

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
المدرسة الوطنية العليا للعلوم الفلاحية
Ecole Nationale Supérieure Agronomique
El-Harrach, Alger



Ecole Doctorale de Biotechnologies Végétales
Thèse présenté en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en
Biotechnologies Végétales
Option : Biotechnologies Végétales

Sujet

**Etiologie et épidémiologie de la maladie de l'enroulement
foliaire de la vigne en Algérie**

Par : LEHAD AREZKI

Soutenu à l'ENSA, le : 04/01 / 2016 devant le jury composé de :

Président :	KHELIFI Lakhdar	(Professeur à l'ENSA)
Directrice de Thèse :	LOUANCHI Meriem	(Maître de conférences à l'ENSA)
Co-Directrice de thèse :	MAHFOUDHI Naïma. Tunis)	(Maître de conférences à INRAT de Tunis)
Examineurs:	BOUZNAD Zouaoui	(Professeur à l'ENSA)
	KRIMI Zoulikha	(Professeur à USD Blida)
	SABAOU Nasseridine	(Professeur à l'ENS de Kouba)

2012-2016

A toute ma famille...

Remerciements

Ces quelques lignes sont pour moi les plus précieuses de cette thèse car elles rendent compte de la gratitude que j'éprouve envers des personnes admirables sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Avant toute ligne, toute phrase, je tiens à remercier Dr. Mahfoudhi Naïma « Maître de conférence à l'INRAT de Tunis » pour avoir accepté d'être ma co-Directrice de thèse et pour toute son aide précieuse. Merci pour votre générosité, votre gentillesse et tout le savoir que vous m'avait transmis.

Je remercie également ma Directrice de thèse Dr. Louanchi Meriem, Maître de Conférence, à l'ENSA, pour toute son aide, travailler avec elle était un vrai plaisir. Sa compréhension et son soutien envers les étudiants m'ont montré qu'enseigner n'est pas seulement de donner des cours.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Khelifi Lakhdar, Directeur de l'ENSA, pour me faire l'honneur de présider le jury. Je remercie également le professeur BOUZNAD Zouaoui, Professeur à l'ENSA, le Professeur KRIMI Zoulikha de USD Blida dont je suis honoré d'avoir été un de ses étudiants, et le Professeur SABAOU Nasserline, Professeur à l'ENS de Kouba, pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Je remercie le Directeur de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Tunis et le responsable du laboratoire de protection des végétaux pour m'avoir accueilli.

Je tiens à remercier M^{elle} Ilhem Selmi et Mme Manel EL Air pour tous leur soutien durant le stage effectué à l'INRAT ainsi que toute l'équipe du laboratoire de virologie végétale, Mme Asma Najjar, Mme Monia Mnari. Mr. Fathi, Mme Fatma et tous les travailleurs de la station.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail et je leur témoigne toute ma gratitude.

En dernier, mais je devrai commencer par vous, Madame Aitouada Mouni, je ne saurai comment vous remercier de m'avoir insufflé la flamme de la virologie dans mon esprit et de m'avoir initié aux bases de cette discipline, vous êtes et vous serez un modèle pour moi.

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des Figures	II
Liste des abréviations	III
I. Introduction	1
II. Données bibliographiques	3
II.1 Données sur la vigne	3
II.1.1 La vigne dans le monde	3
II.1.2 La viticulture en Algérie	4
II.1.2.1 Importance économique de la viticulture.....	4
II.1.2.2 Les cépages de vigne cultivés en Algérie	5
II.1.2.3 Les maladies de la vigne en Algérie.	6
II.2 La maladie de l'enroulement foliaire de la vigne	7
II.2.1 Historique de la maladie	7
II.2.2 Impact économique de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne	8
II.2.3 Symptômes de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne	8
II.2.4 Résistance variétale de la vigne à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne	9
II.2.5 Les virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne	10
II.2.5.1 Taxonomie des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne	10
II.2.5.2 Propriétés des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne.....	12
II.2.5.3 Transmission de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne	16
II.2.5.4 Les méthodes de détection des virus de l'enroulement foliaire de la vigne	18
II.2.6 Variabilité génétique des virus des végétaux	19
II.2.6.1 Les méthodes d'étude de la diversité génétique des virus des végétaux	19
II.2.7 Diversité génétique des virus de l'enroulement foliaire de la vigne	21
III.1. Matériels	23
III.1.1. Echantillonnage de vigne	23
III.1.2 Les tests immunoenzymatiques.....	24
III.1.3 Analyse moléculaire des <i>GLRaV</i> -1, -2 et -3 et SSCP	24
III.2 Méthodes	24
III.2.1 Méthode d'échantillonnage	24
III.2.2 Méthode Sérologique	25
III.2.3 Identification des virus <i>GLRaV</i> -1, -2 et -3 par reverse transcription-PCR	26

III.2.4 Etude de la diversité génétique.....	29
III.2.4.1 Polymorphisme de conformation des acides nucléiques simple brin (SSCP).....	29
III.2.4.2 Séquençages d'une partie du gène HSP70h et CP du GLRaV-2 et -3.....	30
III.2.4.3 Analyse bio-informatique des séquences	31
IV. Résultats et Discussions	34
IV.1. Résultats des prospections.....	34
IV.2. Résultats des Analyses sérologiques et moléculaires.....	35
IV.2.1 Résultats des analyses sérologiques	35
IV.2.2 Résultat des analyses moléculaires	37
IV.2.3 Résultat de la SSCP.....	40
IV.2.4 Séquençage.....	40
IV.2.5 Discussion des résultats sérologiques et moléculaires	42
IV.3 Etude de la diversité génétique du GLRaV-3	43
IV.3.1 Résultats	43
IV.3.1.1 Analyse nucléotidique des isolats du <i>GLRaV-3</i>	43
IV.3.1.2 Etude phylogénétique du GLRaV-3	46
IV.3.2 Discussion	48
IV.4 Etude de la diversité génétique du GLRaV-2	50
IV.4.1 Résultats	50
IV.4.1.1 Comparaison nucléotidique et étude phylogénétique.....	50
IV.4.1.2 Etude phylogénétique.....	50
IV.4.1.3 Courbe de similitude du <i>GLRaV-2</i>	53
IV.4.1.4 Etude de la pression de sélection.....	53
IV.4.2 Discussion.	54
V. Conclusion générale	56
Références.	57
Annexe	65
Publications.....	74
Résumé	75

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification actuelle des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne et quelques propriétés.....	12
Tableau 2 : les différents vignobles et nombre échantillons obtenue durant l'étude.....	25
Tableau 3. Amorces utilisées pour la détection de GLRaV-3 et GLRaV-2.....	29
Tableau 4 : Isolats utilisés pour l'élaboration de la courbe de similitude.....	33
Tableau 5 : Comparaison entre les infections simples et les infections multiples.....	36
Tableau 6 : Prédominance des <i>GLRaV-1</i> , <i>GLRaV-2</i> et <i>GLRaV-3</i>	38
Tableau 7: Les isolats séquencés et leurs provenances.....	41
Tableau 8: Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et les isolats représentatifs des différents groupes décrits pour le gène CP.....	45
Tableau 9: Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et les isolats représentatifs des différents groupes décrits pour le gène HSP70h.....	45
Tableau 10 : Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et certains isolats de chaque groupe phylogénétique	50
Tableau 11: Pourcentage d'identité moyenne des séquences du HSP70h à l'intérieur des groupes et entre les groupes.....	51

Liste des Figures

Figure 1 : Production viticole mondiale par région.....	3
Figure 2 : Carte géographique illustrant les pays par quantité de production.....	4
Figure 3 : exportation du raisin entre 1961 et 2011	5
Figure 4 :Exportation de vins de l'Algérie entre 1961 et 2011.....	5
Figure 5: Enroulement foliaire de la vigne sur cépage blanc et cépage rouge.....	9
Figure 6. Arbre phylogénétique de la famille des <i>Closteroviridae</i>	12
Figure 7 : Micrographie électronique de particules purifiées du GLRaV-3	12
Figure8 : Organisation génomique t foliaire de la vigne.....	15
Figure 9 : <i>P. ficus</i> sur vigne.....	17
Figure10 : Schéma de la polymorphisme de conformation des acides nucléiques simple brin (SSCP).....	21
Figure 11 : localisation des régions prospectées	23
Figure 12 : Représentation schématique du DAS-ELISA.....	25
Figure 13: Conditions de polymérisation de l'amorce du GLRaV-3.	28
Figure 14: Condition de polymérisation des amorces du GLRaV-1 et GLRaV-2	29
Figure 15 : Capture de l'interface web du BLAST d'une séquence du <i>GLRaV-3</i>	31
Figure 16 : Capture de l'interface web de Datamonkey.....	33
Figure 17 : Symptôme d'enroulement foliaire de la vigne sur le cépage Alicante Bouschet. .	34
Figure 18 : Symptôme d'enroulement foliaire de la vigne sur le cépage Dattier de Beyrouth	34
Figure 19: Comparaison entre les infections simples et les infections multiples.....	36
Figure 20 : Prévalence de <i>GLRaV-1</i> , <i>GLRaV-2</i> , et <i>GLRaV-3</i>	36
Figure 21 : Gel de la PCR du GLRaV-3 pour le gène Hsp70h	38
Figure 22: Gel de la PCR du GLRaV-3 pour le gène CP.....	38
Figure 23 : Gel de la PCR du GLRaV-2	39
Figure 24 : Gel de la PCR du GLRaV-1	39
Figure 25 : Profils SSCP de produit PCR spécifiques au gène HSP70h	40
Figure 26 : Séquence de l'isolat ALG2 du <i>GLRaV-2</i> en format FASTA.....	41
Figure 27. Arbre phylogénétique du <i>GLRaV-3</i>	47
Figure 28. Arbre phylogénétique des isolats algériens du <i>GLRaV-2</i>	52
Figure 29. Courbe de similitude des isolats du <i>GLRaV-2</i>	53
Figure 30 : Site évoluant sous une sélection positive et négative	54

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- *CoV*: Cordyline virus 1
- CP: Coat protéine
- DAS-ELISA : Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique
- GLRaV : Grapevine Leafroll associated Virus
- HSP70h: *heat* shock protein 70 homolog
- Kb: Kilo base
- kDa: kilo Dalton
- *LChV*: Little cherry virus
- NLS : Dodecylsulfat-Natriumsalz
- OIV : Organisation Internationale de la Vigne
- ORF: Open Reading Frame
- Pb : Paire base
- PVP : Polyvinylpyrrolidone
- RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
- SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism
- Tpm : Tour par minute
- UTR: Untranslated region

I. Introduction

Les études épidémiologiques des maladies des plantes revêtent une grande importance dans les programmes de lutte contre les maladies et dans la sécurité alimentaire. En effet, elles permettent de connaître l'importance de chaque maladie vis-à-vis de l'insécurité alimentaire. Ainsi, le suivi de l'évolution des maladies permet de mieux cerner les méthodes de propagation pour élaborer des plans et stratégies de lutte efficaces.

Avec une superficie de 7528 millions d'hectares, la vigne est considérée comme la plante la plus cultivée à travers le monde (OIV, 2013). Sa production est essentiellement dirigée vers la vinification.

En Algérie, la viticulture a connu énormément de changement du point de vue rendement, production et superficie. Passant d'une culture vivrière à une vraie industrie, plaçant l'Algérie comme le 4^{ème} pays producteur viticole au monde et le premier exportateur à l'aube de l'indépendance. Cependant, plusieurs facteurs ont causé la ruine de la viticulture en Algérie réduisant les superficies viticoles de 349000 hectares en 1961 à 50650 hectares en 1999. Durant ces dernières années, la viticulture a commencé à connaître un nouvel essor avec de nouvelles plantations de vigne de table et de cuve et des techniques de production améliorées pour atteindre une superficie 68564 hectares avec des rendements de 8325 Kg/ha en 2013 alors qu'ils n'étaient que de l'ordre de 3017 kg/ha en 1993. Plusieurs programmes d'aides et de suivi ont été mis en place par les autorités pour relancer cette filière.

Cependant, les efforts à réaliser pour redynamiser la culture de la vigne doivent être menés de façon raisonnée pour avoir la pérennité d'une production stable. Les stress biotiques constituent l'un des facteurs limitants de cette culture. En effet, les maladies et les ravageurs de la vigne causent des pertes inestimables. Le mildiou et la pourriture grise de la vigne constituent les maladies les plus connues des agriculteurs mais d'autres maladies restent méconnues à cause d'une faible vulgarisation. Certaines prospections réalisées ont montré une très grande prédominance des symptômes correspondant à ceux de l'Esca, qui jusqu'à un passé récent n'était pas prise en compte. D'autres maladies, comme les maladies virales, sont souvent confondues avec des déficiences nutritives.

Plusieurs agents phytopathogènes ont été répertoriés sur la vigne et chaque année, de nouvelles espèces sont identifiées. Les virus et les virus similaires constituent le groupe le plus représenté dans la vigne. En effet, il totalise plus de 60 virus et certaines sont mondialement répandus comme c'est le cas des virus associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne.

Au cours de ce travail, nous avons voulu mettre en évidence l'importance de l'une des maladies virales de la vigne les plus importantes au monde qui cause des pertes annuelles considérables. Ainsi, nous avons mené une étude sur l'étiologie et la prédominance de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne pour les trois principaux virus associés à cette maladie (*GLRaV-1*, -2 et -3) dans les régions viticoles les plus importantes en Algérie. Les problématiques visées dans cette étude sont de savoir si ces virus existent en Algérie, connaître leur prédominance et d'étudier leur diversité génétique.

La première étape de cette étude consistait dans la recherche par test sérologique des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne 1, 2 et 3. Une analyse moléculaire par RT-PCR a été réalisée sur un fragment des gènes HSP70h et Cp pour les trois virus dont certains ont été séquencés pour le *GLRaV-2* et -3 dans le but de mener une étude phylogénétique.

II. Données bibliographiques

II.1 Données sur la vigne

II.1.1 La vigne dans le monde

La superficie viticole mondiale s'élève à 7528 millions d'hectares (OIV, 2013). L'Espagne possède la plus grande superficie viticole avec 1023 millions d'hectares suivi par la France avec 793 millions d'hectares.

La production viticole mondiale est concentrée en Europe et en Asie et représente presque les 3/4 de la production mondiale (figure 1). La Chine occupe la première place suivie par l'Italie, les Etats-Unis d'Amérique puis l'Espagne en termes de production. Cela témoigne de l'importance de cette culture pour ces deux régions dont la finalité est essentiellement la production de vins. Par contre la production africaine ne représente que 5,8% de la production mondiale avec l'Afrique du Sud, l'Egypte, l'Algérie, le Maroc et la Tunisie comme principaux producteurs. Ainsi, en termes de production l'Algérie peut être classée comme le 3^{ème} producteur viticole en Afrique (FAOSTAT, 2013).

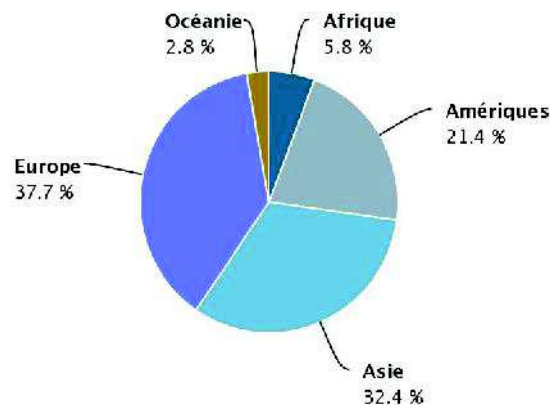


Figure 1 : Production viticole mondiale par région. (Source : <http://faostat3.fao.org>)

Les plus grands producteurs en Europe, sont l'Italie, l'Espagne et la France. En Asie, la Chine est considérée parmi les plus importants producteurs au monde avec des superficies en continuelle évolution suggérant la possibilité qu'elle devienne le leader mondiale dans la filière dans quelques années (figure 2). En effet, le rapport de L'OIV de 2014 indique que les superficies viticoles Européennes sont en diminution à l'inverse des superficies viticoles de la Chine.

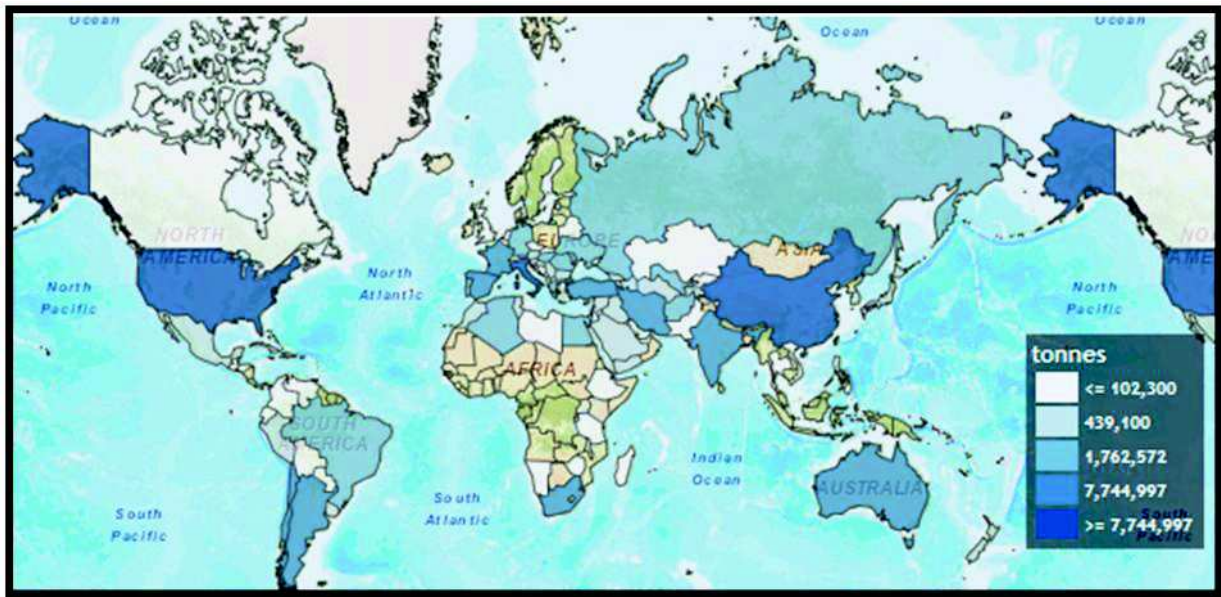


Figure 2 : Carte géographique illustrant les pays par quantité de production (Source <http://faostat3.fao.org>).

II.1.2 La viticulture en Algérie

II.1.2.1 Importance économique de la viticulture

Il est très difficile d'estimer l'importance de la viticulture avant la période coloniale de par le manque de données et d'inventaires. Levadoux et *al.* (1971) ont estimé la superficie viticole à 3000 hectares avant la colonisation française. Après la colonisation, des campagnes de plantations ont été entreprises par les colons pour atteindre une superficie de 349 000 hectares à la veille de l'indépendance. Après l'indépendance, la viticulture algérienne fait face à une crise viticole entre l'Algérie et la France en 1966, ce qui a poussé l'Algérie à procéder à des programmes de reconversions par l'arrachage des vignobles réduisant ainsi les superficies aux environs de 50 000 hectares à la fin des années 90. A partir de 2001, la viticulture a connu un nouvel essor, grâce à un plan de relance de l'agriculture. Ainsi les superficies ont augmenté pour atteindre 68564 hectares en 2013 (FAOSTAT, 2013).

Les seules exportations réalisées par l'Algérie concernant les raisins de table et les raisins secs ont pris fin à partir de 1967, date du début de la crise viticole. Les exportations réalisées entre 1962 et 1966 variaient entre 4 000 et 25 000 tonnes.

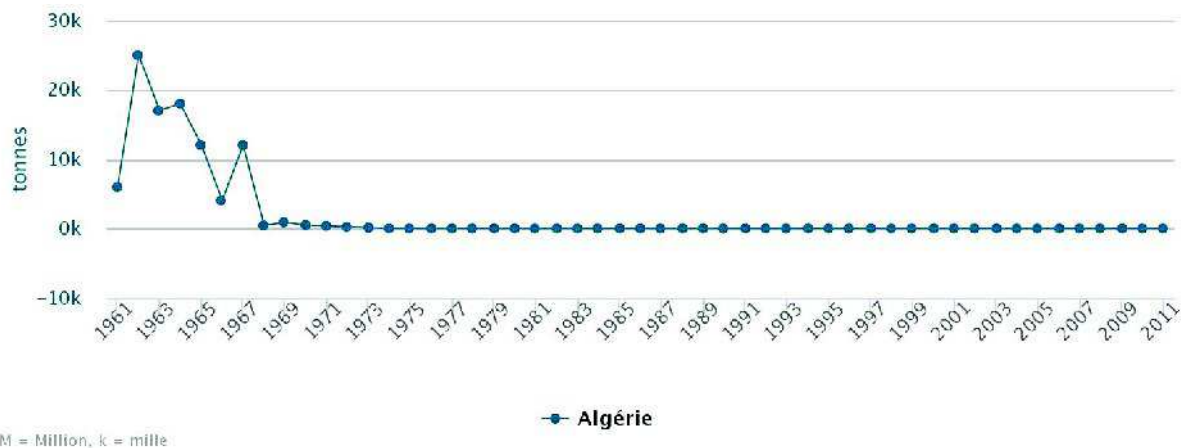


Figure 3 : exportation du raisin entre 1961 et 2011 (Source <http://faostat3.fao.org>)

Avant l'indépendance de l'Algérie, le marché des exportations de vin était de 7 128 000 hectolitres en 1923 pour atteindre 17 125 000 hectolitres en 1938. Après l'indépendance les exportations ont connu certaines variations dans lesquelles on note une chute puis une augmentation. Ce n'est qu'à partir de 1974 que la chute continuelle des exportations a commencé annonçant le déclin de la filière vinicole (figure 4). Ainsi les exportations de vins réalisés en 2010 n'excédaient pas les 105 millions de dollars.

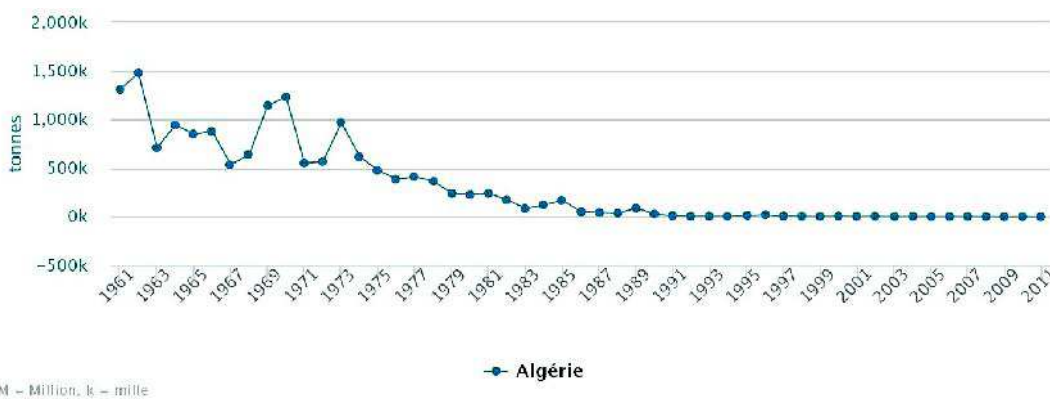


Figure 4 : Exportation de vins de l'Algérie entre 1961 et 2011 (Source <http://faostat3.fao.org>).

II.1.2.2 Les cépages de vigne cultivés en Algérie

Le Vignoble algérien peut être classé en trois catégories : les variétés autochtones, les variétés classiques et les variétés nouvelles. Vu la diversité génétique des variétés en Algérie, il peut aussi être classé en fonction de l'époque de maturité, on distingue les cépages précoces (maturité : 2^e semaine de juillet), les cépages de saisons (maturité : fin juillet à mi-septembre)

et les cépages tardifs (maturité après la mi-septembre., Ils peuvent également être classés selon la couleur du pigment.

Pour les variétés autochtones, la majorité sont des variétés cultivées de façon vivrière par les riverains à l'exception de certaines variétés telle que le Chaouch rencontré dans la région de Boumerdes et la variété Franna rencontrée dans les vignobles de Mascara du côté de Ouled Fares. A Médea, on rencontre de grandes superficies de vignobles cultivés avec la variété Hmar Bou Amer. Beaucoup de variétés algériennes sont méconnues et détruites sans savoir leur importance pour le patrimoine génétique local de la vigne. La collection de l'ITAFV pour les variétés autochtones constitue une référence importante de la diversité génétique de la vigne en Algérie.

Pour les cépages commerciaux un arrêté du Ministère de l'Agriculture (9 Ramadhan 1427 correspondant au 2 octobre 2006) fixe la liste provisoire des espèces et variétés viticoles autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie. L'arrêté définit une liste de 40 variétés pour la vigne de table, 31 pour la vigne de cuve, 5 pour la vigne de séchage et 10 pour les portes greffes.

II.1.2.3 Les maladies de la vigne en Algérie.

La viticulture en Algérie connaît une conversion vers la vigne de table comme le témoigne l'augmentation des rendements et des superficies. Selon les données du Ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche, les rendements de la vigne de table n'ont cessé d'augmenter pour atteindre des rendements de 80 qt/ha à l'inverse de la vigne de cuve qui connaît une diminution pour atteindre 20 qt/ha. Durant le travail réalisé, nous avons constaté que la majorité des vignobles de table sont de cultures installées depuis moins de 20 ans. Cependant, plusieurs viticulteurs connaissent chaque année des pertes inestimables dues aux maladies. Souvent, la méconnaissance des agriculteurs les pousse à investir dans des travaux coûteux et inefficaces comme dans le cas des trachéomycoses (Esca) ou des maladies virales.

