

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET  
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

المدرسة الوطنية للتحليل الفالحة الحراش للجزائر-

**École Nationale Supérieure Agronomique El Harrach -Alger**

**Thèse**

**En vue de l'obtention du diplôme de doctorat  
en Sciences Agronomiques**

**ETUDE DU VIRUS Y DE LA POMME DE TERRE  
EN ALGERIE : INCIDENCE, CARACTERISATION  
BIOLOGIQUE, SEROLOGIQUE ET MOLECULAIRE**

**Présentée par : Mme ALLALA LINDA Epouse-MESSAOUDI**

**Soutenu le :**

**Devant le jury :**

|                       |                             |             |                      |
|-----------------------|-----------------------------|-------------|----------------------|
| <b>Présidente :</b>   | M <sup>me</sup> SELAMI. S   | Professeure | E.N.S.A El Harrach   |
| <b>Directeur :</b>    | M BOUZNAD. Z                | Professeur  | E.N.S.A El Harrach   |
| <b>Co-directeur :</b> | Mr IMAD ISMAIL              | Professeur  | Université de Syrie  |
| <b>Examineurs :</b>   | Mr BOUDJENIBA . M           | Professeur  | ENS de Kouba         |
|                       | M <sup>me</sup> BOULILA. F  | M.C.A       | Université de BEJAIA |
|                       | M <sup>me</sup> LOUANCHI. M | Professeure | E.N.S.A El Harrach   |

**Année universitaire : 2018-2019**

## Remerciements

J'exprime mes sincères remerciements et ma gratitude à Monsieur le Directeur Général de l'ENSA le Professeur Khelifi Lakhdar pour m'avoir poussé vers l'avant à reprendre mes travaux de recherches, pour ses conseils et ses orientations

Je remercie particulièrement Monsieur le professeur BOUZNAD ZOUAOUI, d'avoir accepté de diriger ce travail de bout en bout, son engagement, ses orientations, ses encouragements et surtout le temps qu'il m'a réservé à chaque fois qu'il est sollicité.

Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance et considération.

Je ne saurais remercier Mon codirecteur de thèse, Pr IMAD ISMAIL pour m'avoir guidé et encouragé à entreprendre mes recherches sur les virus de la pomme de terre et d'avoir accepté de s'associer à cette thèse.

Mes recherches n'auraient pu aboutir sans l'aide précieuse et la compétence du Dr LAURENT GLAIS, chercheur à l'INRA de RENNES, France, il m'a formé à distance et pour ses critiques judicieuses plus directement les recherches sur le PVY, à la rédaction de mon article, il m'a donné toute la force pour continuer mes travaux, qu'il trouve ici l'expression sincère de mon amicale reconnaissance.

Il m'est agréable aussi d'exprimer ma gratitude particulière à Mme SELAMI SAMIRA, qui m'a toujours apporté ses conseils et pour son soutien moral et scientifique. Je la remercie aussi pour avoir accepté de présider ce jury.

Toute ma reconnaissance va monsieur le Professeur Didier ANDRIVON de l'INRA DE RENNES pour avoir accepté de me lire durant la réalisation de mon article relatif à cette thèse, qu'il trouve ici l'expression de mes sincères remerciements.

Je ne saurais oublier Madame Sonia Bouhachem-Boukhris, chercheur à l'INRAAT de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour réaliser une partie de mon travail et je lui serais reconnaissante pour l'aide précieuse et les orientations.

Je ne peux oublier d'exprimer ma reconnaissance à Rebha Souissi et Dr IBTISEM FEKIH de l'INRAAT qui ont participé à mes travaux pratiques lors de mon séjour à Tunis, que ce soit pour la reconnaissance des pucerons vecteurs et pour la correction de l'anglais de mon travail d'article.

Je ne pourrais oublier le Dr Kerkoud MOHAMED, pour m'avoir assisté tout au long de mon travail sur la partie moléculaire, ses encouragements, sa participation à l'écriture de mon article m'ont été d'un plus grand soutien et moteur principal pour donner de la lumière à mes travaux.

Mes remerciements vont à Mme Louanchi Meriem pour ses conseils et encouragement et d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse

Je tiens à remercier, Monsieur Boudjeniba Messaoud de l'ENS de Kouba pour avoir accepté d'évaluer ma thèse malgré ses nombreux engagements

Je remercie également Mme BOULILA FARIDA, Directrice du laboratoire de microbiologie des microorganismes à l'Université de Béjaïa pour l'honneur qu'elle me fait pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur KHEDAM Mohamed, ex directeur du CNCC pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté à la réalisation de mes tests sérologiques au sein de laboratoire de phytopathologie avec toute l'équipe sans exception.

Mes remerciements les plus vifs vont particulièrement à monsieur KEDDAD ABDELAZIZ, notre enseignant au département de Botanique, notre spécialiste en Phytopathologie et notre doyen pour sa grande disponibilité, sa patience, sa gentillesse et sa grande implication pour mener à bien ce travail malgré ses grandes responsabilités. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je ne saurais oublier notre professeur Mme Mekliche Leïla pour le soin qu'elle apporté à la lecture du document.

## TRES PROFONDEMENT

Je dédie ce travail...



Tout particulièrement à mon père qui même s'il ne fait plus partie de notre monde, je sens sa présence et sa joie de me voir atteindre le but tant attendu.

A ma chère maman pour tout le soutien, l'amour et d'avoir supporté mon absence dans les moments difficiles où elle avait besoin de moi et à qui je demande Pardon.

A mon cher époux pour le soutien moral et matériel, la patience, et de m'avoir supporté tout au long du parcours épineux et pesant vu les contraintes et la diversité des charges sur moi.

Mes enfants MIRA ET SINOU pour m'avoir supporté tout au long de mes absences, mes humeurs et le stress que je leur ai transmis, pardon mes anges ! Les jours qui arrivent je me rattraperais c'est promis !

A ma petite sœur FANY, mon beau-frère Ali, mes petits neveux Mohamed-NASSIM /Mohamed-CHOUKRI /Malek et mon adoré frère Djamel qui m'ont suivi et soutenu du début à la fin de mon histoire de thèse.

A Monsieur et madame Bouïlla pour le soutien moral et les conseils très précieux dans les moments les plus difficiles de la thèse.

A tous ceux qui m'ont soutenu par gentillesse, fraternité et amitié sans attendre de retour,

Yamina KADID, Malika Maameri, Houda Boureghda, Badiaa FARSI, Hayet Miyamiche et Mounia BENKHELIFA pour m'avoir écouté des journées et des mois lorsque les choses n'allaient pas, ce sont elles qui m'ont soutenu et poussé à continuer, merci à vous toutes.

La liste est longue, celui que j'ai omis de mettre son nom, il se reconnaîtra et Dieu seul le récompensera...

## **LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES**

|       |   |
|-------|---|
| SD    | Seuil de détection  |
| Kb    | kilo base   |
| CNCC  | Centre National du Contrôle et Certification des semences         |
| DSA   | Direction des services Agricoles                                  |
| FAO   | Food and Agriculture Organization of the United Nations           |
| INPV  | Institut National des Protection des Végétaux                     |
| INRA  | Institut National de Recherche Agricole                           |
| MADRP | ministère de l'Agriculture, du Développement Rural et de la Pêche |
| CIP   | centre international de la pomme de terre                         |
| PLRV  | Potato Leaf Roll Virus  |
| PVY   | Potato Virus Yellow   |
| PVA   | Potato Virus A  |
| PVX   | potato virus X  |
| PVS   | Potato Virus S  |
| PVM   | Potato Virus M  |
| Pab   | Polyclonal anti-body  |
| Mabs  | Monoclonal anti-body  |

## LISTE DES FIGURES

**Figure 1.** Évolution de la production totale de pomme de terre et des rendements en fonction des superficies cultivées en Algérie de 1961 à 2016 (FAOSTAT, 2017).

**Figure 2.** (de A à H). Principales espèces de pucerons efficaces dans la transmission du PVY

**Figure 3.** Zones d'études et distribution saisonnière de la culture de pomme de terre à travers les principales régions productrices de pomme de terre en Algérie (MADR, 2014).

**Figure 4.** (de A à P). Symptômes observés en plein champ de pomme de terre dans les régions d'étude lors des inspections visuelles

**Figure 5.** Fréquence des principaux virus en infection simple sur pomme de terre, en fonction des régions prospectées de 2013 à 2016

**Figure 6.** Incidence du PVY en fonction du stade phénologique de la plante et de la saison culturale au niveau de la région d'Ain Defla.

**Figure 7.** Symptômes du PTNRD sur des tubercules de pomme de terre récoltés durant les campagnes (2013-2016) et appartenant à la variété Spunta (A) et la variété Fabula (B, C, D, E) : Déformation et anneaux nécrotiques profonds ou superficiels.

**Figure 8.** Taux d'infection du PVY enregistrés par DAS-ELISA, DTBIA et FLASH-KITS.

**Figure 9.** Résultat du test FLASH-KIT en présence du sérum anti-PVY

**Figure 10.** Visualisation de la réponse du test DTBIA en présence du sérum anti-PVY.

**Figure 11.** Symptômes montrés par quelques adventices poussant dans et au alentour de la culture de pomme de terre.

**Figure 12.** Inventaire des espèces de pucerons identifiées sur pomme de terre

**Figure 13.** Abondance relative des espèces de pucerons colonisant la pomme de terre

**Figure 14.** Représentation des taux de transmission de quatre isolats du PVY par six espèces de pucerons (selon le test Test Duncan):

**Figure 15.** Pourcentage de transmission sous l'effet de l'espèce de puceron par analyse de GLM

**Figure 16.** Pourcentage de transmission sous l'effet de souche virale (YN et YO) par analyse de GLM

**Figure 17.** Représentation structurale génomique du PVY. A. Particules flexueuses du PVY observées au microscope électronique (Quenouille *et al.*, 2013b). (Revers & Garcia, 2015).

**Figure 18.** Symptômes induits chez la gamme de plantes hôtes discriminant le type de souches du virus Y de la pomme de terre. A (D'après Kerlan, 2008 ; Karasev & Gray, 2013)

**Figure 19.** Exemples de symptômes causés par quelques virus affectant la pomme de terre. A. Enroulement foliaire causé par PLRV. (D'après SASA Crown copyright, UK).

**Figure 20.** Principaux symptômes induits chez les feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Burley 30 jours après inoculation par le groupe PVY<sup>O</sup> (A et B) ou par le groupe PVY<sup>N</sup> (C à F). (D'après Mollov & Thill, 2004).

**Figure 22.** Localisation de quelques épitopes pour les différents isolats PVY (en bleu) et pour les isolats PVY<sup>N</sup> (en rouge) et pour les isolats PVY<sup>O</sup> (en vert) au sein des 31 premiers acides aminés de la position N-terminal de la capsid protéique du PVY (Ounouna *et al.*, 2002).

**Figure 23.** Représentation schématique des principaux recombinants du PVY trouvés en Europe et en Amérique du Nord (D'après Karasev *et al.*, 2013).

**Figure 24.** Représentation phylogénétique des 13 branches (indiqués en chiffre Romains) pour des génotypes chez 37 isolats PVY (D'après Kehoe & Jones, 2015).

**Figure 25.** Représentation schématique du génome du PVY avec localisation des déterminants moléculaires ou régions génomiques prouvées ou suspectées impliquées dans la pathogénicité du PVY (D'après Thole *et al.*, 1993).

**Figure 26.** Les différents symptômes de la nécrose annulaire du tubercule de la pomme de terre (PTNRD) causés par les différents groupes d'isolats PVY sur différentes variétés.

**Figure 27.** Diversité des souches du PVY chez la pomme de terre en fonction des régions

**Figure 28.** Symptômes induits par PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> chez différentes plantes hôtes.

**Figure 29.** Symptômes distinctifs entre les souches PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup> sur *Tabac*.

**Figure 30.** Profil du gel d'électrophorèse des produits de RT-PCR amplifiés à la base du polymorphisme dans la région RJ1 (5'NTR/P1) du génome PVY.

**Figure 31.** Profil électrophorétique des produits PCR de la région génomique (RJ2) ou Hc-Pro/P3

**Figure 32.** Profil électrophorétique des produits PCR au niveau de la région génomique (RJ3) ou VPg/Nia. Légende identique que le profil précédent de la figure 31.

**Figure 33.** Profil électrophorétique des produits PCR de la région génomique (RJ4) ou CP.

**Figure 34.** Arbres phylogénétiques basés sur l'analyse de la séquence des nucléotides. (A) 1624-2458 ; (B) 5626-6303 et (C) 9136-9433 correspondant aux régions de recombinaison RJ2, RJ3 et RJ4.

**Figure 35.** Schéma d'alignement des séquences nucléotidiques des isolats PVY algériens par rapport aux séquences nucléotidiques 2368-2458 (A), 5756-5846 (B) et 9148-9238 (C) en bordure des jonctions de recombinaison respectives RJ2, RJ3 et RJ4.

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1.** Taux d'infection virale totale (par au moins un des cinq virus testés) des plants symptomatiques (Symp+) selon la région et le type de variété des plants de pomme de terre échantillonnés

**Tableau 2A.** Fréquence des virus Y, X, S, A et PLRV en fonction du type d'infection, de la variété de pomme de terre et des régions prospectées durant les campagnes agricoles 2013 à 2016

**Tableau 2B.** Taux d'infection simple (%) par un virus et par région

**Tableau 2C.** Taux d'infection multiple (%) par combinaison de 2 virus et par région

**Tableau 3.** Taux moyens d'infection du PVY en fonction de la saison culturale et des stades phénologiques des plants de pomme de terre

**Tableau 4 .** Fréquence et diversité des souches du PVY (PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup>) chez différentes espèces adventices collectées dans les régions du centre algérois (2013-2016).

**Tableau 5.** Abondance relative (A) des pucerons collectés sur feuillage de pomme de terre dans la région d'Ain Defla (2015-2016)

Tableau 6 Les fonctions des protéines structurales dans le cycle biologique du PVY (D'après Revers & Garcia, 2015)

**Tableau 7.** Description des amorces utilisées pour le typage moléculaire des isolats PVY

**Tableau 8.** Liste des 31 séquences du génome complet du PVY obtenus dans la base des données de GenBank pour l'analyse moléculaire des isolats PVY d'origine Algérienne.

**Tableau 9.** Diversité du sérotypes des Isolats PVY algériens par région et l'origine de l'hôte.

**Tableau 10.** Récapitulatif des résultats de la caractérisation biologique, sérologique et moléculaire de 31 isolats PVY isolés sur pomme de terre en Algérie.

**Tableau 11.** Pourcentage d'identité nucléotidique des 10 isolats PVY algériens par comparaison de trois isolats PVY de références sur la base des séquences de nucléotides : 1624-2458, 5626-6303 et 9136-9433 correspondant aux régions de combinaison RJ2, RJ3 et RJ4.

## **LISTE DES ANNEXES**

**Annexe 1.** Liste des virus inféodés à la pomme de terre (ICTV, 2015)

**Annexe 2.** Liste des pucerons vecteurs du virus Y de la pomme de terre (Al Marbeh, 2010)

**Annexe 3.** Les taux moyens de production nationale de pomme de terre des régions d'études (MDR, 2014)

**Annexe 4.** Caractéristiques des variétés de pomme de terre étudiées (CNCC, 2010).

**Annexe 5.** Composition du Kit Bioreba des sera utilisés

**Annexe 6.** Données climatiques de la région de Ain Defla (2013-2017)

**Annexe 7.** Procédure de la technique DTBIA

**Annexe 8.** Procédure de la technique utilisant les FLASHKIT (Agdia)

**Annexe 9.** Analyse de variance par ANOVA et GLM

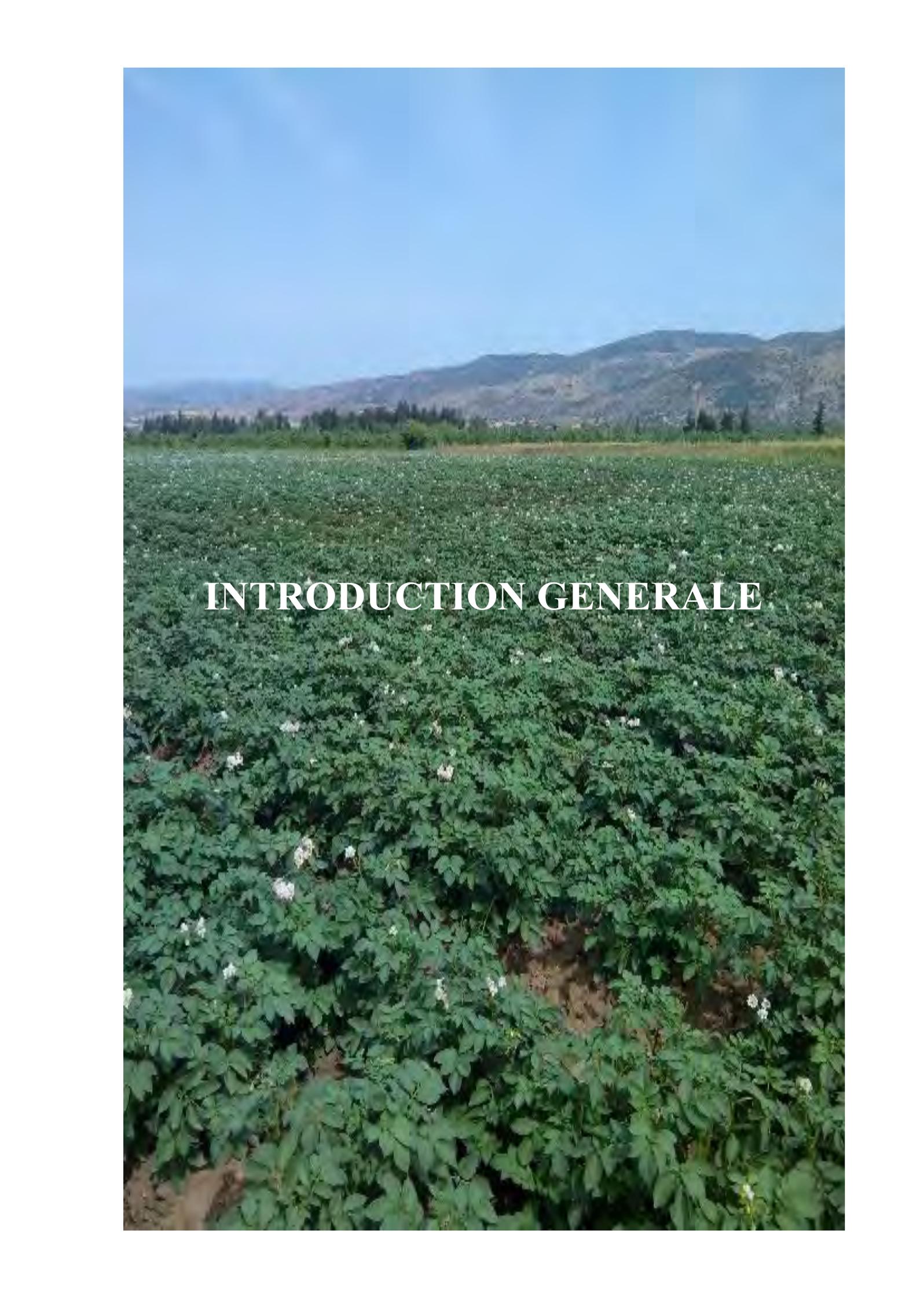
**Annexe 10.** Composition du Plant mini Kit "Qiagen RNeasy" et du milieu réactionnel de la transcription réverse ou MIX RT.

# **TABLE DES MATIERES**

# TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b>   | 1  |
| <b>Chapitre I :</b>  | 6  |
| <b>I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>   | 6  |
| I. 1. Importance économique de la pomme de terre dans le monde   | 6  |
| I. 2. Evolution des superficies cultivées, de la production et du rendement de la pomme de terre en Algérie                                | 8  |
| I.2.1. Répartition des principales zones productrices de pomme de terre en Algérie   | 8  |
| I.2.2. Origine et contrôle des semences et plants de pomme de terre en Algérie   | 8  |
| I.3. Principaux virus de la pomme de terre : cas particulier du PVY  | 10 |
| I.3.1. Impact économique du PVY dans le monde  | 10 |
| I.3.2. Incidence du PVY de la pomme de terre   | 12 |
| I.4. Stratégies de lutte contre la dissémination du PVY  | 12 |
| 1.4.1. Réduction de la transmission du PVY par les pucerons vecteurs   | 13 |
| 1.4.2. L'élimination des sources d'inoculum du PVY   | 13 |
| 1.4.3. Utilisation des variétés de pomme de terre résistantes au PVY   | 14 |
| 1. 4.4. La certification des semences de pomme de terre en vue de contrôler le PVY   | 14 |
| <b>Chapitre II :</b>   | 16 |
| <b>II. PRINCIPAUX FACTEURS DE PROPAGATION DU PVY.</b>  | 16 |
| <b>II. 1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'EPIDEMIOLOGIE DU PVY</b>  | 16 |
| II. 1.1. Les principales étapes d'une épidémie   | 16 |
| II. 1.2. Transmission naturelle du virus Y de la pomme de terre  | 17 |
| II. 1.2.1. Transmission verticale  | 17 |
| II. 1.2.2. Transmission horizontale  | 17 |
| II. 1.3. Diversité des espèces de pucerons associés à la pomme de terre  | 18 |
| II. 1.4. Abondance des populations d'aphides colonisant la pomme de terre  | 18 |
| II. 1.5. Etude de la capacité vectrice des pucerons majoritaires sur pomme de terre  | 20 |
| II. 1.6. Rôle des adventices dans l'épidémiologie du PVY   | 21 |
| <b>II. 2. MATERIEL ET METHODES</b>   | 22 |
| II. 2.1 Prospections et zones d'étude  | 22 |
| II. 2.2. Matériel végétal  | 23 |
| II. 2.3. Gamme de plantes hôtes indicatrices du PVY  | 23 |
| II. 2.4. Protocoles proposés pour l'évaluation du risque phytosanitaire de la culture de pomme de terre.                                   | 23 |
| II. 2.4.1. Fréquence des principaux virus de la pomme de terre selon les régions et durant les trois campagnes agricoles (2013–2016)       | 23 |
| II. 2.4.2. Incidence du PVY sur la pomme de terre durant les trois campagnes agricoles (2013 à 2016) dans la région d'Ain Defla            | 25 |
| II. 2.4.3. Méthodes de détection précoce du PVY dans les germes des tubercules récoltés.   | 27 |
| II. 2.4.4. Recensement des plantes adventices infectées par le PVY   | 28 |
| II. 2.4.5. Inventaire et fréquence des pucerons associés à la pomme de terre   | 29 |
| II. 2.4.6. Evaluation en conditions contrôlées de la capacité vectrice des souches du PVY  | 30 |
| <b>II. 3. RESULTATS ET DISCUSSION</b>  | 32 |
| II .3.1. Identification et fréquence des principaux virus de pomme de terre dans les cinq régions étudiées durant la période (2013 à 2016) | 32 |
| II. 3.1.1. Inspection visuelle des symptômes   | 33 |
| II. 3.1.2. Identification sérologique des virus par le test DAS-ELISA  | 35 |

|   |     |
|---|-----|
| II. 3.1.3. Incidence du PVY dans les parcelles de production de pomme de terre de semence dans la région d'Ain Defla  | 36  |
| II. 3.1.4. Détection précoce du PVY sur les germes de tubercules récoltés   | 40  |
| II. 3.1.5. Etude des principaux facteurs intervenant dans la propagation du PVY   | 44  |
| A. Identification des plantes adventices hôtes du virus Y de la pomme de terre  | 44  |
| B. Inventaire qualitatif de l'aphidofaune associée à la pomme de terre  | 49  |
| C. Estimation de l'efficacité de transmission <i>in vitro</i> des souches PVY <sup>N</sup> et PVY <sup>O</sup> par les espèces de pucerons colonisant la pomme de terre | 53  |
| <b>II.4. DISCUSSION GENERALE</b>  | 58  |
| <b>Chapitre III :</b>   | 67  |
| <b>III. CARACTERISATION BIOLOGIQUE, SEROLOGIQUE ET MOLECULAIRE DEDIFFERENTS ISOLATS DU PVY</b>  | 67  |
| <b>III. 1. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES</b>   | 67  |
| III. 1.1. Structure et diversité génétique évolutive du PVY   | 67  |
| III. 1.1.1. Présentation de l'organisation génomique du PVY   | 67  |
| III. 1.1.2. Source de diversité génétique du PVY  | 69  |
| III. 1.1.3. Émergence de nouvelles souches et variants du PVY dans le monde   | 69  |
| III. 1.2. Outils de détection et de caractérisation du PVY chez les isolats de pomme de terre   | 70  |
| III. 1.2.1. Caractérisation biologique et définition des groupes de souches du PVY  | 71  |
| III. 1.2.2. Caractérisation sérologique par la technique ELISA  | 76  |
| III. 1.2.3. Caractérisation moléculaire par RT-PCR  | 78  |
| III. 1.2.4. Séquençage et phylogénie  | 80  |
| III. 1.2.5. Relation entre les caractères génomiques du PVY et la pathogénicité   | 80  |
| III. 1.2.5.1. Nécrose nervaire induite chez le tabac  | 82  |
| III. 1.2.5.2. Nécrose des tubercules de la pomme de terre (PTNRD)   | 82  |
| III. 1.2.5.3. Virulence et contournement des gènes de résistance  | 83  |
| <b>III. 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>   | 84  |
| III. 2.1. Etude de la diversité des souches PVY de différents isolats de pomme de terre   | 84  |
| III. 2.1.1. Caractérisation sérologique par DAS-ELISA   | 84  |
| III. 2.1.2. Caractérisation biologique par inoculation mécanique  | 84  |
| III. 2.1.3. Caractérisation moléculaire par RT-PCR  | 86  |
| <b>III. 3. RESULTATS</b>  | 91  |
| III. 3.1. Caractérisation sérologique des différents isolats du PVY   | 91  |
| III. 3.2. Caractérisation biologique des isolats PVY  | 92  |
| III. 3.2.1. Indexage biologique préliminaire du PVY sur une gamme de plantes hôtes  | 92  |
| III. 3.2.2. Bio typage des différents isolats PVY de pomme de terre sur la variété Xanthi du tabac  | 94  |
| III. 3.3. Caractérisation moléculaire des isolats PVY   | 94  |
| III. 3.1. Analyse de la séquence nucléotidique des trois régions de recombinaison.  | 100 |
| <b>III. 4. DISCUSSION GENERALE</b>  | 106 |
| <b>CONCLUSION GENERALE</b>  | 109 |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>  | 114 |
| <b>ANNEXES</b>  |     |



# INTRODUCTION GENERALE

# INTRODUCTION GENERALE

L'Algérie occupe actuellement la 16<sup>ème</sup> place parmi les grands producteurs de pomme de terre dans le monde avec une production de 4 606 403 tonnes sur 148 692 ha enregistrées durant la campagne agricole 2016-2017. A présent, elle reprend la première place en Afrique comme en 2013 où la production de pomme de terre avait atteint un maximum de 4 886 538 tonnes avec une superficie plus importante de 161 156 ha (FAOSTAT, 2017). Outre, l'importance socio-économique et agroalimentaire de la pomme de terre et devant les fluctuations notées depuis 2014 au niveau des superficies cultivées et de la production totale, l'état a déployé d'énormes efforts pour le développement de cette culture stratégique afin de subvenir aux besoins de nos agriculteurs en matière de semences. Les rendements quantitatifs et qualitatifs de la pomme de terre sont fortement tributaires de la qualité de la semence utilisée qu'elle soit locale ou importée. Celle-ci doit être saine et indemne de maladies, surtout celles causées par les virus qui peuvent entraîner des pertes significatives atteignant jusqu'à 100% (De Box & Huttinga, 1981 ; Warren *et al.*, 2005 ; Hogue, 2010).

Cependant, pour certains enjeux politiques et des pratiques culturelles non encore maîtrisées par nos agriculteurs, la production en semences locales demeure insuffisante et ne couvre que la moitié des besoins nationaux en semence d'arrière-saison, d'où le recours à l'importation massive de semence de pomme de terre qui s'élève à 220 000 t/an soit un coût variant entre 65 et 70 millions d'Euros selon les années (FAOSTAT, 2017).

Par ailleurs, les contraintes agro-climatiques naturelles, conjuguées aux effets plus récents du changement climatique, pèsent sur le développement de l'agriculture algérienne, contraignant les agriculteurs à l'adoption de systèmes de culture extensifs dans les zones d'agriculture pluviale (Bessaoud *et al.*, 2019).

De nombreux travaux dans le monde ont montré que le changement climatique est impliqué de force dans l'apparition de nouvelles maladies émergentes chez les plantes cultivées (Garrett *et al.*, 2011 ; Bebbber *et al.*, 2013). Parmi les agents responsables, les phytovirus représentent à eux seuls près de la moitié des pathogènes impliqués, soit 47% contre 30% pour les champignons, et seulement 16% pour les bactéries (Anderson *et al.*, 2004).

Les phytovirus représentent mondialement une contrainte majeure pour le développement normal des cultures, dont les pertes de rendement entraînent un coût économique annuel de plus de 30 milliards de dollars, d'où la nécessité de la mise en place de moyens de lutte efficaces et durables. (García-Arenal & McDonald, 2003 ; Malmstrom *et al.*, 2011 ; Sastry & Zitter, 2014). Leur impact est d'autant plus important que leur dissémination est assurée par plusieurs facteurs. Ils peuvent être associés à un grand nombre d'aphides colonisateurs ou non qui peuvent transmettre les différentes populations virales ou constituer un réservoir permanent chez les plantes adventices sous-jacentes et hôtes des phytovirus.

La pomme de terre abrite une quarantaine de virus identifiés jusqu'à présent, six d'entre eux sont considérés comme les plus redoutables dans le monde à cause des dégâts considérables qu'ils causent à cette culture (Kerlan, 2008 ; Marchoux *et al.*, 2008 ; Valkonen, 2007). Il s'agit du *Potato leaf roll virus* (PLRV), *Potato virus Y*, X, A, M et S, qui peuvent agir séparément ou sous différentes combinaisons entraînant ainsi jusqu'à 50% de pertes sur les rendements (ACTA, 2000).

En Algérie, les virus X et Y ont été signalés sur pomme de terre dès les premiers travaux initiés par Senoussi en 1976, suivis de ceux de Benlahcen (1977) ayant rapporté d'autres virus, celui de l'enroulement foliaire ou PLRV, et les virus A, S et M avec cependant une prédominance du PVY. Le degré d'infestation par un complexe des virus Y, X et le PLRV a été estimé à 15 % par Santiago en 1981 lors de son expertise sur les maladies virales de la pomme de terre en Algérie au profit du projet FAO à cette époque. Du fait de son importance, une attention particulière coïncidant avec sa large propagation à travers le monde a été accordée au PVY ayant fait objet d'autres travaux où les deux groupes de souches PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup> ont été suspectés aux moyens de tests biologiques et cytologiques de l'infection par ce virus sur pomme de terre (Ait Ouada, 1985). Par ailleurs, les travaux de Sadouki (1986), Louanchi (1988) et Laarbi (1988 et 1995) ont aussi abordé les aspects épidémiologiques de ces virus notamment le PVY, où il a été rapporté, les principaux facteurs de sa propagation, entre autres les pucerons vecteurs et les plantes réservoirs au niveau du centre Algérois.

Les recherches que nous menons depuis près d'une dizaine d'années ont mis à jours de nouvelles informations concernant le PVY, qui est le virus le plus redoutable et le plus dommageable des potyvirus affectant la pomme de terre. La fréquence dominante du PVY a largement été démontrée dans la majorité des pays producteurs de pomme de terre au monde notamment en Algérie. (De Box & Huttinga, 1981 ; Kerlan & Moury, 2008 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010 ; Hogue *et al.*, 2010 ; Scholthof *et al.*, 2011 ; Allala *et al.*, 2014, 2016 ; Karasev, 2016 ; Wylie *et al.*, 2017).

Le PVY constitue une grande menace pour le développement de la pomme de terre dès lors qu'il cause à lui seul des pertes considérables sur le rendement allant de 10 % à 80 % (Karasev *et al.*, 2010; Blanchard, 2013). Sa gravité dépend à la fois de la sensibilité de la variété, de l'agressivité de ses souches ainsi qu'aux conditions climatiques. Son instabilité génétique remarquable est à l'origine de l'émergence de nouveaux variants plus agressifs qui circulent largement dans le monde via les moyens de transmission connus pour ce virus ainsi que lors des échanges commerciaux des semences non certifiées.

A cause de son importance, une attention bien particulière est alors accordée à ce virus, à l'étude de sa diversité génétique par la caractérisation des populations présentes sur pomme de terre et ce en utilisant les méthodes biologiques, sérologiques et moléculaires. En effet, depuis plus d'une vingtaine d'années, plusieurs études menées sur le PVY rapportent l'émergence de nouvelles souches dans de nombreux foyers d'infection.

Un changement significatif dans la pathogénicité du PVY a eu lieu dès 1980 lorsque la maladie de la nécrose annulaire superficielle des tubercules de pomme de terre (PTNRD) apparaît associée à l'infection par ce virus pour la première fois en Europe (Bezner *et al.*, 1984). Cette maladie est causée par des isolats particuliers du virus Y, dénommés PVY<sup>NTN</sup> du sous-groupe YN qui sont responsables de la nécrose annulaire des tubercules qui deviennent alors impropres à la consommation. Cette situation peut causer des pertes économiques très importantes à l'échelle mondiale (Scholthof *et al.*, 2011). En Algérie, la pression exercée par le virus Y et ses différentes populations, reste méconnue notamment celle associée au PTNRD. La présence de ce dernier en Algérie n'est pas à exclure à cause des importations massives de nouvelles variétés qui peuvent le véhiculer efficacement en absence d'un contrôle phytosanitaire rigoureux. Les risques de sa propagation par les pucerons vecteurs ou par les semences infectées produites localement ou importées notamment chez les variétés sensibles sont donc à craindre. Cette situation préoccupante a suscité un intérêt sur les moyens à mettre en œuvre pour un contrôle efficace de la maladie dans le monde.

Dans une approche de productions durables, la mise en œuvre d'un contrôle efficace contre les bio-agresseurs en général, et les virus en particulier, nécessite incontestablement une meilleure connaissance des diverses populations circulantes au niveau des cultures stratégiques comme la pomme de terre. L'évaluation de leur impact économique dépend de la gravité des symptômes engendrés et de leurs potentialités de dissémination comme dans le cas du virus Y de la pomme de terre.

