus more diversity within these varieties which confirms their instability which could offer improvement possibilities for these varieties (Trochet et al., 2014).

Conclusion

Cassava is one of the income-generating crops grown in Côte d'Ivoire. This study evaluated the genetic diversity of four varieties of cassava cultivated in Daloa district. It comes up the existence of a moderate genetic diversity and differentiation within and between these varieties. Population structure defined two or three clusters depending on variety. This study is the first step in understanding the range of genetic diversity of cassava varieties grown in Daloa. The information generated is of paramount importance to justify and guide conservation strategies for cassava genetic resources in the area, to serve as a reference not only to the region but also to the country and a parental selection guide in the sense of varieties improvement.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have not declared any conflict of interests.

REFERENCES

- Adriano SR, Adenir VT, Anilde GS, Renato AS (2013). Relative contribution of biotic and abiotic factors to the population density of the cassava green mite, *Mononychellus tanajoa* (Acari: Tetranychidae). *Experimental and Applied Acarology* 276:1496-1505.
- Afonso SDJ, Moreira RFC, Ledo CAS, Ferreira CF, Santos VS, Muondo PA (2019). Genetic structure of cassava populations (*Manihot esculenta*, Crantz) from Angola assessed through (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology* 18(7):144-154.
- Beninga M (1992). Evaluation et utilisation des ressources génétiques des mils et des sorghos. Collecte et valorisation des formes sauvages. In : Complexes d'espèces, flux de gènes et ressources génétiques des plantes. Edition Lavoisier-Technique et Documentation pp. 73-86.
- De Meeûs T, McCoy DK, Prugnolle F, Chevillon C, Durand P, Hurterz-Boussès S, Renaud F (2007). Population genetics and molecular epidemiology or how to « débusquer la bête ». *Infection, Genetics and Evolution* 7:308-332.
- Elias M, Panaud O, Robert T (2000). Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihotesculenta* Crantz) farming system using AFLP markers. *Heredity* 85:219-230.
- El-Sharkawy MA (2004). Cassava biology and physiology. *Plant Molecular Biology* 56(4):481-501.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2013). FAOSTAT Database. Food and Agriculture Organization, Roma, Italy. <https://doi.org/www.fao.org/faostat/fr>
- Jarvis D, Myer L, Klemick H, Guarino L, Smale M, Brown A, Sadiki M, Shapit B, Hodgkin T (2000). A Training Guide for In situ Conservation On-Farm (Version 1) Rome 419 p.
- Kawuki RS, Herselman L, Labuschagne MT, Nzuki I, Ralimanana I, Bidiaka M, Kanyange MC, Gashaka G, Masumba E, Mkamilo G, Gethi J, Wanjala B, Zacarias A, Madabula F, Ferguson ME (2013). Genetic Diversity of Cassava (*Manihotesculenta*Crantz) Landraces and Cultivars from Southern, Eastern and Central Africa. *Plant genetic Resources* 18:1-12.
- Kabeya MJ, Uzoma CK, Berhanu DBand, Ivan LI (2012). Genetic Analysis of Selected Cassava (*Manihot esculenta*) Genetic Pool in Africa Assessed with Simple Sequence Repeats *World Journal of Agricultural Sciences* 8(6):637-641. ISSN 1817-3047. DOI: 10.5829/idosi.wjas.2012.8.6.1695
- Kizito BE, Bua A, Fregene M, Egwang T, Gullberg U, Westerbergh A (2005). The effect of cassava mosaic disease on the genetic diversity of cassava in Uganda. *Euphytica* 146:45-54.
- Koffie-bikpo Y, Kra S (2013). La région du Haut-Sassandra dans la distribution des produits vivriers agricoles en Côte d'Ivoire. Rapport Institut de Géographie Tropical, Abidjan 94 p.
- Kombo GR, Dansi A, Loko LY, Orkwor GC, Vodouhè R, Assogba P (2012). Diversity of cassava (*Manihotesculenta*Crantz) cultivars and its management in the department of Bouenza in the Republic of Congo. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59(8):1789-1803.
- Lokko Y, Dixon A, Offei S, Danquah E, Fregene M (2006). Assessment of genetic diversity among African cassava *Manihote sculenta* Crantz accessions resistant to the cassava mosaic virus disease using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1441-1453.
- McKey D, Emperaire L, Elias M, Pinton F, Robert T, Desmoulière S, Rival L (2012). Gestions locales et dynamiques régionales de la diversité variétale du manioc en Amazonie. *Genetique. Resources. Crops Evolution*, 33:465-490.
- Meye CA (2013). Contribution à l'étude de la diversité Génétique du manioc cultivé (*Manihotesculenta*) en Afrique Centrale (Zone CEMAC). Mémoire de master II d'Agronomie et Agroalimentaire, Université de Montpellier 145 p.
- Missihoun AA, Agbangla C, Ahanhanzo C, Vodouhè R (2012). Gestion traditionnelle et statut des ressources génétiques du sorgho (*Sorghumbicolor* L. Moench) au Nord-Ouest du Bénin. *International Journal BiologicalChemical Science* 6(3):1003-1018.
- Moyib O, Kodunola O, Dixon A (2007). SSR markers reveal genetic variation between improved cassava cultivars and landraces within a