Depuis l'introduction des maladies d'origine américaine, la culture de la vigne et conséquemment la production de raisin ne peuvent s'envisager sans une prise en compte très vigilante de l'état sanitaire de la vendange (Dubos, 2002). Le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise, représentent les maladies fongiques les plus répandue et causent annuellement des pertes considérables (Dufour, 2011). Il faut noter que les maladies de dépérissement telles que l'Esca et le Black Dead Arm (BDA), les maladies bactériennes et virales préoccupent de plus en plus la viticulture mondiale.

Plusieurs travaux réalisés ont montré l'existence de nombreuses maladies et ont apporté des améliorations dans la caractérisation et l'identification des agents pathogènes. Ainsi, des études sur la diversité génétique de *Botrytis cinerea* ont été initiées et ont permis de caractériser les populations de ce champignon par des critères morphologiques et moléculaires (Louanchi et al., 2010), les niveaux de résistance à de nombreux fongicides (Alem et al., 2011), et leur appartenance aux différents groupes vacuolaire et transposon (Alem, 2014). Par ailleurs, concernant la maladie de l'Esca et l'eutypiose, plus de 15 espèces fongiques ont été identifiées dans les vignobles algériens et confirmées par des analyses moléculaires (Berraf et al., 2011).

II.2 La maladie de l'enroulement foliaire de la vigne

II.2.1 Historique de la maladie

Les premières descriptions de l'enroulement foliaire de la vigne remontent au 18^{ème} siècle. Lamarck (1785) rapporte que les feuilles de vigne se replient aux extrémités sur elles-mêmes sans citer les causes de ce désordre qui pourrait être due à la présence de virus. D'autres descriptions de l'enroulement foliaire de la vigne ont été rapportées durant la première moitié du 19^{ème} siècle avec un rougissement des feuilles, mais ces symptômes ont été considérés comme dus à des désordres physiologiques (Martelli et Boudon Padieu, 2006). Planchon (1884) décrit cette maladie comme étant une anthracnose déformante. La présence d'enroulements a été aussi décrite par Viala (1885). L'enroulement foliaire de la vigne a été décrit de façon plus précise au début du 20^{ème} siècle. Sanino (1906) désigne l'enroulement sous le terme de « ressors ». Cependant, l'origine exacte de ce symptôme n'a pas pu être identifiée avec exactitude vu le peu de connaissances disponibles sur les agents phytopathogènes. Scheu (1936, 1950) décrit une maladie virale de la vigne en Allemagne associée à l'enroulement foliaire des marges des feuilles (in Charles et al., 2006). Goheen (1958) décrit, en France, des symptômes similaires à ceux de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne.

Les premières études épidémiologiques sur cette maladie remontent à 1905 par Ravez et Roos portant sur sa prédominance en France. Plusieurs études ont suivi, portant essentiellement sur l'épidémiologie (Martelli et al., 2014). Cependant, aucune description de l'agent causal n'a été établie. Ce n'est qu'à partir de 1971 que Mendgen décrit une particule filamenteuse sur un cep atteint par la flavescence dorée qui peut être confondue avec la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne. La première description de l'agent causal remonte à 1979 et est réalisée par Namba et al., qui décrivent un virus appartenant à la famille des *Closteroviridae* sur des ceps atteints par la maladie de l'enroulement foliaire et absent sur les ceps sains. Plusieurs études portant sur la caractérisation du virus de l'enroulement foliaire de

la vigne ont été effectuées (Faoro *et al.*, 1981 ; Gugerli *et al.*, 1984). Il reste que cette maladie est causée par plusieurs virus appartenant à la famille des *Closteroviridae*. Rosciglione et Gugerli (1986) rapportent que le *GLRaV-1* et le *GLRaV-2* sont associés à cette maladie. En 2011, onze virus appartenant à la famille des *Closteroviridae* ont été décrits comme associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne. Ces dernières années, le séquençage du génome complet de ces différents virus montre que le *GLRaV-5*, -6, -De, -Car et -9 présentent la même organisation génomique et représentent des variants génétiques du *GLRaV-4* réduisant le nombre de virus associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne à cinq, le *GLRV-1*, -2, -3, -4 et -7 (Martelli *et al.*, 2014).

II.2.2 Impact économique de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne

La maladie de l'enroulement foliaire de la vigne cause chaque année des pertes considérables sur les vignobles atteints. Une étude menée sur des vignobles à New York aux USA montre des pertes de l'ordre de 1600 à 2350 dollars par hectare (Atallah *et al.*, 2012). En Nouvelle Zélande, les pertes annuelles dues à une infection de 100% par le *GLRaV-3* d'un vignoble de Merlot sont de l'ordre de 2 406 \$/ha (Nimmo-Bell, 2006).

II.2.3 Symptômes de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne

L'expression de l'enroulement foliaire de la vigne varie selon les cépages. Sur les cépages noirs de *Vitis vinifera* des taches rouges se développent sur la face inférieure des feuilles en fin de saison d'été ou d'automne. Selon le climat et la localisation géographique, ces taches s'agrandissent avec le temps et fusionnent. En automne, presque la totalité de la feuille devient rougeâtre, laissant souvent des bandes vertes tout au long des nervures primaires et secondaires, le limbe foliaire s'épaissit, devient gaufré et cassant, et s'enroule vers la face inférieure. Ces symptômes progressent vers la partie supérieure des rameaux. Dans les cas les plus sévères, la totalité de la feuille devient violette foncée. Les baies mûrissent tardivement et de façon irrégulière avec une réduction du taux de sucre. Dans les cépages blancs, les symptômes sont similaires, mais les feuilles dans ce cas présentent une chlorose à un jaunissement, au lieu d'un rougissement (figure 5) (Martelli et Boudon-Padieu, 2006). Selon les cépages, le rougissement peut varier du rouge sang au rouge violacé. Les variations colorimétriques dans les cépages blancs sont moindres, et c'est surtout l'association de l'aspect chlorotique, de l'épaississement du limbe et de l'enroulement des feuilles qui témoignent de la présence de l'enroulement. À la fin de l'été, les feuilles les plus atteintes peuvent brunir et présenter une nécrose de l'épiderme supérieur (Maguet, 2012). Cependant, certains cépages

blancs n'extériorisent pas de symptômes (Naidu *et al.*, 2009). La sévérité des symptômes peut être liée au cépage et à la combinaison greffon/porte-greffe (Golino, 1993) ainsi qu'à la souche virale (Jarugula *et al.*, 2010)

Figure 5: Enroulement foliaire de la vigne sur cépage blanc et cépage rouge (Source : Maree *et al.*, 2013)

II.2.4 Résistance variétale de la vigne à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne

La sévérité des symptômes et des pertes en rendements dues à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne dépend de la combinaison virus, cépages, porte-greffe, climat, sol, et des pratiques culturales (Maree *et al.*, 2013). Les variations génomiques que connaissent les virus au cours du temps affectent leur virulence. Pour le *GLRaV-2*, Bertazzon *et al.* (2010) rapportent que les isolats du groupe phylogénétique BD sont très peu virulents et sont incapables d'induire une incompatibilité au greffage et causent rarement des symptômes



d'enroulement, à l'inverse des isolats du groupe phylogénétique RG qui sont très virulents. Gouveia et Nolasco (2012), rapportent que la virulence du *GLRaV-3* est liée à la présence des suppresseurs d'ARN silencieux. L'intensité des symptômes paraît être liée à l'activité de ces suppresseurs qui varient selon les groupes phylogénétiques. Aucune variété n'a été découverte résistante aux *GLRaVs*.

La sévérité de la maladie dépend aussi du porte-greffe, l'utilisation des portes-greffe Freedom et Harmony augmente la sévérité de la maladie par rapport à l'utilisation du porte-greffe Aramon X Rupestris (Golino *et al.*, 2003).

II.2.5 Les virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne

II.2.5.1 Taxonomie des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne

Plusieurs virus ont été identifiés comme associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne. La caractérisation de ces virus a montré qu'ils sont tous filiformes ce qui a orienté leur classification vers la famille des *Closteroviridae* (le terme grec 'Closter' signifiant filament). Au début deux genres sont compris, le genre des *Crinivirus* et le genre des *Closterovirus*. Les virus monopartites ont été mis dans le genre des *Closterovirus*, par contre, les virus bipartites ont été mis dans le genre des *Crinivirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Une étude phylogénétique des virus de l'enroulement foliaire de la vigne réalisée par Zhu *et al.* (1998), Montre que les *Closteroviridae* transmis par les aphides se situent dans un groupe phylogénétique différent de celui des *Closteroviridae* transmis par cochenilles. Karasev (2000) indique que la famille des *Closteroviridae* peut être divisée sur la base de la diversité génétique du gène HSP70 h, en trois genres, les *Closterovirus*, les *Vinivirus* (modifié par l'ICTV en *Ampelovirus*), et les *Crinivirus*. Le même auteur rapporte que cette diversité est en concordance avec celle effectuée sur la base du type de vecteur. Ainsi, les *Closterovirus* sont transmis par les aphides, les *Ampelovirus* par les cochenilles et les *Crinivirus* par les mouches blanches (Martelli *et al.*, 2002). Cependant, la transmission par vecteur n'a pas été décrite pour beaucoup de virus de cette famille.

Tous les virus associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne appartiennent à la famille des *Closteroviridae* et sont répartis dans trois genres. Le *GLRaV-2* a été placé dans le genre des *Closterovirus*, le *GLRaV-1*, *GLRaV-3*, *GLRaV-4*, le *GLRaV-5* et *GLRaV-6* appartiennent au genre des *Ampelovirus*, cependant le *GLRaV-7* n'a été assigné à aucun genre (Martelli *et al.*, 2002). Avec l'essor des analyses moléculaire, de nouveaux virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne ont été identifiés. Alkowni *et al.* (2004) ont décrit le *GLRaV-9*. Trois nouveaux virus ont été décrits par la suite, le *GLRaV-Pre*, le *GLRaV-De* et le *GLRaV-Car* (Maliogka *et al.*, 2008, 2009 ; Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.*, 2010) (tableau 1).

Ainsi, le nombre de *GLRaVs* décrit a atteint 11 virus en 2012, un *Closterovirus*, 10 *Ampelovirus* (*GLRaV-1*, -3, -4, -5, -6, -8, -9, *GLRaV-Pr*, *GLRaV-De*, *GLRaV-Car*) et une espèce non assignée (*GLRaV-7*). Cependant, le *GLRaV-8* n'étant plus considéré comme une espèce, réduisant ainsi le nombre de *GLRaVs* à 10 espèces (Martelli *et al.*, 2012).

Tableau 1 : Classification actuelle des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne

Virus	Genre	genome (nt)	accession	ORF	Première description
GLRaV-1	<i>Ampelovirus</i>	18659	JQ023131	9	Gugerli et al. (1984)
GLRaV-2	<i>Closterovirus</i>	16494	AY88162	8	Zimmermann et al. (1990)
GLRaV-3	<i>Ampelovirus</i>	18498	EU259806	12	Zee et al. (1987)
GLRaV-4	<i>Ampelovirus</i>	13830	FJ467503	6	Hu et al. (1990)
GLRaV-5^a	<i>Ampelovirus</i>	13384 ^b	FR822696	6	Walter and Zimmermann (1991), Zimmermann et al. (1990)
GLRaV-6^a	<i>Ampelovirus</i>	13807	FJ467504	6	Gugerli and Ramel (1993), Gugerli et al. (1997)
GLRaV-7	<i>Velarivirus</i>	16496	HE588185	10	Choueiri et al. (1996)
GLRaV-9^a	<i>Ampelovirus</i>	12588 ^b	AY29781	6	Alkowni et al. (2004)
GLRaV-Pr^a	<i>Ampelovirus</i>	13696	AM182328	6	Maliogka et al. (2009)
GLRaV-Car^a	<i>Ampelovirus</i>	13626	FJ907331	6	Abou Ghanem-Sabanadzovic et al. (2010)

^a Souche du GLRaV-4.

^b Génome partiel

L'augmentation du seuil de discrimination de 10% à 25% des *GLRaVs* pour trois gènes utilisés dans les études taxonomiques (polymérase, HSP70h et CP) approuvées par l'ICTV (Martelli et al., 2011) a induit de profonds changements dans la taxonomie des *Closteroviridae*.

Martelli et al. (2012) considèrent sur la base de l'étude de l'organisation génomique et des propriétés biologiques que le *GLRaV-5*, le *GLRaV-6*, le *GLRaV-9*, le *GLRaV-De*, *GLRaV-Car* et le *GLRaV-Pre* sont des variants du *GLRaV-4*. Le même auteur a divisé le genre des *Ampelovirus* en deux sous-groupes et a proposé la création d'un quatrième genre nommé *Velarivirus* contenant trois virus, le *GLRaV-7*, le *LChV-1* et le *CoV-1* (figure 6). Sur la base de l'analyse phylogénétique, Al Rawhanh et al. (2012) rapportent le même résultat.

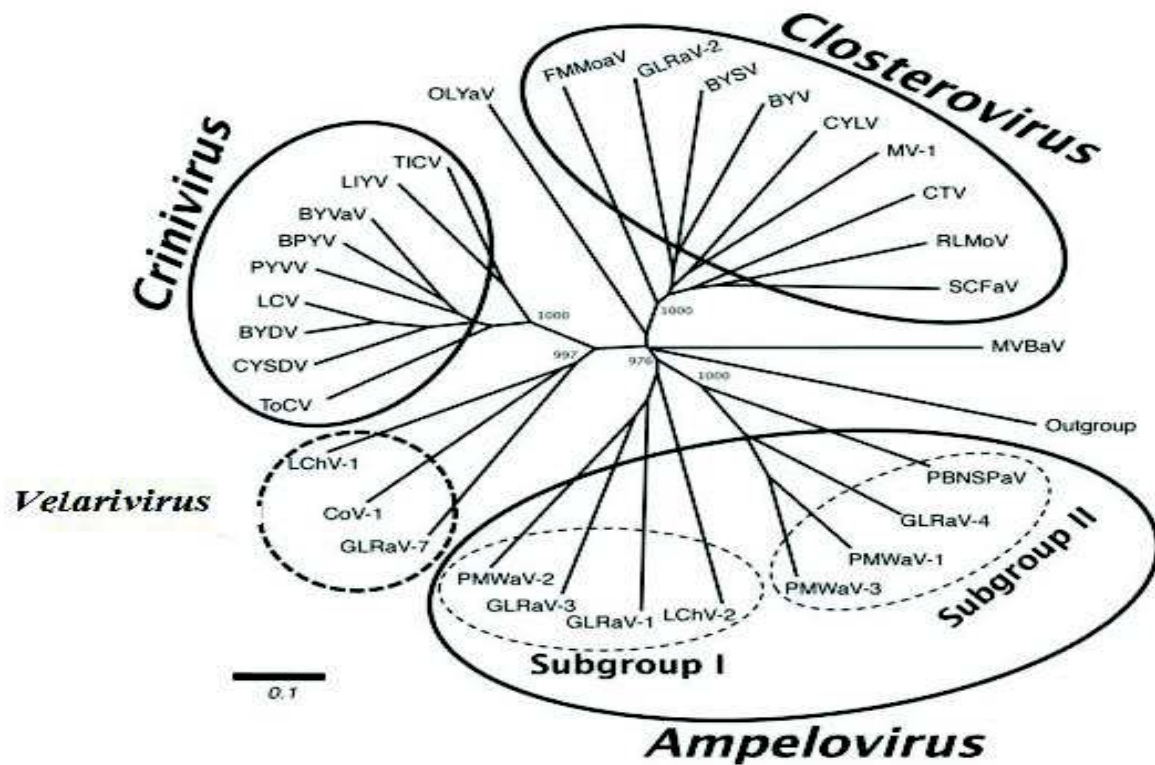


Figure 6. Arbre phylogénétique de la famille des *Closteroviridae* (Martelli et al., 2012)

II.2.5.2 Propriétés des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne

II.2.5.2.1 Les propriétés physicochimiques

Ces virus présentent un très long filament flexueux de symétrie hélicoïdale de 12 x 1200-2000 nm (figure 7). Les particules de tous les membres des *Ampelovirus* et des *Crinivirus* ont la même morphologie. Les sous-unités capsidiales de 22 kDa entourent l'ARN, sauf à une extrémité où des sous-unités de 24 kDa forment une zone distincte (Astier et al., 2001).

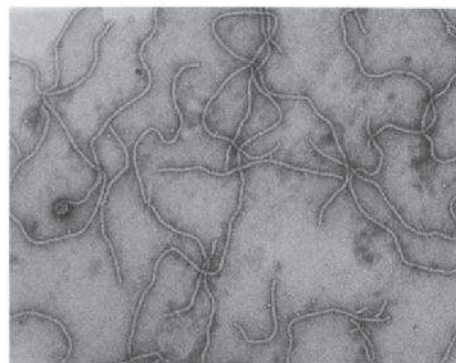


Figure 7 : Micrographie électronique de particules purifiées du GLRaV-3 (Maree et al., 2013).

Les virions appartenant au genre des *Closterovirus* ont presque tous la même taille (supérieure à 1000 nm, généralement de 1250 à 2200 nm de longueur) et contiennent une seule molécule linéaire d'ARN positive de 15,5 à 19,3 kb. La sous-unité de la protéine capsidiale majeure présente un poids moléculaire qui varie entre 22 KDa et 25 KDa alors que le poids moléculaire de la sous-unité de la protéine capsidiale mineure varie entre 24 KDa et 27 KDa (Martelli *et al.*, 2002). Le GLRaV-2 est l'unique espèce virale associée à l'enroulement foliaire de la vigne qui appartient à ce genre.

Chez les *Ampelovirus*, la taille du virion varie entre 1400 et 2200 nm et contient une seule molécule d'ARN monocaténaire positive linéaire de 16,9 à 19,5 Kb (Martelli *et al.*, 2002). Les virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne appartenant à ce genre sont le *GLRaV-1*, -3, -4, -5, -6 et -8.

Le *GLRaV-7* a été classé dans le genre des *Velarivirus* récemment proposé. Il présente un virion d'une taille de 1500 à 1700 nm de long. Le génome est un ARN monocaténaire linéaire positif de 16 496 nucléotides arrangés en 10 ORFs. Il est divisé en deux molécules qui sont nécessaires à l'infection et qui sont encapsidées séparément (Martelli *et al.*, 2012).

II.2.5.2.2 Organisation génomique

Les études moléculaires des *GLRaVs* sont basées en grande majorité sur la comparaison des séquences du gène HSP70h et du gène CP, considérés comme des gènes conservés, conduisant ainsi à regrouper les virus associées à l'enroulement foliaire de la vigne en quatre groupes phylogénétiques distincts. Le genre des *Closterovirus* contient uniquement le *GLRaV-2* comme virus associé à cette maladie, le genre des *Velarivirus* contient le *GLRaV-7* et le genre des *Ampelovirus* contient le *GLRaV-1* et le *GLRaV-3* regroupés dans un sous-groupe I et le *GLRaV-4* avec ces variants regroupés dans le sous-groupe II. L'organisation génomique de ces cinq virus sera discutée de façon détaillée (figure 8).

a. Organisation génomique du *GLRaV-1* et du *GLRaV-3*

Le *GLRaV-1* et le *GLRaV-3* appartiennent au sous-groupe I du genre des *Ampelovirus*, dont l'espèce-type est le *GLRaV-3*. Cette dernière est caractérisée par des virions de taille variable entre 1400 et 2200 nm représentés par une molécule linéaire d'ARN simple brin de polarité positive avec une taille variant entre 16,1 à 19,5 Kb (Martelli *et al.*, 2002). Le virion du *GLRaV-3* est une particule filamenteuse flexueuse de taille 1800x12 nm, monopartite d'environ 18 500 nucléotides représentant ainsi, le deuxième virus le plus long après le CTV (19296 nt) (Le Maguet *et al.*, 2012). La première séquence complète du génome du *GLRaV-3*

a été obtenue par le séquençage de l'isolat NY-1 et a montré qu'il contient 13 ORFs (Ling *et al.*, 1998 ; Ling *et al.*, 2004). Le génome complet du *GLRaV-1* a été séquencé, en 2011, par Rott et Belton (travaux non publiés) et montre qu'il possède un génome de 18 659 nucléotides (numéro d'accèsion°. JQ023131). Cependant, la description de ce génome n'a pas encore été publiée. Fazeli et Rezaian (2000) décrivent une partie du génome de l'isolat BL-4 (12394nt) comme contenant 10 ORFs.

b. Organisation génomique du *GLRaV-2*

Le *GLRaV-2* présente un virion filamenteux flexueux d'environ 1400-1800 nm (Gugerli *et al.*, 1984). Zhu *et al.* (1998) ont réalisé le séquençage de 95% du génome du *GLRaV-2* (numéro d'accèsion : AF039204) et ont révélé la présence de 9 ORF (figure. 8). Les mêmes auteurs, rapportent que l'analyse phylogénétique du *GLRaV-2* montre qu'il est plus lié aux Closteroviridae transmis par les aphides qu'au Closteroviridae transmis par les mouches blanches ou bien les cochenilles. Karasev (2000) propose de classer le *GLRaV-2* dans le genre *Closterovirus* contenant les virus transmis par les aphides.

c. Organisation génomique du *GLRaV-4*

Le *GLRaV-4* présente un génome de 13830 nucléotides codant pour 7 ORF (ORFs 1a, 1b, 2-6) précédés et suivis par une région UTR. L'ORF 1a code pour une polyprotéine de 2345 acides aminés avec une masse moléculaire de 260,1 kDa, elle contient la séquence de la protéinase leader (PRO), la méthyl transférase (MTR) et l'hélicase (HEL). L'ORF 1b code pour l'ARN polymérase indépendante (RdRps), l'ORF 2 pour une protéine hydrophobe de 5 kDa (p5), les ORFs 3-6 codent respectivement pour les protéines HSP70 h, P60, CP et P23. L'organisation génomique du *GLRaV-4* est similaire à celle des *GLRaV-5*, *-6*, *-9*, *-Pr*, *-De* et *-Car* (Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.*, 2012).

d. Organisation génomique du *GLRaV-7*

Le *GLRaV-7* possède un génome de 16 496 nucléotides, il code pour neuf protéines et présente la même organisation avec le *LChV-1* et le *CoV-1* (Al Rwahnih *et al.*, 2012). Les mêmes auteurs rapportent que l'organisation génomique de ces trois virus du genre *Velarivirus* est composée d'une polyprotéine codant pour la protéase Papain-aïne leader, le camping enzyme et l'hélicase, les ORFs 2-9 codent respectivement pour la RdRp, p8, HSP70 h, p61, CP, CP/M, p25 et p27.

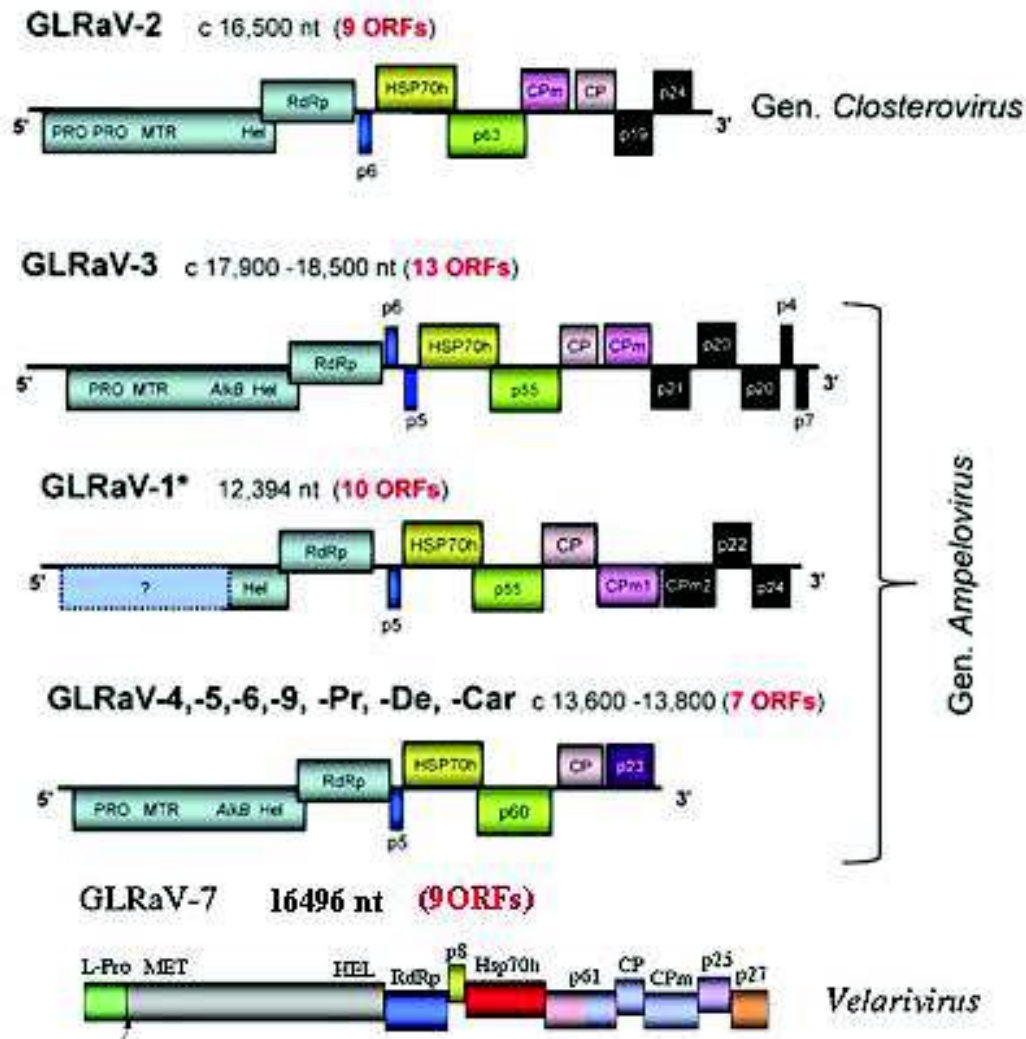


Figure 8 : Organisation génomique des virus associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne (Abou Ghanem-Sabanadzovic *et al.*, 2012 ; Al Rwahnih *et al.*, 2012)

II.2.5.2.3 Effets des GLRaVs sur la vigne

La maladie de l'enroulement foliaire de la vigne présente des effets négatifs sur les ceps atteints allant de la baisse de rendement et de la qualité au dépérissement. Beaucoup d'auteurs ont étudié l'impact de cette maladie en se basant sur le rendement, la teneur en sucre, l'acidité et l'accumulation d'anthocyanine. Les ceps atteints présentent une réduction du rendement de l'ordre de 15-30% ainsi qu'une réduction des anthocyanines totales (Alabi *et al.*, 2012). Credi et Babini (1997) rapportent que ces virus causent des baisses de rendement allant jusqu'à 80%. Ces virus causent une réduction de la teneur en sucre et une augmentation de l'acidité du raisin. En outre, on note une réduction de la concentration en anthocyanines présentes sur l'épiderme des baies (Lee et Martin, 2009). On note aussi, la présence d'inclusions intracellulaires dans le

phloème constituées par une agrégation des particules virales (Martelli et Boudon-Padieu, 2006).