Le développement de nouvelles méthodes utilisant l'outil moléculaire a permis efficacement, la discrimination des différentes populations PVY circulant dans de nombreux pays du monde. Les in-

formations recueillies par ces méthodes sont plus utiles pour l'application des mesures préventives nécessaires afin d'éviter la propagation de ces populations sachant qu'il n'existe actuellement aucun moyen de lutte curative.

Dans ce contexte, nous avons orienté nos investigations vers les connaissances utiles à toute action de lutte contre les principales viroses ciblant généralement la pomme de terre, en particulier le PTNRD non encore identifié en Algérie et ce depuis les premiers travaux de Benlahcen (1977).

Afin d'y parvenir, deux aspects sont abordés dans notre thématique. Le premier porte sur les différents protocoles adoptés pour évaluer l'incidence et le risque phytosanitaire des principales viroses de la pomme de terre, et plus particulièrement celle causée par le PVY. Le deuxième aspect est consacré à l'étude de la diversité génétique de ce virus face à l'inquiétante émergence de nouvelles souches responsables du PTNRD. Toutefois, l'étude de ces deux aspects nécessite une bonne maîtrise des techniques moléculaires largement utilisées dans beaucoup de laboratoires de par le monde, surtout pour un diagnostic précoce et fiable des différentes souches et variant du PVY. Ainsi le présent travail s'articule autour de trois principaux chapitres :

**Le premier chapitre** expose une synthèse générale des données bibliographiques disponibles sur la culture de pomme de terre et sur les principaux virus qui lui sont associés.

**Le deuxième chapitre** porte sur l'évaluation de l'incidence de cinq principales viroses affectant la pomme de terre et plus particulièrement celle causée par le PVY en considérant les facteurs culturaux et vectoriels intervenant dans sa propagation. Ce chapitre comporte une première partie bibliographique présentant essentiellement l'impact économique, l'incidence et l'épidémiologie du PVY, une seconde partie sur la méthodologie adoptée en plein champ et en laboratoire lors de cette évaluation et une troisième partie comportant les résultats obtenus et leur comparaison avec les travaux antérieurs réalisés dans le monde.

**Le troisième chapitre** décrit les caractéristiques biologiques, sérologiques et moléculaires d'une collection d'isolats du PVY prélevés dans cinq régions potentiellement productrices de pomme de terre (Alger, Ain Defla, Boumerdes, Bouira et Tipaza). Ce chapitre comporte également trois parties. La première regroupe les données bibliographiques liées à la diversité génétique du PVY ainsi que ses différentes caractéristiques. La deuxième concerne les différents outils déployés pour la caractérisation des différents isolats obtenus à partir des cultures de pomme de terre localisées dans les régions citées précédemment. La troisième comporte les résultats obtenus suivis d'une discussion.

Ces chapitres sont suivis d'une conclusion générale reprenant les différentes données acquises au cours de cette étude avec des perspectives de recherche envisageables quant à la suite de ce travail.

CHAPITRE I  
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE  
GENERALE



## *Chapitre I*

### **I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

La pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.) occupe actuellement la quatrième position après le blé, le riz et le maïs et constitue la base de l'alimentation humaine (FAOSTAT, 2017). L'adaptation extraordinaire de cette espèce combinée à sa valeur nutritionnelle ainsi que sa multiplication végétative via les tubercules ont favorisé l'augmentation de sa consommation à travers le monde (De Fauw *et al.*, 2012). Originaires de l'Amérique du sud, elles ont été introduites d'abord en Europe suite à la conquête espagnole au 16<sup>ème</sup> siècle puis distribuées vers le reste du monde à la fin du 17<sup>ème</sup> siècle (Birch *et al.*, 2012). De nos jours, la pomme de terre est cultivée dans plus de 150 pays sous différentes conditions climatiques dans les régions tempérées, tropicales et subtropicales (Badooni & Chauhan, 2010 ; Bessaoud *et al.*, 2019).

#### **I.1. IMPORTANCE ECONOMIQUE DE LA POMME DE TERRE DANS LE MONDE**

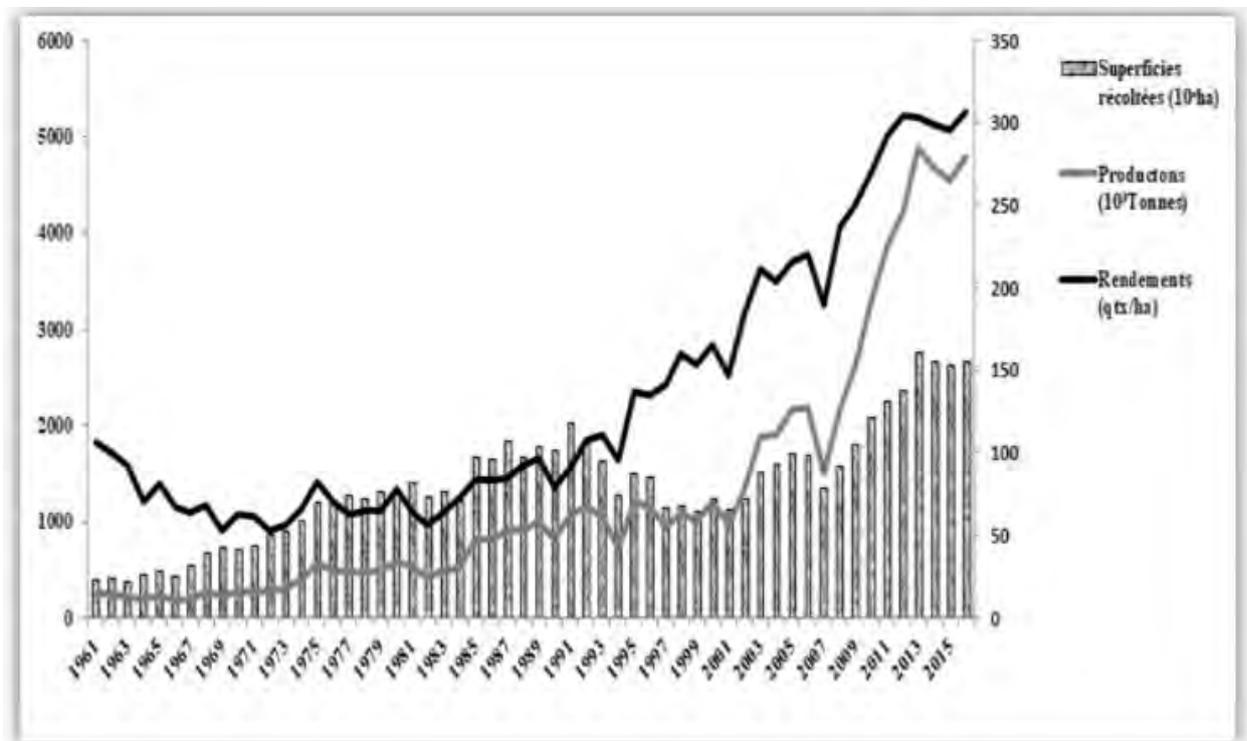
Actuellement, l'Asie et l'Europe sont devenues les deux principales régions productrices de pomme de terre, par les superficies qui leur sont consacrées et les quantités récoltées. Elles fournissent annuellement plus de 80% de la production mondiale. Celle-ci a atteint 381,6 millions de tonnes réparties sur plus de 19,09 millions d'hectares en 2014, soit un rendement moyen de 19,9 tonnes par hectare. La Chine est le plus grand producteur mondial de la pomme de terre avec 99,1 millions de tonnes, cependant l'Amérique du Nord enregistre le plus haut rendement sur le plan mondial (FAOSTAT, 2017).

En Afrique, la production de pomme de terre n'a cessé d'augmenter ces dernières décennies en passant de 2 millions de tonnes en 1960 à 18,6 millions de tonnes en 2005 pour atteindre un maximum de 29,3 millions de tonnes en 2013 sur une superficie de 19,6 millions d'hectares (FAOSTAT, 2017). Cette augmentation continue et régulière de la production se ralentit à partir de 2014 puis reprend légèrement en 2016 où on enregistre une valeur de 24,5 millions de tonnes sur 17,7 millions d'hectares. Une régression parallèle est aussi observée au niveau des superficies cultivées durant la même période 2014-2016 (FAOSTAT, 2017).

## I.2. EVOLUTION DES SUPERFICIES CULTIVEES, DE LA PRODUCTION ET DU RENDEMENT DE LA POMME DE TERRE EN ALGERIE.

Depuis l'indépendance, la pomme de terre a connu incontestablement une progression plus forte et plus régulière dans les différents systèmes de culture en Algérie (Boufares, 2012). Au cours des 14 dernières années (2000-2014), la production intérieure brute agricole (PIBA) est passée, en pourcentage du PIB, de 8,3 % en 2000 à 9,2 % en 2010 et à 11,2 % en 2014. Cette hausse a été imputée à un accroissement des productions maraichères et animales (Bessaoud *et al.*, 2019)

Avec l'augmentation des superficies occupées par la pomme de terre, la production nationale est passée de 2,1 millions de tonnes en 2006 à 4,9 millions de tonnes en 2013 avec 303,2 quintaux par hectare, représentant le rendement maximum obtenu jusqu'à présent (Fig. 1). Depuis 2014, on assiste à des fluctuations au niveau de la production et des superficies cultivées qui tendent vers une diminution traduisant ainsi des variations au niveau des rendements.



**Figure 1** Évolution de la production totale de pomme de terre et des rendements en fonction des superficies cultivées en Algérie de 1961 à 2016 (FAOSTAT, 2017).

Notons qu'avec les différentes phases d'augmentation des rendements observées, la production nationale n'arrive toujours pas à satisfaire les besoins nationaux en semence de pomme de terre. Rappelons que l'auto-approvisionnement en semences varie entre 10 et 20% de la production locale,

concernant que la tranche d'arrière-saison et une partie de la tranche primeur. Les causes de ses variations ont été liées à plusieurs facteurs, essentiellement aux changements climatiques ; notamment la sécheresse, la gestion du secteur agricole sous certains enjeux politiques qui n'accompagnent pas forcément une évolution stable de la production de pomme de terre dans le temps et dans l'espace.

### **I.2.1. Répartition des principales zones productrices de pomme de terre en Algérie**

La plasticité génétique de la pomme de terre lui permet de s'adapter à la diversité des agro systèmes algériens où elle occupe les quatre zones géographiques (Littoral, Sublittoral, Atlas tellien et Hautes Plaines). La courte période de croissance et de développement de cette plante permet la réalisation de trois types de culture par an réparties dans les différentes wilayas productrices selon le calendrier suivant (Tria & Chehat, 2013) :

- La culture primeur (15 novembre–15 janvier) : elle dépend de la pluviométrie et de la rigueur des températures au moment de la mise en place de la culture et des difficultés culturales. Les risques plus élevés courus par les cultivateurs expliquent la régression des superficies consacrées à ce type de culture.
- La culture de saison (15 janvier–15 mars) : elle représente la plus grande part de la production nationale, comparée aux deux autres types de culture car elle est moins dépendante des aléas climatiques. Cependant, elle exige des irrigations en fin de saison pour garantir un bon développement de la plante.
- La culture d'arrière-saison (15 août–15 septembre) : elle vient en deuxième position par sa contribution dans la production nationale et dont la réussite dépendra des possibilités d'irrigation puisque la plantation s'opère en été.

### **I.2.2. Origine et contrôle des semences et plants de pomme de terre en Algérie**

L'augmentation continue des superficies destinées à la culture de la pomme de terre implique forcément une augmentation des besoins en semences. Chaque année, 80% à 90% des semences majoritairement plantées en pleine saison sont importées essentiellement de la Hollande et de la France, soit un montant de 60 millions d'Euros (Anonyme, 2017).

Près de cent vingt (122) variétés de pomme de terre sont actuellement inscrites au Catalogue Variétale Algérien pour être cultivées et autorisées à la commercialisation (Anonyme, 2010). Le processus de contrôle adopté par le CNCC pour l'importation et l'homologation de ces variétés repose es-

sentiellement sur des essais de comportement variétal vis-à-vis des pathogènes sur plusieurs saisons et l'évaluation de leur productivité dans différentes régions du pays.

La variété Spunta est la plus cultivée en Algérie où elle occupe plus de 60% à 80% des superficies des principales régions productrices de pomme de terre et ce en raison de sa faible exigence en eau et ses forts rendements. Elle est réputée avoir une certaine résistance à la transmission du virus Y, mais elle reste sensible à l'égard de certains pathogènes en particulier le mildiou (Anonyme, 2010). Secondairement, les variétés : Fabula, Nicola, Diamant, Timate, Atlas, Bartina, Désirée, Kondor, ont été introduites pour couvrir l'augmentation de la demande des agriculteurs exigeant à la fois une forte productivité et une bonne résistance aux maladies et aux ravageurs rencontrés dans les champs de pomme de terre. Cependant, la majorité de ces variétés, à l'exception de Spunta et Désirée, ne sont pas toujours bien adaptées aux conditions environnementales de l'Algérie surtout lorsqu'elles sont importées à des âges physiologiques très avancés. Ceci affectera considérablement la qualité et la quantité de la production et des rendements de pomme de terre.

Les agriculteurs sont souvent confrontés à des insuffisances en matière de fertilisants et des traitements phytosanitaires appliqués contre les maladies et les ravageurs qui réduisent 5 à 6 fois les rendements en tubercules de pomme de terre. Des programmes d'intensification et de production locale de semence ont été élaborés par l'état pour contrer justement à ces différents problèmes mais qui n'arrive toujours pas à couvrir l'ensemble des besoins en semences et atteindre l'autosuffisance.

La production locale de la semence destinée à la production des plants est réalisée seulement par multiplication végétative par repiquage des tubercules générant de nouvelles plantes génétiquement identiques à la plante mère. Les tubercules issus de la récolte sont souvent stockés dans les chambres froides pour être utilisés l'année suivante pour la production des plants en culture primeur ou en arrière-saison. Cependant, l'inconvénient de ce mode de reproduction est d'offrir une large voie de transmission verticale aux maladies virales devenues l'un des problèmes majeurs de cette culture.

Des normes très strictes définissent des classes de semence correspondant à des taux autorisés d'infection virale. Les semences de pomme de terre sont qualitativement classées en Super Elite, Elite, A et B. Cette classification obéit au processus de certification adopté en Algérie qui implique des inspections visuelles corroborées par des tests de pré-culture et des tests sérologiques établis sur les produits de récolte au niveau du CNCC. Ce contrôle concerne toutes les régions à forte production de pomme de terre pour prévenir une infection secondaire par le biais des tubercules mères infectés.

### I.3. PRINCIPAUX VIRUS DE LA POMME DE TERRE : CAS PARTICULIER DU PVY.

En Algérie comme partout dans le monde, la culture de pomme de terre est malheureusement la cible d'un grand nombre de ravageurs et de maladies d'origine bactérienne, fongique et virale (Bouznad *et al.*, 2008). Les ravageurs, les agents pathogènes et particulièrement les phytovirus affectent significativement le développement normal des plants en réduisant le rendement et la qualité des tubercules récoltés (Rolland *et al.*, 2008).

Dans le monde, on connaît actuellement près de 1000 virus chez les plantes cultivées et spontanées dont 40 virus affectent la pomme de terre. Ces derniers sont regroupés dans 13 familles distinctes (Annexe 1). Parmi ces familles celle des *potyviridae* s'avère la plus importante avec 200 espèces virales (soit 30% des virus décrits) répartis dans huit genres : *Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus* et *Tritimovirus* (Wylie *et al.*, 2017).

Du point de vue économique, l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), accorde plus d'importance à six virus X, Y, S, A, M et le PLRV qui affectent la pomme de terre et qui peuvent, seuls ou sous différentes combinaisons, entraîner différents types de symptômes (Kerlan & Moury, 2008 ; Valkonen *et al.*, 2008. ICTV, 2015). Ceux-ci sont représentés par l'enroulement, la mosaïque (légère ou sévère), la chlorose, la rugosité, la frisolée et la nécrose. Toutefois, la sévérité de ces symptômes varie selon le type d'infection (simple ou multiple), l'isolat et la variété de pomme de terre (Vance, 1991 ; Le Romancer *et al.*, 1994).

#### I.3.1. Impact économique du PVY dans le monde

Sur le plan économique, les virus sont les agents pathogènes les plus importants après les champignons, sur de nombreuses plantes cultivées. Les dommages directs et indirects imputables aux viroses prennent généralement en compte les effets des infections sur la réduction de la croissance des cultures, de leur vigueur, de leur valeur économique. Certaines viroses se manifestent par des symptômes difficilement identifiables visuellement, ce qui amène fréquemment à imputer les baisses de rendement qu'elles provoquent à des déficiences physiologiques ou à des carences nutritionnelles. Cela explique la sous-évaluation globale de l'impact des maladies virales sur la production agricole (<http://www.universalis.fr/encyclopedie/viroses-vegetales/>).

D'une manière générale, la majorité des phytovirus réduisent significativement la qualité et la quantité de la production des plantes cultivées à travers le monde. Leur impact économique n'est pas simple à évaluer, car il dépend étroitement des interactions entre plusieurs facteurs : le type de souche, la pression des vecteurs, les caractéristiques intrinsèques de la plante hôte, l'efficacité des

méthodes de dépistage des virus et d'autres facteurs liés aux pratiques culturales et à l'environnement (Anderson *et al.*, 2004 ; Hogue, 2010).

De tous les potyvirus affectant la pomme de terre, le PVY est le plus dommageable. Il a été classé en tête de liste des dix virus les plus économiquement importants, à cause de sa grande polyphagie, de sa variabilité génétique et de sa large distribution dans le monde (Scholthof *et al.*, 2011 ; Wylie *et al.*, 2017). Selon plusieurs auteurs, l'importance économique du PVY s'opère visiblement à travers les dégâts considérables qui se traduisent par une baisse de rendement allant de 10% à 80% selon les pays (De Bokx & Huttinga, 1981 ; De Bokx & van der Want, 1987 ; Beemster & De Bokx, 1987 ; Van der Zaag, 1987). L'impact du PVY à lui seul se traduit par des pertes considérables des rendements et des diminutions importantes de la qualité des tubercules de la pomme de terre (Hogue, 2010 ; Karasev, 2016).

Par ailleurs, en cas d'infection par le PVY qui débute en cours de saison suite à l'envahissement des pucerons vecteurs, les pertes de rendement sont réduites de 20% comparées à celles causées par des semences infectées comme rapportés par les travaux de (Mondjana *et al.*, 1993 ; Hane & Hamm., 1999 et Hamm *et al.*, 2010). Cependant, les plus grandes pertes de la production et du rendement de la pomme de terre associées au PVY, sont enregistrées lorsque les tubercules de semences utilisés sont originellement infectés conduisant incontestablement à une infection secondaire (De Bokx & van der Want, 1987 ; Whitworth *et al.*, 2006 ; Hogue, 2010).

D'autres virus affectent également la pomme de terre et provoquent aussi des dégâts importants comme celui de l'enroulement foliaire ou PLRV et le virus X dont les pertes de rendement ont été estimées de 10 à 15% FAOSTAT (2017). Des infections mixtes du PVY avec l'un des virus de la pomme de terre entraînent également une baisse de 87% dans les rendements dépassant (Van der Zaag, 1987).

L'importance économique du PVY prend plus d'ampleur suite à l'émergence de souches particulières (PVY<sup>NTN</sup> et PVY<sup>NWi</sup>) qui causent une nécrose annulaire au niveau des tubercules [Potato Tuber Necrotic Ringspot Disease (= PTNRD)]. Cette nécrose annulaire qui est apparue dès 1980 en Europe est actuellement considérée comme la plus dommageable des viroses de la pomme de terre (Le Romancer *et al.*, 1994). La propagation du PTNRD dans le temps et dans l'espace est assurée par les semences ou les tubercules infectés d'où l'importance de l'intensification des programmes de production de semences certifiées afin de limiter les dégâts causés par les souches responsables de cette nécrose (Notle *et al.*, 2004 ; Sing *et al.*, 2008). Par ailleurs, d'autres souches du PVY dites communes

comme la souche PVY<sup>O</sup> ou la souche PVY<sup>C</sup> peuvent entraîner des pertes de rendement mais ne causent pas la nécrose annulaire.

### **I.3.2. Incidence du PVY de la pomme de terre**

L'incidence du PVY varie selon les pays et les facteurs de l'environnement qui favorisent sa propagation. Ces derniers sont principalement représentés par les aphides vecteurs qui transmettent les différentes souches dérivant de ce virus et les plantes alternatives qui permettent le maintien de l'inoculum viral durant tout leur cycle biologique (Le Hingrat, 1990). La majorité des travaux réalisés en Europe, en Amérique, en Asie et même en Afrique indique la présence dominante du virus Y dont le taux d'infection atteint 80% environ par rapport aux autres virus à mosaïque comme A, S, X, M et au *Potato Leaf Roll Virus* (PLRV) (Karasev *et al.*, 2013).

Dans de nombreux pays producteurs de pomme de terre, l'augmentation de l'incidence du PVY a été liée principalement à l'utilisation de semences non certifiées et de tubercules qui sont produits au cours des saisons précédentes et qui sont fortement infectés par le virus (Cherif & Mnari Hattab, 1994, Hane & Hamm, 1999, Jones, 1990 et Chatzivassiliou *et al.*, 2008).

L'évaluation de l'incidence du PVY et de ses différentes souches tient compte du taux d'inoculum dans les semences de pomme de terre avant et après la récolte des tubercules, de la sensibilité ou de la résistance des différentes variétés, de la présence des adventices et de l'abondance des vecteurs du PVY depuis l'émergence des plants jusqu'au défanage (Nolte *et al.*, 2004, Rolot, 2005, Steinger *et al.*, 2014).

### **I.4. STRATEGIES DE LUTTE CONTRE LA DISSEMINATION DU PVY**

En l'absence de moyens curatifs contre la nécrose annulaire causée par le PVY, des programmes de contrôle basés sur des mesures prophylactiques de lutte contre les aphides vecteurs et la sélection de variétés résistantes au PVY ont été développés dans le monde. Toutefois, ces mesures ne sont pas toujours efficaces, et, la lutte contre la dissémination du PVY demeure un défi pour le développement de la culture de pomme de terre dans le monde en raison du mode de transmission non persistant de ce virus ainsi qu'à l'émergence de nouvelles souches et variants ayant des facultés d'adaptation plus grandes aux conditions environnementales. Chaque stratégie de lutte contre le PVY présente cependant des limites d'où l'intérêt de combiner et d'adapter des moyens de lutte préventive et curative en fonction des changements des facteurs environnementaux.

### **1.4.1 Réduction de la transmission du PVY par les pucerons vecteurs**

La lutte contre les pucerons vecteurs de virus repose actuellement sur l'utilisation d'huiles minérales ou d'insecticides de synthèse. La mise en place de brises vents ou d'autres cultures en bordure des champs de pomme de terre permettent également de réduire les vols de pucerons vecteurs ce qui limite l'introduction des virus dans les parcelles, cependant le risque d'infection à l'intérieur de la culture n'est pas à exclure si aucune mesure d'élimination des sources d'inoculum viral n'est appliquée.

L'utilisation des huiles minérales par les producteurs de semences de pomme de terre permet de réduire la transmission des virus par les pucerons non persistants, néanmoins l'efficacité de ces huiles dépend des périodes de vols. Lorsque ces derniers surviennent précocement c'est-à-dire dès l'émergence des cinq premières feuilles, l'application des huiles minérales s'avère inefficace et dans ce cas, elle doit être combinée avec des traitements insecticides. Si, par contre, les vols surviennent tardivement c'est-à-dire 3 à 4 semaines après l'émergence des plantules et que la majorité des feuilles sont déjà couvertes d'huiles minérales, le risque d'infection est moindre (Rolot, 2005 ; Al-Mrabeih *et al.*, 2010). Les huiles minérales peuvent persister sur le feuillage pendant 10 à 14 jours, cependant une application hebdomadaire est souhaitable pour protéger les nouvelles feuilles (Simons & Zitter, 1980 ; Le Hingrat, 1990 ; Merlet & Le Hingrat, 1990). L'application des huiles minérales doit être réalisée à des concentrations adéquates (inférieures à 3%) lorsque les températures ne sont pas trop élevées afin d'éviter les risques de phytotoxicité (Boiteau & Sing, 1982).

Les traitements insecticides permettent en général un contrôle des pucerons qui se reproduisent sur les plants de pomme de terre et qui transmettent le virus de manière non persistante. L'application des insecticides s'avèrent inefficace en présence des espèces de pucerons dites transitoires puisque la période d'inoculation des plants est trop courte pour que l'insecticide fasse son effet. Il faut signaler que les effets nocifs des insecticides sur l'environnement et la santé humaine ont conduit à la recherche de nouvelles méthodes alternatives pour les producteurs, comme l'utilisation de bioagresseurs contre les pucerons.

### **1.4.2. L'élimination des sources d'inoculum du PVY**

L'élimination des sources d'inoculum comme les plants issus des tubercules infectés, les adventives et les repousses de la culture de pomme de terre précédente permettent un contrôle efficace du PVY (Jones, 1990 ; Kerlan *et al.*, 1987).

La lutte contre les adventices hébergeant le PVY s'appuie essentiellement sur l'utilisation des herbicides synthétiques durant tout le cycle végétatif de la pomme de terre. Toutefois, cette dépendance excessive des herbicides a conduit à une pression de sélection sans précédent sur les populations d'adventices entraînant la prévalence de "super adventices" résistantes à ces herbicides (Clements *et al.*, 2014, Mhlanga & Thierfelder, 2016). En outre, certains adventices ont développé une résistance à l'égard de 160 herbicides différents (Heap, 2016).

Les stratégies potentielles visant à atténuer le problème de gestion des plantes adventices consistent en l'utilisation de moyens biologiques et de cultures de couverture du sol. Les moyens de lutte biologique consistent en l'utilisation d'agents bioherbicides comme, par exemple, certaines espèces fongiques appartenant aux genres *Colletotricum*, *Phoma* et *Sclerotinia* ou bactériennes qui appartiennent aux genres *Xanthomonas* et *Pseudomonas* (Harding & Raizada, 2015). Les cultures de couverture du sol constituent une alternative peu coûteuse par rapport aux herbicides plus particulièrement lorsqu'elles sont utilisées en rotation avec la culture principale (Mhlanga & Thierfelder, 2016).

#### **1.4.3. Utilisation des variétés de pomme de terre résistantes au PVY.**

L'utilisation de variétés de pomme de terre résistantes au PVY reste la solution la plus efficace pour prévenir des baisses de rendement causées par ce virus. Plusieurs gènes de résistance ont été détectés chez les solanacées spontanées et les espèces cultivées de pomme de terre (Flor, 1946 ; Kerlan *et al.*, 1987). Dix gènes de résistance au PVY ont été identifiés sur quatre segments chromosomiques du génome de la pomme de terre. Ceux-ci sont soit des gènes de résistance d'hypersensibilité (HR) qui sont généralement spécifiques à certaines souches du PVY ou des gènes d'extrême résistance (ER) qui montrent une grande efficacité à l'égard d'une large gamme de souches (Cockerham, 1970 ; Ross, 1986 ; Hamalainen *et al.*, 2000 ; Robert & Bourdin, 2001 ; Szajko *et al.*, 2008 ; Tian & Valkonen, 2013). Les gènes d'hypersensibilité n'assurent pas toujours une protection suffisante contre le PVY, mais ils sont très utilisés lors des études de caractérisation des groupes de souches du PVY chez les différentes variétés de pomme de terre (Salanki *et al.*, 2007). Les gènes d'extrême résistance (ER) sont hautement efficaces dans le contrôle des différentes souches du PVY, mais ils sont contournés par l'émergence de nouveaux variants du fait de la variabilité génétique de ce virus (Szajko *et al.*, 2008).

#### **1.4.3. La certification des semences de pomme de terre en vue de contrôler le PVY**

La certification de la semence de pomme de terre offre l'opportunité d'éliminer les plants soupçonnés malades qui peuvent causer un risque potentiel au sein de la culture (Frost *et al.*, 2013 ; Lind-

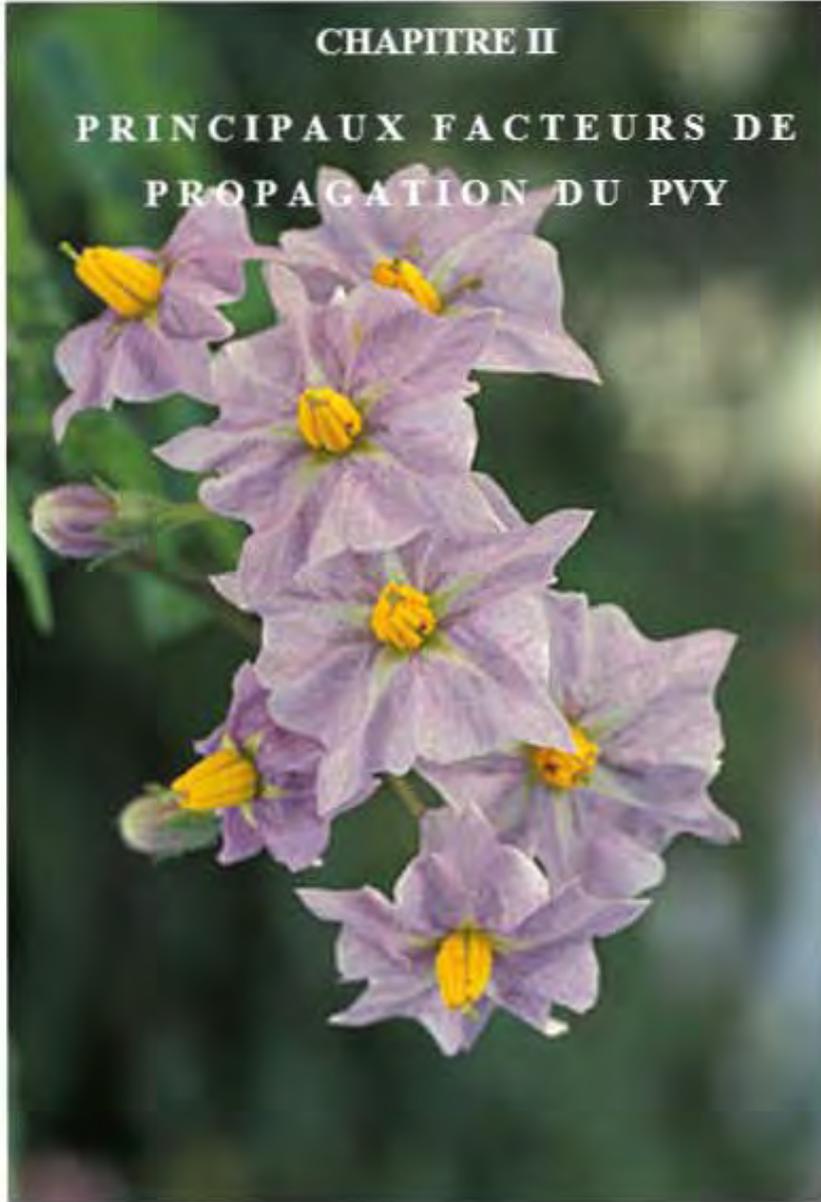
ner *et al.*, 2015). L'utilisation de semence de pommes de terre certifiée saine constitue à l'heure actuelle la principale mesure de la lutte intégrée contre les maladies virales de la pomme de terre. Elle garantit à l'agriculteur l'utilisation d'un matériel sain qui retarde le déclenchement des épidémies en début de chaque culture. Elle repose principalement sur les inspections des cultures en plein champ et les tests standards d'analyse de virus au laboratoire ainsi que sur des examens sérologiques après la récolte afin d'estimer raisonnablement l'incidence du PVY sur les cultures filles à condition que les échantillons collectés soient représentatifs de la culture au champ.

En guise de conclusion de ce chapitre, on peut dire qu'une procédure de détection des virus simple, rapide, fiable et sensible permet certainement d'éliminer les semences infectées du matériel de propagation végétative (Singh, 1999). Pour un contrôle efficient du PVY, il sera donc nécessaire d'établir des programmes de recherches comportant les aspects suivants :

- Identification des déterminants génétiques de l'hôte et du virus, influençant la durabilité d'une résistance et les conséquences de leur déploiement.
- Caractérisation de la diversité du PVY et de la pathogénicité des souches émergentes.
- L'épidémiologie du PVY dans les différents environnements.
- La mise au point de nouvelles méthodes de diagnostic et leur déploiement ainsi que le développement de méthodes de gestion adéquates des cultures.

CHAPITRE II

PRINCIPAUX FACTEURS DE  
PROPAGATION DU PVY



## *Chapitre II*

# **II. PRINCIPAUX FACTEURS DE PROPAGATION DU PVY.**

### **II.1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'EPIDEMIOLOGIE DU PVY**

L'étude épidémiologique du PVY permet d'établir les causes de sa prédominance au sein d'une culture et englobe tous les facteurs qui contribuent à sa transmission en favorisant son acquisition et sa multiplication dans les cellules de l'hôte. Elle décrit la dynamique des épidémies causées par le PVY en plein champ (Semal et Vanderveken, 1989). Cette dynamique dépend des interactions entre le virus, le ou les vecteurs et les plantes hôtes (Astier *et al.*, 2001). En effet, la dissémination du PVY est étroitement liée à la présence des pucerons et des plantes sources de ce virus durant la période de production de la pomme de terre. L'étude du rôle des plantes sources et des vecteurs dans l'épidémiologie du PVY durant la période végétative de la pomme de terre permet d'avoir une vision complète du cycle épidémiologique du virus et de construire un modèle de prévision des risques en tenant compte d'autres facteurs comme la précocité des infections, la translocation du virus et la maturité des plantes.

La nuisance majeure des pucerons qui causent des dégâts directs sur les cultures de pomme de terre (ponction de sève, fumagine et perte sur les rendements) réside dans leur capacité à transmettre préférentiellement des souches particulières du PVY à l'origine de maladies graves comme le PTNRD. De ce fait, il est important de connaître leur abondance et les principales espèces impliquées dans la propagation du PVY et de ses souches émergentes.