- collection of Nigerian cassava germplasm. African Journal of Biotechnology 6(23):2666-2674.
- N'zué B, Zohouri GP, Kouadio KK (2001). Introduction de nouvelles variétés de manioc en milieu paysan. In Anonyme (Ed.). Variétés améliorées de manioc en milieu paysan en Afrique de l'Ouest. Actes d'un atelier régional sur le manioc. Cacadali, Lomé, IITA. pp. 42-51.
- N'zué B, Zohouri GP, Sangare A (2004). Performances agronomiques de quelques variétés de manioc (*Manihot esculenta* crantz) dans trois zones agroclimatiques de la Côte d'Ivoire. Agronomie Africaine 16(2):1-7.
- N'zué B, Zohouri GP, Djédji C, Tahouo O (2013). Bien cultiver le manioc en Côte d'Ivoire. rapport CNRA, Abidjan 4 p.
- Nassar NM (1978). Conservation of the genetic resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): determination of wild species location with emphasis on probable origin. Economic Botany 32:11-320.
- Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583-590.
- Peroni N, Kageyama PY, Begossi A (2007). Molecular differentiation, diversity and folk classification of sweet and bitter cassava (*Manihot esculenta*) in Caicara and Caboclo management systems in Brazil. Genetic Resources and Crop Evolution 54(2):1249-1333.
- Piero NM, Joan MN, Richard OO, Jalemba MA, Omwoyo OR, et al. (2015) Determination of Cyanogenic Compounds Content in Transgenic Acyanogenic Kenyan Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genotypes: Linking Molecular Analysis to Biochemical Analysis. J Anal Bioanal Tech 6:264
- Pritchard JK, Donnelly P (2001). Case-control studies of association in structured or admixed populations. Theoretical Population Biology 60:227-237.
- Rival L, Mckey D (2008). Domestication and diversity in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae). Current Anthropology 9:1119-1128.
- Risterucci AM, Grivet L, N'Goran JA, Flament MH, Lanaud C (2000). A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. Theoretical and Applied Genetics 101:5-6.
- Silva R, Bandel G, Martins PS (2003). Mating system in an experimental garden composed of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) ethnovarieties. Euphytica 134:127-135.
- Sraphet S, Boonchanawiwat A, Tangphatsornrourng S, Boonseng O, Tabata S, Lightfoot DA, Triwitayakorn K. (2011). Development of simple sequence repeat markers and construction of genetic linkage map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Theoretical and Applied Genetics 10(5):1507-1520.
- Trochet A, Etienne R, Le Chevalier H, Joubin T, Riberon A (2014). Structuration génétique des populations de tritons palmés (*Lissotriton helveticus*) en Alsace. Projet BUFO, laboratoire Evolution et Diversité Biologique, université Toulouse 23 p.
- Whankaew S, Supanath K, Chalermopol P, Duncan R, Jarunya N, Kanokporn T (2011). Cross-general transferability of (simple sequence repeat) SSR markers among cassava (*Manihot esculenta* Crantz), rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) and physic nut (*Jatropha curcas* L.). African Journal of Biotechnology 10(10):1768-1776.
- Wright S (1978). Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations. Evolution 19:395-420.

Publication 2

ISSN 1996-0719

International Journal of
Plant
Pathology



Research Article

Molecular Characterization of Cassava Mosaic Viruses and Current Mosaic Disease Concern in Three Major Cassava Production Areas in Côte D'ivoire

¹F. Yao, ¹M.Koffi, ^{1,2}I. Abe, ¹M. N'Djetchi, ¹T. Konan and ¹T.A. Sanogo

¹Research Unit in Genetics and Molecular Epidemiology (URGEM), UFR Environment, Laboratory of Biodiversity and sustainable Management of Tropical Ecosystems, Jean Lorougnon Guédé University, BP 150 Daloa, Ivory Coast
²Laboratory of Genetics, UFR Biosciences, Félix Houphouët Boigny University, 22 BP 582 Abidjan 22, Ivory Coast

Abstract

Background and Objective: Since its introduction in Côte d'Ivoire in the 1980s, Cassava Mosaic Disease has so far continued to cause damage to cassava production in the country. This study aimed to characterize cassava mosaic disease's pathogens and emphasize current concerns in three major cassava-producing regions for better disease control. **Materials and Methods:** Two hundred cassava leaf samples comprising symptomatic infection and healthy characteristics from improved and traditional varieties were collected in the departments of Bouaké, Yamoussoukro and Daloa from 2019-2020 in rainy and dry seasons. These leaves were subjected to molecular analyses. Cassava Mosaic Disease's prevalence and severity were evaluated. All data were analyzed with software R, version 3.3.1. **Results:** Cassava Mosaic Disease overall phenotypic prevalence was 43.37% and almost equally distributed in all investigated departments. After the molecular diagnostic, the infection rate reached 77.7% for symptomatic plants and 34.28% for asymptomatic plants. The severity scores in traditional and improved varieties were S2, S3 and S4 but S2 were the most frequent. ACMV strains were the most detected while EACMV and co-infections showed the highest injury. **Conclusion:** The Cassava Mosaic Viruses largely present in all surveyed regions. Traditional varieties seem to be more resistant to infections and therefore require particular attention for viruses' control.

Key words: Cassava production, cassava mosaic disease, prevalence, severity, molecular characterization

Citation: Yao, F., M. Koffi, I. Abe, M. N'Djetchi, T. Konan and T.A. Sanogo, 2021. Molecular characterization of cassava mosaic viruses and current mosaic disease concern in three major cassava production areas in Côte D'ivoire. *Int. J. Plant Pathol.*, 12: 12-20.

Corresponding Author: M. Koffi, Research Unit in Genetics and Molecular Epidemiology (URGEM), UFR Environment, Laboratory of Biodiversity and sustainable Management of Tropical Ecosystems, Jean Lorougnon Guédé University, BP 150 Daloa, Ivory Coast

Copyright: © 2021 F. Yao *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing Interest: The authors have declared that no competing interest exists.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

INTRODUCTION

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a euphorbiaceous plant with 36 chromosomes¹. Since its introduction in Africa, this plant has been adopted in almost the whole continent and has become one of the leading foods for populations². It is grown mainly for human consumption and animal feed but also industries used³. Yet, cassava has a strategic place in food security because it is one of the main subsistence crops in several African countries, including Côte d'Ivoire⁴. However, for decades, Ivorian cassava production has been threatened by Cassava Mosaic Disease (CMD), which reduces considerably its yield. The pathogen which causes the disease, Cassava Mosaic Virus (CMV), is a begomovirus⁵ and it is mainly transmitted by infected cuttings or by whiteflies, *Bemisia tabaci* is a polyphagous biting-sucking insect⁶. Viral strains impact differently cassava plants, depending on their virulence⁷. The main symptoms of CMD are deformation and discolouration of plant, chlorosis, plant stunting through stunting are non-specific to a virus type^{8,9}. In Côte d'Ivoire, according to Djaha *et al.*¹⁰, production losses due to CMD are enormous. Given the damage and spread of CMD, the current study presents the outcome of country-wide survey conduct across three major cassava-producing regions with the objective to genotype CMV and map their distribution.