L'impact des GLRaVs peut être expliqué par des modifications des fonctions physiologiques de la vigne. Moutinoh *et al.* (2013) rapportent que l'infection mixte par le GLaAV-1 et le GLRaV-3 présente un effet négatif sur les échanges gazeux au niveau des feuilles de la vigne, particulièrement au stade de maturation.

Les effets cytopathologiques sur les cellules de vigne infectées par le *GLRaV-3* sont plus importants sur les feuilles symptomatiques et touchent les mitochondries des cellules parenchymateuses du phloème et causent aussi la diminution de la taille des vésicules membranaires dans l'espace péri mitochondrial (Kim *et al.*, 1989). On note aussi la diminution de la teneur en chlorophylle et en carotène et une diminution de la photosynthèse due à une inhibition de l'activité du photosystème II (PSII) (Bertamini *et al.*, 2004). Il en est de même pour le *GLRaV-1* qui cause une diminution considérable de la photosynthèse, les pigments sont fortement réduits (Bertamini *et al.*, 2005).

II.2.5.3 Transmission de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne

Les virus de l'enroulement foliaire de la vigne sont des virus phloémiques et qui persistent dans le matériel végétal. Leur transmission par greffage est considérée comme le moyen le plus important dans leur propagation à longue distance à l'inverse de leur propagation *in situ* effectuée à l'aide de cochenilles. Engelbrecht et Kasdorf (1990) ont rapporté, en Afrique du Sud, que 71% de plants étaient infectés par le *GLRaV-3* après la septième année de mise en place. Jordan (1993) a rapporté aussi que le pourcentage d'infection par le *GLRaV-3* doublait chaque année en Nouvelle-Zélande. Cabaleiro et Segura (2006) rapportent que le pourcentage d'infection par le *GLRaV-3* avait atteint 100% après 15 ans dans plusieurs vignobles d'Espagne, avec un taux de progression de l'infection de 7,8 à 12,4% par an. La transmission par vecteur a été rapportée dans plusieurs pays du bassin méditerranéen et à travers le monde pour les différents virus de l'enroulement foliaire de la vigne à l'exception du *GLRaV-2* dont aucun vecteur n'a été décrit à ce jour.

Les premiers essais de transmission de la maladie de l'enroulement ont été réalisés par Tanne en 1946 sur des plantes herbacées, bien qu'en réalité elle reste occasionnelle. Woodham et Krake (1983) démontrent que la maladie est transmissible aux espèces herbacées par l'intermédiaire de la cuscute (*Cuscuta campestris*). Cependant, à cette époque l'agent causal était mal connu pour mener des études de transmission plus précises.

La transmission de plante à plante du *GLRaV-3* par la cochenille *Planococcus ficus* (Signoret) a été démontrée pour la première fois par Engelbrecht et Kasdorf en 1990. Plusieurs travaux ont été réalisés pour rechercher d'autres insectes vecteurs pour les différents virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne. Ainsi, on trouve que les *GLRaVs* sont transmis par plusieurs espèces de cochenille. Pour chaque virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne transmis par vecteur, un nombre de vecteur a été décrit. Les connaissances actuelles montrent que: (i) Le *GLRaV-1* est transmis dans la nature par les pseudo-coccidés *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris*, *Pseudococcus affinis*, *Ps. calceolariae*, *Ps. viburnum*, *Ps. maritimus*, *Ps. comstocki* et les coccidés *Pulvinaria vitis*, *Parthenolecanium corni* et *Neopulvinaria innumerabilis*; (ii) les vecteurs du *GLRaV-3* sont les cochenilles, *Planococcus ficus*, *Pl. citri*, *Pseudococcus longispinus*, *Ps. calceolariae*, *Ps. maritimus*, *Ps. affinis*, *Ps. viburni*, *Ps. comstocki*, *Phenacoccus aceris*, *Pulvinaria vitis*, *Neopulvinaria innumerabilis*, *Parthenolecanium corni*, *Coccus hesperidum*, *C. longulus*, *Saissetia* et *Parasaissetia*, et des cochenilles du genre *Ceroplastes*; (iii) le *GLRaV-4* et plusieurs de ses souches sont transmises par *Ps. longispinus* (souche 5 et 9), *Pl. ficus* (souches 6 et 9) et *Ph. Aceris* (souches 5, 6 et 9).

La transmission des *GLRaVs* est réalisée selon le mode semi persistant avec une période de latence de 24 heures (Martelli, 2014). Des études menées par Tsai et *al.* (2010) rapportent l'absence de spécificité des différents virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne vis-à-vis de certaines espèces de vecteur donnés. Ainsi, *Planococcus ficus* peut transmettre cinq différents virus. En Tunisie, le *GLRaV-3* et -5 ont été transmis par *Planococcus ficus* et *Ceroplastes rusci* (Mahfoudhi et al., 2009).



Figure 9 : *P. ficus* sur vigne (<http://icvg.org/resources/descriptions.php>).

II.2.5.4 Les méthodes de détection des virus de l'enroulement foliaire de la vigne

La détection des virus constitue une étape cruciale dans la lutte contre les maladies virales et nécessite souvent l'utilisation de techniques précises. Les premières méthodes utilisées pour la recherche de virus consistaient dans l'indexage de plants supposés être infectés et extériorisant des symptômes sur des plants ne présentant pas de symptôme, à cette époque, la présence de maladie virale était liée à la présence ou l'absence de symptômes. Le premier indexage de vigne atteinte par la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne sur des plants n'extériorisant pas de symptômes a été réalisé par Scheu (1935). L'indexage est souvent réalisé sur des cépages rouges pouvant extérioriser pendant une période courte les symptômes tels que le cabernet sauvignon, Cabernet franc, Pinot noir, Merlot, l'hybride Ln33 ou bien Mission. L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait que certains virus n'extériorisent pas de symptômes, ce qui peut contribuer à leur large propagation et au fait qu'elle nécessite une longue période pour l'obtention de résultats.

Dans le but de déceler la maladie même sur des sujets n'extériorisant pas des symptômes d'enroulement et sur différents tissus végétale, des méthodes plus sensibles ont été mises au point. La méthode ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), basée sur la spécificité de antigène-anticorps, constitue l'une des techniques les plus utilisées pour la détection de virus. Ses premières utilisations pour la détection des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne remontent à 1976 (Voller *et al.*, 1976). Depuis, cette technique est utilisée de façon systématique. Ainsi, elle fut utilisée pour la détection du *GLRaV-1* et -3 (Zee *et al.*, 1987). Des sérums monoclonaux et polyclonaux ont été développés et ont été largement utilisés. Monis (2000) a mis au point des sérums monoclonaux capables de caractériser plusieurs virus associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne. Plusieurs variants restent difficiles à être détectés vu les variations génomiques touchant les épitopes. Ainsi, plusieurs variants du *GLRaV-3* n'ont pas été détectés par les sérums polyclonaux commercialisés (Cohen *et al.*, 2012). Cependant, le test ELISA reste l'une des techniques les plus couramment utilisées pour le diagnostic primaire de criblage étant donné sa facilité mise en œuvre pour l'obtention des résultats.

La technique ELISA est largement utilisée, mais elle présente des limites lorsqu'il s'agit de faible concentration virale. Des techniques plus précises ont été mise au point et ont contribué largement à l'augmentation de la sensibilité.

La Reverse transcriptase *Polymérase Chain Réaction* (RT-PCR) est considérée comme la méthode la plus sensible pour la détection des virus à ARN (Gambino et Gribaudo, 2006; La

Notte *et al.*, 1997; Osman et Rowhani, 2006). A l'inverse du test ELISA qui nécessite une concentration relativement élevée en particule virale, la PCR reconnaît de très faibles concentration et permet de réaliser des analyses durant les différents stades développement. Cependant, la difficulté de cette technique réside dans la mise au point d'amorces spécifiques à une espèce ou souche donnée. Plusieurs outils bio-informatiques ont été développés pour cela, mais, souvent les similitudes nucléotidiques entre espèces et souches rendent cette tâche très difficile à mettre en œuvre dans les conditions réelles.

II.2.6 Variabilité génétique des virus des végétaux

Durant les dix dernières années, les analyses des variations génomiques des virus des végétaux ont révélé un grand degré de diversité. Avec l'utilisation des techniques moléculaires, de nouveaux groupes de virus ont été décrits. Les virus des végétaux présentent beaucoup de propriétés qui les distinguent des autres entités vivantes, ils présentent un taux de mutations de 10^4 - 10^5 plus important que chez les procaryotes ou les eucaryotes (Moury *et al.*, 2006), aboutissant ainsi à une grande diversité génétique.

Les virus des plantes présentent une coévolution avec les plantes sauvages avant leur domestication et constituent ainsi la plus importante source de leur diversité. A cause de leur longévité, les arbres et les arbustes sont considérés comme les plus importantes sources de cette diversité (Cooper et Jones, 2006). Ainsi, l'étude de la diversité génétique des virus des végétaux doit porter sur toutes les variétés spontanées et les variétés cultivées en vue d'avoir une vue d'ensemble sur la structure des populations. Cooper et Jones (2006) considèrent que les génomes des virus des végétaux consistent en une population dynamique de molécules mutables.

II.2.6.1 Les méthodes d'étude de la diversité génétique des virus des végétaux

La variabilité des virus des végétaux a été initialement révélée par les différences biologiques et les propriétés structurales tel que leur habilité à infecter des espèces végétales particulières induisant des symptômes particuliers et d'être transmis par des vecteurs particuliers ou interagissant avec des anticorps spécifiques (Moury *et al.*, 2006).

La diversité génétique peut être mise en évidence par diverses approches techniques. Elle peut fournir divers degrés d'information (Moury *et al.*, 2006).

Différentes techniques ont été utilisées pour caractériser les populations de virus, essentiellement, les anticorps monoclonaux, la *Restriction Fragment Length Polymorphism*

(RFLP) (Vigne et *al.*, 2004), *Single Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) (Jooste et Goszczynski, 2005), la *Ribonucléase Protection Assay* (RPA) basée sur la dégradation des ARN monobrin, l'*Heteroduplex Mobility Assay* (HMA) basé sur la différence du taux de migration entre un ADN heteroduplexe et un ADN monoduplexe indiquant ainsi la présence de substitution ou de délétion (Narayanasamy, 2011). Ainsi, la technique HMA a été utilisée en 2004 pour détecter la diversité génétique du *GLRaV-2* (Angelini et *al.*, 2004 ;et Bertazzon et *al.*, 2004). La ribonucléase T1 *fingerprint* (Rodriguez-Cerezoetal., 1989) et le séquençage d'un fragment du génome ou bien du génome entier (Tomimura et *al.*, 2003). Les séquences des halotypes sont alignées pour calculer la diversité nucléotidique et regrouper les isolats des halotypes qui présentent une diversité entre deux séquences, inférieure au seuil de l'identité des séquences (le seuil de classification des *GLRaVs* est de 10%) (Fauquet and Stanley, 2005).

La SSCP est largement utilisée pour l'étude de la diversité génétique des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne (Jooste et *al.*, 2010 ; Turturo et *al.*, 2005 ; Gouveia et *al.*, 2010 ; Goszczynski, 2013). L'étude de la diversité génétique du *GLRaV-3* menée au cours de ce travail a été réalisée en utilisant la technique SSCP pour révéler les variants génétiques.

II.2.6.1.1 Polymorphisme de conformation des acides nucléiques simple brin (*Single Strand Conformation Polymorphism*) :

La polymorphisme de conformation des acides nucléiques simple brin (SSCP) a rendu possible l'identification des différences entre des séquences virales et constitue une alternative pour la stratégie de clonage et de séquençage. Appliquée pour des régions génomiques petites (100 à 500pb), la SSCP peut décrire, dans certaines conditions, la variation d'un seul nucléotide. La SSCP est une technique basée sur la migration différentielle d'un produit PCR sur un gel de polyacrylamide à une dimension en condition non-dénaturante. Elle permet de visualiser différents profils pour une même espèce virale à cause des variations nucléotidiques qui affectent la conformation tridimensionnelle de l'ADN simple brin conduisant à des profils différents pour chaque variant génétique (figure 10) (Goszczynski et Jooste, 2002). Cette méthode permet un criblage préliminaire au séquençage réduisant ainsi le nombre d'isolats à séquencer

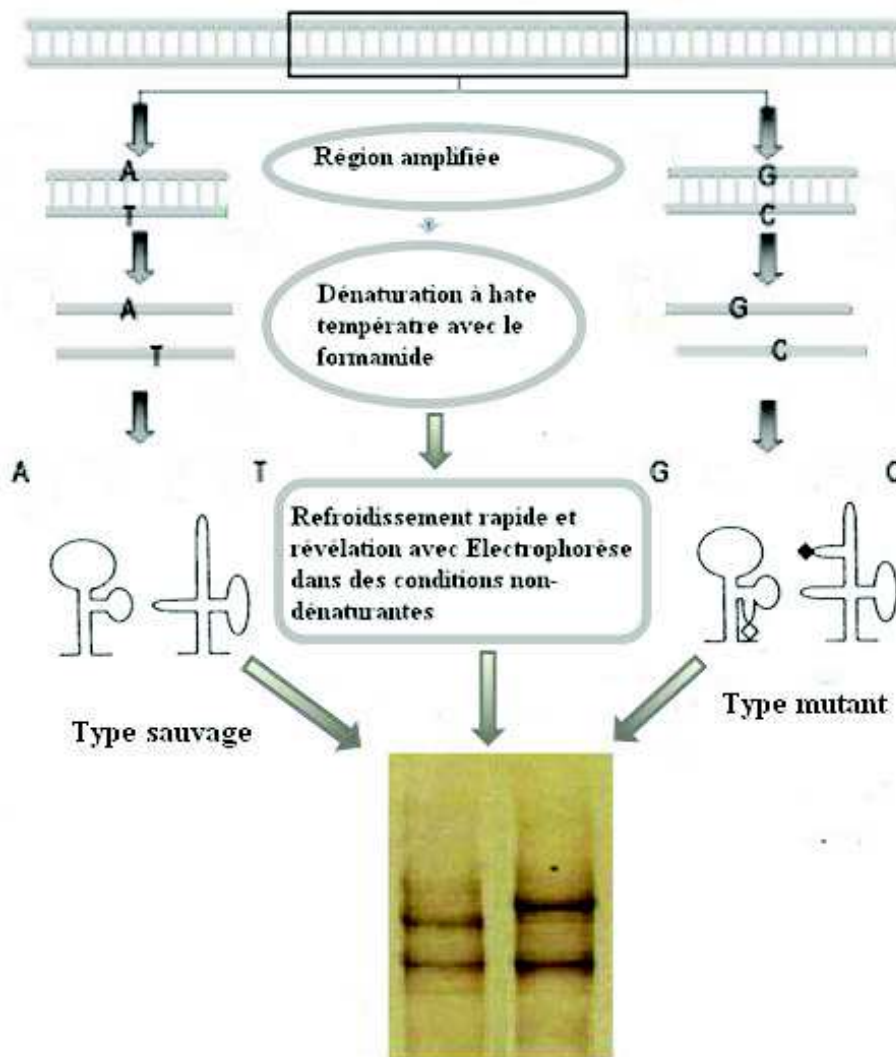


Figure10 : Schéma de la polymorphisme de conformation des acides nucléiques simple brin (SSCP)

II.2.7 Diversité génétique des virus de l'enroulement foliaire de la vigne

L'étude de la variabilité génétique présente un grand intérêt dans la compréhension de la dynamique d'une population et le développement d'outil de contrôle. La majorité des études de la diversité génétique des virus de l'enroulement foliaire de la vigne a été effectuée sur la base de la variabilité des gènes HSP70h et CP considérés comme des gènes conservés.

Ainsi, les études phylogénétiques du *GLRaV-3*, réalisées par divers auteurs, révèlent une forte variabilité génétique de ce virus. Ainsi, en quelques années, on est passé de trois groupes phylogénétiques à sept groupes phylogénétiques. Turturo et *al.*, (2005) décrivent, sur la base de l'étude phylogénétique du gène HSP70h, trois groupes phylogénétiques. Vu l'augmentation du nombre de séquences présentes dans les bases de données et le développement des outils

d'analyse bioinformatique, le nombre est passé à sept groupes phylogénétiques (Chooi et *al.*, 2013). Certains auteurs rapportent que beaucoup d'isolats ne sont pas décelés par des amorces reconnaissant uniquement des variants d'un groupe phylogénétique donné (Turturo et *al.*, 2005). La variabilité du gène CP peut aussi altérer la spécificité du sérum vis-à-vis de certains isolats. Cohen et *al.*, (2012) rapportent que l'isolat NZ2, appartenant au groupe phylogénétique VII, n'a pas été détecté par des sera commercialisés et a nécessité la production d'un sérum monoclonal pour obtenir une réaction positive.

L'étude de la diversité génétique du GLRaV-2 montre un polymorphisme important des populations de ce virus. Ainsi, Angelini et *al.*, (2004), Bertazzon et *al.*, (2010) rapportent cinq groupes phylogénétiques distincts représentés par les isolats PN, H4, RG, BD et P20. Durant la même année, Jarugula et *al.* (2010) rapportent un sixième groupe sur la base de l'étude phylogénétique des gènes HSP70h et CP.

Peu d'études ont été consacrées à la diversité génétique du *GLRaV-1*. La première étude fut réalisée par Kominek et *al.*, (2005) qui rapportent deux groupes distincts sur la base de la partie centrale du gène HSP70h. Après quelques années, Alabi et *al.*, (2011) rapportent la présence de 3 groupes distincts sur la base de trois régions génomiques (CP, CPd2 et HSP70h).

Matériels et Méthodes

III. Matériel et méthodes

III.1. Matériels

III.1.1. Echantillonnage de vigne

III.1.1.1 Zones d'échantillonnage

Les isolats des virus *GLRaV-1*, -2 et -3 faisant l'objet de cette étude ont été obtenus à partir de 484 échantillons de vignes collectée pendant l'automne 2012 dans les principales régions viticoles de l'ouest et du centre de l'Algérie. Dans la wilaya d'Ain Témouchent, nous avons porté notre attention sur les vignobles de Ain Talba, El Malah et sur les vignobles de Oued Berkeche. Puis nous avons porté notre attention sur les vignobles de la wilaya de Mascara en commençant par la région de Maoussa puis de Mamounia et Ain Fares. Au centre, nous avons pu réaliser les prospections et les prélèvements dans la wilaya d'Alger, au niveau de ces frontières avec la wilaya de Blida, sur la commune de Khraïssiya, et au niveau des frontières avec la wilaya de Boumerdes sur El Hamiz. Dans la wilaya de Boumerdes, nous avons porté notre attention sur les vignobles des Isser, Si Moustafa et Bordj Menail. Dans la wilaya de Tizi-Ouzou, nous nous sommes concentré sur les régions de Tademaït et de Azefoun (Figure 11).

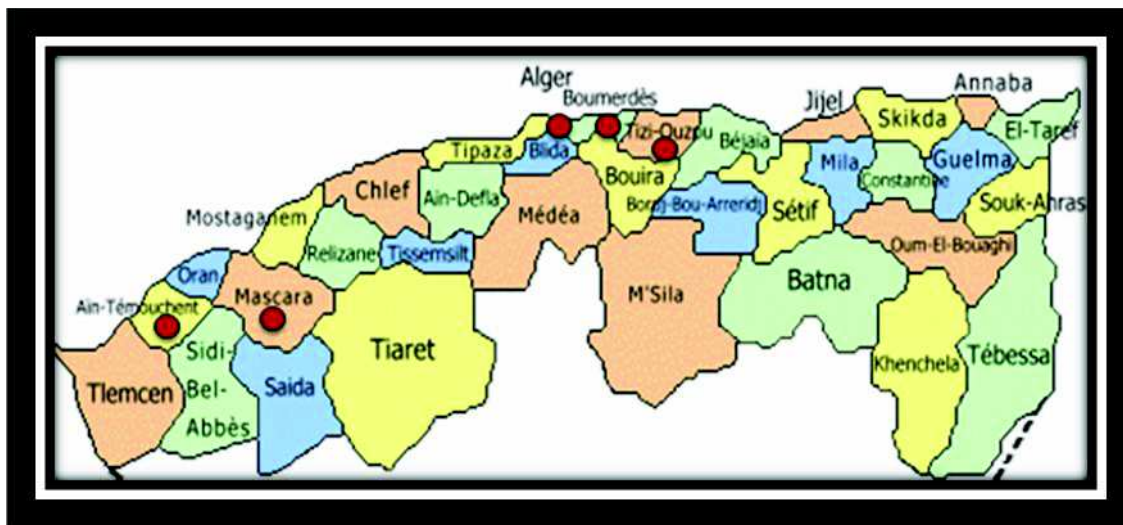


Figure 11 : localisation des régions prospectées

III.1.1.2 Variétés échantillonnées

L'échantillonnage a porté sur des vignobles commerciaux, comprenant huit variétés internationales (355 échantillons) et deux variétés locales (100 échantillons), et sur des variétés autochtones issue de la collection de matériel génétique de l'ITAFV qui contient 18 variétés (29 échantillons) (tableau : 2), le nombre d'échantillons collecté par cépage autochtone varie selon le nombre de cep disponible (Annexe 1)

Tableau 2 : les différents vignobles et nombre d'échantillons obtenus durant l'étude

<i>Cépage</i>	<i>Origine</i>	<i>Nombre</i>
Dattier de Beyrouth	Alger, Boumerdes et Tizi-Ouzou	71
Gros noir	Alger, Tizi Ouzou et Mascara	100
Cardinal	Boumerdes, Alger	52
Alicante	Ain Temouchent, Mascara	30
King Rubi	Boumerdes	9
Muscat	Alger, Tizi-Ouzou	70
Mersguira	Ain Temouchent	10
Çinsaux	Ain Temouchent, Mascara	40
Carignon	Ain Temouchent	31
Valensi	Mascara	42
Autochtones	Mascara (ITAF)	29

III.1.2 Les tests immunoenzymatiques

Tous les échantillons collectés ont été testés par DAS-ELISA vis-à-vis du *GLRaV-1*, -2 et -3 en utilisant des sera poly clonaux commercialisés (*Agritest, Bari, Italie*). Les IgG ont été utilisés à une concentration de 1/1000. Le test a été réalisé à partir du phloème des sarments de vignes. Les lectures de l'absorbance ont été obtenues à 405 nm avec un lecteur de microplaquette automatique (*Multiskan Ascent, Labsystems, Waltham, MA, USA*). Tous les tampons utilisés dans ce test sont présentés en l'annexe 2.

III.1.3 Analyse moléculaire des *GLRaV-1*, -2 et -3 et SSCP

Dans le but confirmer les résultats obtenus lors du test sérologique, pour la détection du *GLRaV-1*, -2 et -3, nous avons réalisé une RT-PCR considérée comme une technique très sensible. Tous les tampons et solutions utilisés dans ce test sont décrits en l'annexe 3.

Tous les produits utilisés dans la technique SSCP sont décrits en l'annexe 4.

III.2 Méthodes

III.2.1 Méthode d'échantillonnage

Une première prospection a été réalisée en septembre 2012 pour une première étude symptomatologique et pour le repérage des vignobles dans lesquels sera effectué l'échantillonnage.

L'échantillonnage a été réalisé de façon aléatoire dans les vignobles au mois de décembre 2012, et les ceps échantillonnés ont été marqués pour toutes investigations ultérieures. Ainsi, nous avons collecté en moyenne 10 échantillons par vignoble en suivant des directions diagonales opposées, on collecte cinq échantillons dans chaque direction. Au total,

484 échantillons ont été collectés et conservés dans du papier absorbant imbibé d'eau à 4°C dans une chambre froide pour une durée de 7 mois. Pour éviter le dessèchement des échantillons, une vérification permanente de l'état d'imbibitions du papier absorbant est réalisée tout en contrôlant l'apparition de moisissures.

III.2.2 Méthode Sérologique

En vue d'étudier la prévalence du *GLRaV-1*, -2 et -3 en Algérie, tous les échantillons collectés durant cette étude ont été testés par DAS-ELISA vis-à-vis de ces trois virus suivant le protocole développé par Clark et Adams (1977).

Pour cela, le phloème des sarments a été décortiqué à l'aide d'un scalpel jusqu'à l'obtention de 1g de phloème et broyé dans un mortier en présence d'un tampon d'extraction.

Les puits de la microplaque ont été sensibilisés par les IgGs dilués dans le tampon de sensibilisation à raison de 1/1000 (annexe 2) puis incubé à 37°C pendant 2 h. Les microplaques ont été lavées avec le tampon de lavage pendant 3 min à trois reprises, les extraits de chaque échantillon sont ajoutés dans les puits à raison de 100µl/puits. Les plaques sont incubées pendant toute la nuit à 4°C.