#### **II.1.1. Les principales étapes d'une épidémie**

Le développement d'une épidémie virale comporte deux types d'infection : primaire et secondaire. Dans un champ, les premiers plants infectés constituent les foyers primaires qui ont pour origine les tubercules initialement infectés ou les infections causées dans des parcelles indemnes. Par la suite, la dissémination du virus dans la parcelle s'effectue par des vecteurs qui viennent de l'extérieur et qui recherchent une plante-hôte. Ces vecteurs avant de causer les infections secondaires, testent d'abord

les plantes adventices ou les cultures voisines qui peuvent être infectées. Les premiers plants infectés vont constituer alors des foyers secondaires qui forment souvent des plages importantes dans les champs de pomme de terre. Le développement secondaire de l'épidémie est assuré par les vols de pucerons qui permettent la dissémination rapide du virus à l'ensemble des parcelles. Le nombre de plants infectés s'accroît alors d'une manière logarithmique (Astier *et al.*, 2001).

Au cours des vols de pucerons, les plantes adventices voisines de la culture qui peuvent être également contaminées constituent de nouveaux réservoirs pour la culture suivante (Lecoq, 1992). L'efficacité de la transmission selon le mode non persistant, l'abondance des plantes réservoirs et les importantes pullulations de pucerons font que le développement des épidémies du PVY dans les cultures de pomme de terre est souvent très rapide.

### **II.1.2. Transmission naturelle du virus Y de la pomme de terre**

Les phytovirus qui sont des biotrophes obligatoires nécessitent pour survivre la transmission d'une plante vivante à une autre. Dans son environnement naturel, le PVY est transmis soit mécaniquement par les vecteurs, soit par voie végétative à travers les tubercules de pomme de terre. Un grand nombre d'espèces de pucerons se sont montrées efficaces dans la transmission non persistante du PVY. Cette transmission est cependant variable selon les solanacées, les adventices et les plantes ornementales (Lacomme *et al.*, 2017).

#### **II.1.2.1. Transmission verticale**

Le PVY est transmis naturellement d'un plant mère infecté vers sa progéniture par le biais des tubercules semences (transmission verticale). Il ne peut pas être transmis par les semences ou par le pollen (De Bokx, 1972). La transmission du PVY par les tubercules semences infectés déclenche des épidémies très précoces entraînant souvent des diminutions importantes sur les rendements. Dans ce cas, la destruction des tubercules semences infectés est obligatoire sinon les risques d'infection augmentent dès que le virus démarre son mouvement vertical au sein de la plante. Celle-ci constituera elle-même une deuxième source d'infection et un foyer de dissémination par les pucerons vecteurs qui à leur tour vont assurer la propagation à une plus grande échelle vers d'autres plantes hôtes de ce virus.

#### **II.1.2.2. Transmission horizontale**

Le PVY est transmissible par voie mécanique par les aphides vecteurs ou par inoculation artificielle selon le mode non persistant comme la grande majorité des virus. Contrairement à la transmission persistante, l'acquisition du PVY ne nécessite pas une période de latence. Ce dernier

peut être transmis presque immédiatement par les pucerons qui vont perdre rapidement leur pouvoir infectieux après une alimentation ultérieure.

Actuellement, on dénombre 65 espèces d'aphides vectrices du PVY (Annexe 2). Ces espèces regroupent les aphides colonisateurs de la pomme de terre et d'autres plantes hôtes. Dans ce cas, l'association entre le puceron vecteur et le virus est considérée comme relativement spécifique. Ainsi, une large gamme d'espèces virales ou de souches du même virus peuvent être transmis avec une efficacité différente par un grand nombre d'espèces de pucerons.

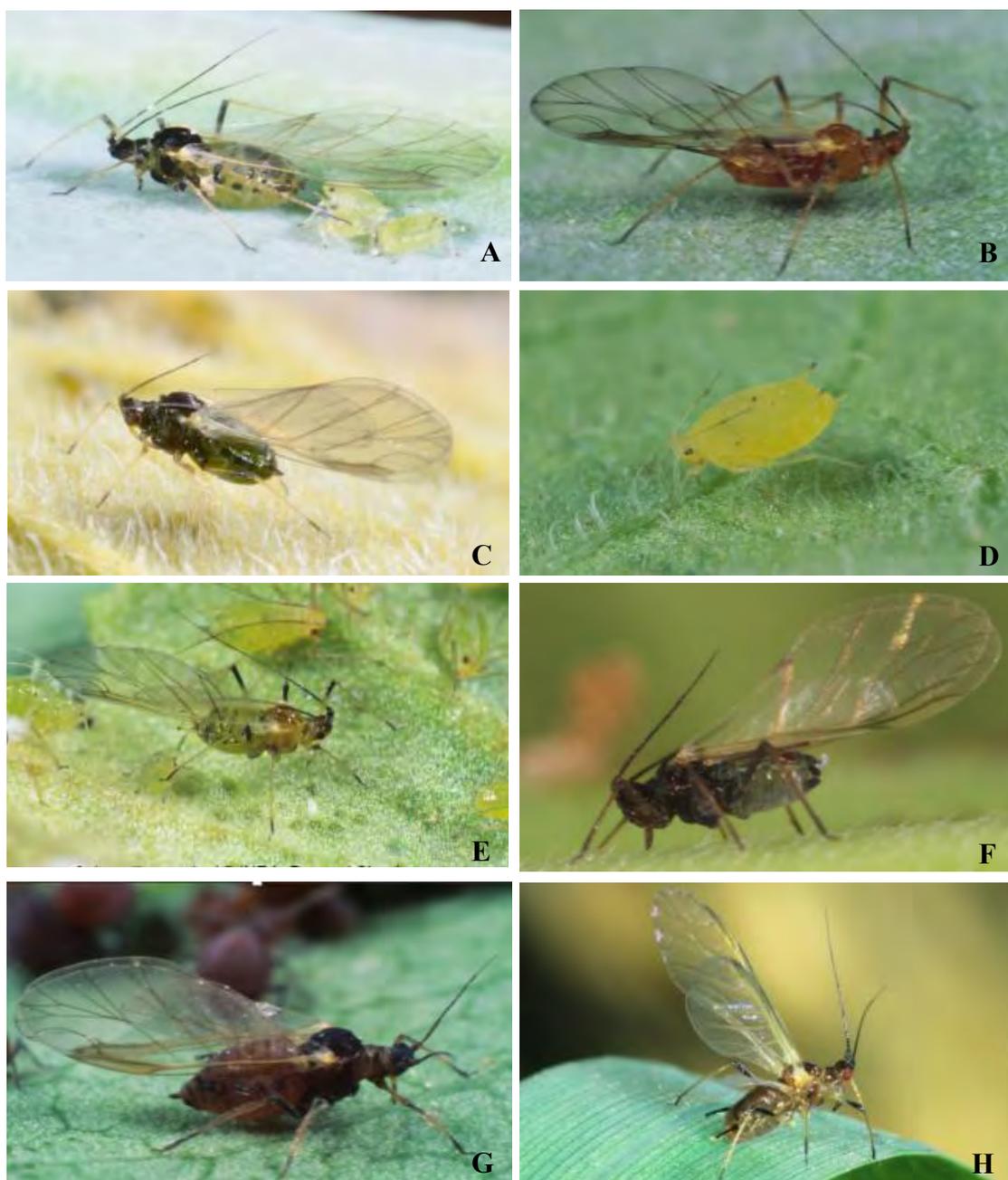
Lors de la transmission du PVY, la protéine de transport HC-Pro agit comme un pont moléculaire assurant ainsi la médiation de la rétention réversible des virions sur des sites de liaisons dans le stylet de l'appareil buccal du puceron durant des brèves périodes de piqûres au moment de la prise de nourriture. Par la suite, le PVY est transféré mécaniquement à un nouvel hôte au cours d'une nouvelle alimentation (Maia *et al.*, 1996 ; Fernandes-Calvino *et al.*, 2010).

### **II.1.3. Diversité des espèces de pucerons associés à la pomme de terre**

De tous les insectes, les pucerons constituent sans doute les ravageurs les plus importants de la pomme de terre à cause des dégâts directs et indirects qu'ils infligent à cette plante. Tous les pucerons sont potentiellement des vecteurs importants de virus. Cinq espèces de pucerons s'alimentent réellement sur la pomme de terre: *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) et *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878) qui établissent précocement leurs colonies sur les feuilles supérieures de la plante (Figs. 2A et B), *Aphis gossypii* Glover, 1877 (Fig. 2C), *Aphis nasturtii* Kalténbach, 1843 et *Aulacorthum solani* (Kalténbach, 1843) qui colonisent les feuilles inférieures et médianes des plants (Figs. 2D et E). D'autres espèces de pucerons non colonisatrices de la pomme de terre, et dont la capacité vectrice est plus faible comme par exemple *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) (Fig. 2F), *Aphis fabae* Scopoli, 1763 et *Sitobion avenae* (Fabricius, 1794) (Figs. 2G et H) qui peuvent jouer un rôle important dans la transmission d'une plante à l'autre de ce potyvirus, du fait de leur forte densité de population (Verbeek *et al.*, 2010 ).

### **II.1.4. Abondance des populations d'aphides colonisant la pomme de terre**

La surveillance des populations aphidiennes présentes dans une culture est une étape incontournable pour l'étude épidémiologique d'une virose pour laquelle elles sont vecteurs. Pour se faire, un piégeage des pucerons est effectué en plein champ, assurant une représentativité de la population par espèce selon différents procédés d'échantillonnage. Ces derniers varient en fonction



**Figure 2** Les principales espèces de pucerons vectrices du PVY. **A.** *Myzus persicae* (Sulzer, 1776). **B.** *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas, 1878). **C.** *Aphis gossypii* Glover, 1877. **D.** *Aphis nasturtii* Kaltenbach, 1843. **E.** *Aulacorthum solani* (Kaltenbach, 1843). **F.** *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758). **G.** *Aphis fabae* Scopoli, 1763. **H.** *Sitobion avenae* (Fabricius, 1794).

de l'objectif de l'étude et de la nature de la forme (aptère ou ailée) des pucerons à échantillonner (Sigvald, 1989). Quoique les pièges jaunes à eau et à succion ne capturent pas toutes les espèces, ils restent incontestablement des instruments simples qui donnent beaucoup d'informations sur l'attraction des pucerons migrants dans les cultures de pomme de terre (Van Harten, 1983 ; Robert *et al.*, 1974 ; 1977).

L'utilisation pratique des données obtenues à l'aide des pièges pour le contrôle du PVY est fortement recommandée car elle donne une image représentative de l'activité relative des différentes espèces impliquées dans le pathosystème "pomme de terre/PVY". Une fois installés au niveau de la strate foliaire, les pièges renseignent efficacement sur la colonisation des aphides migrants dans les cultures de pomme de terre (Rolot, 2005). Le nombre d'aphides capturées à l'aide des pièges jaunes est lié à celui des individus présents sur la culture (Labonne *et al.*, 1989). Cette méthode de piégeage permet de déterminer la date d'apparition des premiers ailés et de mesurer l'intensité de contamination des parcelles.

### **II.1.5. Etude de la capacité vectrice des pucerons majoritaires sur pomme de terre**

L'étude de l'efficacité de transmission du PVY par telle ou telle espèce de pucerons est un préalable important lorsqu'on veut entreprendre une stratégie de lutte contre certaines souches dominantes qui montrent une agressivité forte sur la culture. Parmi les nombreuses espèces de pucerons reconnues vectrices du PVY, *Myzus persicae* est de loin le vecteur le plus efficace (Kostiwi, 1975 ; Eastop, 1977 ; Van Harten, 1983 ; Sigvald, 1984 ; Piron, 1986 ; Ragsdale *et al.*, 2001). Cependant, les autres espèces de pucerons comme *Aphis nasturtii*, *Macrosiphum euphorbiae* et *Aulacorthum solani* qui vivent sur la pomme de terre peuvent également disséminer le PVY (De Bokx, 1987 ; Peters, 1987). En Ecosse, l'espèce *Metopolophium dirhodum* (Walker, 1849) est responsable de 71% des transmissions du PVY (Pickup *et al.*, 2009).

Certaines espèces fréquentent la pomme de terre sans pour autant la coloniser (Ryden *et al.*, 1983). C'est ainsi que 22 espèces ont été reportées comme "visiteuses" par Peters (1987). Parmi ces espèces on peut citer: *Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758), *Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776), *Brachycaudus helichrysi* Kaltenbach, 1843, *Metopolophium dirhodum* (Walker, 1849) et *Cavariella aegopodii* (Scopoli, 1763) qui peuvent être considérées comme des vecteurs probables impliqués dans l'épidémiologie du PVY (Kerlan *et al.*, 1987 ; Weidmann, 1988).

Les différentes souches du PVY ne sont pas transmissibles de la même manière. En effet, les isolats PVY<sup>C</sup> qui sont non-transmissibles par pucerons sont, cependant, transmis lorsqu'ils sont en

association avec le PVA ou avec des souches du PVY<sup>O</sup> (Blanco-Urogoiti, 1998 ; Govier et Kassanis, 1974a, 1974b).

Par ailleurs, les isolats appartenant au groupe des souches nécrotiques se transmettent plus facilement par rapport à d'autres souches du PVY (Proeseler & Weidling, 1975). Il a été également signalé que *M. persicae* et *A. fabae* transmettent mieux le PVY<sup>N</sup> que le PVY<sup>O</sup> avec les taux de transmission respectifs de 50 % et 26 % pour PVY<sup>N</sup> contre 24% et 1% pour PVY<sup>O</sup> (Van Hoof, 1980 ; Sigvald, 1984). Inversement, *A. pisum* semble mieux transmettre le PVY<sup>O</sup> que le PVY<sup>N</sup>, alors que *R. padi* transmet indifféremment ces deux souches (Van Hoof, 1980 ; Sigvald, 1984). L'isolat PVY<sup>N</sup> est transmis efficacement par neuf espèces d'aphides : *A. pisum*, *A. fabae*, *Aphis nasturtii*, *Aphis* spp., *B. helichrysi*, *Myzus cerasi*, *M. persicae*, *Phorodon humuli* et *Uroleucon* sp. En revanche, certaines espèces considérées comme vectrices du PVY n'ont pas été retenues vectrices du PVY<sup>N</sup> (Harrington & Gibson, 1989).

#### II.1.6. Rôle des adventices dans l'épidémiologie du PVY

Le rôle des adventices en tant que réservoirs d'agents pathogènes viraux a eu un impact significatif sur l'épidémiologie du PVY. Les plantes adventices annuelles ou bisannuelles qui sont le plus souvent fréquentes autour des parcelles, constituent des réservoirs permanents pour les aphides et contribuent ainsi à la dissémination rapide du PVY à l'intérieur des cultures (Beemster & De Bokx, 1987). Ces adventices jouent un rôle important dans la conservation du PVY durant l'hiver et constituent une source potentielle de virus pendant le printemps. Parmi les adventices les plus couramment rencontrés dans les cultures de pomme de terre et les plus difficiles à combattre on peut signaler le *Galium aparine* L (gaillet gratteron) et le *Solanum nigrum* L (morelle noire) qui entrent en compétition avec la culture pour l'eau, les nutriments et la lumière (Vafae & Mahmoodi, 2015). En plus des adventices, le PVY peut également subsister dans des cultures hôtes hivernales ou être transmis par les graines de certaines adventices comme ceux de *Solanum nigrum* (Abd El-Aziz *et al.*, 2019).

Le nombre d'espèces réservoirs qu'un virus peut infecter varie selon sa gamme d'hôte (Lecoq, 1996). A la fin des années 1990, 36 espèces d'adventices appartenant à 13 familles botaniques ont été identifiées comme plantes hôtes potentiels du PVY (Edwardson & Christie, 1997). Plus récemment, sept autres espèces adventices ont été également identifiées comme hôtes potentiels (Kaliciak & Syller, 2009 ; Kazinczi *et al.*, 2004). Le PVY peut infecter plusieurs adventices appartenant à 30 familles botaniques comme par exemple les *Solanaceae* et les *Chenopodiaceae* qui permettent aux virus de survivre et de se maintenir en l'absence de culture (Astier *et al.*, 2001).

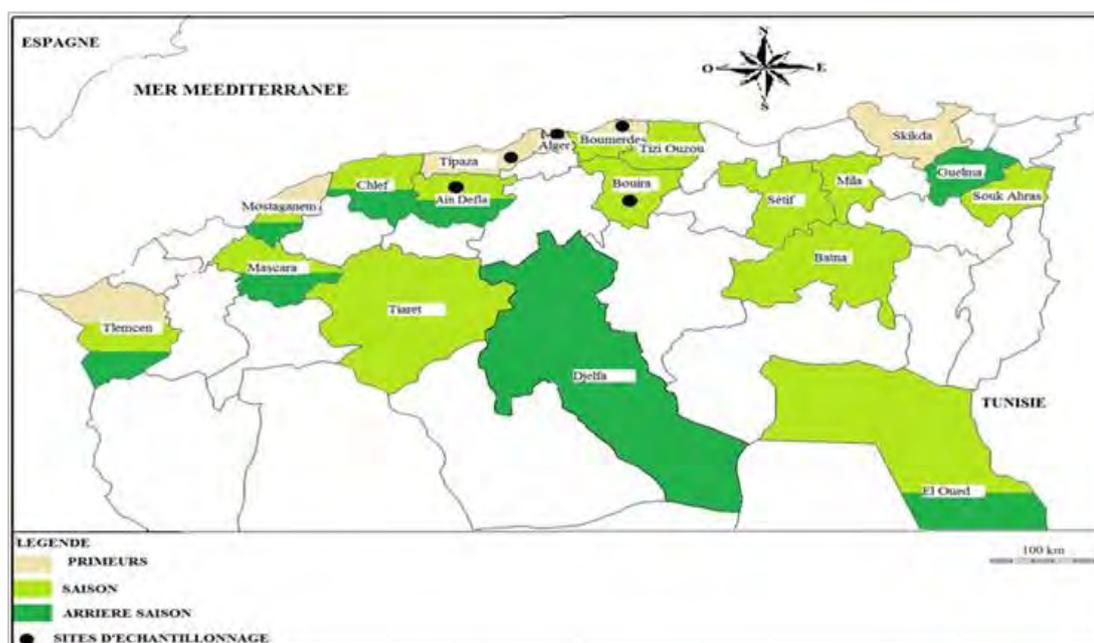
## II.2 MATERIEL ET METHODES

### II.2.1 Prospections et zones d'étude

Les différentes prospections ont été conduites pendant trois campagnes agricoles consécutives de 2013 à 2016. Ces prospections ont été réalisées au niveau de cinq wilayas choisies pour leur forte potentialité dans la production nationale de la pomme de terre (Annexe 3, Fig.3). Ain Defla, Alger, Bouira, Boumerdes et Tipaza. Les parcelles d'étude se répartissent ainsi au niveau des cinq wilayas :

- Ain Defla : 4 parcelles de 3 ha chacune (El Abadia, Rouina, El Amra, Ain Lechiakh),
- Bouira : 2 parcelles de 2 à 3 ha chacune (Aïn Bessem, Haizer)
- Tipaza : 2 parcelles de 2 à 3 ha chacune (Hadjout, Zeralda).
- Alger : 4 parcelles de 3 ha chacune (El-Harrach, El Djoumhouria, Oued Smar, Staoueli)
- Wilaya de Boumerdes : 2 parcelles de 3 ha chacune (Khemis El Khechna, Ouled el Laarbi).

Pour chaque campagne agricole, les prospections ont concerné les deux principales saisons de culture de la pomme de terre [pleine-saison (printemps) et arrière- saison (été)]. Au cours de cette première étape de l'étude, nous avons procédé à l'inspection visuelle des symptômes induits par les principaux virus sur la pomme de terre et plus particulièrement ceux liés au PVY. Ces symptômes sont représentés globalement par les mosaïques, le jaunissement, la nécrose des feuilles, la frisolée, le nanisme et la déformation foliaire.



**Figure 3** Zones d'études et distribution saisonnière de la culture de pomme de terre à travers les principales régions productrices de pomme de terre en Algérie (MADR, 2014).

## II.2.2. Matériel végétal

L'ensemble de l'étude a porté sur cinq variétés de pomme de terre cultivées dans les parcelles prospectées et représentées par : Spunta, Fabula, Ultra, Désirée et Kondor. Ces deux dernières variétés sont cultivées seulement dans la wilaya de Tipaza. Les différentes caractéristiques de ces variétés sont données dans l'annexe 4 (CNCC, 2010).

## II.2.3. Gamme de plantes hôtes indicatrices du PVY

Une gamme restreinte de plantes hôtes a été utilisée pour l'étude des symptômes causés par le PVY. Cette gamme est constituée essentiellement de solanacées et d'une chénopodiacee : le tabac (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi), la tomate (*Solanum lycopersicum* L. var. Marmande), la pomme de terre (*Solanum tuberosum* var. Spunta et var. Fabula), le poivron (*Capsicum annuum* L. var. Oleander) et le chénopode blanc (*Chenopodium album* L.).

## II.2.4. Protocoles proposés pour l'évaluation du risque phytosanitaire de la culture de pomme de terre.

La situation phytosanitaire de la pomme de terre à l'égard des principales viroses et particulièrement celle causée par le PVY a été évaluée à travers les protocoles suivants :

- L'estimation de la fréquence des principaux virus de la pomme de terre (PLRV, X, Y, A et S).
- L'estimation de l'incidence du PVY chez la pomme de terre en fonction de la saison culturale et du stade phénologique de la pomme de terre.
- L'application de différentes méthodes de détection précoce du PVY dans les germes des tubercules récoltés.
- Le recensement des adventices hébergeant le PVY et servant comme hôtes secondaires aux vecteurs entre les saisons culturales.
- L'identification des espèces d'aphides colonisant naturellement la pomme de terre (sous forme d'aptères), leur fréquence selon les saisons culturales ainsi que leur efficacité dans la transmission du PVY.

### II.2.4.1. Fréquence des principaux virus de la pomme de terre selon les régions et durant les trois campagnes agricoles (2013–2016).

Très peu de données sont disponibles sur la fréquence des principaux virus affectant la pomme de terre en Algérie, notamment celles concernant le PVY. La présence de ce dernier est souvent accom-

pagnée par d'autres virus comme X, S, A et PLRV d'où l'intérêt d'évaluer leurs fréquences individuelles et/ou en combinaison avec le PVY et ceci en relation avec la diversité des symptômes observés sur les plants de pomme de terre des différentes régions prospectées.

#### – **Echantillonnage du matériel végétal**

La fréquence relative des virus (Y, X, S, A et PLRV) a été estimée dans une collection de 285 échantillons foliaires prélevés chez les variétés Spunta, Désirée, Fabula, Kondor et Ultra au niveau des cinq régions de l'étude. Les échantillons ont été récoltés à 8 semaines de végétation en plein saison culturale durant les trois campagnes agricoles (2013–2016).

La méthode d'échantillonnage adoptée est celle de Sigvald (1989) qui est basée sur les prélèvements de feuilles à différents étages au niveau des plants (supérieur, médiane et inférieur) distants d'un mètre le long des diagonales parcellaires de chaque région. Ces prélèvements de feuilles ont été effectués de manière aléatoire par rapport à la présence ou non de symptômes associés aux virus, d'où, le nombre des échantillons portant ou non des symptômes était variable selon les régions et le type de variétés de pomme de terre.

#### – **Test immuno enzymatique (DAS-ELISA) pour la détection des virus**

La détection sérologique des virus : PVY, PLRV, PVX, PVA et PVS dans les 285 plants de pomme de terre a été faite par le test DAS ELISA "Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay" selon la méthode de Clark & Adams (1977) et ce en utilisant des kits ELISA produits par la firme Bioreba fournissant les solutions tampons et les anticorps polyclonaux (Annexe 5). Cette technique se déroule en 4 étapes suivie chacune par trois lavages au PBS-T (PBS-Tween à 0,05%) et à l'eau distillée.

La première étape consiste en une sensibilisation de chaque puits de la plaque de microtitration (NUNC) avec 100 µl d'anticorps spécifique anti-virus dilué au 1/1000 avec du tampon carbonate (pH, 9,6) suivi d'une incubation de 4 h à 37°C. Pendant ce temps, les antigènes viraux sont extraits à partir des feuilles de pomme de terre broyées à l'aide d'un presse-feuille à rouleau.

Pour chaque échantillon, 5 à 6 gouttes d'extrait végétal sont récupérées dans un tube Eppendorf contenant 200 µl de tampon d'extraction dilué au 1/20) ; 100 µl de chaque échantillon à tester sont ainsi déposés dans chaque puits de la plaque. Les échantillons sont incubés une nuit à 4°C. Les plaques sont par la suite lavées au PBST. Dans chaque puits on dépose 100 µl de conjugué spécifique couplé à la phosphatase alcaline et dilué au 1/1000 dans le tampon du conjugué. Après une incubation de 4h à 37°C, on ajoute au niveau de chaque puits 100 µl du substrat de cette enzyme (para-

nitrophényl-phosphate) temporairement préparé à raison de 1mg/1ml du tampon Diethanolamine à pH 9,8. La dégradation du substrat incolore par la phosphatase alcaline en composé coloré jaune (para-nitrophényl) va permettre la révélation de la présence du virus. A l'aide du lecteur de plaque ELISA ("Multiskan Ascent Labsystems"), une première lecture des densités optiques (DO) à une longueur d'onde de 405 nm est effectuée au bout d'une demi-heure d'incubation suivie d'une deuxième lecture après une heure d'incubation. La densité optique moyenne de deux répétitions pour chaque échantillon est ainsi obtenue et sera comparée à celle obtenue aussi bien avec les échantillons des témoins négatifs qu'avec les témoins positifs fournis par la firme Bioreba. L'optimisation des valeurs est faite par le logiciel statistique intégré au lecteur ELISA.

Le résultat est considéré comme positif si la valeur de la DO de l'échantillon à tester est trois fois supérieure à la valeur du seuil de détection.

#### **– Calcul du taux d'infection**

A l'issue de ce test ELISA, les résultats représentés par les valeurs moyennes des densités optiques obtenues pour chaque échantillon sont comparés à ceux obtenus avec les témoins négatifs correspondants à chaque virus fourni par la firme Bioreba sous forme lyophilisée dans chaque kit ELISA. Ceci permet donc de déduire les échantillons infectés par chacun des virus recherchés ; le taux de l'infection pour chaque virus est alors estimé en fonction du nombre de plants infectés par rapport au nombre total des plants testés.

#### **– Conservation des isolats PVY.**

Les échantillons de feuilles de pomme de terre, collectés dans les cinq régions étudiées et ayant réagi positivement à l'égard du PVY, ont été conservés comme isolats du PVY selon la méthode de Bos (1969) qui est basée sur la dessiccation à froid du matériel végétal frais en présence d'une couche de chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ). Les isolats peuvent être conservés à 4°C pendant plusieurs années à l'abri de la lumière et de l'humidité pour une utilisation ultérieure notamment pour les tests d'inoculation mécanique.

### **II.2.4.2. Incidence du PVY sur la pomme de terre durant les trois campagnes agricoles (2013 à 2016) dans la région d'Ain Defla**

En plus de l'analyse préliminaire de la fréquence des cinq principaux virus dans les différentes régions prospectées, nous avons également étudié l'incidence particulière du virus le plus dominant sur pomme de terre c'est à dire le PVY sur un grand nombre d'échantillons prélevés au niveau des quatre sites (El Abadia, Rouina, El Amra, Ain Lechiakh) de la région d'Ain Defla durant les trois cam-

pagnes agricoles (2013 à 2016). Le choix de la région d'Ain Defla est justifié par la production importante de pomme de terre par rapport aux quatre autres. Les données climatiques de la région d'Ain Defla de la période d'étude sont indiquées en annexe 6.

Les échantillons collectés au niveau des parcelles de pomme de terre ont été placés séparément dans des sacs en plastique, pour lesquels des codes ont été attribués indiquant le nom du site de la région prospectée, le nom de la variété, la date de prélèvement. L'ensemble des échantillons a été ensuite placé dans une glacière pour éviter la détérioration du matériel végétal lors du déplacement vers le laboratoire.

Lors de la collecte des échantillons, nous avons également tenu compte des éventuelles infections secondaire par le PVY sur les adventices et les repousses de pomme de terre de la culture précédente présents au niveau des parcelles des quatre sites de la région d'Ain Defla durant les trois campagnes agricoles (2013 à 2016).

Les critères considérés lors des prélèvements des échantillons sont basés sur les différentes notations des symptômes observés sur les feuilles (dégénérescence, mosaïque, nécrose, etc.) et sur les tubercules récoltés en plus de l'examen sérologique des échantillons collectés présentant ou pas de symptômes apparents.

#### **–Dates de prélèvements des échantillons**

Pour l'évaluation de l'incidence du PVY, deux facteurs ont été considérés lors de l'échantillonnage : le stade phénologique et la saison culturale. En ce qui concerne le stade phénologique, les prélèvements ont été effectués chez les plants au stade 4 à 5 feuilles en début de culture et chez les plantules germées à partir de tubercules récoltés en fin de culture. Concernant la saison culturale, les prélèvements ont été réalisés en pleine saison et en arrière-saison durant les campagnes culturales 2013-2014, 2014-2015 et 2015-2016. Un total de 1 200 échantillons constitués de rameaux feuillés des variétés de pomme de terre Ultra, Fabula et Spunta ont été prélevés de façon aléatoire le long des diagonales de quatre parcelles situées dans la wilaya de Ain Defla selon le calendrier suivant :

- En début de végétation : 100 échantillons foliaires ont été collectés sur des plants au stade 4 à 5 feuilles (1 mois après la levée) qui coïncide avec la période de forte sensibilité des plants.
- Au moment de la récolte (3 mois après la plantation) : 25 tubercules ont été récoltés le long des diagonales des parcelles au niveau de chaque site soit un total de 100 tubercules. Après une période de dormance, les tubercules prégermés sont mis en coupelles de 100 alvéoles de

5cm de diamètre et de 5 cm de profondeur cm contenant de la tourbe stérilisée. Les coupelles sont ensuite placés dans une cage insecte proof en plexiglas de 95 cm de longueur et de 90 cm de largeur jusqu'à l'émergence des plantules.

#### – Analyse sérologique

Une feuille par échantillon a été directement soumise à l'analyse sérologique par le test DAS-ELISA décrit précédemment. Le reste des feuilles de chaque échantillon a été conservée selon la méthode de Boss (1969), pour des examens ultérieurs.

### **II.2.4.3. Méthodes de détection précoce du PVY dans les germes des tubercules récoltés.**

La détection précoce du PVY est d'une importance capitale pour éviter la propagation du virus dès l'émergence des plants de pomme de terre ou dans un lot de semence contaminé. Pour cela, nous avons utilisé en plus de l'ELISA, deux autres tests sérologiques : le DTBIA ("Direct *Tissue Blot* Immunoassay") et le FLASH-KIT (Agdia, USA) afin de comparer les techniques entre elles du point de vue reproductivité, sensibilité et temps d'exécution. L'analyse sérologique utilisant les trois tests a été réalisée pour chacun d'eux sur un lot de 50 tubercules récoltés au cours de la campagne agricole 2015-2016 au niveau d'Ain Defla.

#### – Détection du PVY par le test DAS-ELISA

Ce test présenté précédemment, utilise un sérum polyclonal anti-PVY à la dilution 1/1000 avec deux répétitions par échantillon. Les échantillons positifs obtenus par ce test sont dénombrés afin de calculer le taux d'infection par ce virus.

#### – Détection du PVY par le test DTBIA

Sur le plan technique, le test DTBIA comparé au test DAS-ELISA présente des avantages en termes de sensibilité, de temps de détection, de coût et de commodité. Il est largement utilisé pour détecter de nombreux virus appartenant aux familles des cucumoviridae, luteoviridae, potexviridae et le groupe du TSWV (Lin *et al.*, 1990 ; Fegla *et al.*, 2001b, Makkouk & Kumari, 2006 ; Shang *et al.*, 2011 ; EL Borollosy, 2015 ; Abd El-Aziz & Younes. 2019) ainsi que la détection de *Xyllela fastidiosa* (Wells *et al.* 1987 sur olivier (Djellouah *et al.*, 2014). Le DTBIA dérive du test ELISA et utilise une membrane de nitrocellulose comme support d'adsorption des protéines (Webster *et al.*, 2004).

L'analyse d'un grand nombre d'échantillons ne nécessite pas, dans le cas du DTBIA, l'extraction du virus et donc le transfert des protéines se fait directement en appliquant la section du fragment de tige ou de feuille fraîchement incisées contre la membrane de nitrocellulose d'où le nom de "Tissue Blot" (Masmoudi *et al.*, 2002). Le résultat positif se traduit par une coloration violacée au niveau des empreintes laissées par les échantillons infectés ayant réagi spécifiquement avec le sérum utilisé, alors que le résultat négatif ne montre aucune coloration.

Au cours de notre expérimentation réalisée selon le protocole décrit par Lin *et al.* (1990) (Annexe 7) nous avons utilisé 2 membranes de nitrocellulose de 10 cm de longueur et de 5 cm de largeur pour tester le lot des 50 tubercules germés. Les sections transversales de 50 germes prélevés à partir des tubercules sont appliquées sur la membrane de nitrocellulose. Celle-ci constitue le support des différents échantillons à analyser suivant les mêmes étapes du test ELISA excepté l'étape de révélation de la réaction enzymatique utilisant comme substrat le NBT où la réponse positive est visualisée au bout de 10 min en donnant la coloration violacée.

#### **– Détection du PVY par le FLASHES KITS**

A la différence des autres tests sérologiques comme ELISA ou DTBIA, l'utilisation du FLASH-KIT ne nécessite pas de conditions optimales d'application du protocole au niveau du laboratoire. Cependant, il peut se faire aisément en plein champ afin de déceler la présence du virus à un stade précoce de la maladie en un temps record et même en absence de symptômes typiques. Le FLASHES-KITS est constitué de bandelette de détection spécifique à chaque virus et d'un sachet en plastique rempli d'une solution tampon d'extraction (PBS) (Annexe 8).

L'identification des virus par ce test peut s'appliquer à tous les organes de la plante à l'état sec ou frais (feuille, tige, fruit, tubercule, etc.). L'échantillon à tester est placé entre les deux parois internes du sachet de broyage en plastique contenant le tampon d'extraction (PBS). Le virus est extrait par broyage de l'échantillon à l'aide d'un pilon métallique ou en porcelaine. L'extrait du virus est alors directement imprégné par capillarité au niveau de la bandelette de détection spécifique introduite délicatement dans le sac de broyage pour quelques secondes. La lecture est effectuée au bout de 3 minutes : la réponse positive est visualisée par l'apparition de deux traits rouges au niveau de la bandelette alors que dans le cas d'une réponse négative, il y a apparition d'un seul trait rouge (Annexe 8).