MATERIALS AND METHODS

Survey areas: The sampling was carried out in Côte d'Ivoire in departments of Bouake (7°69N, 5°03W), Yamoussoukro (6°48N, 5°17W) and Daloa (6°53N, 6°27W). These regions are important cassava-growing regions in Côte d'Ivoire where the rainy seasons stretch from April-June and from September to November while the dry seasons stretch from July-August and from November-March. In each department, five villages were surveyed according to the diversity of cassava varieties.

Field sampling and sample collection: In each village, 5-12 small-holder farmer fields were randomly selected for the surveyed according to the diversity of cassava varieties. A total

of 183 cassava farms were visited. A questionnaire was used to collect information such as department, village, cultivar, crop age, sampling season, cuttings origin and field coordinates recorded using the Global Positioning System (GPS). Sampling was carried out during the dry season, from November, 2019 to February, 2020 and in the rainy season from May-August, 2020. In each field, leaves were collected from 30 plants along two diagonals of the sampling farms following Sseruwagi's method¹¹. The CMD prevalence per farm was obtained by the per cent (%) of the ratio of the number of infected plants (n) to the total number of plants sampled (N)¹² and the severity degrees are chlorotic symptom expression on leaves assessed using a scale of 1-5 according to Bakuzezia¹³ as described in Table 1. A total of 200 CMD symptomatic and healthy leaf samples were collected per field and preserved like herbarium specimen¹⁴ including 65 in Bouaké, 70 in Yamoussoukro and 65 in Daloa.

DNA Extraction from cassava leaf sample: Total DNA were extracted from about 50 mg of leaf sample using a modified Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) protocol as detailed by Abarshi *et al.*¹⁵. For each sample, CTAB lysis buffer was replaced with a buffer containing PBS (400 µL) and ASL (400 µL). Extracted DNA was suspended again in 100 µL of Tris-EDTA (TE) elution buffer for each sample in a labelled 1.5 mL Eppendorf tube and stored at -20°C before PCR.

DNA quality test: After each extraction, 10 out of 30 extracted DNA samples were randomly selected for the quality test. DNA were visualized after electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide and run at 100 volts for 30 min in Tris-borate-EDTA (TBE 0,5 X). The gel was visualized under a UV photographic trans-illuminator. When the staining obtained is of high intensity, the DNA is of good quality and can be used for PCR.

CMD virus diagnosis: Cassava leaf samples were analyzed by PCR using primers JSP001/F and JSP002/R or ACMV-AL1/F and ACMV-AR0/R for ACMV identification and JSP001/F and JSP003/R primers for EACMV identification in Table 2. The PCR

Table 1: Grading scale of CMD severities

Score	Symptom description
1	No symptoms on leaves or stems
2	Mild vein yellowing, chlorotic blotches on leaves No brown streaks, lesions on green stem or leaves
3	Mild vein yellowing, chlorotic blotches on leaves, Mild brown streaks, lesions on green stem portions
4	Sever, extensive vein yellowing, chlorotic blotches on leaves, Severe brown streaks, dark lesions on green stem portions, No defoliation, stem die-back and stunting
5	Severe/extensive vein yellowing, chlorotic blotches on leaves, Severe brown streaks, dark lesions on green stem portions, Defoliation, stem die-back and stunting

Table 2: Primers of CMD virus's identification

Primers	Sequence (forward, reverse)	Expected size (pb)	Virus
JSP001	5'ATGTCGAAGCGACCAGGAGAT 3'	783	ACMV
JSP002	5'TGTTTATTAATTGCCAATACT 3'		
JSP001	5'ATGTCGAAGCGACCAGGAGAT 3'	780	EACMV
JSP003	5'CCTTTATTAATTTGCTCACTGC 3'		
ACMV-AL1/F	5'GCGGAATCCCTAACATTAT 3'	1030	ACMV
ACMV-AR0/R	5'GCTCGTATGTATCTCTAAGGCCTG 3'		

mix contains 5 µL of DNA extract, 5 µL of amplification buffer 10X with MgCl₂, 3.2 µL of dNTP (200 µM), 2.6 µL of each primer (10 pM), 0.1 µL Taq polymerase (5U µL⁻¹) and 31.5 µL of molecular water, for a total volume of 50 µL. Amplification reactions were performed in a PCR thermal cycler (BioRad T100™, SINGAPOUR). This amplification used the standard thermal whose conditions are as follows: Initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 sec, annealing at 55°C for 45 sec and initial extension at 72°C for 55 sec. The PCR reaction ends with a final extension at 72°C, for 10 min. The amplified DNA fragments were electrophoresed in 2% agarose gel stained with ethidium bromide and run at 100 volts for 45 min in Tris-borate-EDTA (TBE 0,5 X). Gels were visualized under a UV photographic trans-illuminator. Amplified products were scored (+) for CMVs positive and (-) for CMVs negative.

Statistical analysis: Comparison of phenotypic prevalence between departments was performed by the pairwise comparison test using the pairwise prop function. Factors likely to influence the disease development were determined by the Odds Ratio at 95%. These factors were compared using Fisher's exact tests according to the Cochran rule or independence Chi-square test, Heat map was carried out to evaluate the rate of each severity degree in departments. The reduction of the colour intensity in a block reflects the percentage increase of the severity score. And the rate of infected plants compared between symptomatic and asymptomatic plants as well as the rates of each virus detected in the different departments using the Chi-square test. The relationship between CMD's severity degrees and virus strains was carried out using the generalized linear model (glm). All statistics tests were performed using R software version 3.3.1 and differences were considered to be significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Phenotypic prevalence and severity of CMD: Cassava mosaic disease occurred in all the three departments surveyed in

Côte d'Ivoire with an average phenotypic prevalence of 43.37%. No significant difference was observed in CMD prevalence between the three study sites ($p = 0.23$), although higher in Daloa (44.74%) followed by Bouake (43.37%) and Yamoussoukro had the lowest prevalence (42.04%) in Table 3. The CMD severity scores observed were S1, S2, S3 and S4 with S2 being the most dominant severity score in all the departments followed by S1 and S3. The score 4 which was the highest severity score was observed only in Bouake and Yamoussoukro with low proportions as 3.08 and 1.43%, respectively in Fig. 1.