Après trois lavages successifs, comme définis précédemment, 100 µl du conjugué dilués dans le tampon de conjugaison (Annexe 2) sont ajoutés à chaque puits. Ensuite on a incubé les plaques à 37°C pendant 2 h (Figure 12). Pour révéler s'il y a réaction, après lavage, on a ajouté le para-nitrophenylphosphate (PNP) à raison de 1mg/ml dilué dans le tampon substrat. Les plaques sont incubées à la température ambiante pendant 30min, après quoi, les résultats ont été révélés par lecture avec un spectrophotomètre à 405 nm (*Multiskan Ascent, Labsystems, Waltham, MA, USA*).

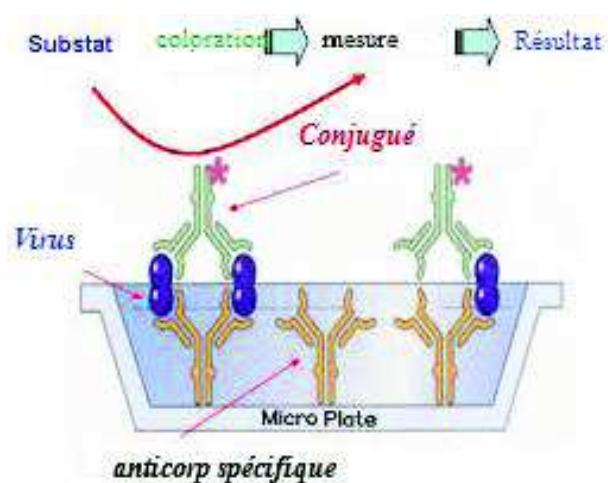


Figure 12 : Représentation schématique du DAS-ELISA

III.2.2.1 Interprétation des résultats

L'interprétation des résultats du test DAS-ELISA a été réalisée par la comparaison des densités optiques obtenues pour chaque extrait par rapport à un seuil de positivité.

Selon Astier *et al*, (2001) la sensibilité et la spécificité de la détection d'un virus par ELISA dépendent du choix du seuil de positivité. Ils rapportent que si les échantillons à identifier comme infectés contiennent une concentration élevée en virus, le choix du seuil de positivité ne présente aucune difficulté (par exemple, 3 fois la moyenne des densités optiques des échantillons sains de référence : la spécificité du test est excellente, la sensibilité est faible). Mais lorsqu'on veut utiliser le test ELISA pour détecter de faibles concentrations en virus, il faut augmenter la sensibilité de détection au détriment de la spécificité. Le même auteur rapporte que le seuil de positivité choisi devient alors un compromis entre la sensibilité et la spécificité de détection.

Dans l'interprétation de nos résultats nous avons choisi un seuil de positivité permettant la détection de faibles concentrations et défini par :

$$\text{Seuil de positivité} = (\text{moyenne des témoins négatifs}) \times 3$$

III.2.2.2 Détermination du pourcentage d'infection

Après avoir déterminé les échantillons positifs, nous avons réalisé le pourcentage d'infection par la formule suivant :

$$\text{Pourcentage de plant infecté \%} = \frac{\text{nombre d'échantillons positif à l'ELISA}}{\text{nombre total d'échantillons analysés}} \times 100$$

Cela nous a permis de voir le pourcentage d'infection de chaque cépage par chacun des virus, de mettre en évidence la prédominance de chacun des virus de l'enroulement foliaire de la vigne pour les différents cépages prospectés

III.2.3 Identification des virus GLRaV-1, -2 et -3 par reverse transcription-PCR

III.2.3.1 Extraction des acides nucléiques totaux (TNA)

Les acides nucléiques totaux ont été extraits, selon le protocole établi par Foissac *et al*. (2001), à partir de 0,2 g de phloème cortical décortiqué à l'aide d'un scalpel sur des boutures de vigne aoutées qui ont été pulvérisés avec de l'azote liquide et broyés à l'aide d'un mortier pour former une poudre. La poudre est homogénéisée dans 1 ml de tampon de broyage (4 M de thiocyanate de guanidine, 0,2 M d'acétate de sodium, 1 M d'acétate de potassium, EDTA 25mM,

25% de PVP-40) mélangé avec 100 µl NLS 10%. Après un refroidissement rapide dans la glace (5min), la solution est centrifugée à 13 000 tpm pendant 10 min. Ensuite, 300 µl du surnageant sont récupérés dans de nouveaux tubes dans lesquels on ajoute une solution composée de 150 µl d'éthanol absolu, 300 µl NaI (6 M) et 35 µl silica (annexe 3) et agiter avec un vortex. Le mélange est doucement agité à l'aide d'un agitateur à température ambiante pour 30 min et centrifugé à 6000 tpm pendant 20 sec. Le culot, composé de l'acide nucléique total et du silica, est lavé 3 fois, en suspendant le culot dans 500 µl de tampon de lavage (annexe 3) et en centrifugeant à 6000 tpm/20sec, après la dernière centrifugation à 6000 tpm pendant 20 sec, et après séchage, le culot a été suspendu dans 120 µl d'eau distillé stérile, puis incubé à 70°C pendant 3 min dans un bain marie et centrifugé rapidement à 13000 tpm pendant 3 min. finalement, 100 µl du surnageant (solution d'acide nucléique total) ont été transféré dans de nouveaux tubes eppendorf et conservé à -20 °C.

La qualité des acides nucléiques totaux a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2% dissout dans du tampon TBE (1%). Les puits du gel ont été chargés avec 10µl de l'acide nucléique total et 3 µl de colorant. La migration électrophorétique a été réalisée à 140 volts. L'observation a été réalisée par coloration du gel dans une solution contenant 0,5µg.ml⁻¹ de bromure d'éthidium et observé sur un transilluminateur à UV.

III.2.3.2 synthèse de l'ADN complémentaire

Une linéarisation des ARN a été réalisée en utilisant des amorces aléatoires (Invitrogen, USA). Pour chaque échantillon, 10 µl d'acides nucléiques totaux sont ajoutés à 2,5 µl du Mix I composé de 1µl Rp (amorce aléatoire) (1µg.µl⁻¹) et 1,5 µl d'eau distillée stérile. Deux tubes contenant de l'eau distillés et stérilisés sont également utilisés à la place des acides nucléiques totaux comme contrôle négatif. Les tubes sont incubés à 90 °C pendant 5 min.

Les ADN complémentaires ont été obtenus par reverse transcription en utilisant une reverse transcriptase (M-MLV). Dans chaque tubes, on rajoute 7,5 µl du Mix II composé de 4 µl de tampon Fs 5X, 0,5 µl de dNTPs 10 mM, 2 µl dTT 0,1mM, 1 µl M-MLV 200 U.µl⁻¹. Le volume final de chaque échantillon est de 20 µl. Les tubes sont incubés à 39°C pendant 1 heure puis à 70 °C pendant 10 min. Les ADNc sont ensuite conservés à -20 °C.

III.2.3.3 Préparation des échantillons pour la PCR

Pour chaque échantillon, 2,5 µl d'ADNc sont ajoutés au milieu réactionnel suivant : 5 µl de tampon 5X, 1 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTPs, 0,5 µl de l'amorce sens (10 mM),

0,5µl de l'amorce antisens (10 mM), 0,25 µl de la Taq polymérase 5 U.µl⁻¹ et 14,25 µl d'eau distillée stérile.

Les amorces d'ADN qui ont été utilisées pour la RT-PCR permettent d'identifier les *GLRaV-1*, *GLRaV-2* et *GLRaV-3* (Tableau 3). Les témoins négatifs et positifs du *GLRaV-1*, -2 et -3 proviennent de la collection du laboratoire de virologie végétale de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Tunis.

Tableau 3. Amorces utilisées pour la détection de GLRaV-1, -2 et -3

Virus	Amorces		Séquences	Amplicon	Références
GLRaV-3	CP3U CP3D	CP	ATGGCATTGAACTGAAATTAGGGC	484pb	Turturo <i>et al.</i> (2005)
			CGGCGCCATAACCTTCTTACA		
GLRaV-3	LR3-LC1F LR3-LC2 R	HSP70h	CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT	545pb	Ling <i>et al.</i> , (1998)
			GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT		
GLRaV-2	L2 F U2 R	HSP70h	ATAATTCGGCGTACATCCCCACTT	331pb	Bertazzon et Angelini (2004)
			GCCCTCCGCGCAACTAATGACAG		
GLRaV-1	HSP70-417F HSP70-737R	HSP70h	GAGCGACTTGCGACTTATCGA	320pb	Osman et Rowhani (2006)
			GGTAAACGGGTGTTCTTCAATTCT		

III.2.3.4 Condition d'amplification

Pour l'identification du GLRaV-3, les conditions d'amplification consiste en une première dénaturation réalisée à 94°C pendant 5 min. Elle est suivie de 35 cycles d'amplification dans les conditions suivantes : dénaturation à 94 °C pendant 30'' pour le gène CP et 35'' pour le gène HSP70h, hybridation des amorces à 57 °C pendant 20'' pour le gène CP et 56°C pendant 45'' pour le gène HSP70h avec une élongation à 72°C pendant 50''. Pour terminer, une élongation finale est réalisée à 72 °C pendant 7 min (Figure 13).

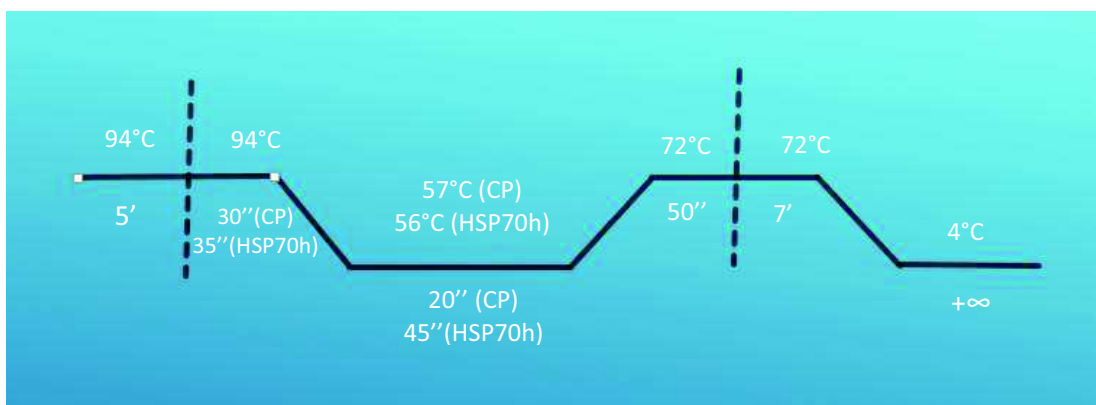


Figure 13: Conditions de polymérisation de l'amorce du GLRaV-3 pour les amorces amplifiant un segment des gènes HSP70h et CP.

L'identification du *GLRaV-1* et *GLRaV-2* est réalisée selon les conditions d'amplification qui consistait en une première dénaturation réalisée à 94°C pendant 5 min. Elle est suivie de 35 cycles d'amplification dans les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 58°C pendant 45 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 min. Pour terminer, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 min (Figure 14).

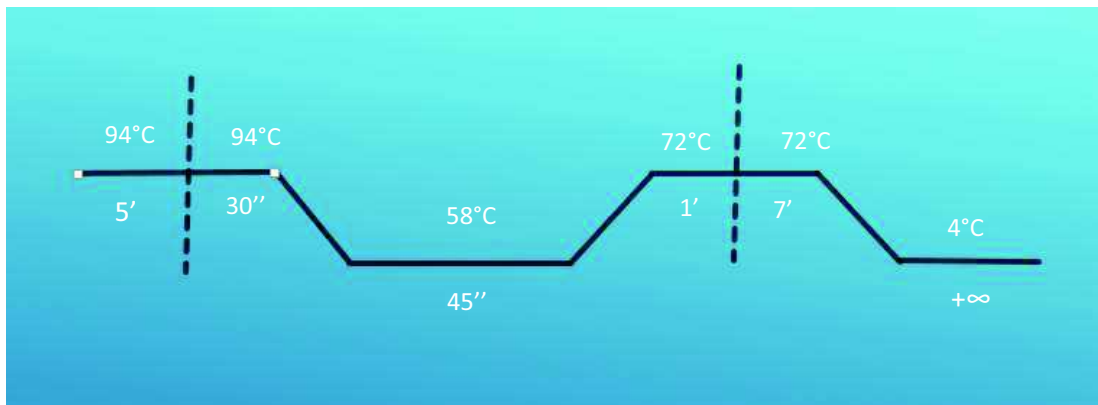


Figure 14: Condition de polymérisation des amorces du GLRaV-1 et GLRaV-2

III.2.3.5 Révélation et visualisation des bandes

Les amplicons ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%. Un marqueur de taille 100 pb a été également ajouté au gel. Les bandes attendues devraient correspondre à une taille de 546 pb et de 484 pb respectivement pour les gènes CP et HSP70h du *GLRaV-3*, de 331 pb pour le *GLRaV-2* et de 320 pb pour le *GLRaV-1*. L'électrophorèse a été réalisée à 140 volts pendant 30 minutes. La visualisation des bandes a été réalisée par coloration du gel au bromure d'éthidium à 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et visualisé sous la lumière UV.

III.2.4 Etude de la diversité génétique

III.2.4.1 Polymorphisme de conformation des acides nucléiques simple brin (SSCP)

L'étude de la variabilité génétique des virus nécessite un screening préliminaire en vue de connaître les différents variants présents dans la population. Durant cette étude nous avons utilisé la technique SSCP pour mettre en évidence les différents variants présents dans la population et faire un choix d'isolats à séquencer. Nous avons utilisé la SSCP uniquement pour le screening de la variabilité génétique du *GLRaV-3*, vu le nombre important d'échantillons infectés par ce virus. Ainsi, au total 60 échantillons positifs lors de la PCR réalisée avec les amorces amplifiant une région du gène HSP70h ont été analysés par la SSCP. Pour cela, 2 μl de produit PCR est mélangé avec 8 μl de tampon de dénaturation (95% de formamide, 0,5 M

EDTA (pH 8,0) et 0,05% de bleu de bromophénol). Le mélange a été incubé à 95 °C pendant 10 min pour la dénaturation de l'ADN et puis on a refroidi le mélange dans de la glace pendant 5 min. les amplicons dénaturés ont été séparés par gel de polyacrylamide non dénaturant 8% à 200 V pendant 3 heures à 4° C. la méthode suivi pour ce test correspond à celle décrite par Goszczyński et Jooste (2002). Les Profils SSCP ont été visualisés par coloration au nitrate d'argent comme décrite par Beidler *et al.* (1982). La visualisation a été réalisée en trois étapes :

- La première étape consiste en une fixation obtenue à l'aide de l'acide acétique (10%) pendant 20 min, le gel est ensuite lavé trois fois pendant deux minutes avec l'eau distillé, puis il est mis dans de l'acide nitrique (1%) pendant trois minute, ensuite le gel est lavé trois fois pendant deux minutes dans l'eau distillé.
- La deuxième étape consiste en une coloration avec du nitrate d'argent (0,15g nitrate d'argent, 100 ml d'eau distillé stérile et 15µl de formaldéhyde) pendant 15min, puis le gel est lavé pendant 2 min.
- La dernière étape consiste à révéler les bandes en agitant le gel dans une solution composée de NaCO₃ (3 g dans 100ml H₂O), 15µl formaldéhyde, 4 µl thiosulfate de sodium (2%). Lorsque les bandes prennent une coloration marron clair, la réaction est stoppée avec de l'acide acétique (1%) pendant 30 min.

III.2.4.2 Séquençages d'une partie du gène HSP70h et CP du GLRaV-2 et -3

Les produits PCR du *GLRaV-3* contenant un amplicon de 484 pb du gène de CP et de 545 pb du gène HSP70h de neuf isolats qui ont généré différents profils SSCP ont été choisi pour le séquençage et les produits PCR de sept isolats du *GLRaV-2* contenant un amplicon de 331 pb du gène HSP70h ont été purifiés avec le kit de purification ExoSAP-IT. Le séquençage direct a été effectué avec les mêmes amorces utilisées pour la RT-PCR à l'aide un séquenceur automatisé de type 3730xl *DNA analyser* (*Applied Biosystems*).

III.2.4.3 Analyse bio-informatique des séquences

III.2.4.3.1 Etude phylogénétique :

En vue d'avoir une indication rapide sur la similitude des séquences obtenues lors de cette étude avec des séquences provenant de diverses régions du monde et inscrites dans la banque de gène *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), un BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) a été réalisé pour chaque séquence obtenue lors de cette étude. Le principe de base du BLAST est de rechercher dans *GenBank* les séquences présentant des segments similaires à la séquence à étudier en réalisant des alignements binaires et en faisant un classement par ordre de pertinence (Figure 15).

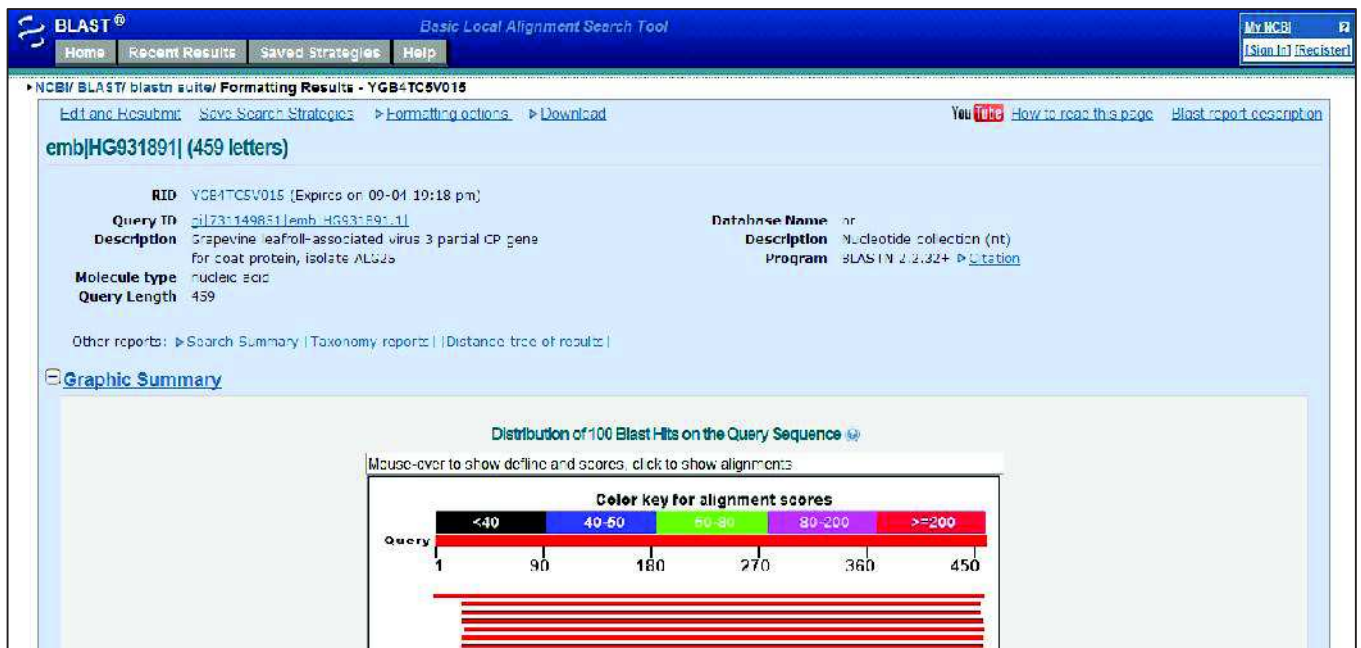


Figure 15 : Capture de l'interface web du BLAST d'une séquence du *GLRaV-3*

Une comparaison au niveau nucléotidique pour les régions des gènes HSP70h et CP des isolats algériens du *GLRaV-2* et *GLRaV-3* avec les séquences représentatives des différents groupes phylogénétiques décrits jusqu'à ce jour pour les deux virus a été menée. Ainsi, des alignements multiples ont été construits avec des séquences provenant de différentes régions à travers le monde téléchargées à partir de la banque de gène *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Les alignements ont été obtenus à l'aide du programme *Clustalw* intégré dans le logiciel MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013). Les arbres phylogénétiques ont été construits à l'aide de la méthode *neighbor joining* avec 1000 répétitions. Les distances entre groupes et à l'intérieur des groupes ont été calculées à l'aide de MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

III.2.4.3.2 Courbes de similitude (Similarity plot)

Pour une confirmation des résultats de l'analyse des séquences, nous avons réalisé une courbe de similitude du GLRaV-2 basée sur l'alignement des séquences représentatives de chaque groupe phylogénétique décrit à ce jour et pour lesquels le génome a été entièrement séquencé. Cette courbe a été réalisée à l'aide du logiciel Simplot 3.5.1 (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>) développé par le professeur Stuart Ray M.D. Pour cela, nous avons utilisé pour les deux virus des isolats dont le génome a été entièrement séquencé et réparti sur les différents groupes phylogénétiques décrits à ce jour (tableau 4).

Tableau 4 : Isolat utilisé pour l'élaboration de la courbe de similitude

<i>Isolat</i>	<i>N° d'accension</i>
96/955	AY881628
GLV2 1050-02	JX513891
PN	AF039204
BD	DQ286725
GLRaV-2-SG	KF220376

III.2.3.3 Etude des recombinaisons et de la sélection naturelle du *GLRaV-2*.

L'étude des pressions de sélection dans les populations du *GLRaV-2* a été menée à l'aide du logiciel Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>) (Figure 16). Ainsi, le ratio entre les substitutions non synonymes par site non synonyme (dN) avec les substitutions synonymes par site synonyme (dS) a été calculé. Ce ratio est considéré comme l'un des indicateurs les plus utilisés pour l'étude de la sélection naturelle. Au cours de ce travail, il a été calculé par les méthodes *single-likelihood ancestor counting (SLAC)* et *random-effects likelihood (REL)*. Ainsi, sur la base de ce ratio, on peut distinguer la sélection neutre si le $dN/dS=1$, la sélection purificatrice ou négative si le $dN/dS<1$ et positive si le $dN/dS>1$.

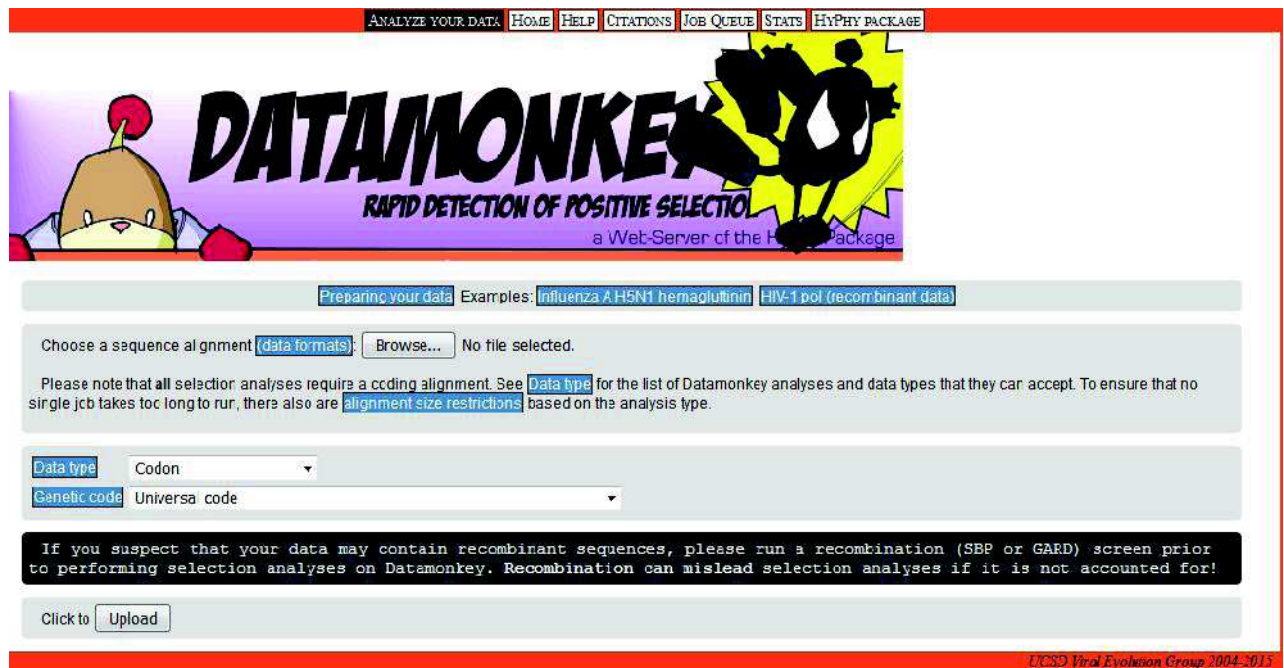


Figure 16 : Capture de l'interface web de Datamonkey

Au cours de l'évolution des virus, des recombinaisons entre variants apparaissent par un brassage du matériel génétique. Une analyse des événements de recombinaison des séquences du *GLRaV-2* étudié a été réalisée avec le programme GARD (Kosakovsky et al., 2006) intégré dans le site de Datamonkey.

Résultats et Discussion

IV. Résultats et Discussions

IV.1. Résultats des prospections

Les prospections réalisées en septembre 2012, montrent que les symptômes d'enroulement sont largement répandus dans les vignobles algériens et plus spécialement dans les vignobles de l'ouest du pays. Sur ce, nous avons constaté que presque la majorité des vignobles des wilayas de Ain Témouchent et de Mascara, essentiellement composés des cépages Alicante Bouschet et Valensi présentent des symptômes d'enroulement très répandus.

Nous avons constaté que les symptômes d'enroulement varient selon les cépages. Ainsi, le cépage Alicante Bouschet présente un enroulement avec coloration rouge brique foncé bien répartie sur toute la feuille à l'inverse du cépage Dattier de Beyrouth qui présente un enroulement suivi d'un léger jaunissement des feuilles (Figures 17 et 18).



Figure 17 : Symptôme d'enroulement foliaire de la vigne sur un cépage rouge, l'Alicante Bouschet.