#### **II.2.4.4. Recensement des plantes adventices infectées par le PVY**

L'étude de l'incidence du PVY nécessite une meilleure connaissance sur l'épidémiologie du vi-

rus et sur sa répartition entre la plante hôte et les autres plantes alternatives infectées par le biais des vecteurs. Les plantes adventices sont considérées comme hôtes secondaires naturelles et sources potentielles pour tous les virus et agissent comme réservoirs permanents du PVY dans l'espace et dans le temps.

Lors de nos prospections conduites durant les trois campagnes agricoles 2013-2016, nous avons recherché le PVY sur les adventices rencontrées à l'intérieur et à l'extérieur des parcelles de pomme de terre dans la région d'Ain Defla. L'identification de ces adventices a été faite à l'aide de la flore de Quézel & Santas (1962, 1963). Les espèces identifiées sont ensuite testées par DAS-ELISA afin de contrôler la présence ou l'absence du PVY et ses deux groupes de souches PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> en utilisant trois anticorps : un anticorps polyclonal pour toutes souches PVY et deux monoclonaux reconnaissant séparément les groupes PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup>.

#### **II.2.4.5. Inventaire et fréquence des pucerons associés à la pomme de terre**

L'évolution de l'incidence du PVY est influencée d'une part, par la fréquence des pucerons vecteurs du PVY colonisant la pomme de terre et d'autre part, par leur degré d'efficacité dans la transmission de ce virus. Pour cela, nous avons effectué un inventaire quantitatif et qualitatif des pucerons présents en plein champ de pomme de terre dans la région d'Ain Defla lors de deux campagnes agricoles 2014-2015 et 2015-2016, suivi par une étude de l'efficacité de transmission du PVY par les espèces de pucerons les plus fréquemment rencontrées au niveau des parcelles prospectées.

La collecte de l'ensemble des espèces de pucerons a été réalisée durant les cultures de pleine saison (mars-mai) et d'arrière-saison (septembre-novembre). La fréquence des pucerons dépend essentiellement de l'abondance de deux types d'espèces : celles dites colonisatrices et celles qualifiées de transitoires qui visitent seulement la culture de pomme de terre. On ne s'intéressera ici qu'aux espèces qui colonisent la culture de la pomme de terre avec leurs deux formes aptères et ailées, capturées respectivement sur le feuillage et au niveau des pièges jaunes. Les échantillonnages sur feuille permettront d'évaluer les colonies se développant sur la pomme de terre. Les captures par piégeage donneront pour chaque région et chaque année la composition en espèces des pucerons ailés fréquentant les parcelles.

##### **– Echantillonnage des pucerons aptères sur les feuilles de pomme de terre**

Pour une bonne estimation des pucerons présents sur la culture, les prélèvements foliaires ont été effectués à différents étages des plants (feuilles basales, médianes et apicales) selon la méthode indiquée par Sigvald (1989). Huit prélèvements aléatoires constitués chacun de 100 feuilles infestées par

les pucerons ont été réalisés pour chacune des saisons de culture de culture durant les deux campagnes agricoles 2014-2015 et 2015-2016. Les prélèvements sont ensuite transférés au laboratoire dans des sachets qui sont numérotés et datés. Les pucerons situés sur ces feuilles ont été collectés délicatement à l'aide d'un pinceau très fin puis dénombrés sous une loupe binoculaire puis identifier.

#### – Echantillonnage des pucerons ailés au niveau des pièges jaunes à eau

Il existe plusieurs types de pièges (pièges à eau colorés, pièges à suction, piège à fils englués, etc.) permettant l'estimation des populations ailées des pucerons au sein d'une parcelle. Les pièges de couleur jaune sont fréquemment utilisés lors des études sur la dissémination du virus (Hille Ris Lambers, 1972 ; Taylor *et al.*, 1972). Deux pièges remplis au trois quart d'eau additionnée d'un émulsifiant ont été placés à 0,7 m du sol dans chaque parcelle, l'un au milieu, l'autre à l'extrémité du champ de pommes de terre destinée à la semence. Ces pièges ont été utilisés de la levée des plants jusqu'à la destruction des fanes durant les cultures de saison et d'arrière-saison. Les pucerons qui étaient collectés deux fois par semaine, ont été conservées dans de l'éthanol à 96% jusqu'à leur identification.

#### – Clef de détermination des pucerons collectés

L'identification des pucerons collectés (aptères et ailés) a été réalisée au niveau des laboratoires d'entomologie de l'INRA de Tunis et de l'ENSA d'Alger à l'aide de clefs de détermination des espèces de Remaudiere (1997) et de Leclant (1999).

### II.2.4.6. Evaluation en conditions contrôlées de la capacité vectrice des souches du PVY

L'estimation de la capacité vectrice des différentes espèces de pucerons a été étudiée en conditions contrôlées. Lors des essais de transmission des souches du PVY, nous avons retenu six espèces de pucerons : *Aphis fabae*, *A. nasturtii*, *A. gossypii*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus persicae* et *Aulacocorthis solani*. Le choix de ces espèces est justifié par leur abondance au niveau des parcelles de pomme de terre et par le fait qu'elles sont connues comme vectrices du PVY.

#### – Protocole d'élevage des pucerons

L'élevage des six espèces de puceron a été réalisé séparément sur des plantules issues de tubercules de pomme de terre appartenant à la variété Spunta. Ces tubercules qui nous ont été fourni par le CNCC (El-Harrach) sont certifiés indemnes de virus. Les plantules issues de ces tubercules et servant de support pour les pucerons sont maintenues dans des cages en plexiglas insecte-proof et ventilées de 50 cm de hauteur, 20 cm de largeur et 20 cm de profondeur. Les cages sont placées dans une chambre de culture à une température de 23°C, une humidité relative de 60% et sous une photopé-

riode de 16h de lumière et 8h d'obscurité. Ces conditions (température, humidité et photopériode) sont favorables à la croissance des plantules et à la pullulation des différentes générations des espèces de pucerons.

#### **– Origine des isolats PVY utilisés pour les essais de transmissions**

Lors des essais de transmission, la source du PVY provient de quatre isolats dont deux appartiennent au sérotype N (PVY<sup>N</sup>-Kh, PVY<sup>N</sup>-Ad) et les deux autres au sérotype O (PVY<sup>O</sup>-Os et PVY<sup>O</sup>-Br). Ces isolats ont été collectés sur pomme de terre au cours de trois campagnes agricoles (2013-2014, 2014-2015 et 2015-2016) au niveau des régions de Boumerdes, d'Ain Defla, d'Alger et de Bouira.

Afin de disposer d'un inoculum viral au cours des essais de transmission, chaque isolat a été multiplié par inoculation mécanique de 5 jeunes plantules de tabac sain appartenant à la variété Xanthi. Avant l'inoculation mécanique, les plantules de tabac ont été préalablement vérifiées comme étant indemnes de virus au moyen du test ELISA en utilisant les sera contre les cinq virus de pomme de terre.

#### **– Inoculation mécanique des plants de tabac par les 4 isolats PVY de pomme de terre**

L'inoculation mécanique a été effectuée sur des plants de tabac. Le tabac a été choisi, dans ce cas, comme plante indicatrice pour la discrimination du type de souches du PVY selon les symptômes induits après l'infection. Cette inoculation a été réalisée selon la méthode de Rolot (2005) qui utilise comme inoculum, l'extrait brut d'un gramme de feuilles infectées et broyées dans 4 ml de tampon phosphate à 0,01M (pH de 7,4) additionné de charbon actif comme antioxydant. Le broyat obtenu pour chaque isolat est alors filtré sur une étamine puis directement étalé à l'aide d'un doigtier en latex sur deux feuilles des plants de tabac, préalablement saupoudrées d'une poudre abrasive de carborundum. Au bout de 3 minutes, les plantules de tabac ainsi inoculées sont abondamment rincées à l'eau distillée puis placées séparément dans des cages insecte-proof au niveau d'une chambre de culture à 23°C pour une durée de 20 jours jusqu'à l'apparition des symptômes. Trois semaines plus tard, les symptômes observés sont notés et comparés avec ceux des données bibliographiques se référant aux deux groupes de souches O et N du PVY.

Le passage du virus dans les plants de tabac inoculés a été confirmé par un contrôle sérologique utilisant des FLASH-KITS imprégnés d'anticorps anti-PVY polyclonal reconnaissant toutes les souches du PVY. Les plantules de tabac ayant répondu positivement au test sérologique serviront d'inoculum pour chaque isolat lors des tests de transmission par le biais des six espèces de pucerons issues de l'élevage.

### **– Protocole de transmission des quatre isolats par le biais des pucerons chez le tabac**

Les différents essais de transmission ont été réalisés par passage des adultes aptères des six espèces de pucerons des plants de tabac inoculées vers des plants de tabac sains. A l'aide d'un pinceau mouillé, cent (100) individus par espèce ont été déposés dans une boîte Petri stérile pour un jeûne de 2 heures permettant et d'augmenter son appétit. Les pucerons de chaque espèce sont ensuite transférés sur les feuilles de tabac inoculés artificiellement par les différents isolats du PVY pour un temps d'acquisition de 3 mn. Par la suite, un groupe de 5 pucerons/espèce a été déposé sur les feuilles d'un plant de tabac indemne de virus pour une période d'inoculation de 24 heures.

Cette opération est répétée trois fois à raison de 15 plants de tabac/espèce/isolat de PVY maintenus dans des cages insecte-proof au niveau d'une chambre de culture, soit un total de 270 plant de tabac (15 x 3 x 6 espèces de pucerons). Après 24 heures, un traitement insecticide a été appliqué pour éliminer tous les pucerons ayant servi à l'inoculation des différents isolats du PVY. Le pourcentage de l'efficacité de transmission par les différentes espèces de pucerons est alors estimé en fonction du nombre de plants infectés par isolat sur le nombre total des plants testés multiplié par 100.

### **–Analyse statistique des données**

Les données obtenues lors de l'étude de l'efficacité de transmission par les cinq espèces de pucerons étudiées sont soumis à l'analyse statistique par le biais du logiciel Statistica complétée par une deuxième analyse par GLM utilisant le R linéaire. La comparaison de la vitesse de transmission entre ces espèces est réalisée par une ANOVA où les moyennes sont classées par le test LSD ou ppds à  $P < 0,05$ .

## **II.3. RESULTATS ET DISCUSSION**

### **II.3.1. Identification et fréquence des principaux virus de pomme de terre dans les cinq régions étudiées durant la période (2013 à 2016).**

Les maladies virales peuvent souvent être diagnostiquées par des symptômes de mosaïque sur les feuilles, le retard de croissance des plants et les malformations des feuilles et des tubercules de pomme de terre. Toutefois, l'expression de ces symptômes peut être masquée à cause des interactions entre les différents virus, le type de variétés et les conditions de croissance comme le climat ou l'âge des plants lorsqu'ils sont infectés. L'étude symptomatologique est donc une étape essentielle dans le diagnostic des maladies virales, mais ne suffit pas à elle seule pour incriminer l'agent responsable. Les hypothèses établies, permettent d'orienter l'examen sérologique pour l'identification d'un ou

plusieurs virus. Ainsi, la diversité des principaux virus de pomme de terre a été abordée à travers des critères macroscopiques observés en plein champ, corroborés avec les données du test sérologique par DAS-ELISA.

### **II.3.1.1. Inspection visuelle des symptômes**

Les observations visuelles effectuées lors des campagnes agricoles 2013-2015, 2014-2015 et 2015-2016 ont porté sur les changements de couleur et de forme des feuilles ainsi que l'aspect général que présentaient les plants de pomme de terre au niveau des cinq régions d'étude. Les symptômes observés sur ces plants sont alors comparés à ceux décrits dans la bibliographie.

Une grande variabilité symptomatologique est notée au niveau des différentes parcelles visitées sur une grande part de plants de pomme de terre montrant des feuilles avec de la mosaïque légère et ou sévère, de la frisolée, du jaunissement, de la marbrure et de l'enroulement, en plus dans certains cas les plants sont rabougris comme le montre la figure 4 (de A à P).

A priori, ces symptômes laissent suggérer la présence des virus PVY, PLRV, PVA, PVS et le PVX qui induisent en majorité des symptômes similaires sur la culture de pomme de terre. En effet, l'enroulement et le jaunissement sont généralement attribués au PLRV, alors que, la mosaïque, la nécrose, la frisolée et le nanisme sont liés à la présence du PVY souvent en association avec le PVX et deux autres virus tous aussi importants comme le PVS et le PVA. Ces derniers peuvent induire des mosaïques sévères en plus de la déformation foliaire (Douglas *et al.*, 1972 ; Wang *et al.*, 2011 ; Hull *et al.*, 2014 ; Yardimici *et al.*, 2015).

Il reste que, ces hypothèses ne sont pas suffisantes même à l'appui des données bibliographiques si on tient compte des autres facteurs biotiques ou abiotiques auxquels est confrontée la culture de pomme de terre. Ces facteurs engendrant des désordres physiologiques liés à une déficience nutritionnelle ou encore à une toxicité de pesticides, pouvant donner des symptômes similaires à ceux causés par les virus soupçonnés présents.



**Figure 4** Symptômes observés sur pomme de terre en plein champ. **A.** Mosaïque sévère. **B.** Eclaircissement internervaire. **C.** Enroulement. **D.** Mosaïque et frisolée. **E.** Feuille violacée. Marbrure. **G.** Nanisme, enroulement et déformation foliaire. **H, J, I, K et N.** Lésions nécrotiques. **L.** Jaunissement. **M.** Gaufrage. **O.** bigarrure. **P.** Gaufrage et aspect argenté sur feuille.



(Suite de Figure 4)

A la suite des informations recueillies lors de la notation des symptômes, une collection de 285 échantillons foliaires a été prélevée sur différentes variétés de pomme de terre, dont 242 présentaient la mosaïque légère à sévère, de la frisolée, du jaunissement et des lésions nécrotiques localisées au niveau des feuilles avec un nanisme des plants (Fig.4G). En revanche, les 43 échantillons restants étaient faiblement symptomatiques à asymptomatiques. L'ensemble de la collection sera soumis à un examen sérologique pour confirmer et affiner le diagnostic des virus suspectés présents.

### II.3.1.2. Identification sérologique des virus par le test DAS-ELISA

Les résultats de ce test sont discutés en fonction de la présence ou l'absence des symptômes observés en plein champ (Tableau 1) et en fonction du type d'infection par les virus présents soit simple ou multiple (Tableaux 2a, 2b, 2c). Un plant est considéré comme infecté en présence d'au moins un des virus étudiés (PLRV, PVA, PVS, PVX et PVY).

**Tableau 1** Taux d'infection virale totale (par au moins un des cinq virus testés) des plants symptomatiques (Symp+) selon la région et le type de variété des plants de pomme de terre échantillonnés

| Région       | Cultivar | Echantillons infectés (%) |                      |             |                      | Echantillons non infectés (%) |                 |             |                |
|--------------|----------|---------------------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------------------------|-----------------|-------------|----------------|
|              |          | Total                     |                      | Sym(+)      |                      | Total                         |                 | Sym(+)      |                |
| Alger        | Spunta   | 100                       | (22/22) <sup>a</sup> | 95,5        | (21/22) <sup>b</sup> | 0                             | (0/22)          | 0           | (0/0)          |
|              | Fabula   | 92,6                      | (25/27)              | 92          | (23/25)              | 7,4                           | (2/27)          | 100         | (2/2)          |
| Ain Defla    | Spunta   | 75,9                      | (41/54)              | 97,5        | (40/41)              | 24,1                          | (13/54)         | 23,1        | (3/13)         |
| Bouira       | Spunta   | 54,2                      | (13/24)              | 100         | (13/13)              | 45,8                          | (11/24)         | 0           | (0/11)         |
| Boumerdes    | Ultra    | 100                       | (32/32)              | 96,8        | (31/32)              | 0                             | (0/32)          | 0           | (0/0)          |
|              | Fabula   | 80,8                      | (42/52)              | 97,6        | (41/42)              | 19,2                          | (10/52)         | 50          | (5/10)         |
| Tipaza       | Spunta   | 81,1                      | (30/37)              | 96,6        | (29/30)              | 18,9                          | (7/37)          | 28,6        | (2/7)          |
|              | Désirée  | 92,3                      | (24/26)              | 91,6        | (22/24)              | 7,7                           | (2/26)          | 0           | (0/2)          |
|              | Condor   | 81,8                      | (9/11)               | 100         | (9/9)                | 18,2                          | (2/11)          | 50          | (1/2)          |
| <b>Total</b> |          | <b>83,5</b>               | <b>(238/285)</b>     | <b>96,2</b> | <b>(229/238)</b>     | <b>16,5</b>                   | <b>(47/285)</b> | <b>27,6</b> | <b>(13/47)</b> |

<sup>a</sup> Nombre total des plants infectés ou non /nombre total des plants testés/région/variété.

<sup>b</sup> Nombre de plants symptomatiques (Symp+) infectés ou non/nombre total des plants testés/région /variété

#### –Taux d'infection virale des plants symptomatiques (Symp+) selon la région et le type de variété des plants de pomme de terre échantillonnés.

Il en ressort que, parmi les 285 échantillons analysés, 238 (soit 83.5%) sont infectés par au moins un des cinq virus considérés. Alors que, 47 (soit 16.5%) échantillons restants ne présentent aucune infection même si 13 échantillons d'entre eux (soit 27.6%), montraient légèrement des symptômes de mosaïque et de jaunissement foliaires. *A contrario*, seulement, 9/238 (3.7%) échantillons d'apparence

saine sont infectés, ce qui permet de dire que la présence de virus n'est toujours pas corrélée avec des symptômes apparents et vice versa.

Ces résultats sont observés quelle que soit la région et pour la majorité des variétés de pomme de terre. Les régions prospectées les plus infectées, sont représentées par Alger (var. Spunta) et Boumerdes (var. Ultra) avec 100% d'infection virale ; tous les échantillons présentant des symptômes étant infectés. La région de Bouira (var. Spunta) est la moins infectée, tous les échantillons symptomatiques sont atteints de virus (Tableau1). A travers le cas de la variété Spunta, il semble que le taux d'infection soit plutôt lié à l'origine géographique des échantillons.

#### **– Fréquence des principaux virus de pomme de terre en fonction du type d'infection**

Nos résultats indiqués par le tableau 2A et par les figures 5A et 5B, montrent clairement la présence dominante du PVY avec une fréquence moyenne totale de 93%, alors que celle causée par les autres virus s'est révélée très faible de l'ordre de 5,5% en présence du PLRV et 0,5% seulement pour les virus X, S et A qui sont moins sporadiques, et ce quel que soit les régions prospectées et le type de variété de pomme de terre.

Considérant, les différentes régions d'où proviennent l'ensemble des échantillons analysés (Tableau 2B et Fig.5A), le taux d'infection moyen simple par le PVY oscille entre 46.29% (Ain Defla) et 75.51% (Alger). Quant au plus fort taux d'infection mixte (Tableau 2C, Fig. 5B) il a été enregistré à Ain Defla (20.4%), alors que Bouira ne présentait aucune infection de ce type. Les régions, d'Alger, Boumerdes et Tipaza présentent presque le même taux d'infection mixte. La combinaison la plus répondue est représentée par PVY+PVX, que l'on retrouve principalement à Alger.

A travers l'exemple de Spunta, il semble que le type d'infection (simple ou multiple) ne soit pas lié à la variété de pomme de terre mais plutôt à l'origine géographique de l'échantillon. Ainsi pour cette variété, le taux d'infection mixte varie de 0% à Bouira à 26.8% à Ain Defla. Le taux d'infection le plus élevé (55.5%) est enregistré pour la variété Kondor à Tipaza.

#### **II.3.1.3. Incidence du PVY dans les parcelles de production de pomme de terre de semence dans la région d'Ain Defla**

La faible fréquence des virus X, A, S et PLRV notée dans les parcelles de pomme de terre de toutes les régions prospectées, a conduit à un échantillonnage plus large pour avoir une estimation plus précise et plus détaillée de la dominance omniprésente du PVY et ce dans 4 localités de la

**Tableau 2A** Fréquence des virus Y, X, S, A et PLRV en fonction du type d'infection, de la variété de pomme de terre et des régions prospectées durant les campagnes agricoles 2013 à 2016.

| Origine des isolats |          | Type d'infection             |                 |                |                |                |                           |                |                |                |               |               | Total         |                |                    |
|---------------------|----------|------------------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|---------------------------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|--------------------|
| Région              | Cultivar | Simple                       |                 |                |                |                | Multiple                  |                |                |                |               |               |               |                |                    |
|                     |          | PVY                          | PLRV            | PVX            | PVS            | PVA            | PVY                       |                | PLRV           |                | PVX           |               |               |                |                    |
|                     |          |                              |                 |                |                |                | PLRV                      | PVX            | PVS            | PVX            | PVS           | PVA           |               | PVS            |                    |
| Alger               | Spunta   | 89.5<br>(17/19) <sup>a</sup> | 10.5<br>(2/19)  |                |                |                | 100<br>(3/3) <sup>a</sup> |                |                |                |               |               |               |                | 22/22 <sup>b</sup> |
|                     | Fabula   | 95.2<br>(20/21)              |                 | 4.8<br>(1/21)  |                |                | 100<br>(4/4)              |                |                |                |               |               |               |                | 25/27              |
| Ain Defla           | Spunta   | 83.3<br>(25/30)              | 16.7<br>(5/30)  |                |                |                | 9<br>(1/11)               | 36.3<br>(4/11) |                | 27.2<br>(3/11) |               |               |               | 27.2<br>(3/11) | 41/54              |
| Bouira              | Spunta   | 100<br>(13/13)               |                 |                |                |                |                           |                |                |                |               |               |               |                | 13/24              |
| Boumerdes           | Ultra    | 93.1<br>(27/29)              | 6.9<br>(2/29)   |                |                |                |                           |                | 100<br>(3/3)   |                |               |               |               |                | 32/32              |
|                     | Fabula   | 94.1<br>(32/34)              | 5.9<br>(2/34)   |                |                |                |                           | 37.5<br>(3/8)  | 37.5<br>(3/8)  | 25<br>(2/8)    |               |               |               |                | 42/52              |
| Tipaza              | Spunta   | 92.6<br>(25/27)              |                 |                | 3.7<br>(1/27)  | 3.7<br>(1/27)  | 100<br>(3/3)              |                |                |                |               |               |               |                | 30/37              |
|                     | Desirée  | 100<br>(22/22)               |                 |                |                |                |                           |                |                |                |               | 100<br>(2/2)  |               |                | 24/26              |
|                     | Condor   | 100<br>(4/4)                 |                 |                |                |                |                           | 40<br>(2/5)    |                | 60<br>(3/5)    |               |               |               |                | 9/11               |
| <b>Total</b>        |          | 93<br>(185/199)              | 5.5<br>(11/199) | 0.5<br>(1/199) | 0.5<br>(1/199) | 0.5<br>(1/199) | 10.2<br>(4/39)            | 41<br>(16/39)  | 15.4<br>(6/39) | 15.4<br>(6/39) | 5.1<br>(2/39) | 5.1<br>(2/39) | 7.7<br>(3/39) |                | 238/285            |

<sup>a</sup> Nombre de plants infectés/nombre total des plants infectés par un ou plusieurs virus.

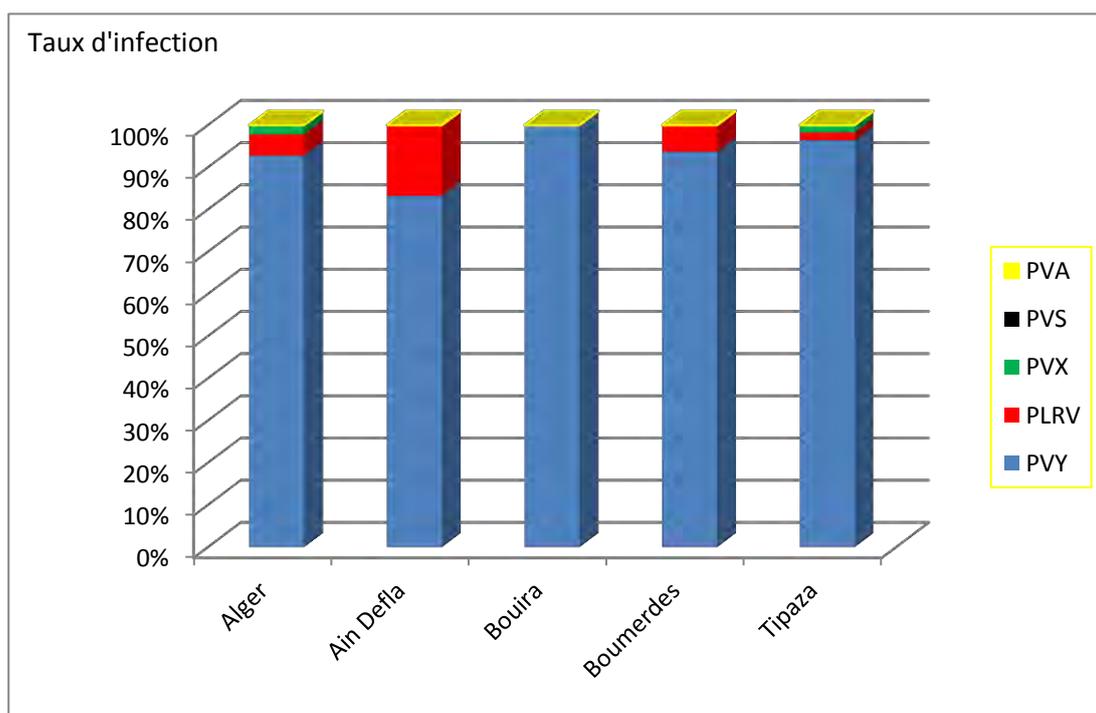
<sup>b</sup> Nombre de plants infectés/ nombre total des plants collectés.

**Tableau 2B** Taux d'infection simple (%) par un virus et par région

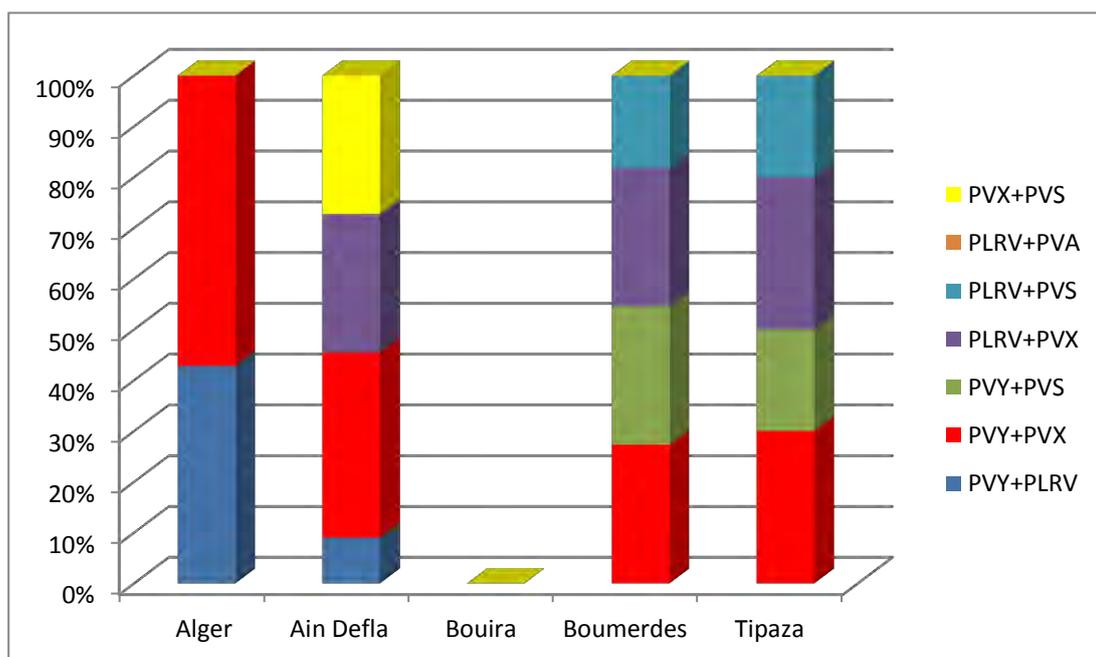
| Région | Alger | Ain Defla | Bouira | Boumerdes | Tipaza |
|--------|-------|-----------|--------|-----------|--------|
| PVY    | 75,51 | 46,29     | 54,16  | 70,23     | 68,91  |
| PLRV   | 4,08  | 9,25      | 0      | 4,76      | 0      |
| PVX    | 2,04  | 0         | 0      | 0         | 0      |
| PVS    | 0     | 0         | 0      | 0         | 1,35   |
| PVA    | 0     | 0         | 0      | 0         | 1,35   |

**Tableau 2C** Taux d'infection multiple (%) par combinaison de 2 virus et par région

| Type infection | Alger | Ain Defla | Bouira | Boumerdes | Tipaza |
|----------------|-------|-----------|--------|-----------|--------|
| PVY+PLRV       | 6,12  | 1,85      | 0      | 0         | 0      |
| PVY+PVX        | 8,16  | 7,4       | 0      | 3,57      | 6,75   |
| PVY+PVS        | 0     | 0         | 0      | 7,14      | 0      |
| PLRV+PVX       | 0     | 5,55      | 0      | 0         | 4,05   |
| PLRV+PVS       | 0     | 0         | 0      | 2,32      | 0      |
| PLRV+PVA       | 0     | 0         | 0      | 0         | 2,7    |
| PVX+PVS        | 0     | 5,55      | 0      | 0         | 0      |



**Figure 5A** Fréquence des principaux virus en infection simple sur pomme de terre, en fonction des régions prospectées de 2013 à 2016



**Figure 5B** Fréquence des principaux virus en infection mixte sur pomme de terre, en fonction des régions prospectées de 2013 à 2016.

wilaya d'Ain Defla. Cette région est dotée du plus haut potentiel de production de pomme de terre de consommation et de semence comparée au reste des régions étudiées.

Dans cette approche, l'estimation de l'incidence du PVY sur la pomme de terre a été faite aussi bien en début de culture (inoculum primaire) qu'en fin de culture (après récolte) pour deux saisons culturales (pleine et arrière saisons) durant les trois campagnes agricoles de 2013 à 2016. Les résultats obtenus de l'examen sérologique sont présentés dans le tableau 3 et illustrés par la figure 6.

**Tableau 3** Taux moyens d'infection du PVY en fonction de la saison culturale et des stades phénologiques des plants de pomme de terre.

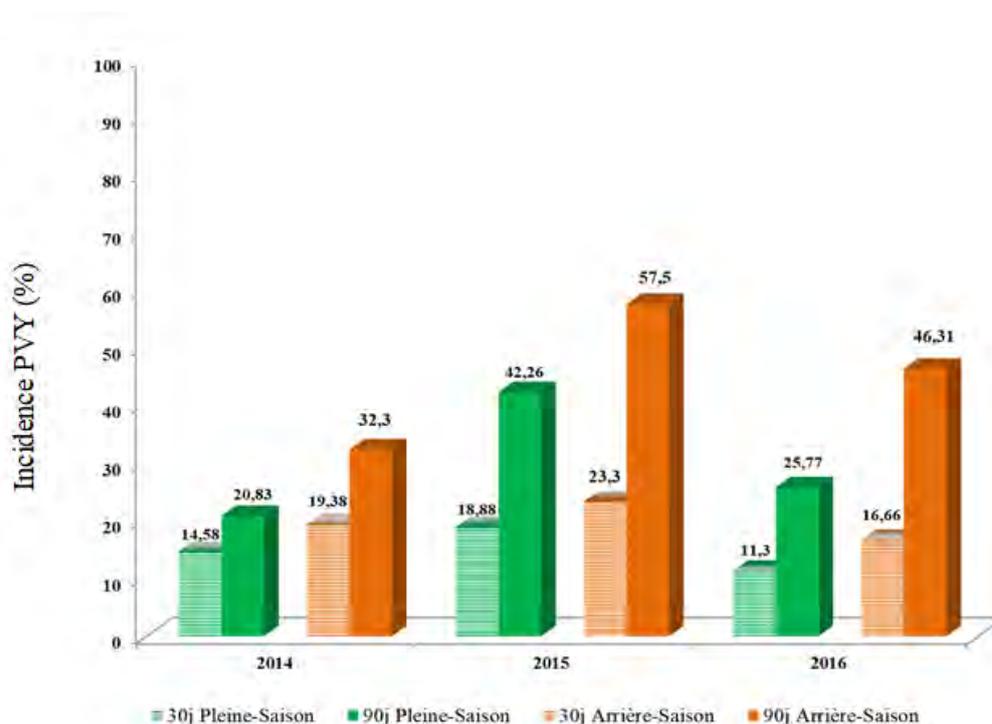
| Période saisonnière | Incidence du PVY (%) |                |                  |                |
|---------------------|----------------------|----------------|------------------|----------------|
|                     | Pleine-Saison        |                | Arrière-Saison   |                |
|                     | Début de culture     | Fin de culture | Début de culture | Fin de culture |
| 2014                | 14,58                | 20,83          | 19,38            | 32,3           |
| 2015                | 18,88                | 42,26          | 23,3             | 57,5           |
| 2016                | 11,3                 | 25,77          | 16,66            | 46,31          |

Le taux d'infection par le PVY augmente considérablement du début de culture à la récolte des tubercules et ce pour les deux saisons culturales de toutes les campagnes agricoles considérées. Cela, semble traduire une infection secondaire survenue dans la descendance issue de la culture primaire.

A l'émergence des plants durant les trois campagnes agricoles, les taux d'infection du PVY se rapprochent avec une légère supériorité pour l'année 2014 -2015. Ce stade du développement de la plante de pomme de terre, comme pour les solanacées, coïncide avec le stade de forte sensibilité à l'infection virale.

En fin de culture et après la récolte, les infections du PVY dans les plantules issues des tubercules récoltés sont très élevées, pour toutes les années, dépassant les seuils tolérés pour la production des semences certifiées par la législation du pays. La campagne 2014-2015, reste toujours la plus marquée avec une plus forte augmentation d'infection virale, en fin de culture, probablement due aux températures automnales plus clémentes notées en cette période. Ceci, est en faveur d'une forte activité aphidienne comparativement aux autres années où les pucerons étaient moins abondants.