Risk factors associated with cassava mosaic disease:

Table 4 shows risk factors associated with cassava disease occurrence in this study. Fields wild cuttings are around 6 times more likely to be infected than cuttings originate from the breeder of the National Centre for Agronomic research or the National Agency for Support to Rural Development (ANADER) (OR = 6.53, IC_{95%} [3.34-12.76]). Significant differential infection was observed among field age intervals ($p < 0.05$). The highest field susceptible age interval was 3-6 months followed by fields which ages were ≥ 7 months. The infection risk is around 6 times more prevalent in the dry season than in the rainy season (OR = 5.86, IC_{95%} [2.82-12.17]).

Molecular detection of CMV and virus variants distribution:

Viral strains identified in this study are African Cassava Mosaic Disease (ACMV) and East African Cassava Mosaic Disease (EACMV). The ACMV was detected by the size 783 and 1030 Pb while EACMV was characterized by size 780 Pb. Out of the 200 samples tested for viral infection, 133 (66.5 %) were positive in Fig. 2. The global infection rates were 70.71, 62.86 and 66.15% in Daloa, Bouake and Yamoussoukro, respectively. There was no significant difference between these rates ($p = 0.93$) in Table 5. Among the 133 infected, 91 (68.42%) were only ACMV positives, 25 (18.80%) were EACMV positives and 17 (12.78%) were positive to both virus strains. ACMV was significantly more prevalent than EACMV in all departments ($p = 0.03$).

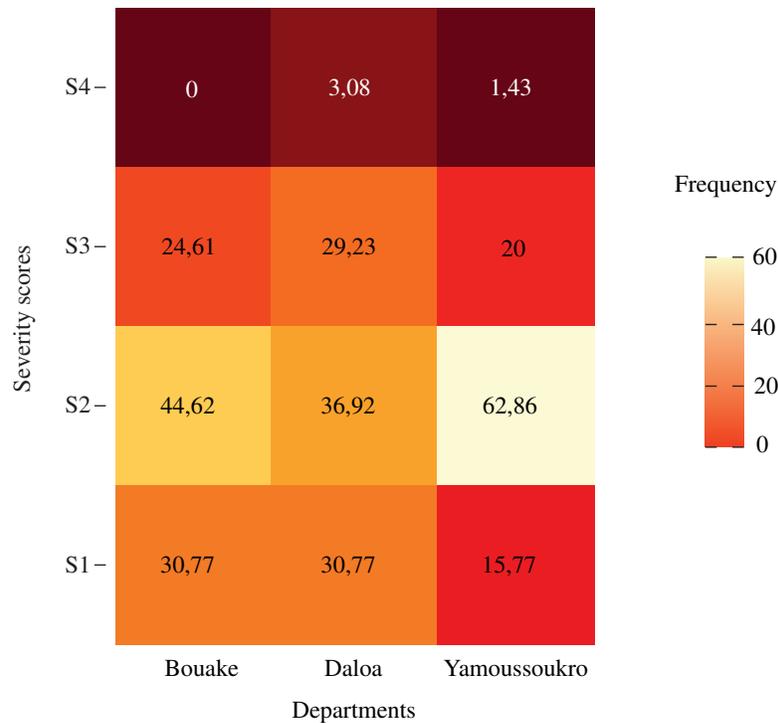


Fig. 1: Proportions of CMD severity degrees in each department

Table 3: Phenotypic prevalence observed in all the departments

Departments	N	Visual observation		F (%)	X ²	p-value
		Symptomatic	Asymptomatic			
Bouake	1946	844	1102	43.37	2.93	0.23
Yamoussoukro	2010	845	1165	42.04		
Daloa	1940	868	1072	44.74		
Total	5896	2557	3339			

N: Total number of samples, F: Frequency, X²: Chi-square constant, p: Probability associated at x² test

Table 4: Risk factors associated with CMD

Factors	N	Symptomatic (%)	Asymptomatic (%)	p-value	OR (IC _{95%})
Cutting origin					
CNRA	58	20 (34.48)	38 (65.52)		
Village	142	110 (77.46)	32 (22.54)	<0.001 ^a	6.53 (3.34-12.76)
Age (month)					
1-2	28	4 (14.28)	24 (85.71)		
3-6	100	78 (78)	22 (22)	<0.001 ^b	6.38 (2.58-15.80)
≥7	72	42 (58.33)	30 (41.77)	0.04 ^a	2.52 (1.02-6.22)
Season					
Rainy	43	14 (32.56)	29 (67.44)		
Dry	157	116 (73.88)	41 (26.12)	<0.001 ^a	5.86 (2.82-12.17)
Total	200	130 (65)	70 (35)		

N: Total number of samples, p: Probability associated at x² test, OR: Odds Ratio, (IC_{95%}), 95% Confidence Interval, a: Independence Chi-square approximation, b: Fisher's exact test

Table 5: Comparison of infection rates between departments

Departments	N	Virus test		T (%)	X ²	p-value
		+	-			
Bouake	65	46	19	70.71	0.14	0.93
Yamoussoukro	70	44	26	62.86		
Daloa	65	43	22	66.15		
Total	200	133	67	66.5		

N: Total number of samples, T: Infection rate, X²: Chi-square constant, p: Probability associated at X² test, +: Virus presence, -: Virus absence