Figure 18 : Symptôme d'enroulement foliaire de la vigne sur le cépage Dattier de Beyrouth

La collecte des échantillons a été réalisée durant le mois de décembre 2012. Un total de 484 échantillons a été obtenu. Ils ont été conservés dans des rubans imbibés d'eau. Parmi les échantillons

collectés, 100 échantillons proviennent de la wilaya d’Aïn Témouchent, 100 échantillons de la wilaya de Mascara dans l’ouest du pays avec 29 échantillons de la collection de vigne autochtone de L’ITAF de Tighenif. Pour les régions du centre, nous avons pu collecter 77 échantillons dans la wilaya d’Alger, 100 échantillons dans la wilaya de Boumerdès et 78 dans la wilaya de Tizi-Ouzou (tableau 5).

IV.2. Résultats des Analyses sérologiques et moléculaires

IV.2.1 Résultats des analyses sérologiques

Les résultats du test immuno-enzymatiques ELISA obtenus pour les 484 échantillons collectés à travers les différentes régions du pays ont montré que 50,6% soit 245 échantillons sont infectés au moins par l’un des trois virus testés. Sur les 245 échantillons infectés, 26% (64/245) ont des infections mixtes provoquées par au moins deux virus et 74% (181/245) présentent des infections simples (Figure 19). Le tableau 5 montre que les infections simples sont plus importantes que les infections multiples pour le *GLRaV-3*, à l’inverse du *GLRaV-1* et 2 dont les infections multiples sont plus importantes. On note aussi une association entre le *GLRaV-2* et *GLRaV-3* plus importante que celle du *GLRaV-1* et *GLRaV-3*.

Tableau 5 : Comparaison entre les infections simples et les infections multiples

<i>Simple infection</i>	<i>GLRaV-1</i>	<i>GLRaV-2</i>	<i>GLRaV-3</i>	<i>total</i>
Infection simple	11	21	149	181
Infection multiple	15	56	63	64
Association <i>GLRaV1/GLRaV-3</i>	15			
Association <i>GLRaV-2/GLRaV-3</i>	56			
Infection Totale	245			

La possibilité de mélange avec d’autres virus associés à l’enroulement foliaire de la vigne n’est pas à exclure vue que l’étude n’a porté que sur trois virus (considérés comme les plus répandus).

Le *GLRaV-3* s’est révélé être le virus le plus répandu avec 43,85% d’infection, suivi par le *GLRaV-2* (15,9%) et le *GLRaV-1* (5,3%) (Figure 20).

Le *GLRaV-3* est le virus le plus répandu avec un taux d’infection de 43,8% (212/484). La variété King’s Rubi est la plus infectée par le *GLRaV-3*, en effet 88,9% des échantillons de cette variété sont infectés par ce virus. La collection des variétés autochtones de l’ITAFV présente un taux élevé d’infection dépassant 79%. Le cépage autochtone le plus cultivé Gros noir a un taux d’infection de 60% par le *GLRaV-3*. Le cépage Cinsault est le moins infecté avec seulement 7,5% des échantillons infectés par ce virus (tableau 6).

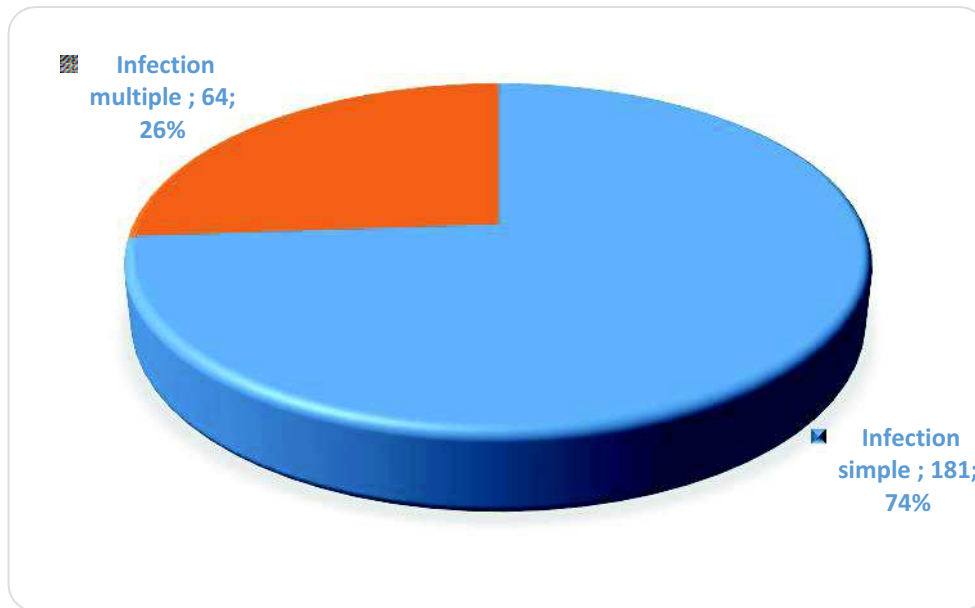


Figure 19: Comparaison entre les infections simples et les infections multiples

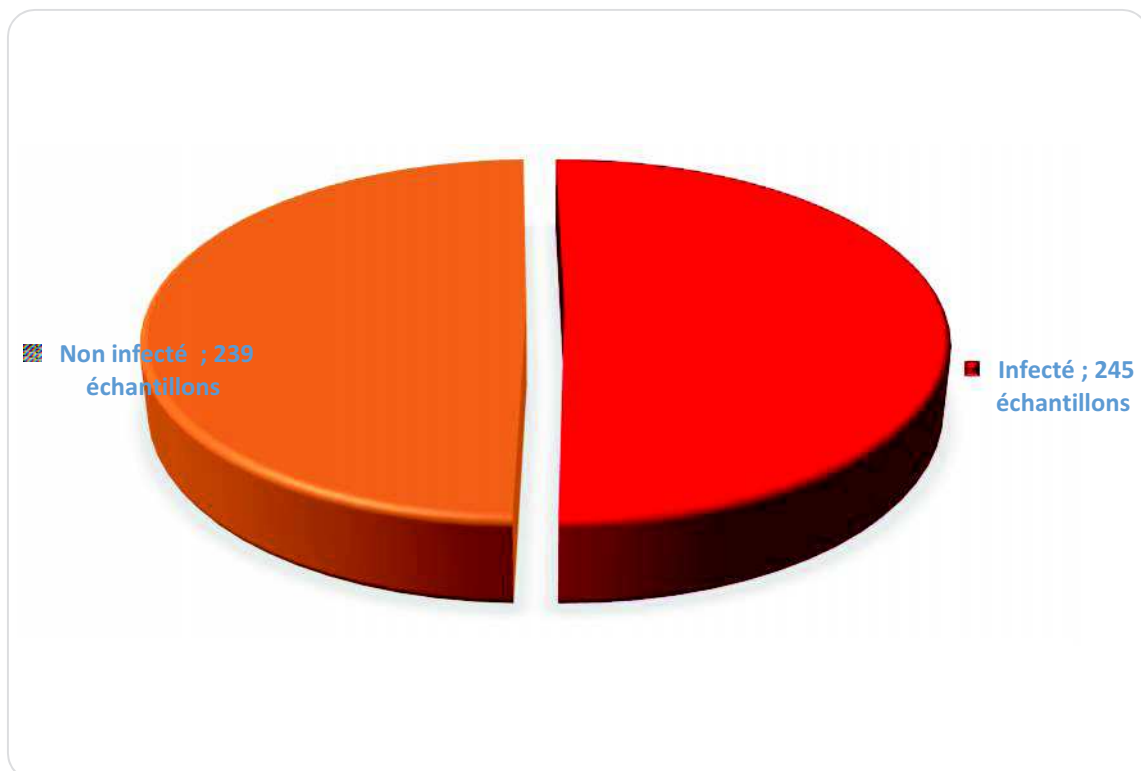


Figure 20 : Prévalence de *GLRaV-1*, *GLRaV-2*, et *GLRaV-3* dans les échantillons analysés

Le *GLRaV-2* est le deuxième virus du point de vue prévalence avec 15,9% d'infection. Il est détecté principalement dans la variété autochtone le Gros noir de Béni Abbas avec 29% d'infection. Les cépages les plus infectés par ce virus sont Alicante Bouschet (26,7%), King's Rubi (22,2%), Dattier de Beyrouth (21,1%), Valensi (11,9%) et Muscat d'Alexandrie (10%). Pour les autres cépages le taux d'infection par le *GLRaV-2* est inférieur à 10%, avec absence d'infection dans le cépage Merseguerra (tableau 6).

Avec un taux d'infection de 5,4%, le *GLRaV-1* s'est révélé être absent dans les cépages King's Rubi, Merseguerra et les variétés autochtones de la collection de l'ITAF. Ce virus a été particulièrement détecté dans les variétés Muscat d'Alexandrie (11,4%), Dattier de Beyrouth (8,5%) et Gros noir de Béni Abbas (7%) (Tableau 6).

La variété King's Rubi s'est avérée être la plus infectée avec un taux d'infection total de 88,9%, suivie par les variétés autochtones de la collection de l'ITAF (82,8%), le cépage Gros noir de Béni Abbas (66%), le cépage Merseguerra (70%), et le cépage Alicante Bouschet (53,5%). Pour les autres variétés le taux d'infection varie de 46,5% pour le Dattier de Beyrouth à 15% pour le Cinsault (tableau 6).

Tableau 6 : Prévalence des virus *GLRaV-1*, *GLRaV-2* et *GLRaV-3* dans les différents cépages

	<i>Nbr</i>	<i>LR3</i>		<i>LR1</i>		<i>LR2</i>		<i>Echantillon infecté</i>	
Dattier de Beyrouth	71	29	(40,8%)	6	(8,5%)	15	(21,1%)	33	(46,5%)
Gros noir *	100	60	(60,0%)	7	(7,0%)	29	(29,0%)	66	(66,0%)
Cardinal	52	24	(46,2%)	1	(1,9%)	3	(5,8%)	24	(46,2%)
Alicante	30	11	(36,7%)	1	(3,3%)	8	(26,7%)	16	(53,3%)
King's Rubi	9	8	(88,9%)	0	(0,0%)	2	(22,2%)	8	(88,9%)
Muscat d'Alexandrie	70	26	(37,1%)	8	(11,4%)	7	(10,0%)	35	(50,0%)
Merseguerra	10	7	(70,0%)	0	(0,0%)	0	(0,0%)	7	(70,0%)
Cinsault	40	3	(7,5%)	1	(2,5%)	3	(7,5%)	6	(15,0%)
Carignon	31	10	(32,3%)	1	(3,2%)	3	(9,7%)	10	(32,3%)
Valensi	42	11	(26,2%)	1	(2,4%)	5	(11,9%)	16	(38,1%)
Autochtones (ITAF)*	29	23	(79,3%)	0	(0,0%)	2	(6,9%)	24	(82,8%)
total	484	212	(43,8%)	26	(5,4%)	77	(15,9%)	245	(50,6%)

*Cépage Autochtone

IV.2.2 Résultat des analyses moléculaires

a. Cas du *GLRaV-3* :

L'observation de la migration sur gel agarose du produit PCR a montré que les amorces utilisées amplifiaient respectivement une bande de 484 pb et de 545 pb des gènes CP et HSP70h.

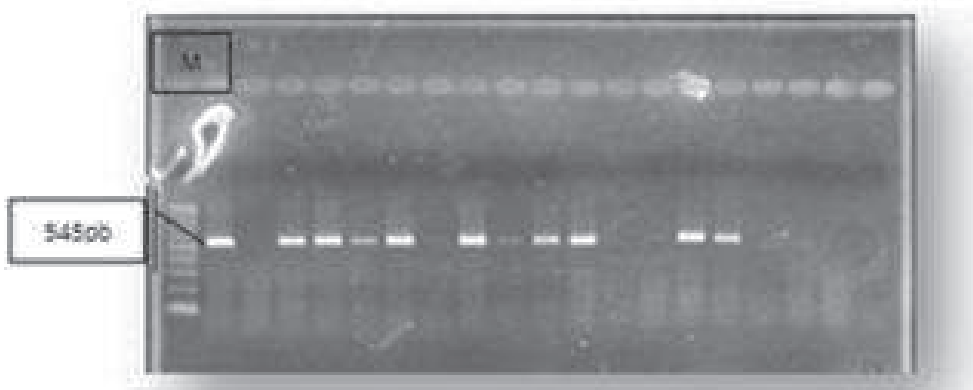


Figure 21: Photo des profils migration électrophorétique pour le produit PCR du gène HSP70h du *GLRaV-3*

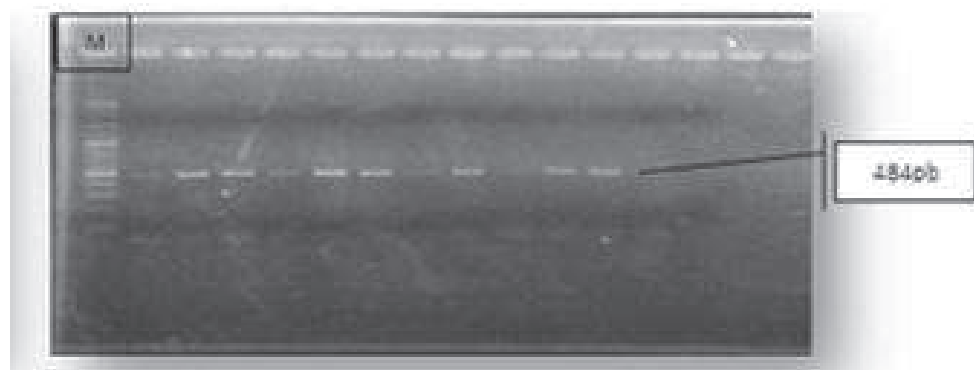


Figure 22 : Photo des profils migration électrophorétique pour le produit PCR du gène cp du *GLRaV-3*

Certaines bandes sont plus concentrées que d'autres, cela est dû à la différence de concentration du virus dans les tissus. Les témoins positifs ont réagi par l'apparition d'une bande aux environs de 484 pb pour le gène CP et de 545 pb pour le gène HSP70h. Aucune réaction n'a été obtenue pour les témoins négatifs. Le marqueur utilisé est de l'ordre de 100 pb. Les résultats obtenus montrent des bandes positionnées au même niveau que celle des témoins positifs et se situant aux alentours de 500 pb pour les deux virus, suggérant que les amorces ont amplifiés les parties qui leur sont spécifiques, à savoir, 484 pb et 545 pb.

b. Cas du *GLRaV-2*

L'amorce utilisée pour la détection du *GLRaV-2* a amplifié une bande de 331 pb observée après une migration sur gel agarose à 1,2%. Certaines bandes étaient plus claires que d'autres. Cela est dû à la différence de concentration entre les extraits utilisés. Le témoin positif a réagi par une bande claire

située dans la même position que celle des échantillons positifs, aucune réaction n'a été obtenue pour le témoin négatif. Le marqueur utilisé est de l'ordre de 100 pb.

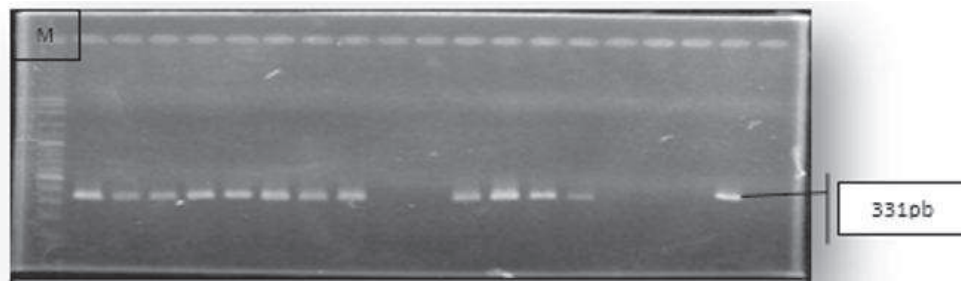


Figure 23: : Photo des profils migration électrophorétique pour le produit PCR du gène HSP70h du *GLRaV-2*

c. Cas du *GLRaV-1*

L'amorce utilisée pour la détection du *GLRaV-1* a amplifié une bande de 320 pb observée après une migration sur gel agarose à 1,2%. Certaines bandes étaient plus claires que d'autres. Cela est dû à la différence de concentration entre les extraits utilisés. Le témoin positif a réagi par une bande située sur la même position que celle des échantillons positifs, aucune réaction n'a été obtenue pour le témoin négatif. Tous les échantillons positifs lors du test ELISA ont réagi positivement.

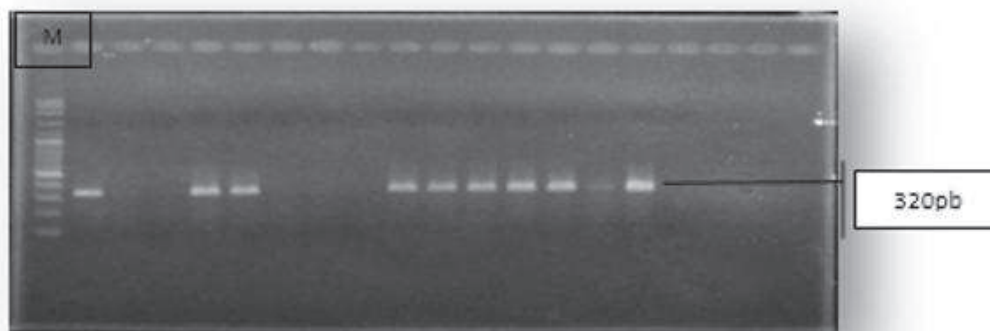


Figure 24: Photo des profils migration électrophorétique pour le produit PCR du gène HSP70h du *GLRaV-1*

IV.2.3 Résultat de la SSCP

En vue de déceler la possibilité d'existence de variant génétique du *GLRaV-3*, une SSCP a été réalisée. Ainsi, au total, 60 échantillons ont été analysés. Après migration et révélation, nous avons obtenu trois profils électrophorétique distincts (figure 25). Neuf isolats ayant différents profils de migration ont été choisis pour le séquençage et l'analyse phylogénétique. Les isolats ALG63 et ALG112 ont le profil A, qui est différents du profil B généré par les isolats ALG2, ALG9, ALG25, ALG28, ALG68 et ALG114. Pour, le profile C, il est représenté par l'isolat ALG71.

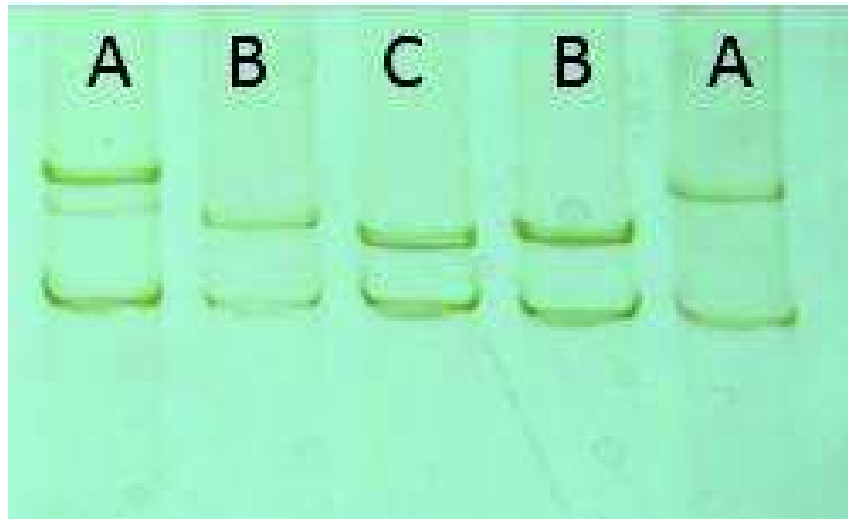


Figure 25 : Profils SSCP de produit PCR spécifiques au gène HSP70h obtenus à partir d'échantillons collectés dans différentes régions viticole de l'Algérie (profil A : isolats ALG63 et ALG112, profil B : ALG2, ALG9, ALG25, ALG28, ALG68 et ALG114 et profil C : ALG71)

IV.2.4 Séquençage

En vue d'étudier les propriétés phylogénétiques du *GLRaV-2* et *GLRaV-3*, nous avons effectué durant ce travail le séquençage de quelques isolats de chaque virus. Le choix des isolats à séquencer a été fait sur la base des résultats obtenus lors de la SSCP pour le *GLRaV-3*, pour le *GLRaV-2*, nous avons choisi les isolats de façon aléatoire.

Ainsi, pour le *GLRaV-3*, nous avons utilisé le produit PCR obtenu à partir des isolats ALG2, ALG9, ALG25, ALG28, ALG63, ALG68, ALG71, ALG112 et ALG114. Pour le *GLRaV-2*, nous avons utilisé les produits PCR obtenus à partir des isolats ALG7, ALG9, ALG19, ALG22, ALG93, ALG55, ALG53. Les séquences obtenues sont inscrites dans la banque de gène *European Nucleotide Archive* (ENA) (www.ebi.ac.uk/ena) et un numéro d'accèsion a été attribué à chacune d'elle (tableau 7).

Tableau 7 : Les isolats séquencés, leurs provenances et leurs numéros d’accessions

	<i>Isolat</i>	<i>Origine</i>	<i>Cépage</i>	<i>N° Accession CP</i>	<i>N° Accession HSP70</i>
<i>GLRaV-3</i>	ALG2	Alger	Dattier de Beyrouth	HG931889	HG931880
	ALG9	Alger	Dattier de Beyrouth	HG931890	HG931881
	ALG25	Mascara	Gros noir des Beni Abbes	HG931891	HG931882
	ALG28	Mascara	Gros noir des Beni Abbes		HG931883
	ALG63	Boumerdes	King s Ruby	HG931892	HG931884
	ALG68	Boumerdes	King s Ruby	HG931893	HG931885
	ALG71	Boumerdes	King s Ruby	HG931894	HG931886
	ALG112	Tizi-Ouzou	Muscat d’Alexandrie	HG931895	HG931887
	ALG114	Boumerdes	Cardinal	HG931896	HG931888
<i>GLRaV-2</i>	ALG7	Alger	Dattier de Beyrouth		HG931897
	ALG9	Alger	Dattier de Beyrouth		HG931898
	ALG19	Alger	Gros noir des Beni Abbes		HG931899
	ALG22	Mascara	Gros noir des Beni Abbes		HG931900
	ALG53	Ain Témouchent	Alicante Bouschet		HG931901
	ALG55	Ain Témouchent	Alicante Bouschet		HG931902
	ALG93	Alger	Gros noir des Beni Abbes		HG931903

Une vérification des séquences pour les contaminations par les vecteurs utilisés lors du séquençage a été effectuée avec le programme VecScreen intégré dans *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>). Les résidus des séquences des amorces utilisées ont été éliminés des séquences obtenues manuellement en réalisant un alignement multiple avec les amorces.