En réalité, cette corrélation est évidente mais pas pour toutes les années, l'abondance des pucerons n'explique pas à elle seule l'augmentation de l'infection virale. En effet, pour toute la période agricole considérée, l'arrière-saison de la culture de pomme de terre, a enregistré la plus forte augmentation de l'infection par le PVY surtout en fin de culture, par rapport à la pleine saison culturale où l'activité aphidienne est généralement plus importante. Ceci, laisse suggérer que l'abondance des pucerons n'explique pas à elle seule l'infection par le PVY.

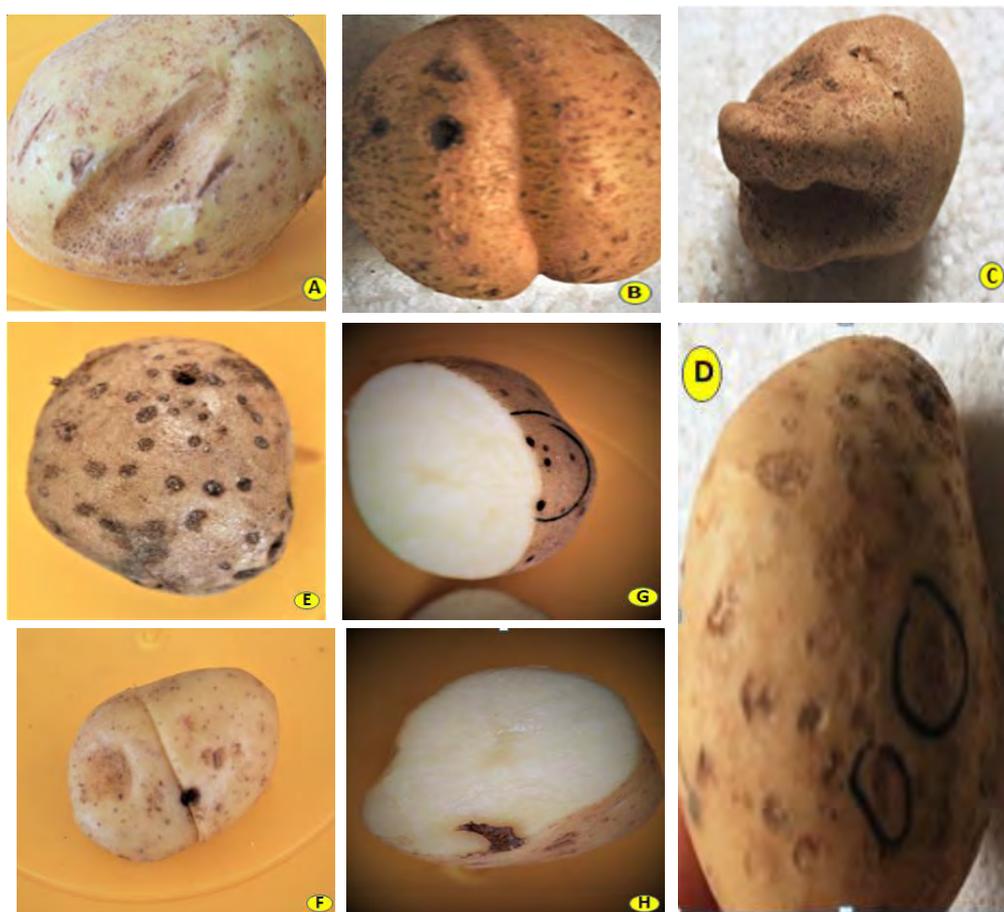


**Figure 6** Incidence du PVY en fonction du stade phénologique de la plante et de la saison culturale au niveau de la région d'Ain Defla.

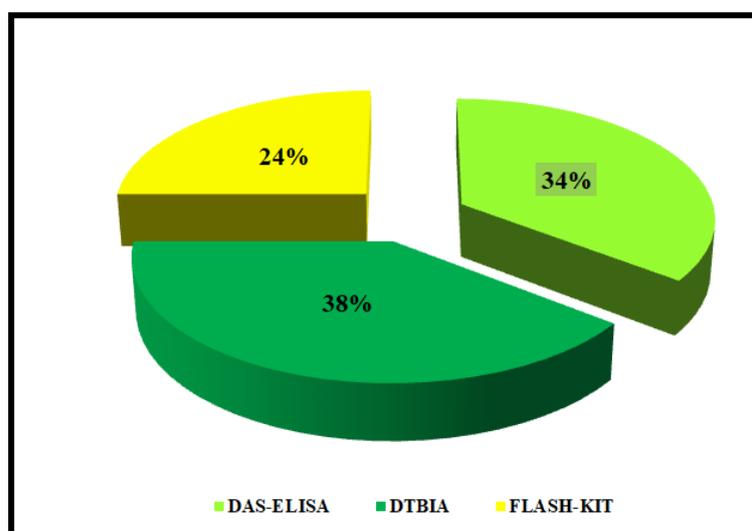
#### II.3.1.4. Détection précoce du PVY sur les germes de tubercules récoltés

La production commerciale de pomme de terre de semence se fait principalement par multiplication végétative au moyen de tubercules. Ces derniers, s'ils sont infectés constitueraient une source d'infection pour de nombreux virus qui sont transmis de génération en génération et de région en région (Hooker, 1986).

Vu l'importance de cette étape pour le contrôle des semences produites localement ou importées, trois méthodes ont été utilisées à titre comparatif : DAS-ELISA, DTBIA et le FLASH-KIT. Parmi la collection des tubercules récoltés sur les deux variétés Spunta et Fabula, nous avons sélectionné, ceux montrant des taches nécrotiques superficielles ou profondes et ceux qui étaient déformés, rappelant à priori les symptômes du PTNRD (Fig.7).



**Figure 7** Symptômes du PTNRD sur des tubercules de pomme de terre récoltés durant les campagnes (2013-2016) et appartenant à la variété Spunta (A) et la variété Fabula (B, C, D, E): Déformation et anneaux nécrotiques profonds ou superficiels.



**Figure 8** Taux d'infection du PVY enregistrés par DAS-ELISA , DTBIA et FLASH-KITS.

La figure 8 représente, les taux moyens d'infection du PVY, obtenus sur les 50 plantules analysées par les trois tests utilisés. Ces plantules sont issues des tubercules de pomme de terre récoltés au cours de la campagne (2014-2015) dans la région d'Ain Defla où les taux de l'infection enregistrés au début de culture étaient les plus importants.

Il s'avère que, le PVY a été détecté par les trois tests utilisés, avec des taux d'infection variant pour les mêmes échantillons analysés. Ces taux, résulteraient probablement d'une infection secondaire survenue avant la récolte des tubercules et à la présence des adventices et repousses de pomme de terre de la culture précédente, pouvant héberger le virus.

Bien que, les valeurs des taux révélés par les deux tests DTBIA et DAS-ELISA, soient relativement proches, le test DTBIA, s'avère le plus sensible en détectant le plus grand nombre de plants infectés, et permet aussi, de réduire le temps et les couts lors de l'extraction de virus.

Cependant, le contrôle de l'infection virale par le FLASH-KIT, a révélé un nombre de plants infectés, inférieur à celui donné par les deux tests précédents, cela, pourrait traduire, la faible concentration en virus qui n'a pu être détectée dans ce cas. L'utilisation de FLASH-KIT, permet toutefois, de détecter efficacement, de fortes concentrations du virus et ce dans moins de 3 minutes, par l'apparition de deux bandes rouges comme indiquées en figure 9.

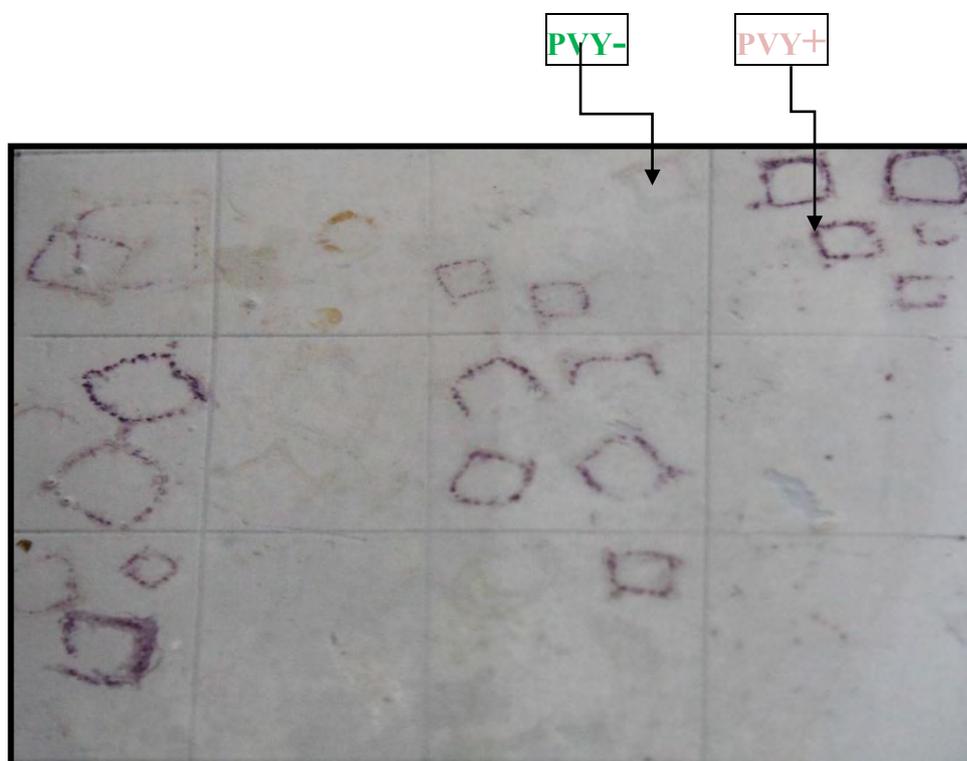


**Figure 9** Résultat du test FLASH-KIT en présence du sérum anti-PVY

Il s'avère que, le PVY a été détecté par les trois tests utilisés, avec des taux d'infection variant pour les mêmes échantillons analysés. Ces taux, résulteraient probablement d'une infection secondaire survenue avant la récolte des tubercules et à la présence des adventices et repousses de pomme de terre de la culture précédente, pouvant héberger le virus.

Bien que, les valeurs des taux révélés par les deux tests DTBIA et DAS-ELISA, soient relativement proches, le test DTBIA, s'avère le plus sensible en détectant le plus grand nombre de plants infectés, et permet aussi, de réduire le temps et les couts lors de l'extraction de virus.

Cependant, le contrôle de l'infection virale par le FLASH-KIT, a révélé un nombre de plants infectés, inférieur à celui donné par les deux tests précédents, cela, pourrait traduire, la faible concentration en virus qui n'a pu être détectée dans ce cas. L'utilisation de FLASH-KIT, permet toutefois, de détecter efficacement, de fortes concentrations du virus et ce dans moins de 3 minutes, par l'apparition de deux bandes rouges comme indiquées en figure 9.



**Figure 10** Visualisation de la réponse du test DTBIA en présence du sérum anti-PVY.

Le test DTBIA permet, de visualiser une réponse positive seulement en 2 à 3 min soit à l'œil nu ou sous le microscope photonique en repérant les ponctuations violacées où sont localisées les protéines capsidiales du virus au niveau des sections de feuilles et de tiges infectées par le virus recherché (Fig.10).

Alors que la réponse positive obtenue par DAS-ELISA est visualisée au bout de 30 à 60 min, dès

l'apparition de la couleur jaune au niveau des puits supportant les échantillons infectés. Une lecture des densités optiques à 405 nm au spectrophotomètre, est nécessaire, permettant la confirmation des résultats visuels. La sensibilité du test DAS-ELISA pour la détection du virus n'est pas négligeable, mais reste en dessous de celle du DTBIA, qui a permis la détection des virus à de faibles concentrations et même chez les plants asymptomatiques. Des résultats similaires ont déjà été obtenus par les travaux de Djellouah *et al.*, (2014) et Yardumci *et al.*, (2015).

Pour toutes ses raisons, nos résultats, sont en faveur de l'utilisation des tests DTBIA et FLASH-KIT comme des méthodes alternatives et fiables du côté du test ELISA pour la détection effective du virus dans les grandes surveillances, particulièrement aux stades précoces de l'infection notamment, en présence d'échantillons visiblement asymptomatiques.

### **II.3.1.5. Etude des principaux facteurs intervenant dans la propagation du PVY**

De tous les virus affectant la pomme de terre, le PVY possède la plus large gamme d'hôtes composée principalement d'espèces appartenant aux solanacées (pomme de terre, piment, poivron, tomate, tabac), mais aussi aux Amarantacées, Chénopodiacées, Euphorbiacées, Légumineuses, Crucifères, Urticacées ...etc.

La transmission du PVY assurée par voie végétative, est à l'origine des infections secondaires qui peuvent survenir aussi par l'intervention des pucerons vecteurs en s'alimentant précocement sur des hôtes secondaires et les adventices qui constituent un réservoir permanent à risque potentiel dans l'épidémie du virus. Dans cette approche épidémiologique, il est donc intéressant de savoir si le PVY est présent avec des fréquences importantes dans les plantes adventices ainsi que les repousses de pomme de terre laissées entre les cultures au niveau des parcelles de pomme de terre de toutes les régions prospectées.

#### **A. Identification des plantes adventices hôtes du virus Y de la pomme de terre**

Sur un total de 390 plantes adventices prélevées sur à l'intérieur et autour des parcelles de pomme de terre, nous avons pu identifier 26 espèces différentes dont certaines sont connues hôtes secondaires potentielles du virus Y de la pomme de terre. Elles ont été classées dans leurs rang taxonomiques jusqu'au nom de l'espèce selon la flore de Quézel & Santa (1963).

Les 26 espèces représentent les 16 familles répertoriées dans le tableau 4 avec le plus grand nombre d'espèce réparti dans trois d'entre elles, à commencer par les *Asteraceae* avec 7 espèces, les *Chenopodiaceae* avec 3 espèces et enfin les *Solanaceae* avec 2 espèces.

Quant aux espèces les plus abondantes au niveau des parcelles de pomme de terre, sont représentées dans l'ordre par *Solanum nigrum* L., *Chenopodium album* L., *Convolvulus arvensis* L. et *Sonchus oleraceus* L. De part, les symptômes montrés par ces espèces, elles ont été décrites comme réservoirs potentiels au virus des cultures maraichères. Les autres espèces identifiées quoique moins présentes mais souvent rencontrées aux alentours et même à l'intérieur des parcelles, montrant des symptômes typiques des virus et peuvent contribuer à la propagation du virus et constituer un réservoir permanent.

#### – Inspection visuelle des symptômes

Dans l'ensemble, les adventices identifiées montrent un large éventail de symptômes, rappelant, à priori, ceux induits par le virus Y de la pomme de terre, comme les mosaïques légère et sévère montrées dans la figure 11, en A, B et K, la chlorose en E, les lésions chlorotiques en D et H ou nécrotiques en F et I et les déformations foliaires en C . Notons également que lors de nos prospections, les feuilles des adventices étaient infestées surtout en période de forte chaleur par des populations d'aphides avec une fréquence dominante des espèces *Myzus persicae*, *Aphis craccivora* et *A. fabae*.

Les virus des plantes sont extrêmement difficiles à identifier à partir des seuls symptômes. C'est pourquoi des analyses sérologiques par DAS-ELISA ont été réalisées pour identifier le type de virus affectant les adventices collectées. Dans notre cas, nous avons recherché si les adventices de la pomme de terre, étaient infectées par le PVY et aussi par lequel groupe de ses souches (PVY<sup>O</sup> ou PVY<sup>N</sup>), et ce en utilisant les sérums spécifiques correspondants.

#### – Fréquence et diversité des souches du PVY dans les adventices

A la suite de l'observation des différents symptômes (Fig. 11) montrés par certaines espèces adventices de la collection prélevée dans les parcelles de pomme de terre, nous avons jugé intéressant d'étudier la fréquence des souches du PVY hébergées par ces plantes connues pour leur rôle de réservoirs pour de nombreux virus des cultures maraichères. Pour cela, les 390 espèces adventices identifiées ont été examinées en ELISA pour la détection du virus PVY et ses deux groupes de souches Nécrotiques ou PVY<sup>N</sup> et les souches Ordinaires ou PVY<sup>O</sup>.

Les résultats obtenus et montrés par le tableau 4 ont révélé la présence du PVY dans 154 échantillons d'adventices sur un nombre total de 390 échantillons testés soit un taux d'infection total par le PVY de 39.49% dont 36.41 % dus au groupe PVY<sup>N</sup>, 3.90 % au groupe PVY<sup>O</sup> et un taux d'infection de



**Figure 11** Symptômes montrés par quelques adventices poussant dans et au alentour de la culture de pomme de terre. **A.** (*Malva multiflora* .L). **B.** (*Chenopodium album* .L). **C.** (*Convolvulus arvensis* .L). **D.** (*Lactuca serriola* .L). **E.** (*Sonchus oleraceus* .L). **F.** (*Datura stramonium* .L). **G.** (*Heliotropium europaeum* .L). **H.** (*Chenopodium amaranticolor* .L). **I.** (*Urtica dioica* .L) . **J.** (*Polygonum aviculare* .L). **K.** (*Solanum nigrum* .L). **L.** (*Erigeron canadensis* .L).

**Tableau 4** Fréquence et diversité des souches du PVY (PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup>) chez différentes espèces adventices collectées dans les régions du centre algérois (2013-2016).

| Famille                     | Espèce d'adventice   | PVY               | PVY <sup>O</sup> | PVY <sup>N</sup> | Autres       | Symptômes |
|-----------------------------|--|-------------------|------------------|------------------|--------------|-----------|
|                             | <i>Anacyclus clavatus</i> (Desf.) Pers.                                      | 0/12 <sup>a</sup> | 0/12             | 0/12             |              | -         |
|                             | <i>Calendula arvensis</i> (Vaill.) L.  | 1/12              | 0/12             | 1/12             |              | -         |
|                             | <i>Lactuca serriola</i> L.   | 1/19              | 0/19             | 1/19             |              | -         |
| <b>Asteraceae</b>           | <b><i>Sonchus oleraceus</i> L.</b>   | <b>27/37</b>      | <b>1/37</b>      | <b>26/37</b>     |              | <b>+</b>  |
|                             | <i>Sonchus asper</i> L.  | 2/9               | 0/9              | 1/9              |              | -         |
|                             | <i>Erigeron canadensis</i> L.  | 4/12              | 0/12             | 4/12             |              | -         |
|                             | <i>Helminthotheca echioides</i> (L.) Holub                                   | 0/8               | 0/8              | 0/8              |              | -         |
| <b>Boraginaceae</b>         | <i>Heliotropium europaeum</i> L.   | 0/5               | 0/5              | 0/5              |              | -         |
|                             | <b><i>Chenopodium album</i> L.</b>   | <b>29/59</b>      | <b>2/59</b>      | <b>25/59</b>     | <b>2</b>     | <b>+</b>  |
| <b>Chenopodiaceae</b>       | <i>Chenopodium murale</i> (L.) Fuentes, Uotila & Borsch                      | 7/10              | 0/10             | 7/10             |              | +         |
|                             | <i>Chenopodium album</i> subsp. <i>amaranthicolor</i> H. J. Coste & A. Reyn. | 9/15              | 0/15             | 9/15             |              | +         |
| <b>Convolvulaceae</b>       | <b><i>Convolvulus arvensis</i> L.</b>  | <b>20/26</b>      | <b>0/26</b>      | <b>20/26</b>     |              | <b>+</b>  |
| <b>Cyperaceae</b>           | <i>Cyperus rotundus</i> L.   | 0/10              | 0/10             | 0/10             |              | -         |
| <b>Fabaceae</b>             | <i>Lotus corniculatus</i> Brot.  | 0/3               | 0/3              | 0/3              |              | -         |
| <b>Lamiaceae</b>            | <i>Lamium amplexicaule</i> L.  | 0/9               | 0/9              | 0/9              |              | -         |
| <b>Malvaceae</b>            | <b><i>Malva multiflora</i> (Cav.) Soldano, Banfi &amp; Galasso</b>           | <b>2/9</b>        | <b>0/9</b>       | <b>2/9</b>       |              | <b>+</b>  |
| <b>Oxalidaceae</b>          | <i>Oxalis pes-caprae</i> L.  | 0/9               | 0/9              | 0/9              |              | -         |
| <b>Papaveraceae</b>         | <i>Fumaria capreolata</i> L.   | 0/9               | 0/9              | 0/9              |              | -         |
|                             | <i>Papaver rhoeas</i> L.   | 0/7               | 0/7              | 0/7              |              | -         |
| <b>Polygonaceae</b>         | <i>Polygonum aviculare</i> L.  | 0/7               | 0/7              | 0/7              |              | -         |
| <b>Poaceae</b>              | <i>Avena sterilis</i> L.   | 0/5               | 0/5              | 0/5              |              | +         |
| <b>Rubiaceae</b>            | <i>Galium aparine</i> L.   | 0/7               | 0/7              | 0/7              |              | -         |
| <b>Solanaceae</b>           | <b><i>Datura stramonium</i> L.</b>   | <b>7/19</b>       | <b>0/19</b>      | <b>7/19</b>      |              | <b>+</b>  |
|                             | <b><i>Solanum nigrum</i> L.</b>  | <b>41/53</b>      | <b>3/53</b>      | <b>35/53</b>     | <b>3</b>     | <b>+</b>  |
| <b>Primulaceae</b>          | <i>Lysimachia arvensis</i> (L.) U. Manns & Anderb.                           | 3/9               | 0/9              | 3/9              |              | -         |
| <b>Urticaceae</b>           | <i>Urtica dioica</i> L.  | 1/19              | 0/19             | 1/19             |              | +         |
| <b>TOTAL</b>                |  | <b>154/390</b>    | <b>6/390</b>     | <b>142/390</b>   | <b>5/390</b> |           |
| <b>TAUX D'INFECTION (%)</b> |  | <b>39,49</b>      | <b>1,53</b>      | <b>36,41</b>     | <b>1,28</b>  |           |

(<sup>a</sup>) Nbre de plantes infectées / Nbre total des plantes testées

1.28% probablement lié à un autre groupe de souches non identifié dans ce cas en présence des deux sera monoclonaux utilisés. D'où la variabilité symptomatologique déjà démontrée pour ce virus, traduit

visiblement sa diversité génétique exprimée par une variété de souches ou variants au sein de la culture de pomme de terre (hôte primaire) et sur les autres plantes avoisinantes notamment les adventices (hôtes secondaires). Ces souches ne sont pas toutes identifiables en ELISA et nécessitent d'autres moyens plus performants ciblant la source de variation au niveau de leur génome (cet aspect sera abordé au troisième chapitre de ce travail).

Nous avons également, constaté comme pour la pomme de terre, que parmi les plantes adventices infectées par le PVY ou l'une de ses souches N et O, certaines présentaient des symptômes alors que d'autres avaient une apparence saine. Cela, explique que la présence de ce virus n'est pas toujours liée à la présence des symptômes apparents, d'où l'importance de l'examen sérologique utilisé dans ce cas.

Concernant l'abondance des espèces adventices estimée à travers la collection retenue ; celle-ci est principalement représentée par trois familles importantes, dont 27.53% appartiennent aux Astéracées, 21.53% aux chénopodiacées et avec et 18.46% aux Solanacées, le reste des familles est relativement faiblement représenté avec une abondance variant entre 0.76% et 2.56%. Cela ne reflète pas forcément leur abondance réelle dans leur milieu naturel au niveau des parcelles de pomme de terre qui dépend des périodes et du nombre des prélèvements et le cycle végétatif de chaque famille considérée durant les saisons culturales des campagnes agricoles 2013-2014, 2014-2015 et 2015-2016.

De ce fait, les taux d'infection du PVY, les plus élevés ont été enregistrés au niveau des familles les plus abondantes, soit : 31.17% chez les solanacées, 29.22% chez les chénopodiacées et 22.72% chez les astéracées. Ces pourcentages représentent le rapport du nombre total des différentes espèces infectées par le PVY/famille sur le nombre total des différentes espèces des familles infectées par le PVY soit (nombre total est de 154). Il va sans dire que, l'importance des taux d'infection enregistrés pour ce virus est en relation proportionnelle avec le risque de propagation du virus à partir de cette source l'hébergeant en permanence avant l'arrivée des pucerons vecteurs observés même sur ces adventices.

Par ailleurs, quel que soit la plante adventice analysée, le groupe PVY<sup>N</sup> est le plus dominant en accord avec les travaux de (Lichkov, 1987, Paz *et al.*, 1997, Jeffries, 1998, Kaliciak & Syller, 2009). Néanmoins, la présence mixte des deux groupes de souches N et O (co-infection) retrouvée déjà sur

pomme de terre, n'a pas été révélée d'ans aucune des adventices testées lors de cette étude. La fréquence dominante du PVY<sup>N</sup> est beaucoup plus notée sur l'espèce *Solanum nigrum* et les différents chénopodes analysés. Ces deux espèces sont considérées comme hôtes potentielles, à ce groupe de souches émergents de plus en plus dans le monde (Kerlan, 2008, Kaliciak & Syller, 2009, Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010, Asala *et al.*, 2014 et Chen *et al.*, 2017).

Les espèces d'adventices contaminées par le PVY ou par l'une de ses groupes de souches durant la pleine-saison culturale de la pomme de terre, peuvent à priori, être à l'origine de l'infection de la pomme de terre car elles sont souvent infestées par les pucerons.

Lors de la collecte des adventices, nous avons également collecté 50 de repousses de plants pomme de terre laissées en plein champ entre les deux campagnes agricoles successives (2014-2015 et 2015-2016). Notant que les repousses collectées présentaient en majorité des symptômes de mosaïque, de frisolée et des déformations foliaires. Le but était de contrôler si les repousses étaient infectées par le PVY. En effet, l'examen sérologique de ces repousses de plants de pomme de terre utilisant le sérum anti-PVY (Bioreba) a révélé la présence du PVY sur 15 repousses sur les cinquante repousses testées soit 30% du taux d'infection par ce virus. Ce taux est notablement élevé, augmentant le risque d'infection primaire pour les cultures de plants certifiés. Les repousses négligées par les agriculteurs, jouent un rôle majeur dans le maintien et la dissémination de ce virus dans la nature par l'intermédiaire des pucerons, d'où la nécessité d'éliminer de façon radicale les repousses des cultures précédentes.

## **B. Inventaire qualitatif de l'aphidofaune associée à la pomme de terre**

Le processus de dissémination des différentes souches du PVY au sein de la culture primaire ou entre les plantes adventices avoisinantes, dépend essentiellement du nombre et de l'abondance de deux types d'espèces d'aphides : celles formant des colonies sur les feuilles de pomme de terre, dites colonisatrices et celles qui visitent sans coloniser cette culture qualifiée de transitoires. Dans ce chapitre, seront traitées les espèces colonisant ou non la pomme de terre et qui sont vectrices ou non du PVY où sont considérées les deux formes ailées et aptères des espèces capturées sur le feuillage et celles capturées dans les pièges jaunes.

Au total, sept (07) espèces de pucerons ont été identifiées, que nous avons classé dans deux tribus : les *Aphidini* et les *Macrosiphini* et quatre genres. La tribu des *Aphidini* est quantitativement la plus dominante avec 5 espèces, soit 71,43 % du peuplement aphidien inventorié. Elle regroupe les espèces *Aphis frangulae* Kaltenbach, 1845, *A. nasturtii* Kaltenbach, 1843, *A. fabae* Scopoli, 1763, *A.*

*gossypii* Glover, 1877, *Aulacorthum solani* (Kaltenbach, 1843). La tribu des *Macrosiphini* qui renferme *Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878 et *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) représentant un taux de 28,57% du peuplement total. L'ensemble des espèces inventoriées sont présentées selon les critères morphologiques utilisés par les différentes clefs d'identifications définies (Fig. 12).

#### – Abondance des espèces de pucerons identifiées

L'abondance des espèces de pucerons colonisant les feuilles de pomme de terre, et celles associées à cette culture, constitue un élément essentiel du processus de dissémination des différentes souches du PVY. Dans ce contexte, nous avons pris en considération, les pucerons inféodés à la pomme de terre et ceux qui viennent la visiter occasionnellement, ainsi que les espèces vectrices ou non du virus PVY.

La finalité de cette approche est d'identifier les principales espèces, les plus abondantes et d'estimer leur capacité vectrice dans les conditions contrôlées en laboratoire. Compte tenu de l'activité aphidofaune tributaire des conditions climatiques, l'échantillonnage des pucerons a été effectué sur 100 feuilles de pomme de terre collectées hebdomadairement au cours de deux périodes culturelles.

Au cours de ces périodes, les différentes observations morphologiques et microscopiques du feuillage nous ont permis d'évaluer essentiellement les colonies se développant sur les plants de pomme de terre. Parmi les sept espèces de pucerons capturées sur feuillage, trois d'entre elles prédominent et forment des colonies sur les plants de pomme de terre ; il s'agit de *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis nasturtii* et *Myzus persicae*. Celles-ci sont caractérisées par une reproduction et une multiplication très rapide, par rapport aux autres espèces trouvées occasionnellement sur la culture. Ainsi, la capacité de colonisation de *Myzus persicae* s'est avérée la plus importante, comparée à celle des autres espèces avec les fréquences relatives de 49,2 % et de 48,78 % du total des pucerons capturés respectivement en arrière-saison et en pleine saison culturale de l'année 2015.

Les données du tableau 5, illustrées par la figure 13 indiquent également que l'espèce *Macrosiphum euphorbiae*, occupant la deuxième position du point de vue abondance après l'espèce *Myzus persicae*, est au contraire plus abondante en pleine-saison (soit 45,5 %) plutôt qu'en arrière-saison culturale (soit 24,2 %) en 2015. Les autres espèces moins abondantes, présentent des valeurs variant entre les deux saisons culturelles, soit en faveur de la pleine saison ou de l'arrière-saison.

Les résultats de l'abondance des espèces de pucerons chez les plants de pomme de terre nous semblent difficiles à interpréter, du fait du nombre d'échantillonnage qui n'est élevée et les variations

des données climatiques enregistrées durant toute la période agricole indiquent des variations irrégulières entre les différentes années peuvent néanmoins expliquer sous réserve une forte abondance des pucerons pour telle ou telle période, lorsque les températures deviennent plus clémentes en arrière-saison.



*Aphis frangulae* Kaltenbach, 1845



*Aphis nasturtii* Kaltenbach, 1843



*Aphis fabae* Scopoli, 1763



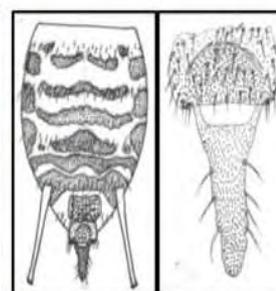
*Aphis gossypii* Glover, 1877



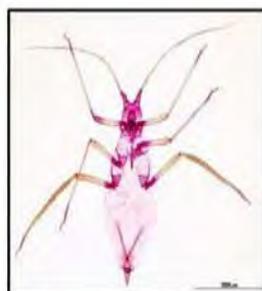
*Myzus persicae* Sulzer, 1776



*Aulacorthum solani* Kaltenbacher, 1843



*Macrosiphum euphorbiae* Thomas, 1878



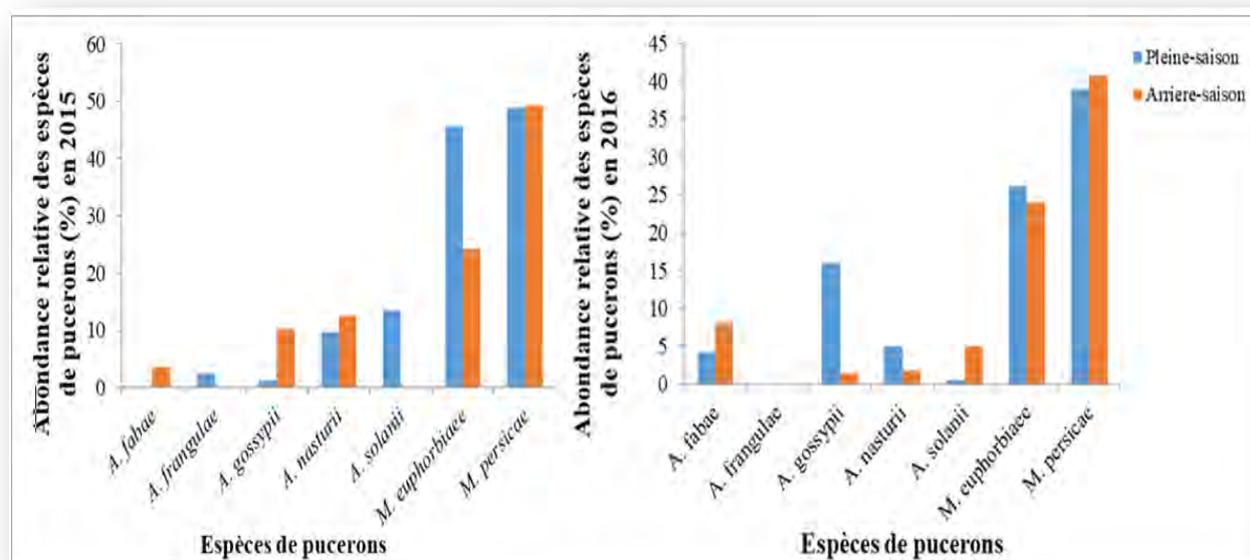
**Figure 12** Inventaire des espèces de pucerons identifiées sur pomme de terre

Cependant, selon les données climatiques enregistrées durant la culture de saison, de l'année 2015 étaient les plus faibles avec des températures moyennes les plus élevées du mois d'avril jusqu'au mois d'août et par des températures plus clémentes durant l'arrière-saison.

Par ailleurs, le dénombrement des espèces identifiées sous binoculaire a montré que la densité est plus importante durant l'arrière-saison culturale et au stade de pleine végétation et ce pour les trois espèces les plus abondantes et inféodées à la pomme de terre (*Macrosiphum euphorbiae*, *Myzus persicae* et *Aphis nasturtii*). En particulier les espèces formant des colonies sur pomme de terre, sont aussi connues vectrices potentielles du PVY et leur capacité de transmission diffère d'une espèce à l'autre. Les espèces *Aphis nasturtii*, *Aphis gossypii*, et *Aulacorthum solani* sont moins fréquentes du fait de leur localisation géographique naturelle qui est plus restreinte ou de leur moindre aptitude à se maintenir sur la pomme de terre.