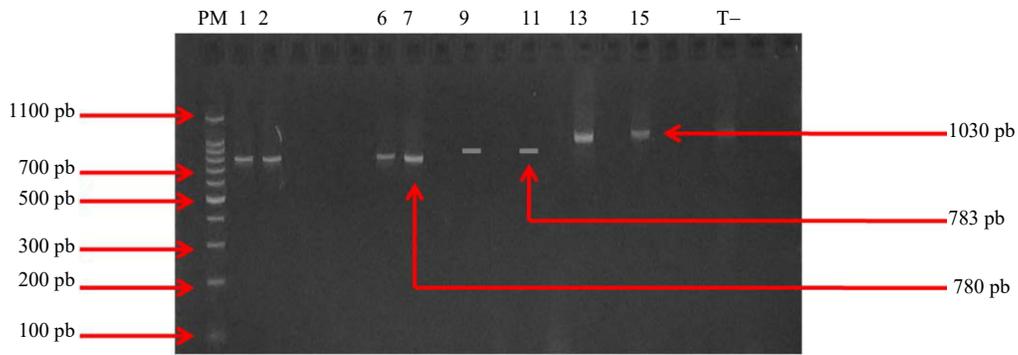


Fig. 2: Electrophoretic profile encoding genes of cassava mosaic virus strains

1, 2, 6 and 7 Samples tested positive to EACMV; 13, 15 and 18 Samples tested positive to ACMV; T-: Negative control (no amplification); PM: Molecular weight marker (100 bp, Invitrogen)

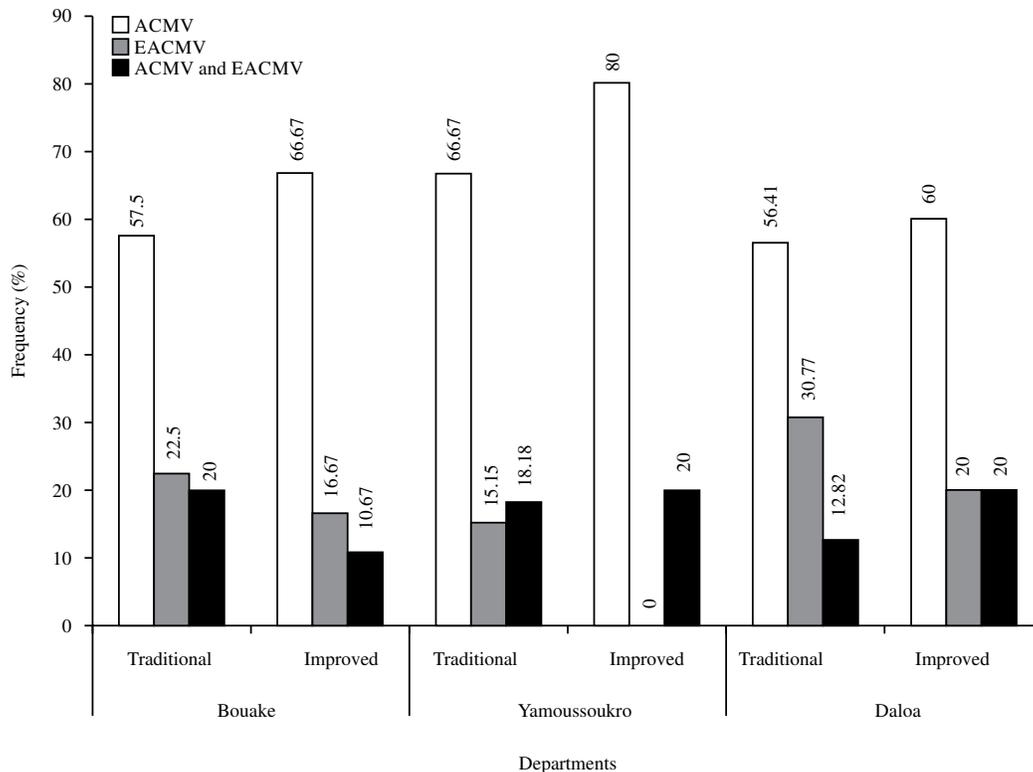


Fig. 3: Virus infection rate in traditional and improved varieties for each department

Infection rates were compared within the department between traditional and improved varieties and it comes out that ACMV strains were more detected than EACMV in both traditional and improved cassava varieties in Fig. 3. The improved varieties involved in severe infections were TMS, Bocou5 and Bocou8.

Infection rate between symptomatic and asymptomatic samples: From the 130 symptomatic DNA analyzed,

101(77.7%) were CMV's positive. This infection rate didn't differ significantly between departments ($p>0.05$) in Fig. 4. Also, the infection rate of asymptomatic plants was evaluated. The results show that from the 70 asymptomatic DNA analyzed, 24 (34.28%) were CMV's positive and this rate didn't differ significantly between departments ($p>0.05$). However, the infection rate of symptomatic plants is higher than asymptomatic plants ($p<0.01$).