Grapevine leafroll-associated virus 3 partial HSP70 gene for Heat shock protein 70 homolog, isolate ALG2

GenBank: HG931880.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>gi|731149829|emb|HG931880.1| Grapevine leafroll-associated virus 3 partial
HSP70 gene for Heat shock protein 70 homolog, isolate ALG2
CCCAAGGCTGCAGATTTCGCTAGGGCTGTGGAGTATTCGCTCGGGCTGTGGGAGAATTGCCCTAGGTAGCG
GCAGGATTGATGTGGCCAATTTGCCGCAGATATCTAAGGTTGTGTTTCGACAATACTGATTTTAGGTGTTT
GGTAGCCTGTGGGGCTAAGGTTTACTGTGATATTTGGCAGGTAATAGCGGACTGAGACTGGTGGACACT
TTGACGAATACGCTAACGGACGAGGTGGTGGACTTTCAACCGGTGGTAATTTTCCCGAAAGGTAGTCCAA
TACCCTGTTTCATACACTCACAGATACACAGTGGGTAGTGGAGATGTGGTGTACGGTATATTTGAAGGGGA
GAATAACAGGGCTTTTCTAAATGAACCGACGTTCCGGGGCGTATCGAAACGTAGGGGAGACCCAAAAGAG
ACCGACGTAGCGCAATTTAATTTATCCACAGACGGTACGGTATCTGTTATTGTTAACGGTGAGGAAGTAA
AGAAATGAATATCTGGTACCCGGGACAAC
```

Figure 26 : Séquence de l’isolat ALG2 du *GLRaV-3* en format FASTA

IV.2.5 Discussion des résultats sérologiques et moléculaires

Au cours de cette étude, nous avons pu observer des différences dans les symptômes d'enroulement foliaire de la vigne. Plusieurs auteurs rapportent que les symptômes externes majeurs sont un enroulement des feuilles vers la face inférieure suivi d'un jaunissement comme dans le cas du Chardonnay ou d'un rougissement suivant qu'on est en présence d'un cépage blanc ou bien rouge (Martinson *et al.*, 2008 ; Bovey, 1980 ; Martelli, 1993). Cependant, certaines espèces de vigne américaines n'extériorisent pas de symptômes d'enroulement ou de coloration (Vuittenez, 1985). A l'heure actuelle, toutes les variétés cultivées sont sensibles à cette maladie. Cependant, il est utile de réaliser des recherches sur les vignes spontanées dont le patrimoine génétique est presque inexploité. Un programme de recherche visant à identifier et caractériser les vignes spontanées est nécessaire pour constituer une base de données en vue d'une exploitation efficace de ce patrimoine génétique.

L'enroulement foliaire observé dans les vignobles de l'ouest et du centre du pays est majoritairement lié à la présence de virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne. Lekikot *et al.* (2012) et Lehad (2012) rapportent la présence du *GLRaV-1*, -2, -3, -5 et -6 en Algérie. Les mêmes auteurs rapportent que les vignobles présentant des symptômes d'enroulement étaient infectés par au moins un virus associé à l'enroulement foliaire de la vigne.

Lehad *et al.* (2012) rapportent un pourcentage d'infection par les virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne de l'ordre de 78% d'infection sur un total de 100 échantillons pour le *GLRaV-1*, -2, -3, -5 et -6. Au cours de cette étude, nous avons obtenu un pourcentage d'infection de l'ordre de 50,6% sur un total de 484 échantillons pour le *GLRaV-1*, -2 et -3. La différence de prévalence des *GLRaVs* obtenue entre les deux études est due à la différence du nombre d'échantillons et de virus analysés.

L'étude de la prévalence des trois virus a révélé des disparités dans le pourcentage de prédominance de chaque virus. La large prédominance du *GLRaV-3* est essentiellement due à la propagation par le matériel végétal infecté et par les cochenilles.

Une comparaison entre le taux d'infection pour chaque cépage a été réalisée. Les résultats ont révélés que certains cépages sont fortement infectés par rapport à d'autres. Le cépage King's Rubi est le plus infecté et la quasi-totalité du vignoble situé dans la wilaya de Boumerdes était infecté par l'enroulement foliaire de la vigne après seulement la 5^{ème} année de mise en place du vignoble. Ceci peut être expliqué par l'utilisation d'un matériel végétal infecté. Souvent les viticulteurs, méconnaissent les mécanismes de transmission des virus et utilisent des greffons provenant de vignobles infectés. Cependant, mêmes les stations de production de portes greffes et greffons peuvent héberger des virus qui seront propagés par multiplication végétative. Ainsi, au cours de cette étude, nous avons analysé la collection de vignes autochtones de l'ITAFV de Tighennif (Mascara) vis-à-vis du *GLRaV-1*, -2 et -3 et les résultats sérologiques ont montré un pourcentage d'infection très élevé (82,8%).

L'absence de symptômes ou bien leur apparition tardive rend leur détection dans un vignoble nouvellement installé très difficile. Il est donc nécessaire de réaliser un suivi rigoureux à partir des parcs à bois afin d'éviter que des pieds infectés ne soient multipliés.

Les résultats obtenus montrent que l'association entre le *GLRaV-2* et le *GLRaV-3* est plus importante que l'association entre le *GLRaV-1* et le *GLRaV-3*. La grande propagation du *GLRaV-2* par rapport au *GLRaV-1* peut expliquer cette importante association avec le *GLRaV-3* et du fait de l'utilisation d'un matériel végétal infecté.

Les résultats des tests sérologiques ont été confirmés par la technique RT-PCR et par séquençage. Ainsi parmi les échantillons positifs au test ELISA, certains ont été choisis pour le séquençage et les séquences obtenues correspondent au virus en question. La vérification par VecScreen n'a montré aucune contamination des séquences par le génome du vecteur utilisé dans le séquençage et la recherche de similitude par BLAST confirme que les séquences obtenues coïncident avec les séquences recherchées dans cette étude.

Plusieurs études sur la prévalence des virus de l'enroulement foliaire de la vigne ont été menées à travers le monde et ont révélé une grande propagation de ces virus ce qui les rendent comme étant les virus les plus répandus à travers le monde. En Algérie, peu de travaux leurs ont été consacrés. Notre travail a permis d'approfondir nos connaissances sur les *GLRaVs* et constitue une base importante dans la mesure où il repose sur une analyse d'un nombre considérable d'échantillons et dans différentes régions viticoles. Le séquençage d'une partie du génome des isolats algériens a permis de les répertorier dans des bases de données internationales et fournira des données précieuses sur l'appartenance phylogénétique des différents types viraux analysés. D'autres travaux sont nécessaires, notamment sur la recherche des autres virus associés à cette maladie pour une compréhension globale de cette maladie en Algérie. Les résultats permettront de mettre en place des programmes de prévention et proposer des méthodes de lutte efficaces.

IV.3 Etude de la diversité génétique du GLRaV-3

IV.3.1 Résultats

IV.3.1.1 Analyse nucléotidique des isolats du *GLRaV-3*

Le screening de la diversité génétique réalisé à l'aide de la SSCP, pour le *GLRaV-3*, en utilisant le produit PCR obtenu a révélé la possibilité de la présence de trois variants génétiques caractérisés par des profils distincts. L'utilisation des méthodes de screening de la variabilité génétique réduisent en effet la probabilité d'écarter des variants génétiques moins représentés dans une région géographique donnée. Avec l'utilisation de la SSCP, nous avons réduit le nombre d'isolats à séquencer et nous avons porté notre attention uniquement sur les isolats présentant une variabilité révélée par des profils

électrophorétiques distincts. Une analyse bio-informatique des séquences a été réalisée en vue d'étudier les variations génétiques.

Pour étudier les relations nucléotidiques existantes entre les isolats séquencés, nous avons réalisé une matrice de similitude nucléotidique à l'aide du programme informatique ClustalW (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2). Ainsi, sur la base d'un alignement de 402 nucléotides du gène de la protéine capsidiale et d'un alignement de 370 nucléotides du gène HSP70h, nous avons réalisé une comparaison nucléotidique entre les isolats algériens séquencés. Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de similitude entre les isolats est de 89-100% pour les deux gènes. L'isolat ALG71 révèle des pourcentages de similitude respectivement de l'ordre de 89-92% et 88-90% avec tous les autres isolats séquencés. L'isolat ALG2 montre un pourcentage de similitude avec les isolats ALG9, ALG28, ALG114 et ALG68 allant de 98 à 100%, par contre il ne présente que 92-94% d'identité avec les isolats ALG63, ALG112 et ALG71. La comparaison nucléotidique a révélé que les isolats ALG63 et ALG112 présentait un pourcentage de similitude de l'ordre de 100%. (Tableau 8)

Une comparaison nucléotidique du gène HSP70h a été réalisée entre les isolats algériens séquencés lors de cette étude et les séquences représentatives des différents groupes phylogénétiques décrits par Maree *et al.* (2013). Les résultats obtenus montrent que les isolats ALG2, ALG9, ALG25, ALG28, ALG68 et ALG114 ont 92% d'identité avec l'isolat NY (AF037268) du groupe I, 86% -87% d'identité avec l'isolat LN du groupes III, 98-99% d'identité avec l'isolat 623 du groupe II, 73 -75% d'identité avec l'isolat GH30 et l'isolat NZ2 des groupes VI et VII.

Les séquences des isolats ALG63 et ALG112 montrent 99% d'identité avec l'isolat NY (AF037268) du groupe I, 89% d'identité avec isolat LN (JQ423939) du groupe III, 93% d'identité avec l'isolat 623 du groupe II, 75% d'identité avec le GH30 du groupe VI et 76% d'identité avec l'isolat NZ2 (JX220899.2) du groupe VII. L'isolat ALG71 montre 89% d'identité avec l'isolat NY, 99% d'identité avec l'isolat LN, 88% d'identité avec l'isolat 623, 76% d'identité avec les isolats GH30 et NZ2.

La comparaison nucléotidique du gène CP des isolats algériens séquencés lors de cette étude et des isolats représentatifs des groupes phylogénétiques décrits par Maree *et al.*, (2013) révèle que, les isolats ALG2, ALG9, ALG25, ALG68 et ALG114 présentent 99% d'identité avec l'isolat GP18 du groupe II et 89-90% d'identité avec NY-1, LP-20, Terrantez da Terceira-2 et Trincadeira-12 respectivement des groupes I, III, IV et V. Les isolats ALG63 ALG112 présentent 99% d'identité avec l'isolat NY-1 du groupe I et 91 à 93% d'identité avec GP18, PL-20, Terrantez da Terceira-2-Trincadeira-12 du groupes II, III, IV et V. En outre, l'isolat ALG71 présente 99% d'identité avec l'isolat LP-20 du groupe III et 89 à 91% avec les isolats NY-1, GP18, Terrantez da Terceira-2 et Trincadeira-12 respectivement du groupe I, II, IV et V.

Tableau 8 : Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et les isolats représentatifs des différents groupes décrits pour le gène CP.

	NY	NZ2	GH30	Trincadeira-12	Terrantez_da Terceira-2	PL-20	GP18	ALG2	ALG9	ALG25	ALG63	ALG68	ALG71	ALG112	ALG114
NY	ID														
NZ2	75%	ID													
GH30	76%	80%	ID												
Trincadeira-12	92%	75%	75%	ID											
Terrantez_da Terceira-2	91%	76%	77%	91%	ID										
PL-20	91%	74%	76%	89%	91%	ID									
GP18	90%	74%	75%	89%	89%	89%	ID								
ALG2	90%	74%	75%	89%	90%	90%	99%	ID							
ALG9	90%	74%	75%	89%	90%	90%	99%	100%	ID						
ALG25	90%	74%	75%	90%	90%	89%	99%	100%	100%	ID					
ALG63	99%	75%	76%	93%	91%	91%	91%	90%	90%	91%	ID				
ALG68	91%	73%	76%	89%	89%	89%	99%	99%	99%	99%	91%	ID			
ALG71	91%	74%	77%	89%	91%	99%	89%	90%	90%	90%	91%	89%	ID		
ALG112	99%	75%	77%	93%	91%	91%	91%	91%	91%	91%	100%	91%	91%	ID	
ALG114	90%	74%	75%	89%	90%	89%	99%	99%	99%	100%	90%	99%	89%	91%	ID

Tableau 9 : Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et les isolats représentatifs des différents groupes décrits pour le gène HSP70h.

	LN	NZ2	139	GH30	NZ-1	PL-20	623	621	NY-1	GP18	ALG2	ALG9	ALG25	ALG28	ALG63	ALG68	ALG71	ALG112	ALG114	
LN	ID	76%	72%	76%	74%	99%	87%	89%	88%	88%	87%	86%	87%	87%	89%	87%	99%	89%	87%	
NZ2		ID	72%	79%	80%	76%	74%	76%	75%	75%	74%	73%	74%	74%	76%	74%	76%	76%	74%	
139			ID	73%	73%	71%	74%	72%	72%	73%	73%	73%	73%	73%	73%	73%	72%	73%	73%	
GH30				ID	93%	75%	76%	74%	73%	76%	75%	74%	75%	75%	75%	76%	76%	75%	75%	
NZ-1					ID	74%	77%	75%	74%	77%	77%	75%	77%	77%	75%	77%	74%	75%	77%	
PL-20						ID	88%	89%	89%	89%	88%	87%	88%	88%	89%	88%	99%	89%	88%	
623							ID	93%	92%	99%	99%	98%	99%	99%	93%	99%	88%	93%	99%	
621								ID	98%	93%	93%	92%	93%	93%	99%	93%	89%	99%	93%	
NY-1									ID	92%	92%	91%	92%	92%	99%	92%	89%	99%	92%	
GP18										ID	99%	98%	99%	99%	93%	99%	89%	93%	99%	
ALG2											ID	99%	100%	100%	93%	100%	88%	93%	100%	
ALG9												ID	99%	99%	92%	98%	86%	92%	100%	
ALG25													ID	100%	93%	100%	88%	93%	100%	
ALG28														ID	93%	100%	88%	93%	100%	
ALG63															ID	93%	90%	100%	94%	
ALG68																ID	88%	93%	100%	
ALG71																	ID	90%	88%	
ALG112																		ID	94%	
ALG114																				ID

IV.3.1.2 Etude phylogénétique du GLRaV-3

L'étude phylogénétique menée avec le logiciel MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) pour les isolats algériens et ceux téléchargés à partir de la banque de gène GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a permis d'obtenir un arbre phylogénétique qui a révélé que les isolats algériens sont répartis dans trois groupes pour les deux régions génomiques. Pour la région du gène HSP70h, les isolats algériens ALG63 et ALG112 ont été regroupés dans le groupe I représenté par l'isolat NY-1. Six isolats algériens (ALG2, ALG9, ALG25, ALG28, ALG 68 et ALG114) ont été regroupés dans le groupe II représenté par l'isolat GP18. L'isolat ALG71 est regroupé dans le groupe III. L'analyse du gène CP révèle la même distribution phylogénétique que celle obtenue lors de l'étude phylogénétique du HSP70h (figure 27). En outre, l'analyse phylogénétique est en accord avec les résultats obtenus lors de l'analyse nucléotidique et lors de la SSCP.

Ainsi, un arbre phylogénétique a été construit pour les deux gènes. L'analyse de l'arbre phylogénétique du HSP70h révèle l'existence de six groupes phylogénétiques avec la suggestion de l'existence d'un septième. Cependant, nous avons constaté la présence de deux nouveaux sous-groupes représentés par les isolats TU32 (sous-groupe I) et WA C5-1 (sous-groupe II). La comparaison de ces deux isolats avec les isolats de chaque groupe a révélé que l'isolat WA C5-1 présente 95% d'identité avec l'isolat NY-1 et 93% d'identité avec l'isolat GP18. L'isolat TU32 présente 95% d'identité avec l'isolat NY-1 et 94% avec le GP18. Les isolats WA C5-1 et TU32 présentent une identité de 95%. L'arbre phylogénétique indique la présence d'un isolat (l'isolat 139 (JX266782) qui pourrait constituer un autre groupe provenant d'Australie isolé des autres groupes.

Pour l'étude phylogénétique de la protéine capsidiale, les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par Maree *et al.* (2013). Ainsi, on a trouvé l'existence de 6 groupes phylogénétiques avec la suggestion de la présence d'un septième constitué par l'isolat NZ2 provenant de la Nouvelle Zélande. Cependant, l'arbre phylogénétique construit lors de cette étude montre la possibilité d'existence d'un 8^{ème} groupe représenté par l'isolat (43-15) (JF421951) provenant des Etats unies d'Amérique.

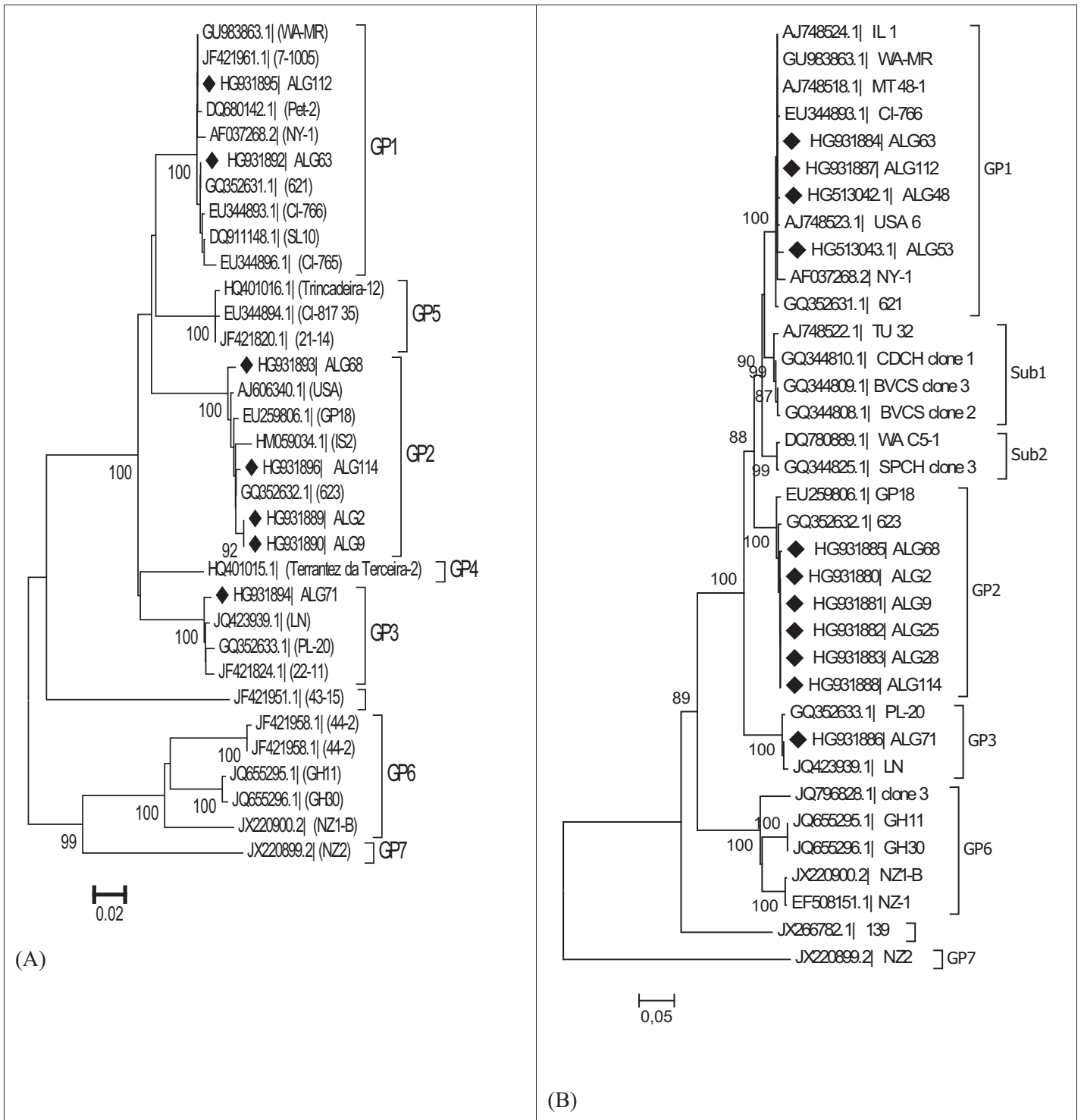


Figure 27. Arbre phylogénétique du GLRaV-3 construit à partir d'isolats séquencés lors de cette étude et d'isolats téléchargés à partir de GenBank (annexe 5), basée sur une région de 370 nt dans le gène HSP70h et 402 nt du gène CP, réalisée à l'aide du logiciel MEGA6 (Tamura et al., 2013). L'arbre phylogénétique a été réalisé selon la méthode du neighbor-joining ; Les pourcentages du bootstrap supporté ($\geq 90\%$) à partir de 1000 répliques sont présentés au niveau des nœuds. (◆ : Isolats algériens ; (A) : arbre phylogénétique pour la région du gène de protéine capsidiale ; (B) : arbre phylogénétique pour le gène HSP70h).

IV.3.2 Discussion

L'étude de l'identité nucléotidique des isolats algériens, séquencés au cours de cette étude, montrent que certains isolats sont fortement liés. Ainsi, les isolats ALG2, ALG9, ALG25, ALG28, ALG68 et ALG114 présentent une similarité nucléotidique élevée et présentent des différences considérables par rapport aux isolats ALG63 et ALG112 qui présentent une identité de 100%. Les deux groupes d'isolats présentent une faible identité avec l'isolat ALG71. Ainsi, la comparaison au niveau nucléotidique montre la possibilité d'existence de trois variants génétiques confirmant les résultats obtenus lors de la SSCP. Les trois groupes d'isolats ayant le même pourcentage de similarité ont présenté le même profil électrophorétique.

Une étude phylogénétique a été réalisée pour les deux gènes HSP70h et CP pour les isolats séquencés lors de cette étude et des isolats téléchargés à partir de la banque de gènes *GenBank*. Ainsi, un arbre phylogénétique a été construit pour chacun des deux gènes.

Les arbres phylogénétiques construits pour les deux gènes confirment les résultats obtenus lors de la SSCP et lors de la comparaison nucléotidique des isolats algériens qui sont distribués avec le même regroupement que celui de la comparaison nucléotidique et de la SSCP.

L'arbre phylogénétique construit pour le gène HSP70h révèle cinq groupes correspondant à ceux décrits pour le gène CP par Gouveia et al. (2011) et Chooi et al. (2013), sauf pour les groupes IV et V. A l'heure actuelle, aucune séquence du gène HSP70h des isolats composant ces deux groupes n'est disponible.

Certains isolats sont encore ambigus, tel que les isolats TU32 et WA C5-1. Fuchs et al. (2009) ont regroupé ces deux isolats au sein d'une même branche mais dans notre étude, les deux isolats présentent deux branches distinctes formant deux nouveaux sous-groupes contenant des isolats américains et tunisiens. Jooste *et al.* (2010) signalent également que les deux isolats TU32 et WA C5-1 sont placés sur des branches séparées, liés aux groupes I et II. Ainsi, au cours de cette étude, nous confirmons les constatations de Jooste et al. (2010). Cependant, l'étude phylogénétique des groupes IV et V révèle qu'ils sont liés aux groupes I, II et III dans la même branche, d'où l'hypothèse que les deux sous-groupes représentent les groupes IV et V déjà décrits. Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, le séquençage du gène HSP70h des isolats en question est nécessaire. Une autre possibilité est que ces deux nouveaux sous-groupes peuvent indiquer la grande diversité du GLRaV-3. En outre, l'isolat 139 (JX266782) reste ambigu et se place sur une branche individuellement. La comparaison au niveau nucléotidique révèle que l'isolat 139 présente 71% à 73% d'identité avec les isolats des différents groupes. Ces résultats suggèrent l'existence d'un 8^{ième} groupe (tableau 8).

L'arbre phylogénétique de la région du gène de CP révèle les mêmes résultats que ceux obtenus par Chooi *et al.* (2013). Nous avons observé six groupes et l'existence éventuelle d'un septième groupe. Cependant, Farooq *et al.* (2013) rapportent deux nouveaux sous-groupes liés aux groupes I et III. Durant

cette étude, nous avons pu mettre en évidence la présence d'un isolat ambigu (isolat 43-15) qui se place sur une branche individuelle qui pourrait constituer un autre groupe phylogénétique.

Les deux arbres phylogénétiques développés au cours de cette étude indiquent que les isolats algériens sont distribués de la même manière pour les deux gènes dans trois groupes phylogénétiques. Nous pouvons en conclure que plus d'un variant génétique est présent en Algérie. Il est également possible que certains isolats ne soient pas détectés par un anticorps polyclonal mis au point par l'utilisation seulement de certains variants dans leur élaboration. Cohen *et al.* (2012) ont rapporté que l'isolat NZ2 lié au groupe VI n'est pas détecté par ELISA et l'utilisation d'une amorce spécifique à l'isolat donne une réaction positive. Ainsi, les arbres phylogénétiques construits dans notre étude indiquent la grande distribution des variants génétiques des groupes I, II et III qui contiennent une grande proportion d'isolats américains et européens. Cela pourrait être dû à la grande circulation du matériel végétal provenant de ces régions, sauf pour certains groupes phylogénétiques qui contiennent des isolats spécifiques à une zone géographique distincte. Plusieurs auteurs ont étudié la distribution des variantes. Sharma *et al.* (2011) ont rapporté que 27% des *GLRaV-3* sont des variants du groupe I et 31% du groupe II et III. Cette distribution peut être due à la grande commercialisation du matériel végétal infecté par ces variants ou bien par la spécificité des vecteurs à certains variants. D'autres études sont nécessaires pour comprendre la distribution des variants génétiques du *GLRaV-3*.

Nous pouvons conclure qu'une grande enquête est nécessaire sur les cépages autochtones à travers le monde pour une meilleure compréhension de la diversité génétique du *GLRaV-3*. Les isolats 43-15, 139, TU32 et WA C5-1 révèlent un nouveau regroupement du *GLRaV-3* et suggère que la variabilité génétique de cette population est plus complexe qu'elle n'est considérée et la recherche de nouveaux isolats dans différentes zones géographiques peut révéler de nouveaux variants. D'autres études sont nécessaires pour déterminer les spécificités biologiques des différents variants génétiques et l'effet des mutations sur leur virulence.

IV.4 Etude de la diversité génétique du *GLRaV-2*

IV.4.1 Résultats

IV.4.1.1 Comparaison nucléotidique et étude phylogénétique

Au cours de cette étude, nous avons réalisé une RT-PCR et sept isolats du *GLRaV-2* ont été séquencés ce qui représente les premiers isolats séquencés provenant de l'Algérie. En vue de cerner les relations phylogénétiques de ces isolats, une comparaison au niveau nucléotidique a été réalisée avec des séquences représentatives de chaque groupe décrit par Jarugula *et al.* (2010). Les résultats obtenus montrent que les isolats algériens présentent des pourcentages d'identité variant entre 97% et 100%.