**Tableau 5.** Abondance relative (A) des pucerons collectés sur feuillage de pomme de terre dans la région d'Ain Defla (2015-2016)

|            | Espèces                       | Pleine saison (mars-mai) |              | Arrière-saison/septembre-Novembre |              |
|------------|-------------------------------|--------------------------|--------------|-----------------------------------|--------------|
|            |                               | Nombre d'individus       | Abondance(%) | Nombre d'individus                | Abondance(%) |
| Année 2015 | <i>Aphis fabae</i>            | 0                        | 0            | 5                                 | 3,6          |
|            | <i>Aphis frangulae</i>        | 2                        | 2,4          | 0                                 | 0            |
|            | <i>Aphis gossypii</i>         | 1                        | 1,2          | 14                                | 10,25        |
|            | <i>Aphis nasturtii</i>        | 8                        | 9,7          | 17                                | 12,5         |
|            | <i>Aulacorthum solani</i>     | 11                       | 13,4         | 0                                 | 0            |
|            | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | 20                       | 45,5         | 33                                | 24,2         |
|            | <i>Myzus persicae</i>         | 40                       | 48,78        | 67                                | 49,2         |
|            | <b>TOTAL</b>                  | 82                       | 100          | 136                               | 100          |
| Année 2016 | <i>Aphis fabae</i>            | 5                        | 4,2          | 16                                | 8,1          |
|            | <i>Aphis frangulae</i>        | 0                        | 0            | 0                                 | 0            |
|            | <i>Aphis gossypii</i>         | 20                       | 16           | 3                                 | 1,5          |
|            | <i>Aphis nasturtii</i>        | 6                        | 5            | 21                                | 1,7          |
|            | <i>Aulacorthum solani</i>     | 10                       | 0,84         | 9                                 | 4,9          |
|            | <i>Macrosiphum euphorbiae</i> | 31                       | 26,2         | 47                                | 23,97        |
|            | <i>Myzus persicae</i>         | 46                       | 38,9         | 80                                | 40,81        |
|            | <b>TOTAL</b>                  | 118                      | 100          | 196                               | 100          |



**Figure 13** Abondance relative des espèces de pucerons colonisant la pomme de terre.

### C. Estimation de l'efficacité de transmission *in vitro* des souches PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> par les espèces de pucerons colonisant la pomme de terre

Cette étude vient compléter l'analyse de la diversité des espèces de pucerons colonisant la pomme de terre. Elle a pour objectif d'examiner l'efficacité de transmission de différents isolats PVY par six espèces aphides choisies selon leur abondance. Il s'agit de *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Myzus persicae*, *Aphis fabae*, *Aphis gossypii* et *Aphis nasturtii*.

L'inoculum viral, utilisé lors des essais de transmission, est représenté par quatre isolats (YO-os, YO-br, YN-ad et YN-kh) provenant des régions d'Alger, de Bouira, d'Ain Defla et de Boumerdes. Ces quatre isolats ont été sélectionnés selon leur sérotypes O ou N, représentant respectivement le groupe de souches nécrotiques (YN) et le groupe de souches ordinaires (YO).

La capacité de ces espèces à transmettre le virus a été évaluée en laboratoire, de tabac à tabac et ce en utilisant les formes aptères, mais également, dans la mesure du possible, les formes ailées afin de se rapprocher des conditions naturelles de la transmission selon les recommandations consignées dans les modèles de prévision des risques (Sigvald, 1987).

Les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse statistiques descriptives, test d'analyse de la

variance (ANOVA), test d'égalité de variance (test de Bartlett) et enfin un test de comparaison des moyennes (test de Duncan)( Annexe 9).

L'analyse de la variance a permis de montrer des effets significatifs de l'espèce, de la souche virale et de leur interaction au seuil de 0.01% (Annexe 9). Le modèle de l'analyse de la variance suppose au préalable l'égalité des variances (hypothèse nulle). Ceci peut être vérifié par le test de Bartlett. Nos données ont montré que cette égalité de variance n'est pas vérifiée même avec des transformations des variables en Log des taux et en arc sinus. Mais comme notre plan d'expérience est de type des facteurs fixes (souches du virus Y et espèces de pucerons) avec des effectifs égaux. Ceci implique une interférence faible de l'inégalité de la variance sur l'ANOVA. Les résultats donnés par l'ANOVA peuvent donc être exploités et comparés par un test de comparaison des moyennes exprimées en pourcentage comme celui de DUNCAN (Fig.14) et complétée par la GLM montrant clairement les différentes interactions entre chaque espèce de puceron et l'une des deux souches YN et YO du PVY (Figs. 15 et 16).

Dès le 15ème jour qui suit les essais de transmission, une première évaluation visuelle de la fréquence de l'infection par le PVY a été effectuée en fonction de l'apparition des symptômes typiques chez les plantules de tabac inoculées. Il en résulte que la transmission des différents isolats a été assurée dans sa majorité au moyen des six espèces de pucerons virulifères et ce à travers les symptômes de mosaïque, d'éclaircissement et de nécrose internervaire engendrés chez 198/270 plantules inoculées de tabac.

Ces plantules, ont montré des symptômes de mosaïque légère à sévère en infection avec les isolats du groupe O, et une mosaïque plutôt sévère et un éclaircissement des nervures évoluant en une nécrose, en infection par le groupe O. Cependant, 72/270 plants de tabac n'ont pas exprimé de symptômes en présence des différents isolats transmis par les pucerons, surtout par l'espèce *Macrosiphum euphorbiae*. En se référant aux résultats de l'étude de l'incidence du PVY abordée au début de ce travail, l'absence de symptômes chez les plants inoculés, ne signifie pas la présence du virus.

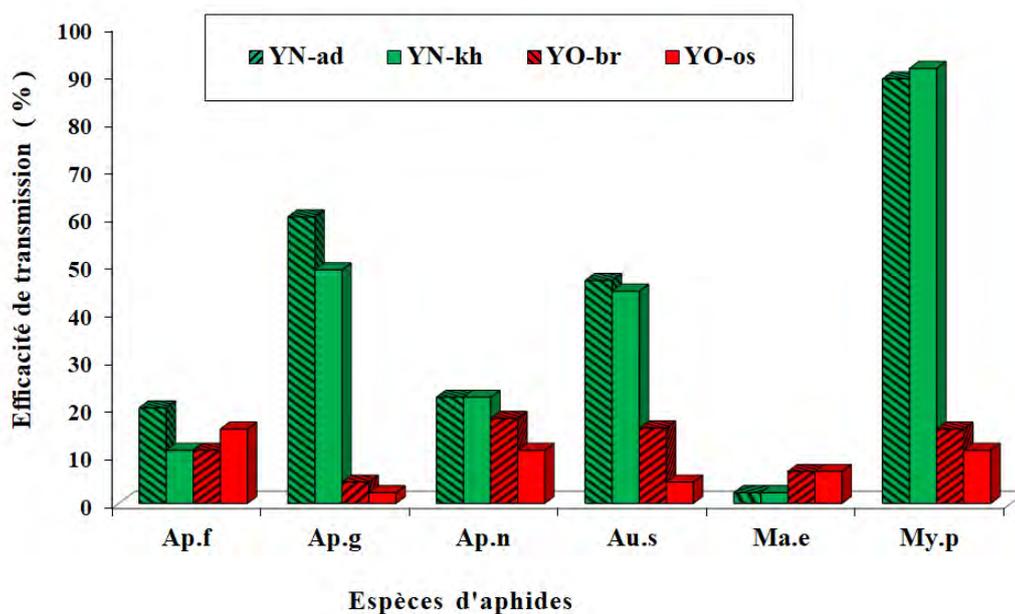
A cet effet, les tests sérologiques s'imposent pour confirmer les hypothèses émises sur la base des observations visuelles. Cela permettra également de quantifier les taux d'infection par le PVY pour chaque combinaison des espèces de pucerons avec les quatre isolats concernés par l'étude. Ainsi, les résultats du test DAS-ELISA ont révélé la présence du PVY et les deux groupes de souches O et N, même chez certains échantillons d'apparence saine, puisque le nombre total de plants infectés avec ou sans symptômes était plus élevé soit 225/270, un taux supérieur au nombre évalué visuellement

(198/270). Cela signifie, que toutes les espèces aphides ont réussi à transmettre les quatre isolats PVY, avec des capacités vectrices moyennes variant de 4,44 % à 51,67 %.

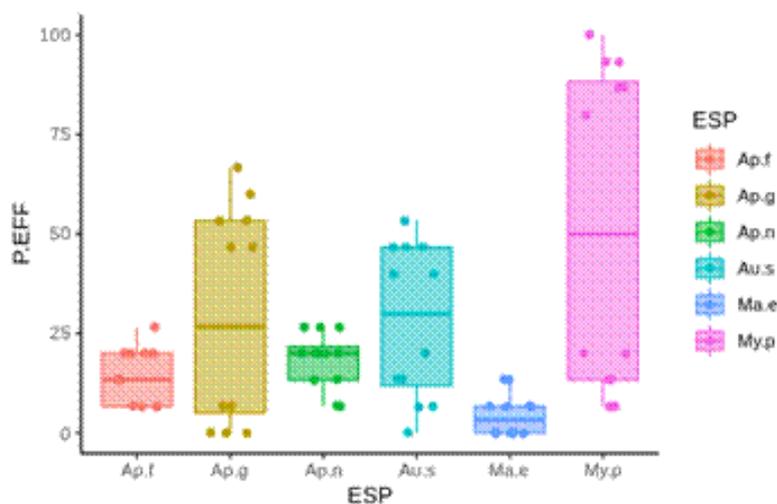
L'espèce, *Myzus persicae* s'est avérée la plus efficace avec un taux moyen de transmission de 51,67 % suivie d'*Aulacorthum solani* et d'*Aphis gossypii* ; qui semblent jouer un rôle dans la propagation du PVY avec un même taux de transmission de 28,89 %.

Les espèces *Aphis nasturtii* et *Aphis fabae* ont enregistré des taux de transmission relativement faibles de 18,33 % et 14,44 % respectivement, alors que l'espèce *Macrosiphum euphorbiae* bien qu'aussi abondante sur le feuillage que l'espèce *Myzus persicae*, elle s'est avérée la moins efficace à transmettre les différents isolats PVY, dont le taux d'infection est de 4,44 %.

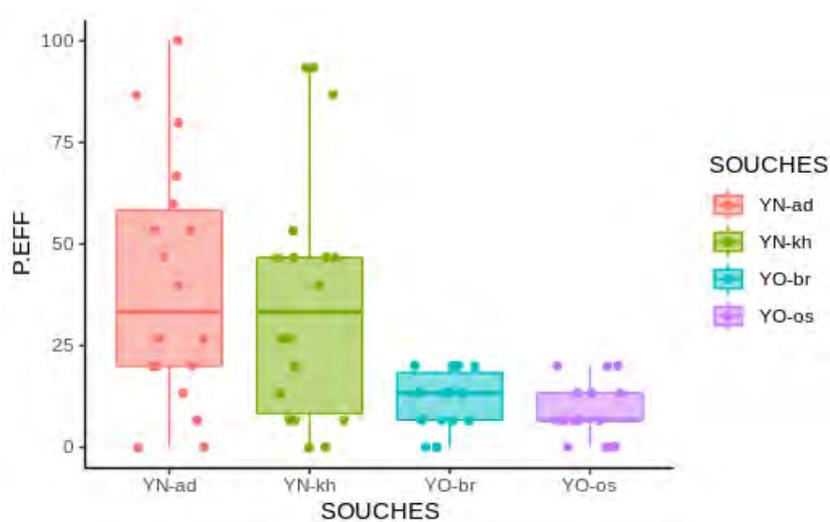
Par ailleurs, nos résultats montrent également que les isolats du groupe de souche PVY-O, sont moins transmis que ceux représentant le groupe PVY-N et ce quelle que soit l'espèce de pucerons utilisée dans leur transmission. L'espèce *Myzus persicae* transmet efficacement la souche nécrotique PVY-N qui s'est avérée la plus dominante dans les parcelles de pomme de terre lors de l'étude de la diversité des souches du virus PVY.



**Figure 14** Représentation des taux de transmission de quatre isolats du PVY par six espèces de pucerons (selon le test Test Duncan). YN-ad (Ain Defla), YN-kh (Boumerdes), YO-br (Bouira) et YO-os). (Ap.f. (*Aphis fabae*), Ap.g (*Aphis gossypii*), Ap.n. (*Aphis nasturtii*), Au.s (*Aulacorthum solani*), Ma.e (*Macrosiphum euphorbiae*) et My.p. (*Myzus persicae*))



**Figure 15** Pourcentage de transmission sous l'effet de l'espèce de puceron par analyse de GLM  
Les boîtes à moustaches représentent le deuxième et le troisième quartile. Les barres symbolisent les plus fortes et plus faibles valeurs observées.



**Figure 16** Pourcentage de transmission sous l'effet de souche virale (YN et YO) par analyse de GLM

L'efficacité de la transmission des différentes espèces de pucerons étudiées dépend du type de souche PVY. En effet, les quatre isolats étudiés ont montré que la souche YN-ad est moyennement la

plus propagée aux plantules inoculées, causant un taux d'infection de 40%, tandis que la souche O-os est la moins transmise avec un taux d'infection de 8,52%.

Aussi, l'espèce *Myzus persicae* représente en moyenne l'espèce la plus efficace dans la transmission du PVY avec 51,67 % de plantules infectées, alors que l'espèce *Macrosiphum euphorbiae* s'est avéré la moins efficace avec 4,4 % de plantules infectées.

La pression des pucerons pourrait également être l'une des explications de la vaste répartition de PVY en Algérie. En effet, parmi les espèces de pucerons piégés en 2014 à 2016 dans les principales régions de culture de la pomme de terre du pays en pleine saison culturale *Myzus persicae* est prédominante, comparé à d'autres espèces identifiées, comme : *Aphis nasturtii*, *Aphis frangulae*, *Macrosiphum euphorbiae* et *Rhopalosiphum insertum helichrysi*.

Nos résultats sont en accord avec d'autres études ayant montré que *Myzus persicae* est de loin le meilleur vecteur de transmission du PVY (Sigvald, 1992 ; Verbeek *et al.*, 2010), mais la moindre capacité vectrice d'autres espèces de pucerons de la pomme de terre n'empêche pas de propager des populations de PVY. En effet, d'autres espèces colonisatrices comme *Aulacorthum solani* et *Aphis gossypii* semblent jouer un rôle secondaire dans la propagation du PVY avec un même taux de transmission de 28,89 %. Cependant, l'espèce *Macrosiphum euphorbiae* bien qu'abondante sur le feuillage comme pour l'espèce *Myzus persicae*, s'est avérée la moins efficace à transmettre les différents isolats PVY, avec un taux d'infection de 4,44 %.

Par ailleurs, nos résultats montrent également que les isolats du groupe de souches PVY<sup>O</sup>, sont moins transmis que ceux représentant le groupe PVY<sup>N</sup> et ce quelle que soit l'espèce de puceron responsable dans leur transmission. L'espèce *Myzus persicae* transmet efficacement la souche nécrotique PVY<sup>N</sup> qui s'est avérée la plus dominante sur pomme de terre lors de l'étude de la diversité des souches du virus PVY. Ce résultat original pourrait donc expliquer en partie la dominance écrasante de la souche nécrotique sur les autres populations du virus Y, qui tendent à disparaître pour être remplacées par des souches plus agressives et apparemment bien transmises par les vecteurs.

L'étude d'aphidofaune réalisée en plein champ de pomme de terre indique la présence de sept espèces colonisant la culture de pomme de terre à savoir *Aphis fabae*, *Aphis frangulae*, *Aphis nasturtii*, *Aulacorthum solani*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis gossypii* et *Myzus persicae*, en accord avec les données antérieures obtenues dans les mêmes régions prospectées par Daghfali (2012) ; Hadjaj (2015), Chelihi (2016) ; Bouzid et Guedouar (2017). Les espèces les plus abondantes rapportées par ces études sont représentées par *Myzus persicae* et *Macrosiphum euphorbiae*, où les premières infesta-

tions ont été observées précocement dès le mois de mai ; fortes infestations de populations ont été notées fin août.

Cependant, le rôle important des aphides aptères non colonisateurs dans la dispersion du virus Y a été également démontrée par Hull, (2002) et ont déjà été décrits comme facteurs impliqués dans les épisodes épidémiques du PVY en Europe (De Box & Piron., 1990 ; Harrington & Gibson., 1989 ; Robert & Bourdin., 2001 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2007).

Yattara et ses collaborateurs (2013) ont rapporté que tous les pucerons sont potentiellement des vecteurs importants de viroses. Parmi ces insectes, cinq espèces s'alimentent réellement de la pomme de terre. Il s'agit, des pucerons *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* qui établissent précocement leurs colonies sur les feuilles supérieures de la plante, suivies plus tard de trois autres espèces : *Aphis gossypii*, *Aphis nasturtii* et *Aulacorthum solani* qui colonisent les feuilles inférieures et médianes des plants. Ces insectes sont vecteurs de nombreux virus notamment le virus Y de la pomme de terre.

Par ailleurs, la plus forte incidence du virus Y, enregistrée en arrière- saison de la campagne agricole 2014-2015 au niveau des quatre localités de la région de Ain Defla, peut être reliée à une forte activité aphidienne à cette période de l'année. Durant cette période les températures hivernales notées étaient assez clémentes favorables pour une forte pullulation des pucerons recensées. Nous avons remarqué également plusieurs colonies de ses aphides survivent en cette période hivernale, en absence de précipitations enregistrées en plus des températures modérées. Il a été également relevé durant de la période 2015-2016, que la culture de pomme de terre, est un hôte alternatif pour certaines espèces de pucerons qui viennent précocement la coloniser dès le début de la pleine saison de la culture.

#### **II.4. DISCUSSION GENERALE**

Les maladies virales comptent parmi les facteurs les plus limitant de la production de pommes de terre dans la majorité des pays producteurs à travers le monde. Leur impact économique a largement été rapporté par plusieurs auteurs depuis plus de trois décennies (Van der Zaag, 1987 ; Hane et Hamm., 1989 ; Mondjana *et al.*, 1993 et 1999 ; Nolte *et al.*, 2004 ; Piche *et al.*, 2004 ; Anderson *et al.*, 2004 ; Kerlan *et al.*, 2006 ; Chikh Ali *et al.*, 2007 ; Karasev *et al.*, 2010 ; Hamm *et al.*, 2010 ; Hogue, 2010 ; Yardumci *et al.*, 2015).

La situation en Algérie n'est pas différente comme nous allons le discuter à travers les résultats obtenus au cours de cette première partie de l'étude qui nous renseignent sur de nouvelles informa-

tions quant à l'évaluation du risque phytosanitaire des principaux virus associés à cette culture et essentiellement le PVY. Différents protocoles ont été utilisés pour soutenir la détection précoce de l'infection virale notamment chez la pomme de terre de semence. Nous discutons aussi, les principaux facteurs associés à la dissémination verticale ou horizontale des virus responsables des épisodes épidémiques rencontrés en plein champs durant trois campagnes agricoles consécutives couvrant la période de 2013 à 2016 dans les cinq régions du pays à forte production de pomme de terre (Alger, Ain Defla, Boumerdes, Bouira et Tipaza).

A la suite des différentes prospections conduites en cette période, l'analyse sérologique par (DAS-ELISA) de la collection des 285 échantillons foliaires de plants de pomme de terre a révélé la présence de cinq virus économiquement importants : le PVY, PLRV, PVX, PVS et PVA à des taux d'infection respectifs de 93 %, 5,5 %, 0,5 %, 0,5 % et 0,5 %.

Quelle que soit la région prospectée, le PVY s'est avéré le plus dominant par rapport aux autres virus, que ce soit en infection simple ou en combinaison avec les virus X, S et PLRV. La combinaison la plus rencontrée dans ce cas, associe les deux virus Y et X avec un taux de 41%. Les plants co-infectés ont montré des symptômes beaucoup plus graves qu'en infection simple incluant la mosaïque sévère, la nécrose généralisée et la frisolée des feuilles qui sont soit enroulées ou déformées et dans certains cas un nanisme des plants.

L'apparition conjointe des virus Y, X, ou de l'un ou de ces deux virus avec celui de l'enroulement (PLRV) ou avec les virus A et S, a également produit des symptômes beaucoup plus sévères qu'en cas d'infection séparée et ce en accord avec les travaux de Mac Donald et Singh (1996) et de Warren *et al.* (2005). Toutefois, indépendamment du PVY, les virus X, S et A causent des symptômes de mosaïques beaucoup plus modérés, transitoires et difficiles à discerner lors des inspections visuelles comme a été rapporté par (Bartels, 1971 ; Brecks, 1960).

Les dommages sont donc moins faciles à quantifier que ceux causés simplement par le PVY, néanmoins, la détection de ces virus dans des lots de semences peut entraîner leur déclassement sur les marchés d'exportation qui imposent des restrictions plus sévères à l'importation de semences infectées par ces virus à mosaïque (Ali *et al.*, 2002).

Certains virus de la pomme de terre comme le PVY et le PVX sont souvent désignés comme virus latents parce qu'ils peuvent être portés par des plants ou tubercules sans y présenter des symptômes visibles. Dépendant de la variété et/ou des conditions météorologiques, l'expression des symptômes peut aussi être affectée. Un temps frais et nuageux peut rendre les symptômes plus prononcés. La

présence de plus d'un virus sur un plant peut donc affecter les types de symptômes et en augmenter la gravité. De plus, il importe de noter que les symptômes d'un même virus s'expriment très différemment selon la variété ( Cardenas *et al.*, 2017).

La forte prévalence du PVY et la faible fréquence des autres virus révélés par cette étude, sont également cohérentes avec la situation décrite précédemment dans les pays méditerranéens comme la Tunisie (Djilani-Khouadja *et al.*, 2010 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010 ; Larbi *et al.*, 2012) ; l'Égypte (El-Absawy *et al.*, 2012 ; Ahmad *et al.*, 2011 ; El Borollosy, 2015), la Syrie (Chikh Ali *et al.*, 2006) ; le Soudan (El Balla, 2010) mais aussi dans des pays européens ou autres pays dans le monde (Valkonen, 2007 ; Sawalha, 2012 ; Yardimci *et al.*, 2015 ; Miha *et al.*, 1993) ; Karasev & Gray., 2013 ; Chikh Ali *et al.*, 2013 ; Yattara *et al.*, 2014 ; Lacomme *et al.*, 2018).

Bien que les fréquences de détection des cinq virus représentent un état de la diversité à un moment donné, elles couvrent trois saisons de culture au niveau des principales régions productrices de pommes de terre dans le Centre du pays. Cependant, les conditions spécifiques de l'enquête peuvent expliquer la faible fréquence de certains de ces virus. Par exemple, la faible incidence des isolats de PVA dans les échantillons pourrait refléter le fait que les feuilles de pomme de terre ont été obtenues principalement à partir de la variété Spunta, identifiée comme étant résistante à l'infection PVA (<http://plantdepommedeterre.org>). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les semences de pomme de terre ont été importées de pays européens où les infections PVA ne sont pas fréquentes.

Nos résultats ont également révélé que l'infection par le PVY n'était pas spécifiquement liée au type de variété de pomme de terre, ni même à sa région d'origine. En effet, les échantillons PVY positifs ont été détectés majoritaires dans toutes les zones étudiées et chez toutes les variétés de pomme de terre, même celles qui à l'origine sont décrites par le CNCC comme non sensibles à l'infection par le virus Y sur la base d'observations du rendement tel le cas des variétés Fabula, Ultra, Kondor.

De plus, les résultats apportés par l'étude plus détaillée de l'incidence du PVY, menée dans la région de Ain Defla durant les campagnes agricoles 2013 à 2016, indiquent clairement la propagation du virus par les semences « certifiées indemnes selon les agriculteurs » puisqu'on le retrouve chez les plantules issues de tubercules récoltés avec un taux d'infection 2 fois plus élevé à celui enregistré au début de chacune des saisons culturales. Cependant, les taux d'infection par le PVY enregistrés en arrière-saison sont les plus élevés en début de végétation et à la récolte des tubercules. Ceci renforce l'hypothèse du passage du virus des plants mère aux tubercules fils qui proviennent de la récolte précédente de la pleine saison culturale.

Dans le même sens, l'infection enregistrée en début d'émergence des plants de pomme de terre, bien que faible, résulterait à priori du tubercule mère infecté, des repousses des cultures précédentes ou encore des plantes adventices qui constituent un réservoir permanent pour de nombreux virus notamment le PVY. En effet, celui-ci possède, une large gamme de plantes hôtes constituées principalement de solanacées cultivées et des solanacées sauvages qui poussent spontanément en plein champ de pomme de terre (Kaliciak & Syller, 2009 ; Pourrahim & Farzadfar, 2016 ; Zitter, 2001 ; Kerlan *et al.*, 2006 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2008).

La comparaison entre les trois campagnes agricoles au niveau de la même région, montre une forte incidence en 2015, et que nous pourrions expliquer par les changements climatiques qui affectent considérablement le comportement des virus, des vecteurs et la sensibilité de la plante.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette prévalence de PVY, comme l'origine des semences de pomme de terre et la pression exercée par les pucerons vecteurs qui sera abordée plus loin dans cette discussion.

Conformément à la réglementation, la plupart des pommes de terre sont intensément cultivées en pleine-saison avec essentiellement des variétés des classes Super Élite et Élite importées d'Europe. Cela n'exclue pas l'utilisation des semences non-certifiées des catégories A et B par certains des agriculteurs. Ceci représente un risque économiquement potentiel dans la production de la pomme de terre de semence du pays.

Des situations similaires ont été rapportées dans d'autres pays notamment chez nos voisins tunisiens qui demeurent tributaires de l'importation de semences de différentes provenance (Khamassy, 1999 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2008 ; 2010 ; Djilani-kouadja *et al.*, 2010 ; Larbi *et al.*, 2012, Tayahi *et al.*, 2016). D'autres pays européens connaissent également cette propagation par les échanges commerciaux des semences intra-européens (Hamm et Hane, 1999, Jones *et al.*, 2003, Yattara *et al.*, 2013 ; Kerlan *et al.*, 2008 ; Valkoven *et al.*, 2008,) ainsi que d'autres pays non européens (Glais *et al.*, 2005).

Une autre raison de l'augmentation graduelle de l'incidence du PVY du début de la saison à la fin de culture implique l'intervention du puceron vecteur dans ce cas le plus abondant et le plus efficace (*Myzus persica*) qui transmet le PVY de la plante malade à la plante saine. Nos résultats s'accordent avec les travaux de (Boiteau *et al.*, 1998 ; Kassim *et al.*, 2014) où le puceron vert du pêcher s'était avéré être le puceron le plus efficace dans la transmission du PVY. Slawomir (2010) a déclaré que

PVY restait actif après 17 heures dès son acquisition sur le stylet du puceron, ce qui augmente la propagation de virus.

Les résultats de l'évaluation symptomatologique des virus, corroborés par les différents tests sérologiques utilisés, ont montré que la présence de virus n'est pas toujours associée à la présence de symptômes. Ainsi, il a déjà été rapporté dans plusieurs travaux que certaines variétés tolérantes peuvent héberger des virus sans montrer de symptômes visibles. Cela résulte de facteurs intrinsèques liés à la variété et à la pathogénicité du virus (Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010, Lacroix *et al.*, 2011).

L'étude de la progression de l'incidence entre deux cycles de plantations successives, montre une tendance générale à son augmentation au second cycle, qui dans ce cas est représenté par l'arrière-saison. Ce phénomène pourrait s'expliquer entre autre par l'utilisation des plantes adventices potentiellement hôtes du virus et la prolifération des insectes vecteurs dans les parcelles.

La relation entre l'hôte, le virus et le vecteur est complexe et ancienne. Le rôle des adventices en tant que réservoirs d'agents pathogènes viraux a eu un impact significatif sur l'épidémiologie virale dans de nombreuses régions du monde (Sastry & Zitter, 2014). Ces adventices agissent comme des hôtes alternatifs pour un certain nombre de virus et les vecteurs polyphages qui les transmettent (Thresh, 2003). Ce n'est que récemment que le rôle des adventices dans l'épidémie virale a été au centre des recherches, à travers le monde.

Bien que le nombre de signalements de virus identifiés sur les mauvaises herbes au niveau mondial soit en augmentation, il n'existe à notre connaissance aucun rapport sur la distribution des adventices de pomme de terre et des virus qu'ils hébergent en Algérie. Leur présence dans un champ de pomme de terre en tant que réservoir potentiel des principaux virus de cette culture ainsi que leur effet réducteur de la quantité et la qualité de la production, a été montré pour la première fois par Al-lala *et al.*, (2014).

Par suite à ces travaux, nous avons recherché la diversité des souches PVY au sein même des plantes adventices récoltées dans et aux alentours de la culture de pomme de terre lors de nos prospections dans plusieurs régions du pays notamment celle la région de Ain Defla. Ainsi, nous avons identifié 14 / 26 espèces adventices poussant à proximité et dans des parcelles de pomme de terre visitées, hébergeant naturellement le PVY.

L'identification du virus a montré que chez ses plantes adventices nous avons identifié 142 cas d'infection par la souche nécrotique ou PVY<sup>N</sup> et six cas seulement par la souche commune PVY<sup>O</sup> et ce, en utilisant les anticorps monoclonaux aux dilutions de 1/500 et dirigés spécifiquement contre ces

deux groupes de souches. Cependant, la présence mixte des deux groupes de souches sur une même espèce d'hôte a également été observée chez *Chenopodium album*, *Chenopodium murale* et *Solanum nigrum*. Notons que ces trois espèces s'avèrent être les plus abondantes et les plus infectées par le PVY. Par ailleurs, 5/154 isolats PVY désignées par "others" n'ont pas donné de réponse positive avec aucun des deux sérums monoclonaux utilisés et qui probablement ils appartiennent à un autre groupe de souches non identifiées par ELISA.

La majorité des espèces identifiées étaient infestées par les pucerons montraient des symptômes de : mosaïque, marbrure, taches nécrotiques et chlorotiques, déformation et l'enroulement des feuilles (Tableau 4). Des symptômes similaires ont également été observés sur les plants de pomme de terre.

Les espèces, *Sanctus oleraceus*, *Convolvulus arvensis*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. album*, *Solanum nigrum*, et *Datura stramonium*, ont été déjà rapportées en tant que réservoirs potentiels pour le PVY dans les champs de pommes de terre (Edwardson & Christie, 1997 ; Kerlan, 2006 ; Kaliciak & Syller, 2009 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010) Ceci pourrait également contribuer à maintenir l'infection par le PVY et à la vitesse de sa propagation au sein de la culture.

En effet, leur rôle essentiel dans l'épidémie des virus en tant que réservoirs hôtes pathogènes viraux, en agissant comme sources initiales d'inoculum viral d'une part, et hébergent également des insectes vecteurs responsables de la transmission virale d'autre part, entraîne une croissance rapide de la population de vecteurs (Thresh, 2003 ; Wisler & Norris, 2005). En conséquence, l'incidence des maladies virales persiste dans les champs et les épidémies peuvent se produire plus fréquemment (Sastry & Zitter, 2014). Le rôle des adventices comme réservoirs des virus phytopathogènes a fait augmenter significativement l'impact des épidémies virales dans plusieurs pays de monde et en Algérie. Elles servent comme sources potentielles de l'inoculum viral dans les cultures au champ (Prajapat *et al.*, 2014). De plus, il est connu que les mauvaises herbes hébergent des vecteurs viraux, contribuant ainsi à la persistance des maladies virales dans les agroécosystèmes du monde entier.

De plus, il est connu que les mauvaises herbes hébergent des vecteurs viraux, contribuant ainsi à la persistance des maladies virales dans les agro-écosystèmes du monde entier (Asala *et al.*, 2014).

La pression des pucerons pourrait également être l'une des explications de la vaste répartition de PVY en Algérie. En effet, parmi les espèces de pucerons piégés en 2014 à 2016 dans les principales régions de culture de la pomme de terre du pays à la mi-saison, *Myzus persicae* est prédominante, comparé à d'autres espèces identifiées, comme : *Aphis nasturtii*, *Aphis frangulae*, *Macrosiphum euphorbiae* et *Rhopalosiphum padi*.

Nos résultats sont en accord avec d'autres études ayant montré que *Myzus persicae* est de loin le meilleur vecteur de transmission du PVY (Sigvald, 1992 ; Verbeek *et al.*, 2010), mais la moindre capacité vectrice d'autres espèces de pucerons de la pomme de terre n'empêche pas de propager des populations de PVY. En effet, d'autres espèces colonisatrices comme *Aulacorthum solani* et *Aphis gossypii* semblent jouer un rôle secondaire dans la propagation du PVY avec un même taux de transmission de 28,89 %.

Cependant, l'espèce *Macrosiphum euphorbiae* bien qu'abondante sur le feuillage comme pour l'espèce *Myzus persicae*, s'est avérée la moins efficace à transmettre les différents isolats PVY, avec un taux d'infection de 4,44 %.

Par ailleurs, nos résultats montrent également que les isolats du groupe de souches PVY<sup>O</sup>, sont moins transmis que ceux représentant le groupe PVY<sup>N</sup> et ce quelle que soit l'espèce de puceron responsable dans leur transmission.

L'espèce *Myzus persicae* transmet efficacement la souche nécrotique PVY<sup>N</sup> qui s'est avérée la plus dominante sur pomme de terre lors de l'étude de la diversité des souches du virus PVY. Ce résultat original pourrait donc expliquer en partie la dominance écrasante de la souche nécrotique sur les autres populations du virus Y, qui tendent à disparaître pour être remplacées par des souches plus agressives et apparemment bien transmises par les vecteurs.

L'étude de l'aphidofaune réalisée en plein champ de pomme de terre indique la présence de sept espèces colonisant la culture de pomme de terre à savoir *Aphis fabae*, *Aphis frangulae*, *Aphis nasturtii*, *Aulacorthum solani*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aphis gossypii* et *Myzus persicae*, en accord avec les résultats antérieurs obtenus dans les mêmes régions prospectées par Daghfali (2012) ; Hadjaj (2015); Chelihu (2016); Bouzid et Guedouar (2017). Les espèces les plus abondantes rapportées par ces études sont représentées par *Myzus persicae* et *Macrosiphum euphorbiae*, où les premières infestations ont été observées précocement dès le mois de mai ; fortes infestations de populations ont été notées fin août.