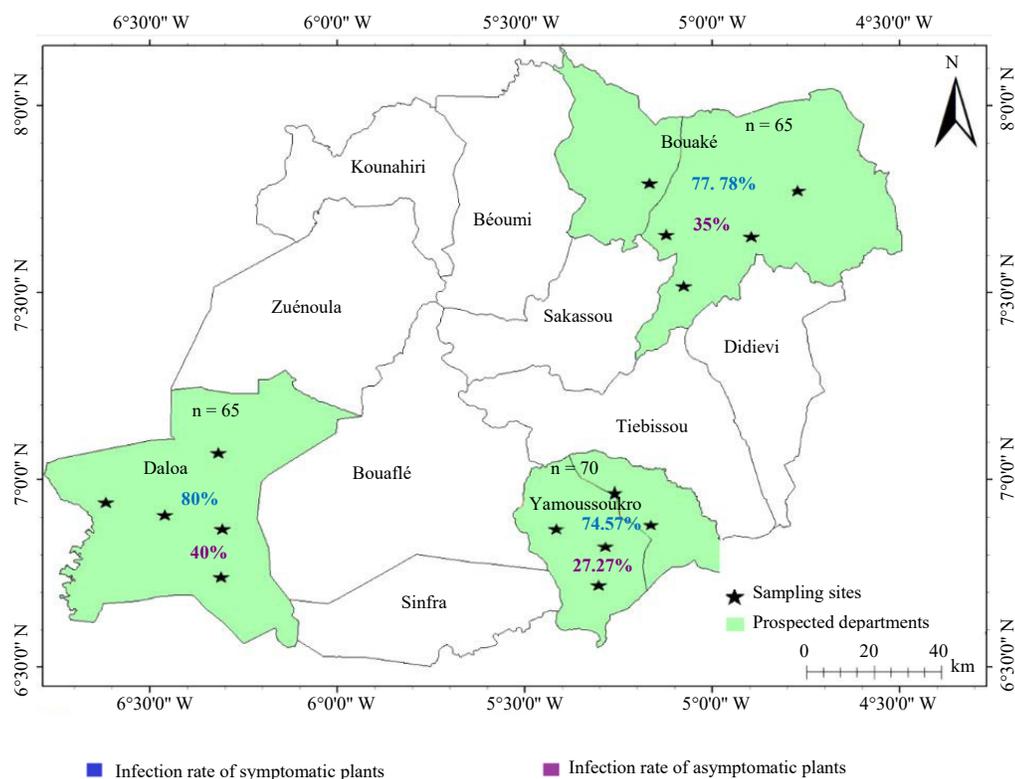


Fig. 4: Distribution of infection rate in symptomatic and asymptomatic plants

DISCUSSION

This study showed that Cassava Mosaic Disease (CMD) is equally distributed in all the three departments surveyed with an overall prevalence of 43.37%. The most observed severity scores were S2 and S3 and the score S4 was observed only in Daloa and Yamoussoukro with a low proportion. Cuttings origin, plants age and season are factors that increase CMD prevalence in Ivorian sites visited. Farms whose plants are aged from 3-6 months old were most infected. At this stage, cassava plants are actively growing, so they are more vulnerable to pathogens and in case of infection, they provide infected leaflets¹⁶. Moreover, the dry season is a suitable period for virus development and propagation in fields¹⁷. Correlation between virus development and dry season could be explained by the water stress in the young plants, which increases their vulnerability to pathogens, particularly viruses¹⁸.

Cuttings cultivated very often come from other fields of the same village or the same department or another department or even other neighbouring countries. According to Toualy *et al.*¹⁹, this cassava growing method is the primary means to perpetuate disease in the plant population. Indeed,

cutting is the most widely practised method in developing countries by cutting exchanging between farmers²⁰. However, many times, these recycled cuttings come from infected village plantations where cuttings are not controlled. This promotes the development and spread of cassava mosaic disease²¹. Virus development could also be explained by the maintenance of the poor field observed during sampling. Some research has shown that CMV is associated with factors such as plant age, climatic conditions, susceptibility of the infected cassava variety, the field maintenance, the virus strain responsible for the infection and co-infection⁹. The current study revealed the existence of the two viral strains in the three cassava production areas surveyed with some co-infection cases which can be very unsafe depending on the EACMV variants present in these co-infections. EACMV variants can be more perilous and result from recombination causing considerable yield losses⁶. However, ACMV was the most detected virus with a less aggressive severity score. These results are similar to Toualy *et al.*¹⁹, findings, which showed the presence of ACMV and EACMV in the North-East of Côte d'Ivoire with ACMV identified as the most widespread virus in the cassava growing areas. Indeed, the symptoms caused by ACMV alone are moderate while plants infected with EACMV

or co-infection between ACMV and EACMV present high severity scores²² even if some samples that have expressed the presence of both strains of virus ACMV and EACMV showed a low severity score (S2). That could mean that the variants of EACMV involved in these co-infections were less severe or the particular genotype of the plant is tolerant to the virus. On other hand, some authors reported that infection due to EACMV is necessarily associated with the presence of ACMV, which was not the case in this study in which for some plants, only the EACMV virus was detected²³. Most of the improved varieties were infected by viruses while only these varieties have been popularized for several years in Côte d'Ivoire at the expense of the large local cultivars which are disappearing. The large prevalence of cassava mosaic disease could be due to the reduction of virus tolerance in most improved cultivars whose genetic structures are very homogeneous compared to traditional varieties and therefore would have caused a great vulnerability to diseases²⁴. Indeed, the abandonment of traditional varieties would have caused a loss of genetic diversity²⁵. Some authors argue that traditional varieties can maintain or even increase genetic diversity in the field through gene flow^{26,27}. Therefore, the permanent contact between insect-virus-host would have turned the improved varieties into favourable hosts for the viruses and facilitate their spread²⁸. On the other hand, some traditional varieties (22%) weren't infected and these could contain resistance genes to CMV. Resistant genes study could confirm or not this assertion to better appreciate these varieties use for possible improvements of cassava in Côte d'Ivoire. The virus infection rate was significantly greater in symptomatic plants than in asymptomatic plants. Thirty-four symptomatic samples (22.82%) were CMV's negative meaning that these symptoms could be related to other factors or others CMV variants not tested in this study. Indeed, CMD evolves rapidly and this evolution is largely due to recombination between existing strains resulting in new viruses with the same symptoms but sometimes more aggressive. According to Bisimwa *et al.*²⁹, the severe epidemic that affected Uganda in the 1990s was caused by the recombinant virus EACMV-UG2, resulting from the recombination between ACMV and EACMV. Also, recombination can occur between CMV and other viruses such as cassava brown streak virus (CBSV)⁹.

Some asymptomatic samples (35.29%) were CMV positive. The absence of symptoms in these leaves tested positive could be justified by the possibility that these plants contained CMD resistance genes. Indeed, the resistant character in these plants would have reduced viruses' manifestation. This result shows that PCR diagnostic is necessary to confirm whether plants are infected or not³⁰.

CONCLUSION

This study shows that Cassava Mosaic Disease is still active and equally distributed in all the three departments surveyed in Côte d'Ivoire with an overall prevalence of 43.37%. The risk factors associated were cutting materials used, field age and dry season. Although severity scores 3 and 4 were observed, 'score 2' was the most frequent in both traditional and improved varieties. The improved varieties were infected the same as some traditional varieties and the most severely infected improved varieties were TMS, Bocou 5 and Bocou 8. This study noticed a resistance loss in improved varieties. The viruses ACMV, EACMV and co-infection were present in both variety types. However, ACMV was the most viruses detected while EACMV and co-infection showed the highest aggressive scores. The 22% of ignored traditional varieties seem to be more CMV's resistant and therefore require particular attention. The virus infection rate was greater in symptomatic plants than asymptomatic plants but PCR is necessary to assess if plants are affected or no by mosaic disease.