La comparaison des isolats algériens avec les isolats représentatifs des différents groupes a révélé 98% à 100% d'identité avec les isolats OR1 et PN, 74% à 75% d'identité avec la PV20 isolats et BD, 71% à 72% d'identité avec *GRSLaV*, 86% à 87% d'identité avec l'isolat 93/955, et 85% à 86% d'identité avec l'isolat *GLRaV-2-SG* (tableau 10). Cette analyse suggère que tous les isolats algériens obtenus appartiennent au groupe PN. Pour confirmer cette constatation, nous avons réalisé un arbre phylogénétique.

Tableau 10 : Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et certains isolats de chaque groupe phylogénétique.

	<i>ALG7</i>	<i>ALG9</i>	<i>ALG19</i>	<i>ALG22</i>	<i>ALG53</i>	<i>ALG55</i>	<i>ALG93</i>	<i>PV20_</i>	<i>ORI_</i>	<i>GRSLaV</i>	<i>BD</i>	<i>PN</i>	<i>93/955</i>	<i>GLRaV-2-SG</i>
<i>ALG7</i>	ID	98%	99%	97%	98%	99%	99%	74%	98%	71%	75%	99%	86%	85%
<i>ALG9</i>	98%	ID	99%	98%	99%	98%	99%	74%	99%	72%	74%	99%	86%	85%
<i>ALG19</i>	99%	99%	ID	99%	99%	99%	100%	75%	99%	72%	75%	100%	87%	86%
<i>ALG22</i>	97%	98%	99%	ID	98%	98%	99%	74%	99%	72%	74%	99%	86%	86%
<i>ALG53</i>	98%	99%	99%	98%	ID	98%	99%	74%	99%	72%	75%	99%	86%	86%
<i>ALG55</i>	99%	98%	99%	98%	98%	ID	99%	75%	99%	71%	75%	99%	87%	85%
<i>ALG93</i>	99%	99%	100%	99%	99%	99%	ID	74%	100%	72%	75%	100%	86%	86%
<i>PV20_</i>	74%	74%	75%	74%	74%	75%	74%	ID	74%	71%	74%	74%	77%	74%
<i>ORI_</i>	98%	99%	99%	99%	99%	99%	100%	74%	ID	72%	74%	100%	86%	86%
<i>GRSLaV</i>	71%	72%	72%	72%	72%	71%	72%	71%	72%	ID	81%	72%	71%	72%
<i>BD</i>	75%	74%	75%	74%	75%	75%	75%	74%	74%	81%	ID	75%	74%	77%
<i>PN</i>	99%	99%	100%	99%	99%	99%	100%	74%	100%	72%	75%	ID	86%	86%
<i>93/955</i>	86%	86%	87%	86%	86%	87%	86%	77%	86%	71%	74%	86%	ID	85%
<i>GLRaV-2-SG</i>	85%	85%	86%	86%	86%	85%	86%	74%	86%	72%	77%	86%	85%	ID

IV.4.1.2 Etude phylogénétique

L'analyse phylogénétique révèle la présence de six groupes distincts. Les groupes PN et H4 représentent les groupes les plus importants de cette population. Le groupe de RG contient les isolats provenant du cépage Red Glob obtenu en Californie. Les groupes PV20, BD et 93/955 sont moins représentés (Figure 28).

L'arbre phylogénétique révèle que tous les isolats algériens collectés dans différentes régions viticoles font partie du groupe PN. La majorité des séquences téléchargées aléatoirement à partir de *GenBank* se regroupent dans les groupes PN et H4 qui sont issus essentiellement d'Europe et d'Amérique du Nord.

Une analyse de la similitude entre les isolats de chaque groupe et entre les groupes a été menée à l'aide du logiciel MEGA6. Les résultats montrent que le groupe PN présente 99% d'identité. Le groupe H4 présente une identité de 95%. Les groupes RG, BD et 93/955 présentent respectivement 96%, 98% et 100% d'identité. L'étude de la similitude entre groupes a permis de révéler que le groupe PN présente 70-86% avec les autres groupes, de 72 à 78% pour le groupe BD, 71-86%, 69-78%, 69-74% et 71-86% respectivement pour H4, RG, PV20 et 93 / 955 (tableau 10). Ainsi, les groupes définis dans cette étude présentent des différences nucléotidiques considérables.

Table 10 : Pourcentage d'identité moyenne des séquences du HSP70h à l'intérieur des groupes et entre les groupes.

Isolats	<i>Pourcentage d'identité moyenne à l'intérieur des groupes</i>						<i>Pourcentage d'identité moyenne entre groupes</i>					
	BD	PN	H4	RG	93/955	PV20	BD	PN	H4	RG	PV20	93/955
Distance	98%	99%	95%	96%	100%	100%	72-78%	70-86%	71-86%	69-78%	69-74%	71-86%

IV.4.1.3 Courbe de similitude du *GLRaV-2*

Une courbe de similitude a été élaborée à l'aide du logiciel *Simplot* 3.2 pour les isolats représentatifs de chaque groupe. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 29 montrant les différences nucléotidiques existantes entre les groupes tout au long du génome. La figure 29 révèle que l'isolat PN (violet) est distant des autres isolats et les isolats H4 (bleu) et 93/955 (marron) sont plus ou moins reliés. Il en est de même pour les isolats des groupes BD (noir) et RG (jaune). Ainsi, les courbes de similitudes obtenues confortent les résultats de la comparaison nucléotidique entre les groupes qui montrent clairement que le groupe PN est considérablement distant des autres groupes et que les groupes H4 et 93/955 sont relativement proche, comme c'est le cas aussi pour les groupes BD et RG. Cependant, l'absence de résultats pour le groupe PV20 est due à l'absence de séquence du génome entier d'un isolat de ce groupe.

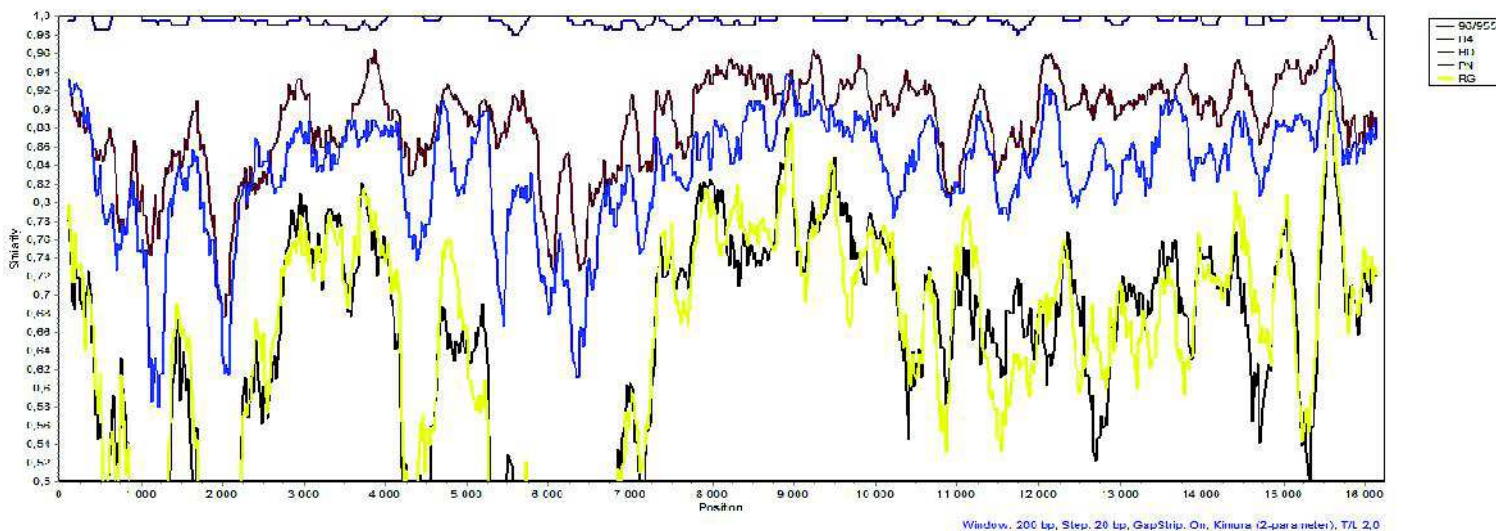


Figure 29. Courbe de similitude construite à partir d'un alignement multiple du génome entier de cinq isolats représentative des différents groupes du *GLRaV-2*.

IV.4.1.4 Etude de la pression de sélection

La valeur moyenne du dN/dS obtenue avec la méthode SLAC et REL est supérieure à 1, suggérant ainsi l'apparition de sélection positive. En effet, la méthode SLAC révèle un rapport dN/dS = 1,81 avec la présence de certains sites évoluant sous une sélection positive et d'autres sous une sélection négative. La même constatation a été faite pour la méthode REL avec laquelle nous avons obtenu un rapport dN/dS = 3,71 avec certains sites évoluant sous la sélection positive et d'autres sous la sélection négative. Une courbe des résultats de chaque site a été élaborée avec le logiciel *Datamonkey* pour la méthode SLAC indiquant les sites évoluant sous une sélection positive et négative. Ainsi, la figure 30,

indique que le nombre de sites évoluant sous une sélection positive est plus important que les sites évoluant sous une sélection négative.

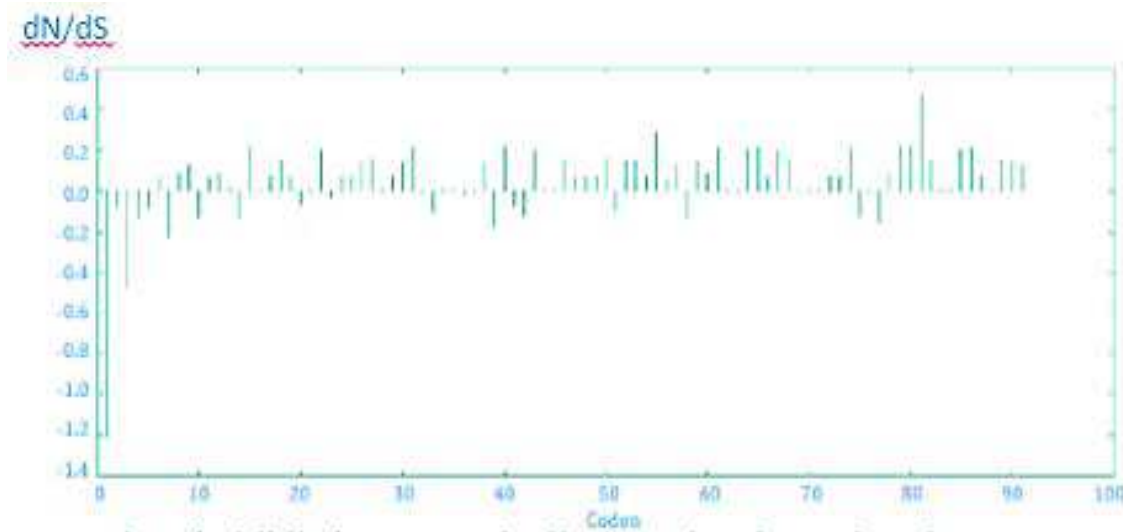


Figure 30 : Site évoluant sous une sélection positive et négative.

IV.4.2 Discussion.

Plusieurs auteurs ont étudié la variation génétique des *GLRaV-2*. Sur la base de l'analyse du gène CP, Bertazzon *et al.* (2010) ont rapporté cinq groupes. Dans la même année, Jarugula *et al.* (2010) ont rapporté six groupes. Dans cette étude, l'analyse phylogénétique du gène HSP70h révèle la présence de six groupes confirmant les études précédentes. En effet, la comparaison au niveau nucléotidique révèle que les groupes décrits présentent moins de 86% de similitude entre eux et la similarité au sein des groupes révèle une identité de plus de 95%. En outre, la courbe de similitude révèle cinq variants distincts, sauf pour le variant PV20 en raison de l'absence de séquence du génome complet. Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Jarugula *et al.* (2010), qui fait état d'une identité de séquence interlignage entre les groupes PN, 93/955, et H4 allant de 83 à 86% et entre les groupes PV20, BD et RG de l'ordre de 68 à 80%.

L'arbre phylogénétique révèle que tous les isolats algériens provenant de régions éloignées sont rangés dans un même groupe, indiquant ainsi, l'absence de corrélation entre la distribution géographique et la distribution phylogénétique. Plusieurs auteurs rapportent l'absence de corrélation entre la distribution géographique et la structure phylogénétique pour le *GLRaV-2* (Bertazzon *et al.*, 2010 ; Beuve *et al.*, 2007 ; Jarugula *et al.*, 2010). Cette observation peut être due à la grande circulation de portes greffes infectés. En effet, une grande enquête sur les populations autochtones et sauvages est nécessaire pour une meilleure compréhension de la variation génétique du *GLRaV-2* et de mettre en évidence de nouveaux variants génétiques.

Après la dévastation des vignobles du pourtour méditerranéen, de grandes importations de portes greffes provenant d'Amérique du nord ont été entreprises. Ceci peut expliquer l'importance des groupes PN et H4 composés essentiellement d'isolats américains.

La stabilité génétique des virus peut être attribuée à une sélection négative ou de purification qui tend à maintenir l'intégrité fonctionnelle du génome viral. Cependant, plusieurs genres ont été signalés comme évoluant sous sélection positive (les genres Aureusvirus, Carmovirus, dianthovirus, Necrovirus et Tombuvirus). Jarugula *et al.* (2010) ont rapporté que le gène HSP70h évolue sous une sélection négative avec $dN / dS < 1$. Dans notre étude, nous avons constaté que ce gène évolue sous sélection positive. En effet, nous avons obtenu un rapport moyen dN/dS supérieur à 1 ($DN / DS = 1,81$ pour SLAC et $dN / dS = 3,71$). Les résultats révèlent également que certains sites sont sous sélection neutre et d'autres sous sélection négative. Cela peut être dû au fait que certains sites dans le gène HSP70h sont exposés aux mutations qui sont maintenues dans la population et d'autres sont stables et ne subissent aucune mutation. Ainsi, il est nécessaire de faire des études sur la prédisposition d'un codon donné aux mutations génétiques. La sélection positive obtenue peut s'expliquer par des changements de la composition en acides aminés dans certains sites aboutissant à la formation de groupes d'isolats ayant la même composition en acides aminés. Il est intéressant de connaître l'effet de ces mutations sur l'interaction du virus et de son hôte. En effet, ces mutations peuvent expliquer les différences de virulence entre les différents variants. Bertazzon *et al.*, (2010) ont rapportés que les isolats du groupe BD étaient moins virulents et étaient incapables d'induire une incompatibilité au greffage et ils causent rarement des symptômes d'enroulement. En revanche, les isolats du groupe RG semblaient plus virulents. Ainsi, l'étude des variations génomiques peuvent conduire à la connaissance des mécanismes de virulence et pourra contribuer à une meilleure compréhension de l'interaction plante-virus pour un meilleur contrôle de la maladie et la mise au point de méthodes de lutte plus appropriées.

L'absence d'événements de recombinaison peut être expliquée par le fait que chaque cèp est infecté par un seul variant limitant ainsi les échanges génomiques entre les variants éloignés. En effet, les résultats révèlent la présence d'un seul variant en Algérie. Une étude plus approfondie pour la recherche de nouveaux variants génétiques du *GLRaV-2* s'avère nécessaire pour pouvoir évaluer la diversité génétique de ce virus par les méthodes de screening comme la SSCP.

Conclusion Générale

V. Conclusion générale

Le travail réalisé au cours de cette thèse nous a permis d'avoir une vue d'ensemble sur la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie. Ainsi, les résultats obtenus montrent clairement que les symptômes d'enroulement observés lors des prospections de septembre 2012 sont dus à la présence de virus associés à la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne. De ce fait nous avons pu mettre en évidence l'étiologie de cette maladie.

L'étude menée au cours de cette thèse a permis de mettre en évidence l'existence de trois virus associés à cette maladie grâce à des analyses sérologiques et moléculaires (RT-PCR) vis-à-vis du GLRaV-1, -2 et -3. L'analyse sérologique nous a permis d'étudier la prédominance de chaque virus. Les résultats montrent que le GLRaV-3 est le virus le plus répandu en Algérie suivi par le GLRaV-2 puis du GLRaV-1 et révèle que l'association du GLRaV-2 et du GLRaV-3 est plus importante que celle du GLRaV-1 avec le GLRaV-3.

L'analyse moléculaire RT-PCR a été réalisée pour les trois virus et a confirmé les résultats obtenus lors du test sérologique DAS-ELISA, puis une SSCP a été réalisée pour le GLRaV-3 et a mis en évidence l'existence de trois variants génétiques de ce virus. Quelques isolats du GLRaV-3 et du GLRaV-2 ont été sélectionnés pour être séquencés. Les séquences ont été inscrites dans la banque de gène ENA.

Une comparaison au niveau nucléotidique a été réalisée pour le GLRaV-2 et le GLRaV-3. Les résultats obtenus pour le GLRaV-3 ont révélé des similitudes importantes entre certains isolats et des divergences entre groupes de séquences suggérant l'existence d'une ségrégation des isolats algériens en trois groupes. Cette ségrégation des isolats algériens est en concordance avec la ségrégation obtenue lors de la SSCP. Une étude phylogénétique a été réalisée pour mettre en évidence la structure de la population du GLRaV-3 et la distribution des isolats analysés dans les différents groupes phylogénétiques. Les résultats montrent une distribution identique pour les deux gènes et conforme à la distribution obtenue lors de la SSCP et de la comparaison nucléotidique. De ce fait, la SSCP et la comparaison nucléotidique peuvent être considérées comme des méthodes efficaces dans le screening de la variabilité génétique. L'étude phylogénétique du GLRaV-3 nous a permis de confirmer les résultats obtenus par divers auteurs tout en suggérant la possibilité d'existence de nouveaux groupes phylogénétiques qui n'ont pas été signalés précédemment. Ainsi, la structure phylogénétique du GLRaV-3 doit

être revue au fur et à mesure du séquençage de nouveaux variants essentiellement à partir de vignes autochtones spontanées et cultivées.

Les isolats du GLRaV-2 séquencés au cours de cette étude montrent qu'ils présentent de grandes similitudes au niveau nucléotidique. L'étude phylogénétique révèle qu'ils appartiennent au même groupe phylogénétique. Ceci peut être dû au fait que ce virus se propage via le matériel végétal et la présence d'un seul variant en Algérie limite les recombinaisons génétiques entre différents variants. Ainsi, l'homogénéité de cette population peut être la cause de sa stabilité génétique en Algérie. Cependant, il est nécessaire de mener des études sur les vignes spontanées pour la recherche de nouveaux variants. En effet, l'étude phylogénétique menée au cours de cette étude révèle l'existence de 6 groupes phylogénétiques distants.

Ce travail constitue la première étude menée sur la variabilité génétique des virus de l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie (GLRaV-2 et GLRaV-3) et ouvre la voie pour l'étude de la variabilité génétique des autres virus de l'enroulement foliaire de la vigne et la recherche de nouveaux variants dans des vignes autochtones cultivées et spontanées.

Pour une meilleure compréhension de la prédominance des virus étudiés, il est nécessaire de réaliser des recherches sur les modes de propagation de ces virus en Algérie par la mise au point de l'état sanitaire des parcs à bois et le circuit du matériel végétal à travers le territoire national ainsi que sur les différents vecteurs et leur rôle dans la dissémination des virus.

Références

Références.

- Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S., Gugerli P., Rowhani A.** 2012. Genome organization, serology and phylogeny of grapevine leafroll-associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications. *Virus Research* **163**: 120-128.
- Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Sabanadzovic, S., Uyemoto, J. K., Golino, D., and Rowhani, A.** 2010. A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Arch. Virol.* **155**, 1871–1876.
- Al Rwahnih M., Dolja V.V., Daubert S., Koonin E.V., Rowhani A.,** 2012. Genomic and biological analyses of a virus from a symptomless grapevine support a new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus Research*. **163**: 302-309.
- Alabi O. J., Gutha L. R., Casassa L. F., Harbertson J., Mirales M., Beaver C. W., et al.** 2012. “Impacts of grapevine leafroll disease on own-rooted wine grape cultivar in cool climate viticulture,” in Proceedings of the 17th Congress of ICVG 7-14 October (Davis: Foundation Plant Services), 170–171
- Alabi O.J., Al Rwahnih M., Karthikeyan G., Poojari S., Fuchs M., Rowhani A., Naidu R.A.** 2011. *Grapevine leafroll-associated virus 1* occurs as genetically diverse populations. *Phytopathology*.101: 1446–1456
- Alkowni R., Rowhani A., Daubert S., Golino D.** 2004. Partial characterization of a new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Journal of Plant Pathology*. **2**: 123–133.
- Angelini E., Bertazzon N., Borgo M.** 2004. Diversity among *Grapevine Leafroll-associated Virus 2* detected by Heteroduplex Mobility Assay. *J. Phytopathol.* **152**:416-422.
- Astier S., Albouy J., Maury Y.,** 2001, Principes de virologie végétale Génome, pouvoir pathogène, écologie, INRA de France
- Atallah S.S., Gómez M.I., Fuchs M.F., Martinson T.E.** 2012. Economic Impact of Grapevine Leafroll Disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes Vineyards of New York. *Am. J. Enol. Vitic.* **63**. 73-79
- Beidler, J.L., Hilliard, P.R., and Rill, R.L.** 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.* **126**: 374-380.
- Bertamini M., Malonini U., Kriskinasamy M. et Nedunchezian N.** 2005. Physiological response of field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Marzemino) to grapevine leafroll-associated virus (*GLRaV-1*). *Phytopathol. Mediterr.* **44**, 256–265
- Bertamini M., Muthuchelian K. et Nedunchezian N.** 2004. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology*. **152**:145–152.
- Bertazzon N., Borgo M., Vanin S., Angelini E.** 2010. Genetic variability and pathological properties of *Grapevine leafroll associated virus -2* isolates. *European Journal of Plant Pathology* **127**:185-197

- Beuve M., Sempé L., Lemaire O. A.** 2007. Sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *Journal of Virological Methods*. 141:117-124,.
- Cabaleiro C. et Segura A.** 2006. Temporal analysis of *grapevine leafroll associated virus 3* epidemics. *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 441-446.
- Charles J.G., Cohen D., Walker J.T.S., Forgie S.A., Bell V.A., Breen K.C.** 2006. A review of the ecology of Grapevine Leafroll associated Virus type 3 (GLRaV-3). *New Zealand Plant Protection Society* 59 : 330-337.
- Chooi K. M., Cohen D., et Pearson M. N.** 2013. Molecular characterization of two divergent variants of Grapevine leafroll-associated virus 3 in New Zealand. *Arch. Virol.* 158 :1597-1602
- Choueiri E., D. Boscia, M. Digiario, M.A. Castellano and Martelli G.P.** 1996. Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis*. 35, 91–93
- Clark M. F., and Adams A. N.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Cohen D., Chooi K. M., Bell V. A., Blouin A. G., Pearson M. N., et MacDiarmid R. M.** 2012. “Detection of new strains of GLRaV-3 in New Zealand using ELISA and RT-PCR,” in Proceedings of the 17th Congress of ICVG 7–14 October (Davis: Foundation Plant Services), 118–119.
- Cooper I., Jones R. A. C.** 2006. Wild plants and viruses: under-investigated ecosystems. *Advances in Virus Research*. 67:1–47.
- Credi R. et Babini A.R.** 1997. Effects of virus and virus-like infections on growth, yield and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 48: 7-12.
- Dubos, B.** 2002. *Maladies cryptogamiques de la vigne*. 2nd ed. Féret, Bordeaux. P208.
- Dufour M. C.** 2011. Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis* induites par élévation face à la diversité génétique de bioagresseurs, thèse, Bordeaux. p366
- Engelbrecht D. J., Kasdorf G. G. F.** 1990. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closterovirus by the nive mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica*. 22: 341-346
- Faoro F., Tornaghi R., Belli G.** 1981. Association of a possible closterovirus with grapevine leafroll in northern Italy. *J. Plant Pathol.* 17 :183–189.
- Farooq A. B. U., Ma Y. X., Wang Z., Zhuo N., Wenxing X., Wang G. P., et al.** 2013. Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in *Grapevine leafroll-associated virus 3* in China. *Virus Res.* 171 :15–21
- Fauquet C. M. et Stanley J.** 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: a review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Arch Virol.* 150 : 2151–2179.

- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq M.J., Candresse T., 2001.** Polyvalent detection of Tricho-, Capilloand Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*. 550: 37-44.
- Fuchs, M., Masella-Herrick, P., Loeb, G. M., Martinson, T. E., Hoch, H. C. 2009.** Diversity of *Ampeloviruses* in mealybug and soft scale vectors and in grapevine hosts from leafroll-affected vineyards. *Phytopathology*, 99: 1177–1184.
- Gambino G. et Gribaudo I.** 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex RT-PCR with coamplification of a plant RNA internal control. *Phytopathology*. 96:1223–1229
- Goheen A. C., Harmon F. N., Weinberger J. H.** 1958. Leafroll (White Emperor disease) of grapes in California. *Phytopathology* 48 51
- Golino D. A.,** 1993. Potential interactions between rootstocks and grapevine latent viruses. *American Journal of Enology and Viticulture*. 44: 148-152.
- Golino D. A., Sim S. T., Rowhani A.** 2003. “The role of rootstock genotype in the effects of single and mixed infection of grapevine viruses,” in Proceedings of the 14th Congress of ICVG 12–17 September (Locorotondo: University of Bari). 246–247
- Goszczynski D. E.** 2013. Brief report of a new highly divergent variant of Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Journal of Phytopathology*. 161(11–12): 874–879
- Goszczynski D. E., et Jooste A. E. C.** 2002. The application of single strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of *Grapevine* virus A. *Vitis* 41: 77-82.
- Gouveia P., Nolasco G.** 2012. The p19.7 RNA silencing suppressor from *Grapevine leafroll-associated virus 3* shows different levels of activity across phylogenetic groups. *Virus Genes*. 45 : 333–339
- Gouveia Paulo, Santos Margarida Teixeira, Eiras-Dias Jose Eduardo, Nolasco Gustavo.** 2011. Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties, *Archives of Virology*, 56, (3): 413-420
- Gugerli P. et Ramel M. E.** 1993. “Grapevine leafroll-associated virus II analysed by monoclonal antibodies,” in Proceedings of the 11th Congress of ICVG 5–10 September (Montreux: Federal Agricultural Research Station of Changins). 23–24
- Gugerli P., Brugger J. J., Bovey R.** 1984. L’enroulement de la vigne: mise en évidence de particules virales et développement d’une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide. *Rev. Suisse Vitic. Arboric Hortic.* 16:299–304