Cependant, le rôle important des aphides aptères non colonisateurs dans la dispersion du virus Y a été également démontrée par Hull (2002) et ont déjà été décrits comme facteurs impliqués dans les épisodes épidémiques du PVY en Europe (De Box & Piron., 1990 ; Harrington & Gibson., 1989 ; Robert & Bourdin., 2001 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2007).

Yattara et ses collaborateurs (2013) ont rapporté que tous les pucerons sont potentiellement des vecteurs importants de viroses. Parmi ces insectes, cinq espèces s'alimentent réellement de la pomme

de terre. Il s'agit, des pucerons *Myzus persicae* (Sulzer), *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) qui établissent précocement leurs colonies sur les feuilles supérieures de la plante, suivies plus tard de trois autres espèces : *Aphis gossypii* (Glover), *Aphis nasturtii* (Kaltenbach) et *Aulacorthum solani* (Kaltenbach), qui colonisent les feuilles inférieures et médianes des plants. Ces insectes sont vecteurs de nombreux virus notamment le virus Y de la pomme de terre.

Par ailleurs, la plus forte incidence du virus Y, enregistrée en arrière- saison de la campagne agricole 2014-2015 au niveau des quatre localités de la région de Ain Defla, peut être reliée à une forte activité aphidienne à cette période de l'année. Durant cette période les températures hivernales notées étaient relativement clémentes en faveur d'une pullulation plus ou moins importante des pucerons recensés. Nous avons remarqué également plusieurs colonies de ses aphides survivent en cette période hivernale, en absence de précipitations enregistrées durant la période avril-août de l'année 2015 comparée aux autres années. Il a été également relevé, durant de la période 2015-2016, que la culture de pomme de terre, est un hôte alternatif pour certaines espèces de pucerons qui viennent précocement la coloniser dès le début de la pleine saison de la culture.

Au final, Il est bien évident que la détection et l'identification des virus de la pomme de terre constituent un élément essentiel pour la gestion de la production de pommes de terre de semence. Aussi, le développement de techniques modernes de contrôle virologique est un besoin fondamental et pratique dans la production des semences d'origine (Ryazansev *et al.*, 2008).

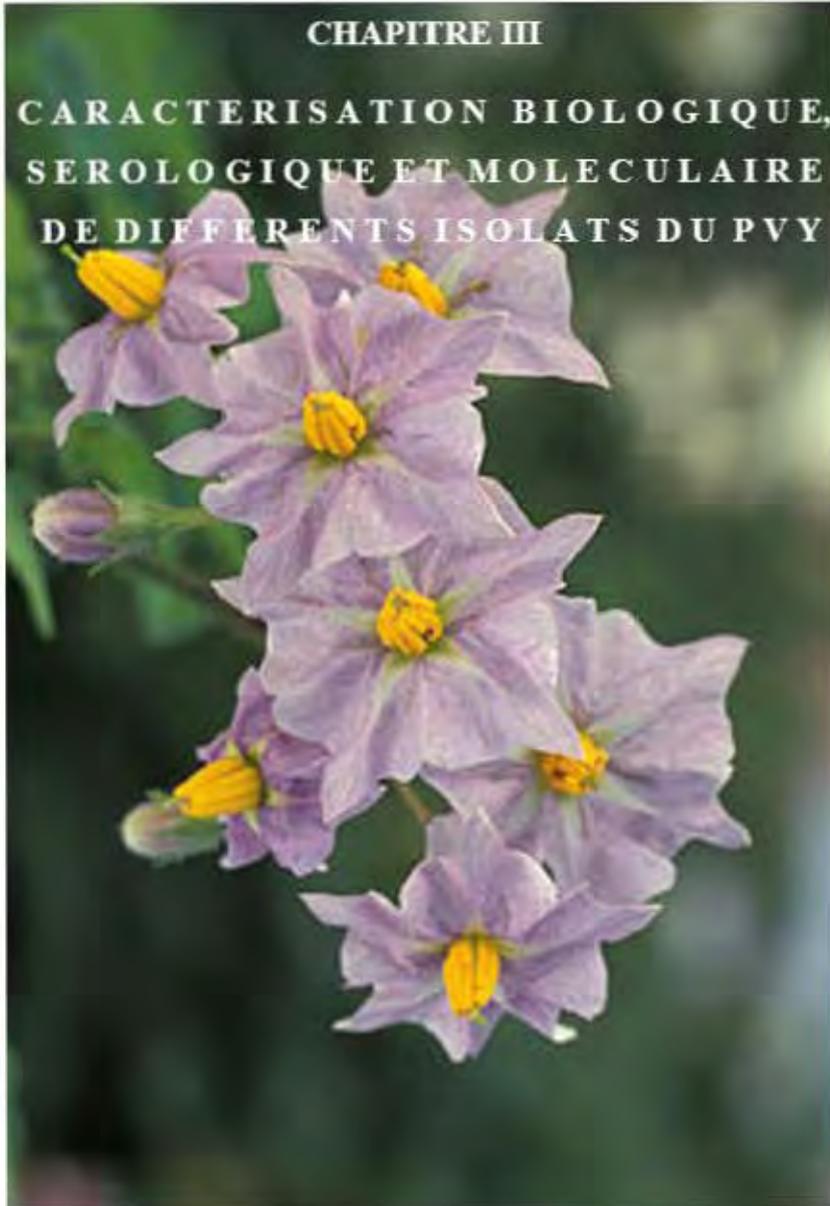
L'ensemble des informations apportées dans ce premier chapitre de notre travail sont soutenues par l'utilisation de diverses techniques sérologiques qui ont permis la détection des virus étudiés même lorsque ceux-ci ne sont pas visibles à l'œil nu ou montrant un symptôme apparent. Ceci constitue un grand obstacle dans le diagnostic virologique lorsque les moyens sont limités ou n'apportent pas toujours les bonnes réponses aux problèmes observés sur le terrain. D'où pour lors de l'évaluation de l'incidence du PVY, nous avons utilisé deux autres techniques aussi efficaces que le test ELISA communément utilisée pour la détection des virus.

L'utilisation de ces tests (DTBIA et FLASH-KIT) est bien généralisée dans les laboratoires étrangers, vu les avantages pratiques qu'ils offrent par la réduction des coûts et le gain du temps, puisqu'ils permettent de tester un grand nombre d'échantillons en un temps réduit comparativement à la technique ELISA. Ces deux tests, sont fortement recommandés pour la détection précoce des viroses en pré culture de la pomme de terre.

La variabilité symptomatologique observée chez les différents isolats de pomme de terre infectée par le PVY, suppose la présence de différentes souches de ce même virus circulant dans la pomme de terre, non identifiées par les moyens classiques. Cela, nécessite des techniques plus performantes sollicitant l'outil moléculaire pour mieux caractériser et identifier ce que les méthodes sérologiques n'ont pu faire. Pour cela, nous proposons de poursuivre l'étude avec un deuxième chapitre qui traite particulièrement la caractérisation d'une collection d'isolats du virus PVY, représentant les différentes régions prospectées.

CHAPITRE III

CARACTERISATION BIOLOGIQUE,  
SEROLOGIQUE ET MOLECULAIRE  
DE DIFFERENTS ISOLATS DU PVY



## *Chapitre III*

# CARACTERISATION BIOLOGIQUE, SEROLOGIQUE ET MOLECULAIRE DE DIFFERENTS ISOLATS DU PVY

Depuis plus d'une trentaine d'années, de nombreux travaux ont rapporté l'émergence de nouvelles souches du PVY dans plusieurs pays producteurs de pomme de terre dans le monde mais pas en Algérie. En outre de l'importance économique de ce virus, démontrée dans la première partie de ce travail, nous nous proposons d'étudier sa variabilité génétique à travers ses propriétés biologiques, sérologiques et moléculaires afin d'apporter les informations utiles pour renseigner le pool de souches présentes sur la pomme de terre à partir d'une collection localement isolée de ce virus.

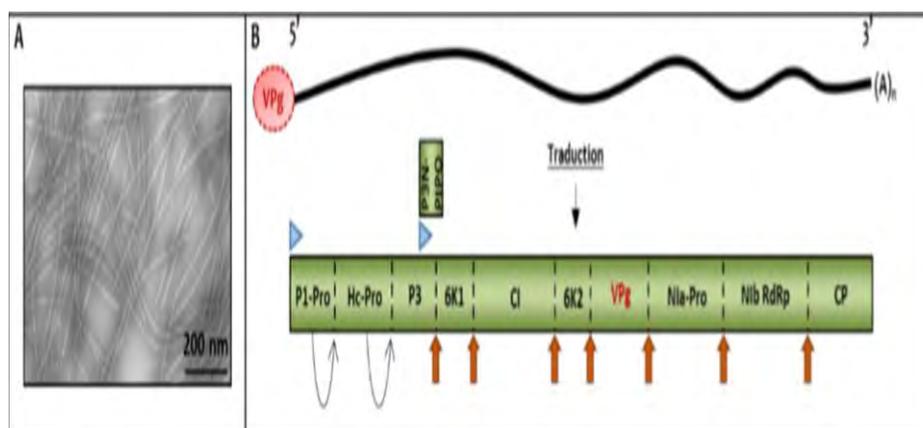
Cette approche sera basée sur les informations récentes corrélées à la classification et la caractérisation de différentes souches ou variants émergents dans le monde. Nous présentons, les travaux le plus connus au monde et ceux qui utilisent les meilleurs outils de diagnostic, offrant des moyens d'identification incontournables face à la grande variabilité et l'instabilité génétique du PVY.

### **III.1. DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES**

#### **III.1 1. Structure et diversité génétique évolutive du PVY**

##### **III.1.1.1. Présentation de l'organisation génomique du PVY**

Le PVY se présente sous forme d'une particule flexueuse d'environ 700 nm de longueur et de 11–13 nm de diamètre, renfermant le génome enveloppé d'une capsidie protéique (CP) de 30 kDa (Fig.17A). Ce génome est composé d'un simple brin d'ARN de polarité positive extrémité 3' par une chaîne polyprotéique (poly A) de 3140 acides aminés composant les 11 protéines multifonctionnelles du virus, P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, Nib, CP et P3N-PIPO (Fig.17B) (Cuevas *et al.*, 2012, Revers & Garcia, 2015). Chacune de ces protéines assure une ou plusieurs fonctions dans le cycle biologique viral comme indiqué dans le tableau 6



**Figure 17** Représentation structurale génomique du PVY. **A.** Particules flexueuses du PVY observées au microscope électronique (Quenouille *et al.*, 2013b). **B.** Représentation de la polyprotéine codée par l'ARN viral lié à son extrémité 5' à la protéine VPg, et qui possède une queue poly A à son extrémité 3'. Les triangles bleus représentent les 2ORFs permettant la traduction des polyprotéines dont les sites de clivage sont indiqués par des pointillés. Les flèches en orange indiquent les sites de clivage reconnus par NI-Pro (Revers & Garcia, 2015).

**Tableau 6** Fonctions des protéines structurales dans le cycle biologique du PVY ( Revers & Garcia,2015)

| Protéine | Taille (Kda) | Différentes fonctions biologiques  |
|----------|--------------|--|
| P1       | 35           | serine protéase, stimule l'amplification du génome, le silencing de la HC-Pro et stabilise la CP.  |
| HC-Pro   | 52           | cystéine protéase, nécessaire pour la transmission par aphides, impliquée dans la réplication et la pathogénicité virale et suppresseur de l'activité Silencing. |
| P3,      | 50           | nécessaire pour la réplication virale, la pathogénicité et l'expression des symptômes.   |
| 6K1,     | 6            | -rôle dans l'infection virale.   |
| P3N-PiPO | 25           | -nécessaire pour le mouvement intercellulaire du virus   |
| CI       | 71           | -RNA hélicase qui forme les protéines d'inclusion, le cylindre cytoplasmique et les pinwheels. Intervient dans le mouvement intercellulaire du virus.            |
| 6K2      | 6            | Intervient dans la replication   |
| VPg      | 21           | Protéine liée au génome virale, intervenant dans l'initiation de la réplication virale.  |
| Nia-Pro  | 27           | Sérine protéase, nécessaire pour l'infection   |
| Nib      | 58           | Réplication virale   |
| CP       | 30           | Protéine capsidiale, rôle dans l'encapsidation le mouvement, transmission et régulation de l'amplification du RNA viral  |

### III.1.1.2. Source de diversité génétique du PVY

En général, les virus présentent une variabilité génomique complexe qui peut donner naissance à de nouvelles souches leur permettant de s'adapter dans de nouvelles conditions environnementales Hull (2002). Ils possèdent une grande aptitude à muter et à se recombiner avec une vitesse de  $10^3$  à  $10^6$  plus élevée à celles des bactéries et des eucaryotes (Hull, 2009 ; Gajo *et al.*, 2009 ).

De tous les potyvirus, le PVY constitue le modèle type vu sa grande instabilité génétique largement démontrée dans le monde (Simon & Bujarski., 1994 ; Roossinck., 1997).

Cette diversité est conduite par trois principales voies : mutation, recombinaison et réassortiment, créant ainsi de nouveaux variants qui survivent et qui se succèdent dans de multiples plantes hôtes de ce virus et dans différents environnements (Blanchard *et al.*, 2008 ; Kerlan *et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 2009).

Des études génétiques ont démontré que le taux des mutations spontanées chez le PVY peut atteindre  $10^{-5}$  à  $10^{-6}$ /site/génération (Tromas & Elena, 2010). Elles se produisent à un taux élevé pendant la réplication du virus à ARN, ce qui entraîne une population de génotypes presque identiques (Smith *et al.*, 1997). Les génotypes les mieux adaptés à l'hôte deviendront prédominants avec le temps (Drake & Holland., 1999 ; Garcia-A *et al.*, 2001). Pour comprendre l'évolution de la composition génétique des populations virales, il est donc important de connaître le taux des mutations et le spectre moléculaire des mutations spontanées chez une espèce virale (Tromas & Elena, 2010).

### III.1.1.3. Émergence de nouvelles souches et variants du PVY dans le monde

Alors que le consensus international sur la nomenclature du PVY est encore en débat, plusieurs groupes de souches et de variants du PVY ont été décrits dans le monde. Les symptômes causés par ces souches incluent la mosaïque légère à sévère, la frisolée et les nécroses au niveau des feuilles et des tubercules de pomme de terre. L'expression de tel ou tel symptôme dépend fortement du type d'infection (primaire via le tubercule ou secondaire par le vecteur), du degré d'agressivité des souches virales, du type de variété de pomme de terre et des conditions climatiques du milieu.

La multiplication de semences infectées peut se traduire par le développement de plants nains aux feuilles crispées parfaitement improductifs (Kerlan, 2006). Lors des deux dernières décennies, une attention particulière a été donnée à l'étude des multiples recombinants du PVY circulant dans le globe et affectant la culture de pomme de terre (Glais *et al.*, 2002 ; Lorenzen *et al.*, 2006 ; Lorenzen

*et al.*, 2008 ; Hu *et al.*, 2009 ; Hu *et al.* ; 2009, Chikh Ali *et al.*, 2010 ; 2016 ; Karasev *et al.*, 2011 ; 2013; 2016).

En Europe, les souches non recombinantes PVY<sup>O</sup> ont disparu et remplacées par les souches recombinantes PVY<sup>NTN</sup> et PVY<sup>N-WI</sup>, qui prédominent à présent chez les pommes de terre, alors que les autres souches non recombinantes PVY<sup>N</sup> sont toujours présentes mais très rare (Blanchard *et al.*, 2008 ; Kerlan *et al.*, 2011).

Aux Etats Unis et au Canada, bien que l'incidence des souches recombinantes est en forte augmentation ainsi leur distribution, la souche PVY<sup>O</sup> reste prédominante chez la pomme de terre, alors que la souche PVY<sup>N</sup> est rare (Piche *et al.*, 2004 ; Balauf *et al.*, 2006 ; Karasev *et al.*, 2008; Gray *et al.*, 2010 ).

En Afrique, le PVY connaît depuis plus d'une vingtaine d'années une évolution dans le temps et dans l'espace avec l'émergence de nouvelles souches qui n'existaient pas ou non encore identifiées, surtout au niveau des pays dépendants des importations massives de semences de pomme de terre. Cette voie d'importation peut être une source d'introduction de nouvelles souches, en absence d'un contrôle phytosanitaire continu dans les pays concernés.

Une prédominance de la souche nécrotique PVY<sup>N</sup> et plus particulièrement le variant PVY<sup>NTN</sup> a été rapportée en Tunisie (Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010; Larbi *et al.*, 2012 et Tayahi *et al.*, 2016) et au Mali par Yattara *et al.* (2013). En Egypte, la présence dominante des souches, PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup> a récemment été signalée (El Borollosy ,2015).

### **III.1.2. Outils de détection et de caractérisation du PVY chez les isolats de pomme de terre**

Le diagnostic viral repose sur l'observation visuelle des plants corroborés par un ou plusieurs tests au laboratoire. Cependant, les plants infectés n'expriment qu'une gamme limitée de symptômes. Des symptômes similaires peuvent être causés par plus d'une espèce ou souche virale, par une carence en éléments minéraux ou encore par une phytotoxicité des herbicides (Le Hingrat, 2005).

En outre, l'infection par certains isolats du PVY peut être asymptomatique ou n'entraîner que de légers symptômes sur les plants de pomme de terre difficilement repérables lors de l'inspection visuelle, et nécessitent des tests supplémentaires pour identifier le ou les virus en cause. A cet effet, différents tests sérologiques et moléculaires sont à présent très utilisés dans les grands laboratoires au monde. Ils répondent efficacement aux différentes hypothèses préétablies lors des inspections visuelles au champ, et permettent donc l'identification des différents isolats de ce virus responsables des symptômes observés.

La nomenclature du PVY repose essentiellement sur la caractérisation des groupes de souches qui reflète visiblement leur degré de pathogénicité et leur impact sur la plante hôte (Singh *et al.*, 2008). En outre, l'étude de la relation entre la pathogénicité et les caractéristiques du génome contribue donc, à l'identification infime des déterminants génétiques de chaque souche virale responsable de tel ou tel symptôme chez la gamme d'hôtes ainsi qu'à la conception précise des outils de diagnostic nécessaires.

### III.1.2.1. Caractérisation biologique et définition des groupes de souches du PVY

Le PVY existe sous forme d'un complexe de groupe de souches ou de souches responsables d'altérations physiologiques chez la pomme de terre (Smith, 1931). Celles-ci sont traduites par une grande diversité de symptômes allant d'une légère à sévère mosaïque, marbrure, chlorose et nécrose entraînant une baisse significative du rendement et de la qualité des tubercules (Kerlan, 2008 ; Karasev & Gray, 2013) (Figs. 18, 19, 20 et 21).

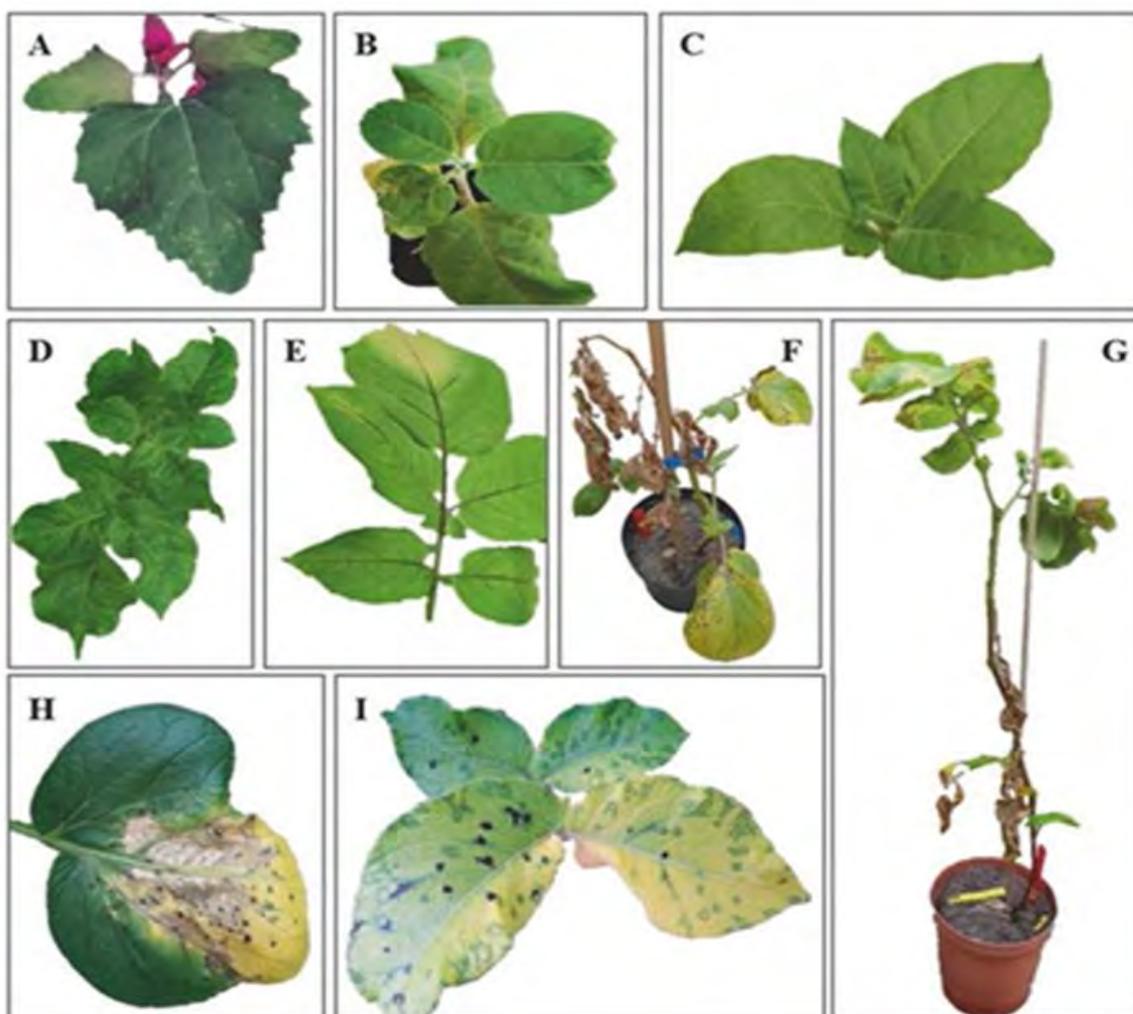
L'indexage biologique du PVY repose sur deux critères essentiels permettant la distinction biologique du type de souche entre différents isolats du PVY, prélevés chez la pomme de terre :

- l'un concerne la capacité d'induire des symptômes sur les feuilles des plantes indicatrices inoculées *in vitro* et de détourner les gènes de résistances de type HR chez différents variétés de pomme de terre.
- l'autre critère concerne la capacité d'induire la nécrose annulaire ou PTNRD chez les tubercules de la pomme de terre.

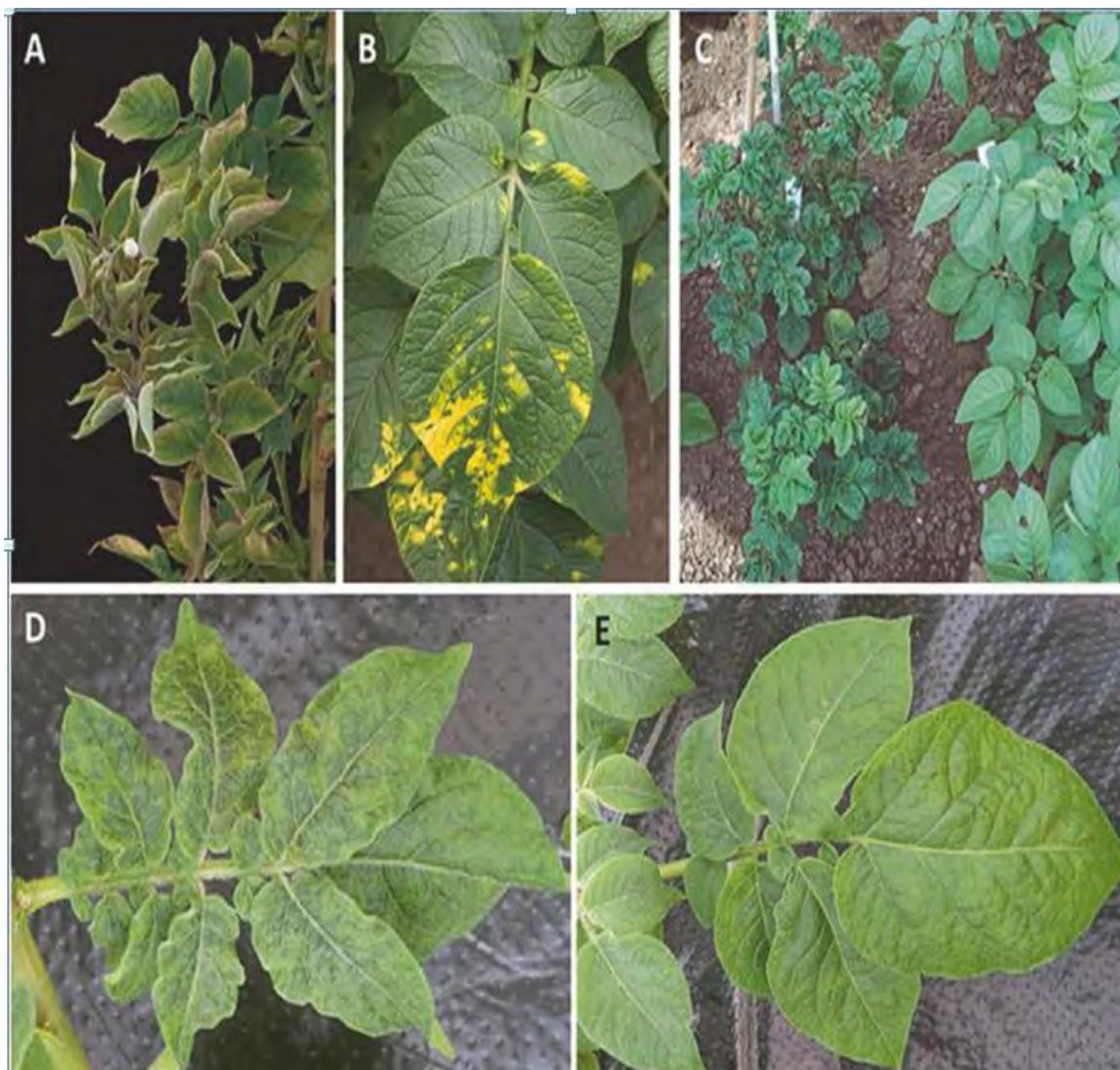
A l'issue de cette approche, cinq groupes de souches ont été alors définis (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>Z</sup> et PVY<sup>E</sup>), ainsi que deux autres sous-groupes ou variants (PVY<sup>NTN</sup> et PVY<sup>N-W</sup>) originaire du groupe de souche PVY<sup>N</sup> (Chrzanowska, 1994 ; Singh *et al.*, 2008 ; Galvino-Costa *et al.*, 2012 ; Karasev & Gray, 2013).

#### – Le groupe de souches ordinaire (PVY<sup>O</sup>) et de souches communes (PVY<sup>C</sup>)

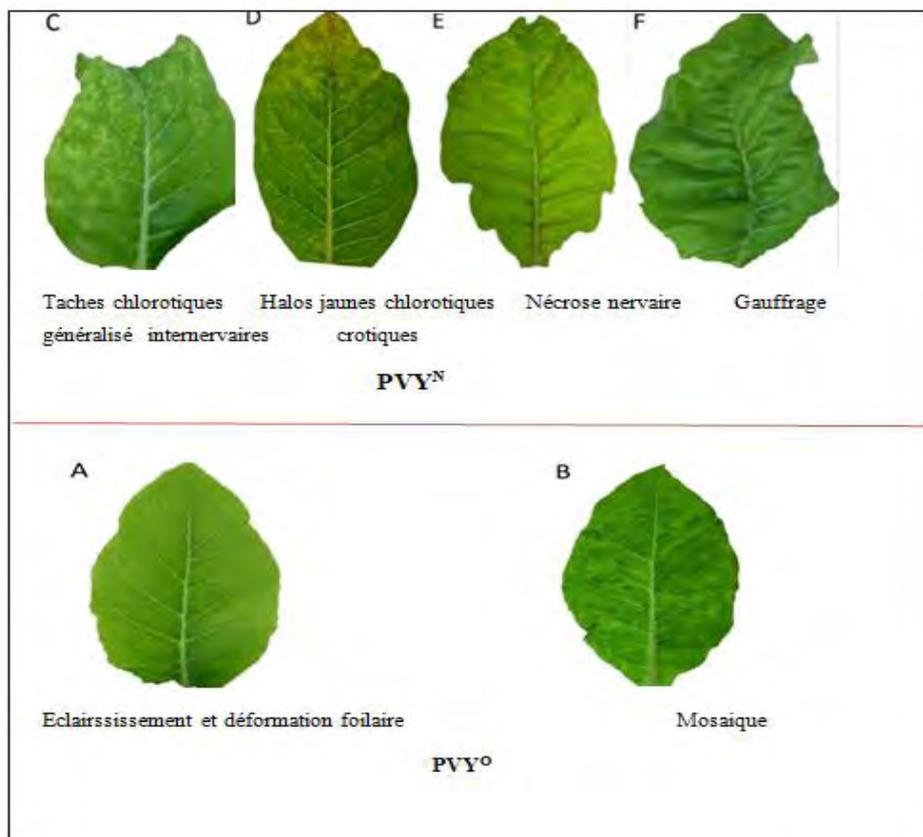
Les isolats appartenant aux groupes de souches PVY<sup>O</sup> et de souches PVY<sup>C</sup> induisent des mosaïques similaires sur les feuilles infectées de tabac mais s'expriment différemment chez les plants de pomme de terre. Le groupe des souches communes PVY<sup>C</sup> cause des symptômes légers en forme de stries de pointillés sur les feuilles et les tiges chez les variétés sensibles de pomme de terre et une réaction d'hypersensibilité (HR) chez les variétés portant le gène de résistance Nc<sub>ibr</sub> (de Box & Hut-



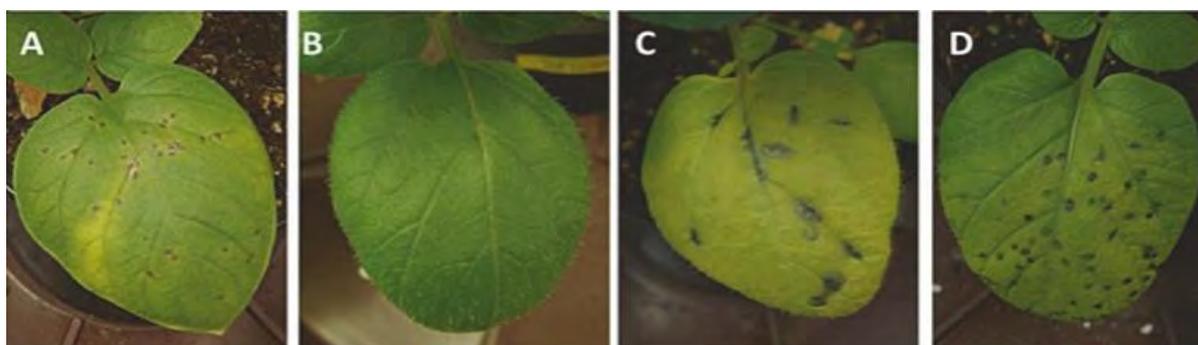
**Figure 18** Symptômes induits chez la gamme de plantes hôtes discriminant le type de souches du virus Y de la pomme de terre. **A.** Lésions locales sur feuilles de *Chenopodium amaranticolor* inoculé par PVY<sup>O</sup>. Nécrose nervaire et déformation sur feuilles de *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi infecté par PVY<sup>N</sup>. **C.** Mosaïque déformation foliaire chez tabac infecté par PVY<sup>O</sup>. **D.** Mosaïque sévère sur tabac infecté par PVY<sup>O</sup>. **E.** Nécrosé nervaire sur tabac par PVY<sup>O</sup>. **F.** Hypersensibilité ou HR résultant vers nécrose apicale et flétrissement des feuilles basales sur tabac. **G.** HR avec nécrose leaf drop streak chez le tabac. **H., I.** Lésions locales nécrotiques ou green ring spot necrotic spot chez pomme de terre. (D'après Kerlan, 2008 ; Karasev & Gray, 2013)



**Figure 19** Exemples de symptômes causés par quelques virus affectant la pomme de terre. **(A)**. Enroulement foliaire causé par PLRV. **(B)**. Marbrure causée par PMTV. **(C)**. Mosaïque sévère causée par PVA et PVX, en infection mixte : rugosité et nanisme). Différents symptômes liés au PVY affectant les variétés de pomme de terre : mosaïque sévère, distorsion foliaire des plages chlorotiques bien délimitées chez King Edward **(D)** et mosaïque légère avec marbrure chez Pentland Crown **(E)** induits par le même isolat (D'après SASA Crown copyright, UK).



**Figure 20** Principaux symptômes induits chez les feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Burley 30 jours après inoculation par le groupe PVY<sup>O</sup> (A et B) ou par le groupe PVY<sup>N</sup> (C à F) (D'après Mollov & Thill, 2004).



**Figure 21** Diversité des symptômes exprimés par différentes variétés de pomme de terre et l'expression génétique face à l'infection par le PVY<sup>NTN</sup>. A. cv. Rywal avec HR (lésions locales nécrotiques résultant d'une restriction du mouvement du PVY<sup>NTN</sup>). B. cv. Désirée tolérante (mosaïque légère due au mouvement systémique du PVY<sup>NTN</sup>). C. cv. Désirée sensible: NahG (symptômes sévères induits par le NahG transgene et traduit par le mouvement systémique du PVY<sup>NTN</sup>). D. cv. Igor (nécrose sévère sur feuilles inoculées et chlorose systémique).

tinga 1981). Aucun cas de PTNRD n'a été associé à ce groupe de souches (Glais *et al.*, 2015).

Le groupe des souches ordinaires PVY<sup>O</sup> cause des symptômes plus sévères regroupant la nécrose, la rugosité, le froissement des feuilles ainsi que le nanisme des plants de pomme de terre. Aussi, il élicite une réaction hypersensible chez les variétés de pomme de terre portant soit le gène de résistance Nc<sub>tbr</sub> (Jones, 1990 ; Rolland *et al.*, 2008) ou encore les gènes Ny-1 et Ny-2 (Szajko *et al.*, 2014). Certains isolats de ce groupe peuvent causer la maladie du PTNRD, lorsqu'ils sont inoculés sur certains variétés sensibles de pomme de terre en conditions contrôlées sous serre (Gray *et al.*, 2010).