SIGNIFICANCE STATEMENT

This study highlights a high prevalence of Cassava mosaic disease in Côte d'Ivoire and a resistance loss in improved cassava varieties. These results suggest significant control measures to delay the spread of the pathogen. Resistant or tolerant character in some plants would have reduced viruses' manifestation. This result shows that PCR diagnostic is very useful to confirm whether plants are infected or not. A control approach based on the combination of traditional varieties tolerant to viruses might help.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the Ivorian agricultural structures such as "CNRA_Bouaké", "ANADER_Yamoussoukro" and "Chambred' Agriculture_Daloa" and farmers for their help in samples collection. We are also grateful to the head of URGEM-Daloa laboratory for having authorized molecular analysis in his laboratory.

REFERENCES

1. Pariyo, A., P. Tukamuhabwa, Y. Baguma, R.S. Kawuki and T. Alicai *et al.*, 2013. Simple sequence repeat (SSR) diversity of cassava in South, East and central Africa in relation to resistance to cassava brown streak disease. *Afr. J. Biotechnol.*, 12: 4453-4464.

2. Alamu, E.O., P. Ntawuruhunga, T. Chibwe, I. Mukuka and M. Chiona, 2019. Evaluation of cassava processing and utilization at household level in Zambia. *Food Secur.*, 11: 141-150.
3. Chavarriaga-Aguirre, P., A. Brand, A. Medina, M. Prías and R. Escobar *et al.*, 2016. The potential of using biotechnology to improve cassava: A review. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 52: 461-478.
4. Mobio, A.J., G. Fokou, S. Aka, K.B. Kouassi and K.S. Kreppel *et al.*, 2021. Exploring beyond the conjunctural rhetoric: Sociocultural drivers for the "cassava crisis" in Côte d'Ivoire. *Agric. Food Econ.*, Vol. 9. 10.1186/s40100-020-00174-0.
5. Mivedor, A.S., K.A. Dansou-Kodjo, D.K. Adjata and J.S. Pita, 2020. Identification and incidence of cassava mosaic begomoviruses in Togo. *Asian J. Plant Pathol.*, 14: 11-20.
6. Legg, J.P., B. Owor, P. Sseruwagi and J. Ndunguru, 2006. Cassava mosaic virus disease in East and Central Africa: Epidemiology and management of a regional pandemic. *Adv. Vir. Res.*, 67: 355-418.
7. Eni, A.O. and D.K. Fasasi, 2013. Molecular detection of two cassava begomoviruses in some parts of Southern Nigeria. *Afr. J. Agric. Res.*, 8: 1350-1353.
8. Tiendrebeogo, F., P. Lefevre, M. Hoareau, V.S. Traore and N. Barro *et al.*, 2009. Occurrence of *East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG) in Burkina Faso. *Plant Pathol.*, 58: 783-783.
9. Zinga, I., F. Chiroleu, J. Legg, P. Lefevre and E.K. Komba *et al.*, 2013. Epidemiological assessment of cassava mosaic disease in Central African Republic reveals the importance of mixed viral infection and poor health of plant cuttings. *Crop Prot.*, 44: 6-12.
10. Djaha, K.E., K. Abo, T. Kone, D. Kone and M. Kone, 2018. Analysis of the population structure of cassava growers, production systems and plots' sanitary state in Côte d'Ivoire. *J. Anim. Plant Sci.*, 36: 5833-5843.
11. Abubakar, M., D. Singh and J.N. Keta, 2019. Cassava mosaic disease and associated gemini viruses in bauchi state, Nigeria: occurrence and distribution. *Am. J. Plant Biol.*, 4: 85-90.
12. Mohammed, I.U., S. Ghosh and M.N. Maruthi, 2016. Host and virus effects on reversion in cassava affected by cassava brown streak disease. *Plant Pathol.*, 65: 593-600.
13. Bakuzezia, M.M., 2019. The impact of African cassava mosaic in Kindu and its surroundings (Dr Congo). *Int. J. Innovation Appl. Stud.*, 2: 445-456.
14. Chikoti, P.C., M. Tembo, M. Chisola, P. Ntawuruhunga and J. Ndunguru, 2015. Status of cassava mosaic disease and whitefly population in Zambia. *Afr. J. Biotechnol.*, 14: 2539-2546.
15. Abarshi, M.M., I.U. Mohammed, S.C. Jeremiah, J.P. Legg, P.L. Kumar, R.J. Hillocks and M.N. Maruthi, 2012. Multiplex RT-PCR assays for the simultaneous detection of both RNA and DNA viruses infecting cassava and the common occurrence of mixed infections by two cassava brown streak viruses in East Africa. *J. Virol. Methods*, 179: 176-184.
16. Mbewe, W., P.L. Kumar, W. Changadeya, P. Ntawuruhunga and J. Legg, 2014. Diversity, distribution and effects on cassava cultivars of cassava brown streak viruses in malawi. *J. Phytopathol.*, 163: 433-443.
17. Chikoti, P.C., R.M. Mulenga, M. Tembo and P. Sseruwagi, 2019. Cassava mosaic disease: a review of a threat to cassava production in Zambia. *J. Plant Pathol.*, 101: 467-477.
18. Kapoor, D., S. Bhardwaj, M. Landi, A. Sharma, M. Ramakrishnan and A. Sharma, 2020. The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Appl. Sci.*, Vol. 10. 10.3390/app 10165692.
19. Toualy, M.N.Y., S. Akinbade, S.Koutoua, H. Diallo and P.L. Kumar, 2014. Incidence and distribution of cassava mosaic begomoviruses in Cote d'Ivoire. *Int. Inst. Trop. Agric.*, 4: 131-139.
20. Pootakham, W., J.R. Shearman, P. Ruang-areerate, C. Sonthirod and D. Sangsrakru *et al.*, 2014. Large-scale SNP discovery through RNA sequencing and SNP genotyping by targeted enrichment sequencing in cassava (*Manihot esculenta* crantz). *PLoS ONE*, Vol. 9. 10.1371/journal.pone. 0116028.
21. Harimalala, M., P. Lefevre, A.D. Bruyn, F. Tiendrébéogo and M. Hoareau *et al.*, 2012. A novel cassava-infecting begomovirus from madagascar: Cassava mosaic madagascar virus. *Arch. Virol.*, 157: 2027-2030.
22. Eni, A.O., O.P. Efekemo, O.A. Onile-ere and J.S. Pita, 2020. South west and north central Nigeria: Assessment of cassava mosaic disease and field status of African cassava mosaic virus and east African cassava mosaic virus. *Ann. Applied Biol.*, 178: 466-479.
23. Were, M.N., B. Mukoye, A.K. Osogo, B.C. Mangeni and P.A. Nyamwamu *et al.*, 2016. Occurrence and distribution of begomoviruses infecting cassava in western Kenya. *Plant*, 4: 108-113.
24. Kombo, G.R., A. Dansi, L.Y. Loko, G.C. Orkwor, R. Vodouhè, P. Assogba and J.M. Magema, 2012. Diversity of cassava (*Manihot esculenta* crantz) cultivars and its management in the department of bouenza in the republic of Congo. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 59: 1789-1803.
25. Yao, F., M. Koffi, I. Abe, B. Ahouty and S. Simaro *et al.*, 2019. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* crantz) varieties grown in daloa district in central-western côte d'ivoire. *Afr. J. Agric. Res.*, 14: 1341-1348.