- Gugerli P., Brugger J. J., Ramel M. E.** 1997. Identification immuno-chimique du sixième virus associé à la maladie de l’enroulement de la vigne et amélioration des techniques de diagnostic pour la selection sanitaire en viticulture. *Rev. Suisse Vitic. Arboric Hortic.* 29 :137–141
- Hu J. S., Gonsalves D., Teliz D.** 1990. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease. *J. Phytopathol.* 128 :1-14

Jarugula S., Alabi O.J., Martin R.R., Naidu A. 2010. Genetic variability of natural populations of *Grapevine leafroll-associated virus 2* in Pacific Northwest vineyards. *Phytopathol.* 100: 698 -707.

Jean Baptiste Pierre Antoine de Monet de Lamarck, Jean Louis Marie Poiret. 1785. Encyclopédie méthodique botanique. Tome1. Panckoucke, 1808. P :458

Jooste A. E. C., Goszczynski D. E. 2005. Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing reveal two major groups of divergent molecular variants of *Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)*. *Vitis.* 44(1):39-43

Jooste, A. E. C., Maree, H. J., Bellstedt, D. U., Goszczynski, D. E., Pietersen, G., and Burger, J. T. 2010. Three Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR. *Arch. Virol.* 155 : 1997–2006

Jordan D. 1993. Leafroll spread in New Zealand vineyards. *Australian and New Zealand*

Karasev, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 38: 293-324.

Kim K.S., Gonsalves D., Teliz D. and Lee K.W. 1989. Ultrastructure and mitochondrial vesiculation associated with closterovirus-like particles in leafroll-diseased grapevines. *Phytopathology.* 79:357-360..

Komínek P, Glasa M, Bryxiová M., 2005. Analysis of the molecular variability of Grapevine leafroll- associated virus 1 reveals the presence of two distinct virus groups and their mixed occurrence in grapevines. *Virus Genes* 3, 247-255.

Kosakovsky Pond, S.L., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, Ch.H., Frost, S.D.W., 2006. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. *Mol. Biol. Evol.* 23, 1891-1901.

La Notte P., Buzkan N., Choueiri E., Minafra A., Martelli G.P. 1997. Acquisition and transmission of grapevine virus A by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *Journal of Plant Pathology.* 78 : 79-85.

Le Maguet J. 2012. Epidémiologie de l'enroulement viral de la vigne dans les vignobles français septentrionaux et transmission par cochenilles vectrices. Thèse doctorat CIFRE, Université Strasbourg. 204 p.

Lee, J., & Martin, R. R. 2009. Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics. *Food Chemistry.* 112 : 889–896.

Lehad A., 2012. Etude du complexe viral associé à l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie, Institut National Agronomique d'El-Harrache.

Lekikot A K., Elbeaino T., Ghezli C., et Digiario M. “Preliminary Survey of Grapevine Viruses in Algeria” Proceedings of the 17th Congress of ICVG. 2012 October 7–14. Davis: Foundation Plant Services.

- Levadoux L., Benabderrabou A. et Douaouri B.** 1971. Ampélographie algérienne : cépages de table et de cuve cultivés en Algérie. société nationale d'édition et de diffusion. 118 p.
- Ling K. S., Zhu H. Y., Drong R. F., Slightom J. L., McFerson J. R., Gonsalves D.** 1998. Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus 3 genome reveals a typical monopartite closterovirus. *J. Gen. Virol.* 79, 1299–1307.
- Ling K. S., Zhu H. Y., Gonsalves D.** 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus Ampelovirus. *J. Gen. Virol.* 85 : 2099–2102.
- Maliogka V. Dovas C., Katis N.** 2008. Evolutionary relationships of virus species belonging to a distinct lineage within the Ampelovirus genus. *Virus Research* 135 , 125–35
- Maliogka V. I., Dovas C. I., Lotos L., Efthimiou K., Katis N. I.** 2009. Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus Ampelovirus. *Arch. Virol.* 154 : 209–218
- Maree H. J., Almeida R. P. P., Bester R., Chooi K. M., Cohen D., Dolja V. V., Fuchs M. F., Golino D. A., Jooste A. E. C., Martelli G. P., Naidu R. A., Rowhani A., Saldarelli P., et Burger J. T.** 2013. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Front. Microbiol.* 4:82.
- Martelli G, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja V, Falk B, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev A, Minafra A, Namba S, Vetten H, Wisler G and Yoshikawa N., 2002.** The family Closteroviridae revised. *Archives of Virology.* 147: 2039–2044
- Martelli G. P.** 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathol.* 96 (supplement 1): 1-136.
- Martelli G. P., Agranovsky A. A., Al Rwahnih M., Dolja V. V., Dovas C. I., Fuchs M., et al.** 2012. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *J. Plant Pathol.* 94, 7–19.
- Martelli G. P., Agranovsky A. A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R. H. A., et al.** 2011. “Family Closteroviridae,” in *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, eds King A., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E., editors. (Amsterdam: Elsevier-Academic Press;) : 987–1001
- Martelli, G. P.** 1993 : Graft-transmissible Diseases of Grapevines . Handbook for Detection and Diagnosis. *FAO Publication Division, Rome.*
- Martelli, G.P. & Boudon-Padieu E.** 2006. Directory of infectious diseases of grapevines. International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies. *Options Méditerranéennes Ser. B, Studies and Research.* 55: 59-75.
- Martinson, T., Fuchs, M., Loeb, G. and Hoch, H.** 2008. Grapevine Leafroll – an Increasing Problem in the Finger Lakes. Finger Lakes Vineyard Notes, Cornell University Cooperative Extension. 6: 6-11
- Mendgen K.** 1971. Studies on a yellows disease of vines along the Rhein, Mosel and Saar. *Weinberg und Keller.* 18: 345 - 431.

- Monis J., 2000**, Development of monoclonal antibodies reactive to a new grapevine leafroll-associated closterovirus. *Plant Dis.* **8**: 858-862.
- Moury B., Desbiez C., Jacquemond M. et Lecoq H.** 2006. Genetic diversity of plant virus populations: towards hypothesis testing in molecular epidemiology. *Adv Virus Res.* **67** : 49–87
- Moutinho-Pereira J., Correia C.M., Goncalves B., Bacelar E.A., Coutinho J.F., Ferreira H.F., Lousada J.L., Cortez M.I.** 2012. Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and -3) on the physiology of the Portuguese grapevine cultivar ‘Touriga Nacional’ growing under field conditions. *Ann. Appl. Biol.* **160**: 237– 249.
- Naidu R.A., Perry E.M., Pierce F.J. and Mekuria T.** 2009. The potential of spectral reflectance technique for detecting *Grapevine leafroll-associated virus-3* in two red-berried wine grape cultivars. *Computers and Electronics in Agriculture.* **66**: 38-45.
- Namba S., Yamashita S., Doi Y., Yora K. et Yang R.** 1979. Grapevine Leafroll virus, a possible member of closteroviruses. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan.* **45**: 497-502.
- Narayanasamy P.** 2011. Crop disease management- principles and practices. New India publishing Agency, New Delhi.
- Nimmo-Bell.** 2006. The economic effects and financial impact of GLRaV-3. Nimmo-Bell and Co. Ltd, Hastings, New Zealand. <http://www.nzwine.com/reports>
- Osman F. et Rowhani A.** 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods.* **133** : 130–136.
- Rodríguez-Cerezo E., Moya A. & García-Arenal F.** 1989. Variability and evolution of the plant RNA virus pepper mild mottle virus. *Journal of Virology.* **63** : 2198-2203
- Rosciglione B., Gugerli P.** 1989. Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret. *Proceedings 9th meeting of ICVG, Kiryat Anavim, Israel, 1987.* Pp: 67-69
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.
- Tomimura K., Gibbs A.J., Jenner C.E., Walsh J.A., Ohshima K.** 2003. The phylogeny of *Turnip mosaic virus*; comparison of 38 genomic sequences reveal a Eurasian origin and a recent ‘emergence’ in east Asia. *Molecular Ecology.* **12**: 209–211.
- Tsai C.-W., Rowhani A., Golino D.A., Daane K.M., Almeida R.P.P.** 2010. Mealybug transmission of grapevine leafroll viruses: An analysis of virus-vector specificity. *Phytopathology* **100**: 830-834.
- Turturo, C., Salderelli, P., Yafeng, D., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., et al.** 2005. Genetic variability and population structure of grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *J. Gen. Virol.* **86** : 217–224.
- Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R., Wickner R.B.** 2000.

Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Academic Press*, California, USA.

Vigne Emmanuelle, Bergdoll Marc , Guyader Sebastien et Fuchs Marc . 2004. Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *Journal of General Virology*. 85: 2435–2445

Voller A., Bartlett A., Bidwell D. E., Clark M. F. & Adams A. N. 1976. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. gen. Virology*. 33: 165-167.

Vuittenez A. 1985. Additions to the Inventory of virus and virus-like diseases of grapevine of French and foreign origin studied in France, with special reference to those studied in the Station de Pathologie Vegetale of INRA at Colmar. *Phytopathol. Medit.* 24: 114-122

Walter B., Zimmermann D. 1991. Further characterization of closterovirus-like particles associated with the grapevine leafroll disease. *Proceedings 10th Meeting of ICVG, Volos, Greece*. 1990: 62-66. *Wine Industry Journal*. 8(4): 322-324.

Woodham R. C. et Krake L. R. 1983. A comparison of grapevine summer mottle and vein mosaic disease. *Vitis*. 22 :247-252.

Zee F., Gonsalves D., Goheen A., Kim K. S., Pool R., Lee R. F. 1987. Cytopathology of leafroll-diseased grapevines and the purification and serology of associated closterovirus-like particles. *Phytopathology*. 77 : 1427–1434

Zhu H. Y., Ling K. S., Goszczynski D. E., McFerson J. R. et Gonsalves D. 1998. Nucleotide sequence and genome organization of grapevine leafroll-associated virus-2 are similar to beet yellows virus, the closterovirus type member. *J. Gen. Virol.* 79:1289-1298.

Zimmermann D., Sommermeyer G., Walter B. et Van Regenmort'elm. H. V. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies specific to closterovirus-like particles associated with grapevine Leafroll disease. *J. Phytopathol.* 130: 277-288.

Site internet

- <http://www.datamonkey.org/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- www.ebi.ac.uk/ena
- www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2
- <http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>
- <http://www.oiv.int/oiv/cms/index>
- <http://faostat3.fao.org>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>
- www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2

Annexes

Annexe

Annexe 1: cépage Autochtones de la collection ITAF de utilisé lors de cette étude

Ahmar machtras	Tiziounine
Ahchichene	Farana noir
Aberkane	Tadelith
Kabylie aldebert	Raisin de bouni
Adadi des bibans	Ahmar de mascara
Ain el couma	Ain el kelb
Farana	Muscat noir
Muscat d'adda	El awali
Toutrisin	Sid ahmed draa el mizane

Annexe 2 : Tampon du test sérologique

1 -Tampon phosphate (PBS)

(Ph7,4, pour 1000ml)

- 8 gr NaCl
- 0,2 gr KH_2PO_4
- 2,9 gr Na_2HPO_4
- 0,2 gr KCl
- 0,2 gr NaN_3

2- tampon d'extraction (Tris)

(Ph= 8,2, pour 1000ml)

- 60,5 gr Tris
- 8 gr NaCl
- 10 gr polyvinylpyrrolidone (PVP)
- 10 gr PEG
- 0,2 gr NaN_3
- 0,5 ml tween 20

3- tampon de sensibilisation

(Ph= 9,6, pour 1000ml)

- 1,5 gr Na_2CO_3
- 2,93 gr NaHCO_3
- 0,2 gr NaN_3

4- tampon de conjugaison

(Ph= 7,4, pour 1000ml)

- 1000 ml PBS
- 0,5 ml tween 20
- 20 gr PVP
- 2 gr BSA (Bovine Serum Albumine)

5- Tampon de substrats

(Ph= 9,8, pour 1000ml)

- 97 ml Diethanolamine
 - 0,2 gr NaN_3
- Ajuster le Ph avec HCl

6- tampon de lavage

(Ph= 7,4 pour 1000ml)

- 1000 ml PBS
- 0,5 gr Tween 20

Annexe 3 : Tampon RT-PCR

1- Tampon d'extraction des acides nucléique totaux

a- Tampon de broyage (pour 50 ml)

- 23,65 gr thieosanate Guanidine (4M)
- 1,36 gr NaOAc (0,2 M) Ph : 5,2-5,5
- 0,465 gr EDTA 25mM
- 4,9 gr KOAc 1,0 M
- 50 ml d'eau distillé stérile (ajouter lentement et avec attention)
- 1,25 gr PVP-40, 2,5 % (ajouter après avoir fait la stérilisation)
- 1,2 ml CH₃COOH pour ajuster le Ph (5,6- 5,8)

Le tampon peut être Stocké à 4°C pendant quelques mois

b- Tampon de lavage (pour 10ml)

- 100 µl tris HCl 1M pH 7,4
- 100µl EDTA 0,5M
- 10µl NaCl 5M
- 5 ml d'eau distillé
- Stérilisé le tout puis ajouter :
 - o 5ml éthanol absolu (la concentration finale doit être 50% éthanol)

Le tampon est conservé à 4°C.

c- Préparation du TBE (pour 1 L)

- o 121 gr tris
- o 61,3 gr acide borique
- o 3,7 gr EDTA

d- Préparation du NaI

- o 1,875 gr Na₂SO₃ distillé dans 30ml
- o 90 gr NaI distillé dans 50ml

Après dissolution compléter a 100ml puis mettre dans l'autoclave à 120°C pendant 30 minutes

e- préparation du grinding buffer, pH= 5,8. Pour un volume de 500ml.

- o 236,4 gr Guanidine thiocyanate (4M) dans 100ml \implies -I-
- o 8,203 gr NaOAc (0,2 M) Anhydre dans 100ml \implies -II-
- o 4,653 gr EDTA (25mM) \implies -II-
- o 49,07 gr KOAc (1M) \implies -III-
- o Mélange des composés -I- et -II- jusqu'à dissolution puis ajouter le composé -III-
- o Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique.

- Ajuster le volume jusqu'à 500ml
- Mettre à l'autoclave 120°C pendant 20min
- Ajouter 2,5% de Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40)

f- Préparation du silica (silica dioxyde).

- 60 gr de silica dans 500ml d'eau distillé
- Laisser 24 heures en température ambiante
- Jeter 470ml du surnageant
- Compléter le reste (30ml) jusqu'à 500ml avec de l'eau distillé
- Agiter jusqu'à dissolution du culot
- Déposer pour décantation pendant 5 heures
- Jeter 440 ml du surnageant
- Ajuster les 60 ml restante à un pH de 2,0 avec du HCl
- Autoclave à 120°C pendant 20min puis stockage à 4°C

Annexe 4. Tampon utilisés lors de la SSCP

- Tampon de dénaturation

- 190 μ L formamide
- 8 μ L EDTA (0,5M)
- Colorant

- PAGE 8% (Gel Polyacrylamide)

- H₂O 7ml
- Polyacrylamide
- TBE 10X
- APS 10 μ L
- TEMED 10 μ L

- Coloration du gel

- Acide acétique (10%)
- Acide nitrique (1%)
- Nitrate d'Argent (0.15gr pour 100ml H₂O)
- Formamide (150 μ L pour 100mL H₂O)
- Na₂CO₃ dans 100mL H₂O
- Thiosulfate de sodium (2%)
- Acide acétique (10%)

Annexe 5: Numéro d'accèsion des isolats analysés lors de l'étude phylogénétique du *GLRaV-3* pour le gène HSP70h et gène CP.

N° accession	Isolat	Groupe	N° accession	Isolat	Groupe
CP			HSP70h		
AF037268.2	NY-1	I	AF037268.2	NY-1	I
AJ606338.1	AUSG_5.1	I	HG931884	ALG63*	I
AJ606346.1	TA_3.3	I	HG931887	ALG112*	I
JN546587.1	G11	I	GQ352631.1	621	I
JF421961.1	7-1005	I	EU344893.1	Cl-766	I
JF421927.1	39-9	I	AJ748518.1	MT_48-1	I
JF421886.1	35-6	I	AJ748521.1	MT_48-4	I
JF421814.1	20-5	I	DQ780885.1	WA_C1-1	I
HQ130304.1	6-115	I	DQ780886.1	WA_C2-1	I
HQ130297.1	6-11	I	DQ780887.1	WA_C3-1	I
GQ352631.1	621	I	DQ780888.1	WA_C4-1	I
GU983863.1	WA-MR	I	DQ780890.1	WA_C6-1	I
DQ680142.1	Pet-2	I	DQ780891.1	WA_N1-1	I
DQ062152.1	Pet-3	I	AJ748511.1	AUSG_5-4	I
EU344893.1	Cl-766	I	AJ748512.1	AUSG_5-5	I
HG931892	ALG63*	I	AJ748515.1	SY_2-2	I
HG931895	ALG112*	I	AJ748517.1	SY_2-7	I
AJ606353.1	TU_16	I	AJ748524.1	IL_1	I
AJ606351.1	MT_48	I	AJ748523.1	USA_6	I
AJ606339.1	AUSG_5.2	II	HG513042.1	ALG48*	I
AJ606340.1	USA	II	HG513043.1	ALG53*	I
AJ606345.1	TA_3.1	II	GQ344828.1	FVCS	I
JF421908.1	38-14	II	GQ344820.1	HCSY_clone_2	I
JF421904.1	38-10	II	GQ344817.1	RCME_clone_1	I
JF421811.1	20-2	II	GQ344811.1	CDCH_clone_2	I
JF421766.1	13-1	II	GQ344807.1	BVCS_clone_1	I
HQ130294.1	3-23	II	JX559645.1	3138-07	I
GQ352632.1	623	II	GU983863.1	WA-MR	I
HM059034.1	IS2	II	HG931880	ALG2*	II
EU259806.1	GP18	II	HG931881	ALG9*	II
AY753208.1	Pet-4	II	HG931882	ALG25*	II
HG931889	ALG2*	II	HG931883	ALG28*	II
HG931890	ALG9*	II	HG931885	ALG68*	II
HG931893	ALG68*	II	HG931888	ALG114*	II
HG931896	ALG114*	II	EU259806.1	GP18	II
JF421944.1	41-3	III	GQ352632.1	623	II
JF421940.1	41-17	III	AJ748513.1	AUSG_5-6	II
JF421841.1	24-6	III	AJ748516.1	SY_2-4	II
JF421837.1	24-1	III	GQ344818.1	RCME_clone_2	II
JF421824.1	22-11	III	AJ748510.1	AUSG_5-2	II
JF421810.1	20-13	III	HG931886	ALG71*	III
JF421805.1	19-7	III	GQ352633.1	PL-20	III
JF421784.1	16-12	III	AJ748519.1	MT_48-2	III
JF421767.1	13-14	III	AJ748520.1	MT_48-3	III
HQ130323.1	8-26	III	GQ344822.1	HCSY_clone_4	III
HQ130320.1	8-19	III	JQ423939.1	LN	III
GQ352633.1	PL-20	III	GQ344825.1	SPCH_clone_3	Sub1
HG931894	ALG71	III	DQ780889.1	WA_C5-1	Sub1
AJ606347.1	SS_5.2	III	AJ748522.1	TU_32	Sub2
JQ423939.1	LN	III	GQ344812.1	CVLM_clone_1	Sub2
HQ401015.1	Terrantez_da_Terceira-2	IV	GQ344810.1	CDCH_clone_1	Sub2
HQ130310.1	7-112	IV	GQ344809.1	BVCS_clone_3	Sub2
JF421820.1	21-14	V	GQ344808.1	BVCS_clone_2	Sub2
HQ401016.1	Trincadeira-12	V	EF508151.1	NZ-1	VI

EU344894.1	CI-817_35	V	JQ655295.1	GH11	VI
JX220900.2	NZ1-B	VI	JQ655296.1	GH30	VI
JQ655296.1	GH30	VI	JX220900.2	NZ1-B	VI
JQ655295.1	GH11	VI	JQ796828.1	clone 3	VI
JF421958.1	44-2	VI	JX266782.1	139	
JF421827.1	22-15	VI	JX220899	NZ2	VII
JF421818.1	21-12	VI			
JX220899.2	NZ2	VII			
JF421951.1	43-15				
HG931891	ALG25*				

- Isolats algérien séquencé au cours de cette étude.

Annexe 6 : Nom, origine et numéro d'accèsion des séquences des isolats du *Grapevine leafroll-associated virus 2* téléchargé à partir de GenBank utilisées dans l'étude phylogénétique.

Isolat	GenBank Accession	Region	Pays
PG11	EF012720	HPS70h	France
EU760775.1	WA-ZR1	HPS70h	USA
EU760776.1	WA-WHC1	HSP70h	USA
EU760778	WA-HHC5	HSP70h	USA
EU760782	WA-OB3	HSP70h	USA
EU760783	WA-OB2	HSP70h	USA
EU760786	WA-HHF1	HSP70h	USA
EU760787	WA-HHB3	HSP70h	USA
EU760788	WA-HHB2	HSP70h	USA
EU760789	WA-HHB1	HSP70h	USA
EU760807	WA- RW3	HSP70h	USA
EU760808	WA- RW1	HSP70h	USA
EU760810	WA- RW6	HSP70h	USA
EU760811	WA- RW5	HSP70h	USA
EU760812	WA- RW4	HSP70h	USA
EU760819	WA- LE1	HSP70h	USA
EU760820	WA- BV1	HSP70h	USA
EU760821	WA- BV4	HSP70h	USA
EU760822	WA- BV5	HSP70h	USA
EU760827	WA- ARV3	HSP70h	USA
EU760829	WA- AR1	HSP70h	USA
EU760830	WA- 7H1	HSP70h	USA
JQ771955	OR2	HSP70h	USA
JX559644	3138-07	HSP70h	Canada
AF039204	PN	HSP70h	USA
GU457400	OR-G21	HSP70h	USA
GU457401	OR-G5b,	HSP70h	USA
GU457402	OR-G6b	HSP70h	USA
GU457403	OR-G12	HSP70h	USA
GU457404	OR-G18	HSP70h	USA
GU457405	OR-G8a	HSP70h	USA
EU760823	WA-BV2	HSP70h	USA
KF417612	TX12	HSP70h	USA
KF417613	GO6	HSP70h	USA
KF417616	SM8	HSP70h	USA
EU760779	WA-HHC4	HSP70h	USA
FJ436234	OR1	HSP70h	USA
EU760828	WA-ARV2	HSP70h	USA
EU760784	WA-OB1	HSP70h	USA
HG931898	ALG9	HSP70h	Algerie
KF417622	VABR10A	HSP70h	USA
KF417615	BR4	HSP70h	USA
KF417623	VAHB10A	HSP70h	USA
KF417625	VARM10C	HSP70h	USA
KF417624	VE01 1-2E1	HSP70h	USA
HG931899	ALG19	HSP70h	Algerie
HG931902	ALG55	HSP70h	Algerie
EU760780	WA-HHC3	HSP70h	USA
HG931897	ALG7	HSP70h	Algerie
HG931901	ALG53	HSP70h	Algerie
KF417617	IN7	HSP70h	USA
EU760781	WA-HHC2	HSP70h	USA
EU760785	WA-HHC1	HSP70h	USA

EU760824	WA-BV3	HSP70h	USA
EU760809	WA-RW2	HSP70h	USA
HG931900	ALG22	HSP70h	Algerie
EU760774	WA-WHM1	HSP70h	USA
KF417621	VAFLO49	HSP70h	USA
KF417618	MM2	HSP70h	USA
KF417619	VALV032	HSP70h	USA
KF417614	BR5	HSP70h	USA
EU760814	WA-MCU5	HSP70h	USA
EU760813	WA-MCU6	HSP70h	USA
EU760815	WA-MCU4	HSP70h	USA
EU760816	WA-MCU3	HSP70h	USA
EU760817	WA-MCU2	HSP70h	USA
EU760818	WA-MCU1	HSP70h	USA
KC110862	WA Con2	HSP70h	USA
EF564589	WC-HSP-15	HSP70h	Afrique du sud
KF220376	GLRaV-2-SG	HSP70h	USA
EU760795	WA-HHA2	HSP70h	USA
EU760791	WA-HHA5	HSP70h	USA
EU760801	WA-HHA12	HSP70h	USA
EU760826	WA-ARV4	HSP70h	USA
EU760793	WA-HHA3	HSP70h	USA
EU760792	WA-HHA4	HSP70h	USA
EU760796	WA-HHA17	HSP70h	USA
EU760797	WA- HHA16	HSP70h	USA
EU760798	WA- HHA15	HSP70h	USA
EU760799	WA- HHA14	HSP70h	USA
EU760800	WA- HHA13	HSP70h	USA
EU760802	WA- HHA11	HSP70h	USA
EU760803	WA- HHA10	HSP70h	USA
EU760804	WA- HHA9	HSP70h	USA
EU760805	WA- HHA8	HSP70h	USA
EU760806	WA- HHA7	HSP70h	USA
EU760794	WA- HHA1	HSP70h	USA
EU760790	WA- HHA6	HSP70h	USA
AY881628	93/955	HSP70h	Afrique du sud
EF012721	PV20	HSP70h	France
DQ286725	BD	HSP70h	Italie
AY456132	Alfie	HSP70h	Nouvelle Zeland
JX513891	GLV2 1050-02	HSP70h	Canada
AF314061	Grslav	HSP70h	Unknown
EU760831	WA-Chot1	HSP70h	USA
EU760832	WA-Chot2	HSP70h	USA
EU760833	WA-Chot3	HSP70h	USA
EU760835	ID-FB1	HSP70h	USA
EU760834	WA-BV4	HSP70h	USA

Publications

- **A. Lehad, I. Selmi, M. Louanchi, M. Aitouada et N. Mahfoudhi.** 2015. Genetic diversity of grapevine leafroll-associated virus 3 in Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 97 (1), 203-207
- **A. Lehad, I. Selmi, M. Louanchi, M. Aitouada et N. Mahfoudhi.** 2015. Survey and genetic diversity of grapevine leafroll associated Virus-2 in Algeria. *Int. J. Phytopathol.* 04 (01). 35-42
- **Lehad Arezki, Selmi Ilhem, El Air Manel, Louanchi Meriem, Aitouada Mouni and Mahfoudhi Naïma.** 2015, Occurrence of *Grapevine Leafroll associated Virus* in Algerian vineyards. Proceeding of the 18th Congress of ICVG, Ankara, Turkey, 7-11 September. P: 157-158

Résumé

Une étude étiologique et épidémiologique a été réalisée en vue de déterminer l'agent causal de la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne rencontré sur la majorité des vignobles algériens et de déterminer son importance. Pour cela 484 échantillons ont été collectés sur les vignobles du centre et de l'ouest du pays. Une analyse ELISA a été réalisée et a révélé la prédominance du *GLRaV-3* avec 212 échantillons infectés par rapport aux *GLRaV-1* et *-2* qui n'ont montrés respectivement que 26 et 77 échantillons infectés. Une RT-PCR a été réalisé pour confirmer ces résultats et le séquençage de certains isolats a été réalisé.

Sur la base des séquences obtenues, une étude phylogénétique a été menée pour le *GLRaV-2* et *-3*. Les résultats ont montré que les isolats algériens du *GLRaV-3* se regroupent dans trois groupes phylogénétiques et dans un seul groupe phylogénétique pour le *GLRaV-2*. Les arbres développés montrent la possibilité d'existence de nouveaux groupes phylogénétique pour le *GLRaV-3*.