26. Kawuki, R.S., L. Herselman, M.T. Labuschagne, I. Nzuki and I. Ralimanana *et al.*, 2013. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces and cultivars from Southern, Eastern and Central Africa. *Plant Genet. Resour.*, 2: 170-181.
27. Fu, Y.B., P.P. Wangsomnuk and B. Ruttawat, 2014. Thai elite cassava genetic diversity was fortuitously conserved through farming with different sets of varieties. *Conserv. Genet.*, 15: 1463-1478.
28. Dietzgen, R.G., K.S. Mann and K.N. Johnson, 2016. Plant virus–insect vector interactions: Current and potential future research directions. *Viruses*, Vol. 8. 10.3390/v8110303.
29. Bisimwa, E., J. Walangululu and C. Bragard, 2015. Cassava mosaic disease yield loss assessment under various altitude agroecosystems in the Sud-Kivu Region, Democratic Republic of Congo. *TROPICULTURA*, 33: 101-111.
30. Eni, A.O., J.D.A. Hughes and M.E.C. Rey, 2008. Survey of the incidence and distribution of five viruses infecting yams in the major yam-producing zones in benin. *Ann. Appl. Biol.*, 153: 223-232.

RESUME

Dans la lutte contre la pauvreté et l'insécurité alimentaire, le manioc est une culture importante en Afrique en général et particulièrement en Côte d'Ivoire, qui rencontre d'énormes difficultés liées aux contraintes biotiques et abiotiques. La mosaïque est l'un des problèmes majeurs qui réduisent fortement les productions du manioc, à cause de l'augmentation et la dissémination rapide de ses virus pathogènes. Cette thèse s'inscrit dans la vision du développement durable avec pour objectif d'améliorer et de garantir une production durable au manioc en Côte d'Ivoire à partir de la lutte contre la mosaïque. Spécifiquement, il a été question de comprendre l'épidémiologie de la mosaïque du manioc, d'évaluer la diversité et la structuration génétique du manioc disponible et de cribler des génotypes de manioc résistants à cette virose. L'échantillonnage a comporté deux phases dont une enquête et des collectes d'échantillons de feuilles de manioc dans les départements de Bouaké, Yamoussoukro et Daloa. Ces feuilles ont été soumises à des analyses moléculaires au laboratoire suivant trois objectifs à savoir la détection des souches virales de mosaïque, le génotypage des variétés de manioc et l'identification des gènes de résistance à la mosaïque. Après leur détection, vingt-deux (22) séquences de la souche virale ACMV ont été séquencées. La prévalence globale de la mosaïque du manioc était de 43,65 % avec des niveaux de sévérité allant de 1 à 4. Sept (7) variantes ACMV issues des mécanismes de mutations génétiques ont été identifiées. Par ailleurs, la diversité génétique du manioc observée était faible chez les variétés améliorées avec une faible différenciation génétique alors et plus élevée chez les variétés traditionnelles avec une différenciation génétique modérée. Aussi, une phylogénie a révélé divers groupes génétiques chez les variétés traditionnelles dans les trois départements prospectés. Enfin, 32 génotypes de manioc traditionnels ont été définis comme étant résistants à la mosaïque et 24 autres comme étant hautement résistants. Ces génotypes pourraient être divulgués en vue d'augmenter la diversité génétique du manioc, moteur de la vigueur chez les plantes, et ainsi minimiser la croissance de la mosaïque en Côte d'Ivoire.

Mots clés : Mosaïque du manioc ; mutation génétique ; souche et variante virales ; diversité génétique ; génotypes de manioc résistants ; Côte d'Ivoire.

ABSTRACT

In the fight against poverty and food insecurity, cassava is an important crop in Africa in general and in Côte d'Ivoire particularly that faces difficulties due to biotic and abiotic constraints. Mosaic disease is one of the most problems that severely reduce cassava production, due to virus increases and dissemination. This thesis follows sustainable development approach with objective to improve and assure a sustainable cassava production in Côte d'Ivoire through mosaic control. Specifically, we aim to understand epidemiology of CMD, evaluate the genetic diversity and structuration of cassava and screen resistant genotypes of cassava to mosaic. Sampling included survey and leaves collection in Bouake, Yamoussoukro and Daloa. These samples were subjected to molecular analysis according to three objectives: detection of virus strains, cassava varieties genotyping and identification of mosaic resistance genes. After detection, twenty-two (22) viruses of ACMV strain were sequenced. The prevalence was 43.65% with severity levels from 1 to 4. Seven ACMV variants from genetic mutation were identified. The genetic diversity of cassava was low in improved varieties with low genetic differentiation while it was high in traditional varieties with moderate genetic differentiation. Phylogeny revealed genetic groups among traditional varieties in all departments surveyed. Finally, 32 traditional genotypes were defined as mosaic resistant and 24 others as highly resistant. These genotypes could be released to increase the genetic diversity of cassava, which is the engine of plant vigor, and thus reduce cassava mosaic development in Côte d'Ivoire.

Key words : Cassava mosaic ; genetic mutation ; virus strain and variant ; genetic diversity ; resistant cassava genotypes; Côte d'Ivoire.