#### – Le groupe de souches PVY<sup>N</sup>

Contrairement aux deux groupes de souches précédents, les isolats PVY<sup>N</sup> causent la nécrose des nervures chez les feuilles de tabac et de la mosaïque légère chez la plupart des variétés de pomme de terre ; ils induisent aussi une réaction d'hypersensibilité en présence des gènes de résistance Ny-1 ou Ny-2 chez certaines d'entre eux (Jones *et al.*, 1990 et Szajko *et al.*, 2008). En conditions optimales et sous serre, certains isolats de ce groupe peuvent induire le PTNRD chez les tubercules infectés de pomme de terre (Kerlan & Tribodet, 1996).

#### – Le groupe de souches PVY<sup>NTN</sup>

Ce groupe est relié phénotypiquement à celui des souches PVY<sup>N</sup>, car les deux induisent de la nécrose nerveaire chez les plants infectées de tabac. Chez les variétés de pomme de terre portant les gènes de résistance Ny.1 et Ny-2, une réaction d'hypersensibilité est produite par les souches PVY<sup>NTN</sup>. Cependant, la caractéristique principale des souches PVY<sup>NTN</sup>, demeure leur aptitude à induire la maladie du PTNRD chez les variétés sensibles de pomme de terre, et ce en conditions environnementales naturelles ou contrôlées dont dépendraient l'extériorisation des symptômes maladifs et leur sévérité (Le Romancer *et al.*, 1994 ; Browning *et al.*, 2004 ; Kerlan *et al.*, 2011).

Les souches PVY<sup>NTN</sup> semblent être un groupe très hétérogène, contrairement au groupe originaire PVY<sup>N</sup> dont certains isolats peuvent contourner différents gènes de résistance, en suscitant une réaction d'hypersensibilité. En conséquence ils pourraient faire partie d'un autre groupe appelé "Other" (Chikh Ali *et al.*, 2014).

#### – Le groupe de souches PVY<sup>N-Wi</sup>

Les symptômes induits par ce groupe de souches sont identiques à ceux induits par les souches PVY<sup>N</sup> aussi bien chez les plants de tabac que les plants de pomme de terre. Cependant, les isolats PVY<sup>N-Wi</sup> semblent causer différentes réactions chez *Solanum brachycarpum* parmi les plantes hôtes

rarement utilisées comme plantes indicatrices. Comme pour les souches PVY<sup>O</sup>, les isolats PVY<sup>N-Wi</sup> provenant de l'Europe induisent de la mosaïque et des spots nécrotiques. Au contraire, les isolats de ce groupe provenant de l'Amérique du nord ont été nommés PVY<sup>N:O</sup> et causent de la nécrose des nervures entraînant la mort des plants, comme le font les souches PVY<sup>N</sup> (Singh & Singh, 1994). De plus, certains isolats PVY<sup>N:O</sup> induisent de manière atypique de larges lésions circulaires superficielles au niveau des tubercules, au lieu des anneaux nécrotiques typiques au PTNRD (Piche *et al.*, 2004). Actuellement, la classification du groupe PVY<sup>N-Wi</sup> est utilisée pour définir différents sous-groupes: PVY<sup>N-Wilga</sup> et PVY<sup>N:O</sup> (Sing *et al.*, 2008).

#### – Le groupe de souches PVY<sup>Z</sup> et PVY<sup>E</sup>

Très peu d'isolats représentant ces deux groupes rares ont été décrits jusqu'à présent (Kerlan *et al.*, 2011; Galvino-Costa *et al.*, 2012). Ils, montrent des symptômes similaires à ceux causés par le groupe PVY<sup>NTN</sup> sur feuilles de pomme de terre, contournant les gènes de résistance Ny<sub>tbr</sub>, Nc<sub>tbr</sub> et ou Nz<sub>tbr</sub>. Ils induisent une réaction d'hypersensibilité chez les variétés Maris Bard de pomme de terre et causent le PTNRD de ses tubercules (Jones, 1990; Kerlan *et al.*, 2011).

Par contre, sur les feuilles de tabac, les souches PVY<sup>Z</sup> et PVY<sup>E</sup> ne causent pas la nécrose des nervures contrairement aux souches PVY<sup>NTN</sup> et causent de la mosaïque comme le font les souches PVY<sup>O</sup> (Kerlan *et al.*, 2011).

Même si les outils biologiques disponibles pour caractériser les isolats de PVY sont nombreux et semblent être facilement accessibles, l'expression des symptômes décrits ci-dessus est fortement dépendante des conditions expérimentales et environnementales en particulier en ce qui concerne l'apparition des nécroses sur tubercules (Mollov & Thill, 2004). D'où l'assignation des isolats de PVY dans leurs groupes et sous-groupes d'appartenance peut quelquefois être difficile. De ce fait, de nombreux outils sérologiques et/ou moléculaires ont été développés comme alternatives à l'indexage biologique du PVY.

#### III.1.2.2. Caractérisation sérologique par la technique ELISA

Il existe plusieurs approches qui ont été développées et affinées pour le diagnostic sérologique des bio-agresseurs en général et des virus en particulier, et ce depuis l'acquisition des connaissances dans le domaine d'immunologie cumulées il y a plus d'une trentaine d'années.

Parmi les techniques les plus couramment utilisées dans les laboratoires au monde, nous pouvons citer l'immuno précipitation sur milieu gélosé, L'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), le FLASHKIT et le TBIA (Tissue blot ImmunoAssay). Elles impliquent toutes l'interaction entre deux

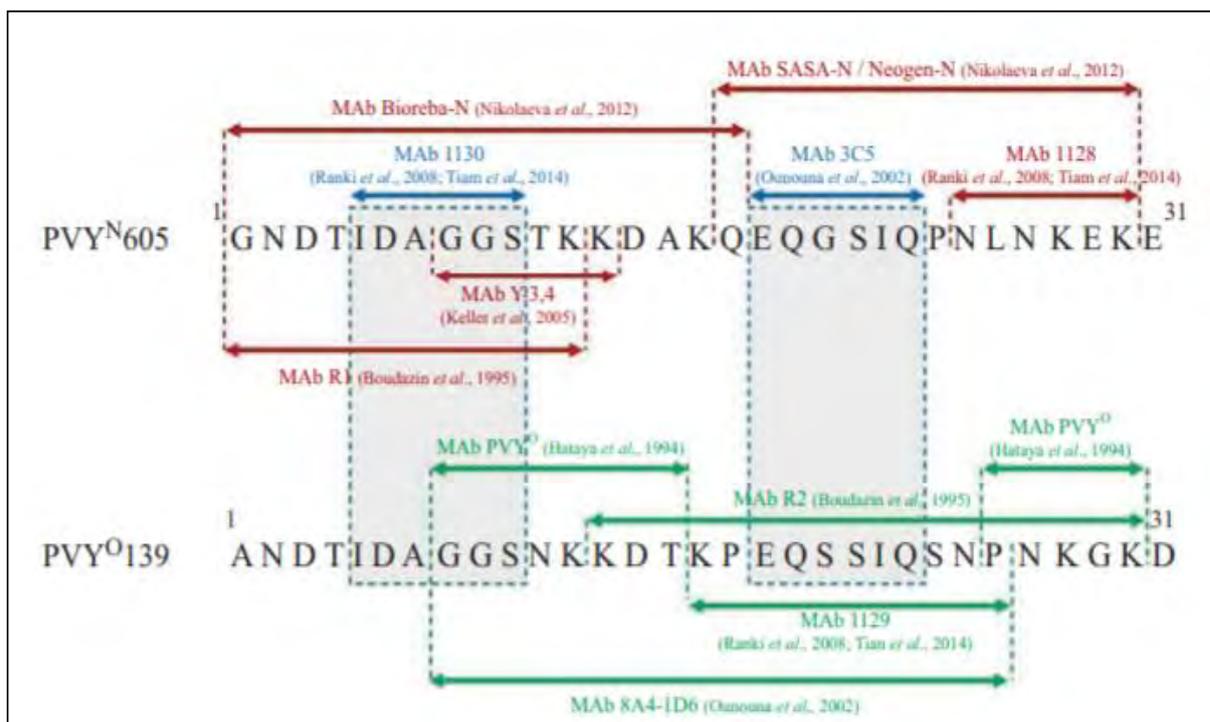
protéines: l'antigène représenté par la protéine capsidiale du virus et l'anticorps produit par un animal (Lapin, Souris, chèvre, etc.) auquel on a injecté l'antigène viral (Shukla & Ward, 1988).

L'utilisation de la technique DAS-ELISA pour la détection du PVY fut initiée dès 1980 (Gugerli, 1978) et a été rapidement validée dans le contrôle des semences en raison de sa sensibilité et sa reproductivité face à un grand nombre d'échantillons à tester. Son application s'est généralisée aux feuilles, aux germes de pomme de terre dans le processus de contrôle phytosanitaire (Kerlan & Le Hingrat, 1996 ; Boonham *et al.*, 1998, Vetten *et al.*, 1983). Elle permet également de détecter le PVY dans les pucerons tels que *M. persicae* (Carlebach *et al.*, 1982).

L'identification du PVY et /ou la caractérisation du type de souches a été rendue possible avec l'utilisation de deux types d'anticorps ou sera développés et adaptés aux caractéristiques de ce virus, grâce aux propriétés antigéniques de ces groupes de souches facilitant ainsi leur classification. Les anticorps polyclonaux reconnaissent plusieurs épitopes ou sites antigéniques, et les anticorps monoclonaux (Mab) sont dirigés contre un épitope précis d'un groupe de souche donné.

En effet, ces MAb ont fourni la première preuve que le PVY se présente sous deux groupes sérologiques ou sérotypes: sérotype N regroupant (PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, et PVY<sup>Z</sup> et PVY<sup>E</sup>) et le sérotype O/C incluant (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup> et PVY<sup>N-WI</sup>) et qui se distinguent entre eux par l'antigénicité de l'enveloppe ou de la capsid (CP) (Ounouna *et al.*, 2002). Cette dernière est constituée d'une région hydrophobe correspondant à la partie centrale de la protéine et deux régions hydrophiles, les régions N et C – terminales qui sont exposées à la surface de la particule. Ces deux dernières régions correspondent aux 31 premiers et 19 derniers acides aminés comme illustré par la figure 22. Cependant, le typage sérologique ainsi que l'antigénicité de la capsid CP, ne sont pas toujours corrélés avec les caractéristiques biologiques de certains isolats de PVY. C'est le cas des variants recombinants PVY<sup>N-Wilga</sup> ou PVY<sup>N:O</sup>, des variants qui réagissent avec le MAb anti-PVY<sup>O</sup>. La spécificité des outils sérologiques disponibles actuellement ne permet donc pas de différencier les isolats PVY<sup>NTN</sup>, recombinants des isolats parentaux PVY<sup>N</sup>, ni les isolats PVY<sup>N-W</sup> recombinants des isolats parentaux PVY<sup>O</sup>. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces Mabs reconnaissent différents épitopes individuels qui ne sont pas nécessairement spécifiques à un groupe de souches particulier de PVY et dont la classification est basée sur la pathogénicité du virus (Sing *et al.*, 2008).

La base de la diversité du sérotype est le résultat des changements méconnus chez les nucléotides produits lors des événements de mutation et de recombinaison qui altèrent la composition des acides aminés et dans certains cas la structure de la capsid CP. En conséquence, l'absence d'une validation



**Figure 22** Localisation de quelques épitopes pour les différents isolats PVY (en bleu) et pour les isolats PVY<sup>N</sup> (en rouge) et pour les isolats PVY<sup>O</sup> (en vert) au sein des 31 premiers acides aminés de la position N-terminal de la capsid protéique du PVY (Ounouna *et al.*, 2002).

complète des sera monoclonaux et polyclonaux avec une gamme référentielle d'isolats PVY, limiterait l'utilisation du sérotypage pour la classification de certains isolats non reconnus par certains Mabs (Chikh Ali *et al.*, 2007 ; Karasev *et al.*, 2010).

A cet effet, pour contrer cette inhérente issue, les études phylogénétiques et le séquençage du génome partiel ou complet sont forts recommandés par Karasev *et al.*, (2013) avant d'assigner les isolats de PVY à un génotype donné.

### III.1.2.3. Caractérisation moléculaire par RT-PCR

L'instabilité génétique remarquable chez le PVY est à l'origine de son évolution rapide avec l'émergence de nouvelles souches et variants efficacement identifiés par l'analyse moléculaire et le séquençage du génome viral au niveau des nucléotides (Robaglia *et al.*, 1989).

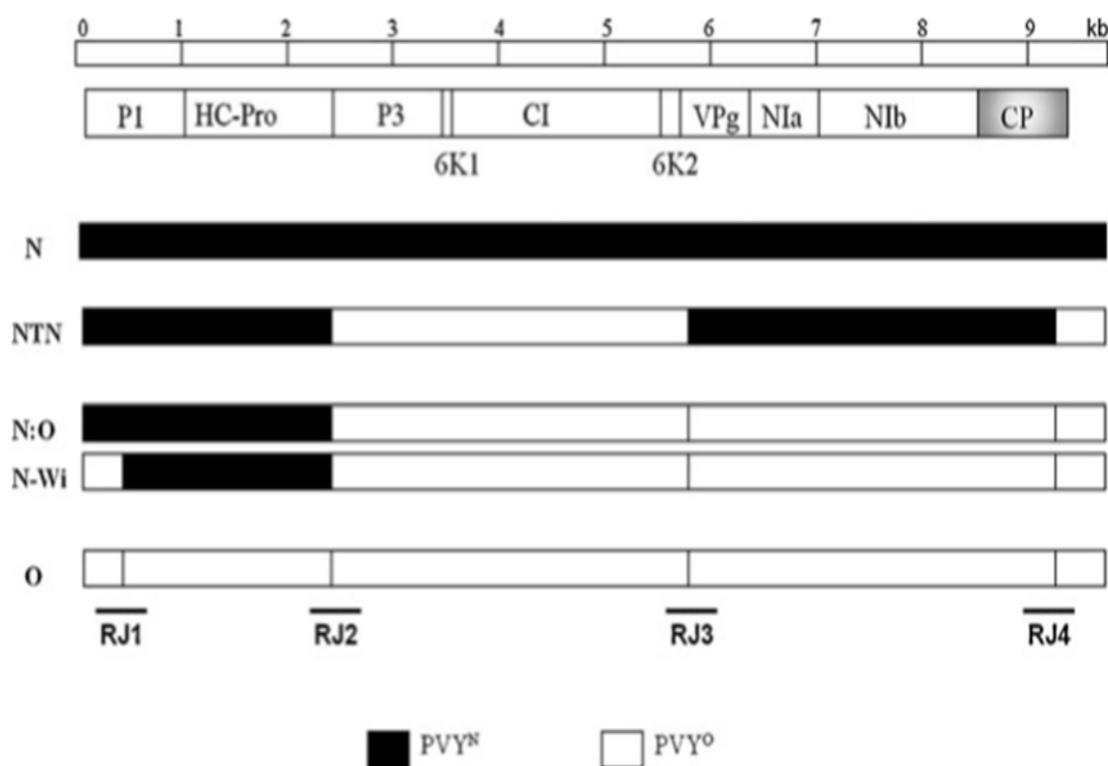
Initialement, le séquençage partiel à la base du polymorphisme au niveau des régions génomiques 5 NTR et Pi du PVY, a contribué à tracer les premiers critères taxonomiques pour la classification des principales souches du PVY pour des isolats d'origine géographique différente et isolés de différentes plantes hôtes sources. Il en résulte, la séparation de trois grands groupes de souches en séquençant seulement la région terminale 5'NTR (nécrotique: PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, non nécrotique: PVY<sup>O</sup> et

PVY<sup>C</sup> et autre que le virus PVY) (Thole *et al.*, 1993, Jakab *et al.*, 1997, Glais *et al.*, 1998, Nie & Singh, 2002 ; Lorenzen *et al.*, 2006).

En plus de ces génomes parentaux, de multiples génomes de PVY recombinants ont été découverts, constitués de segments de séquence de PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup> (Glais *et al.*, 2002a ; Chikh Ali *et al.*, 2007, 2008, Karasev *et al.*, 2011, Galvino Costa *et al.*, 2012). En effet, au moins neuf schémas de recombinaison ont été élaborés sur la base de l'analyse d'un grand nombre de nucléotides (2385) par le séquençage partiel (P1, HC-Pro, CP) et le séquençage total du virus Y chez plus de 256 isolats.

Ces modèles recombinants avaient entre 1 et 4 jonctions recombinantes (RJ), dont la plupart étaient relativement conservées dans leur position au sein du génome du PVY, en particulier dans les régions PI, HC-Pro et VPg-NIa (Hu *et al.*, 2009a).

Les trois modèles de recombinaison les plus fréquemment caractérisés sont représentés par les variants PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>N:O</sup> et PVY<sup>NWi</sup> avec les positions des RJ correspondantes (Karasev *et al.*, 2013, Chikh ali *et al.*, 2016). Les quatre régions RJs indiquées sur la figure 23 ont été largement testées en tant qu'outil de détermination pour le typage de recombinants PVY.



**Figure 23** Représentation schématique des principaux recombinants du PVY trouvés en Europe et en Amérique du Nord (D'après Karasev *et al.*, 2013).

Plusieurs types d'amorces exploitant le polymorphisme d'un nucléotide simple autour de ces régions, sont maintenant disponibles pour les différents recombinants du PVY. Une grande partie des propriétés génomiques des isolats, le nombre et la position de leur RJs ont été également déterminés par des tests de RT-PCR ou par séquençage du génome (Karasev *et al.*, 2013).

#### **III.1.2.4. Séquençage et phylogénie**

Avant l'avènement des technologies de séquençage, l'utilisation des arbres phylogénétiques était exclusivement limitée en systématique pour décrire les relations entre les espèces. Aujourd'hui, elle s'est généralisée à toutes les branches de la biologie pour traiter les relations entre les différentes espèces où les différents gènes, l'origine de la propagation de l'infection virale à travers l'histoire des populations et la dynamique évolutive et épidémiologique des virus ainsi que leur diversité génétique. Celle-ci conduit à l'émergence de nouvelles souches ou variants sous la pression d'autres facteurs environnementaux.

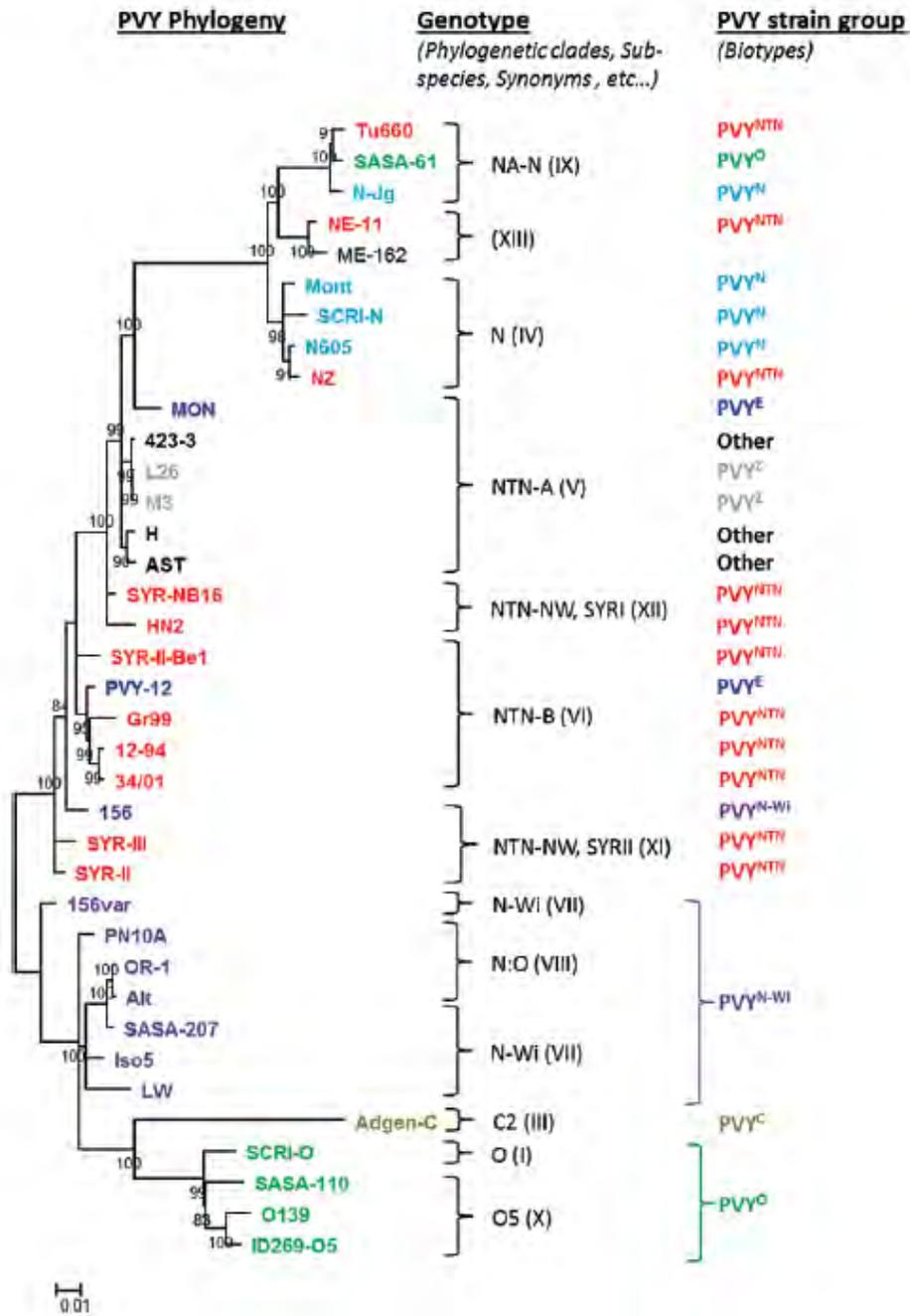
En phytopathologie basée sur des approches moléculaires, l'étude phylogénique est devenue un outil indispensable pour la comparaison entre les génomes des différents pathogènes. C'est le cas des virus connus pour leur variabilité génétique, permettant ainsi leur identification et classification dans leurs rangs respectifs.

La construction d'un arbre phylogénétique repose sur des pro-logiciels disponibles et choisis en fonction de l'objectif de l'étude (Yang & Rannala, 2012). Plusieurs travaux de séquençage et de phylogénie ont pu définir un large groupe de génotypes pour le PVY et qui sont réparties dans au moins 13 différents sous-groupes (numérotés de I à XIII dans la figure 24). Ceci montre que la variabilité génétique des différentes souches est très importante surtout avec la différenciation des déterminants moléculaires de leur pathogénicité (Kehoe & Jones, 2015)

#### **III.1.2.5 Relation entre les caractères génomiques du PVY et la pathogénicité**

Même si la classification des PVY reste complexe, il existe une bonne corrélation entre la phylogénie et les caractères biologiques (spécificité d'hôte, symptômes) (Moury, 2010b).

Grace à la plasticité de son génome, le PVY a fortement évolué en s'adaptant à des changements environnementaux et aux contraintes biotiques et abiotiques. Cette évolution a été souvent accompagnée par des isolats capables de produire des symptômes plus graves chez les deux principaux hôtes, le tabac et la pomme de terre, et de contourner les gènes résistance chez différentes variétés de pomme de terre. Toutes les modifications en termes de pathogénicité et de virulence sont corrélées avec des changements génétiques majeurs ou mineurs telles que les mutations et les recombinaisons.

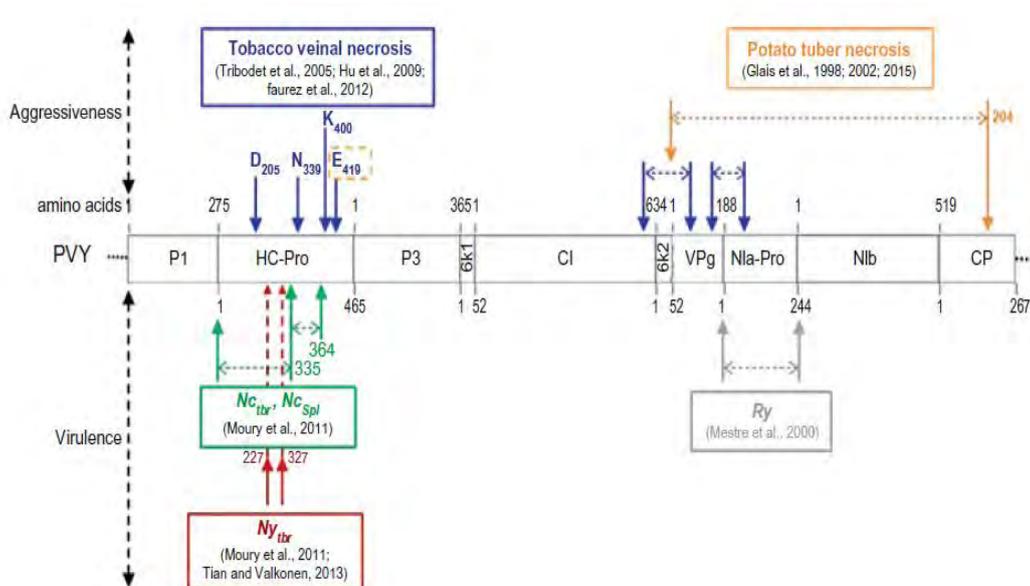


**Figure 24** Représentation phylogénétique des 13 branches (indiqués en chiffre Romains) pour des génotypes chez 37 isolats PVY (D’après Kehoe & Jones, 2015).

### III.2.5.1. Nécrose nerveire induite chez le tabac

Le premier critère utilisé pour la différenciation entre les deux groupes de souches PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> consiste en leur capacité d'induire la nécrose des feuilles de tabac. Les déterminants génétiques impliqués dans l'expression de la réaction nécrotique sont probablement localisés entre les deux régions terminales C et N du gène P3 (Glais *et al.*, 1998 et Glais *et al.*, 2002) (Fig. 25).

Les facteurs responsables pour l'expression de la nécrose des nervures chez les feuilles de tabac sont représentés en bleu; ceux impliqués dans le PTNRD sont en orange. Les régions génomiques démontrées dans le contrôle de la résistance des plantes (HR-Extrême Résistance-R) sont montrés en vert ( $NC_{ibr}$ ), en rouge ( $NY_{ibr}$ ) ou en gris ( $Ry$ ). La chaîne des acides aminés est présentée selon Thole *et al.*, (1993).



**Figure 25** Représentation schématique du génome du PVY avec localisation des déterminants moléculaires ou régions génomiques prouvées ou suspectées impliquées dans la pathogénicité du PVY (D'après Thole *et al.*, 1993).

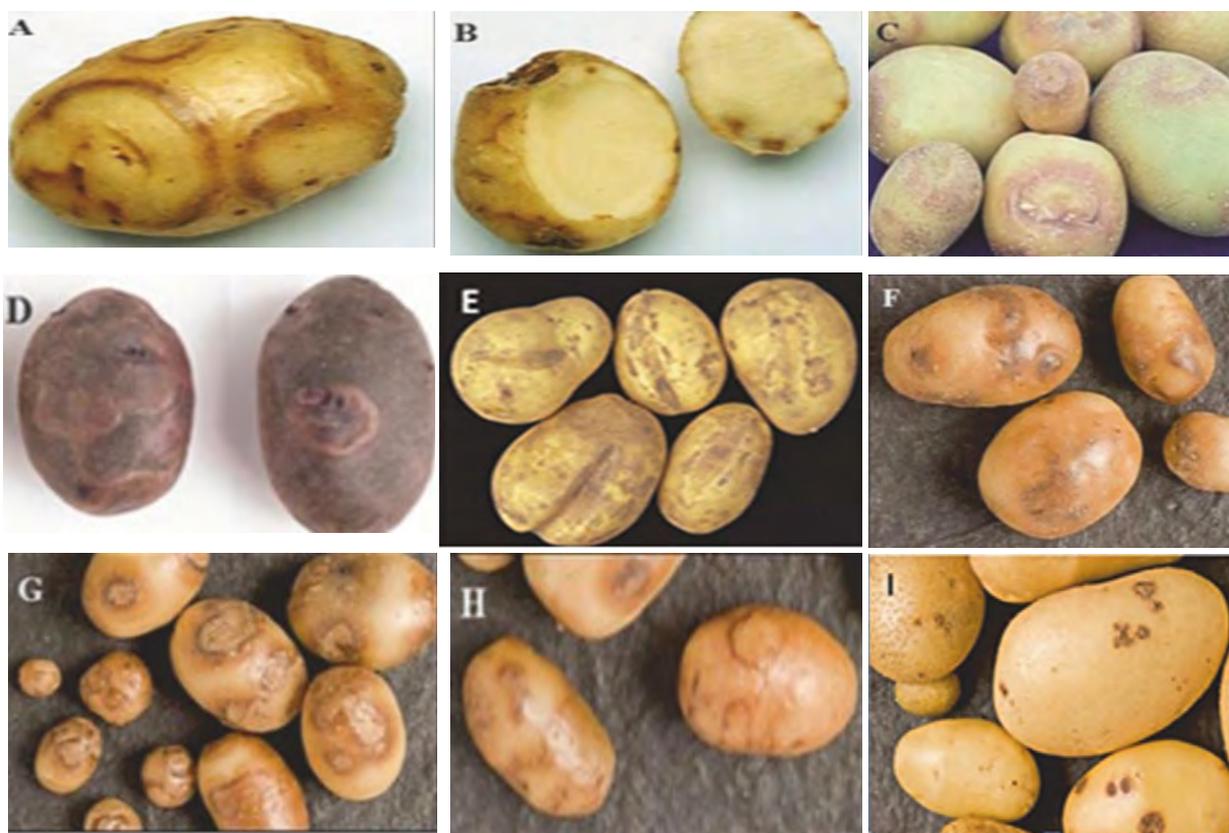
### III.1.2.5.2. Nécrose des tubercules de la pomme de terre (PTNRD)

Les études de comparaison des caractéristiques biologiques et moléculaires de plusieurs isolats PVY de pomme de terre causant le PTNRD, ont montré que les régions NIa, Nib and/or CP sont impliquées dans l'expression de cette maladie (Glais *et al.*, 1998 ; Glais *et al.*, 2002) (Fig. 26), suivies par la région HC-Pro (Glais *et al.*, 2015). Tous ces déterminants moléculaires ont été déjà validés pour les quatre variétés de pomme de terre connus sensibles au PTNRD (Béa, Hermes, Monalisa et Nicola).

### III.1.2.5.3. Virulence et contournement des gènes de résistance

En plus de leur capacité d'induire la nécrose nervaire chez les feuilles de tabac ou la nécrose au niveau des tubercules de pomme de terre, les variants PVY sont plus virulents du fait de leur capacité à contourner les gènes de résistance présents chez certaines variétés de pomme de terre. A titre d'exemple les groupes de souches PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>Z</sup>, PVY<sup>E</sup>, PVY<sup>NTN</sup> et PVYN<sup>WI</sup> contournent la résistance conférée par les gènes Nctbr et Nytbr respectivement en cas d'infection par les groupes PVY<sup>C</sup> et PVY<sup>O</sup> (Jones, 1990 ; Kerlan *et al.*, 1999).

Actuellement, beaucoup de travaux, ont montré que la région HC-Pro, portait des facteurs d'avirulence impliqués dans le contournement de la résistance induite. Ces facteurs sont conférés par les gènes Nytbr à l'égard de l'isolat PVY<sup>O</sup> par induction d'une nécrose localisée et inhibition de la propagation de virus (Tain & Valkonen, 2013; Tain & Valkonen, 2015).



**Figure 26** Les différents symptômes de la nécrose annulaire du tubercule de la pomme de terre (PTNRD) causés par les différents groupes d'isolats PVY sur différentes variétés. **A-B.** Isolat PVY<sup>NTN</sup> NZ sur cv. Rua. **C.** PVY<sup>N-Wi</sup> (isolat Polish) sur cv. Nadine. **D.** PVY<sup>NTN</sup> sur cv. Cheftain. **E.** Isolat PVY<sup>O</sup> sur cv Nadine. **F., G., H. et I.** Isolat PVY<sup>NTN</sup> (Source : GNIS/K. Charlet-Ramage).

## III.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### III.2.1. Etude de la diversité des souches PVY de différents isolats de pomme de terre

L'étude de la diversité des principaux virus affectant la pomme de terre, abordée au début de ce travail a révélé, la présence de plusieurs virus à mosaïques Y, A, X, S et le virus de l'enroulement le PLRV. L'évaluation de leur fréquence a montré que le PVY est de loin le plus dominant sur pomme de terre, avec une variabilité symptomatologique remarquable au niveau de toutes les régions prospectées. Cette variabilité extraordinaire caractérisant ce potyvirus a fait l'objet de plusieurs travaux dans le monde où il a été décrit comme le plus instable génétiquement parmi ses homologues. Il regroupe au moins sept souches distinctes et économiquement importantes.

Du fait de leur importance, cette deuxième partie de l'étude est consacrée à l'analyse de la diversité génétique du PVY, jusque-là méconnue dans nos conditions, notamment le type de souches virales circulant dans les parcelles de pomme terre. Pour ce faire, une collection de 185 isolats du PVY a été sélectionnée à partir de l'ensemble des échantillons foliaires de pomme de terre représentant les cinq régions prospectées du pays.

La caractérisation des isolats retenue dans cette étude, utilise des outils sérologiques, biologiques et moléculaires recommandés dans de nombreux travaux similaires.

#### III.2.1.1. Caractérisation sérologique par DAS-ELISA

L'ensemble des isolats du PVY ont été analysés individuellement par le test DAS-ELISA utilisant deux sera monoclonaux spécifiquement dirigés contre deux principaux groupes de souches connus pour ce virus: celui des souches communes ou serotype (O) incluant les souches PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N-WI</sup> (Adgen, Ayr, UK) et celui des souches nécrotiques ou serotype-N regroupant les souches PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>Z</sup>, PVY<sup>E</sup> (Bioreba, Basel, Switzerland).

Les différentes étapes du test DAS-ELISA ont déjà été décrites dans la première partie de ce travail (II.2.4.1). Les résultats obtenus dans ce cas sont exploités qualitativement par l'identification du type de souche et quantitativement par les taux d'infections calculés pour chaque groupe de souche et ce en fonction du nombre de plants infectés sur le nombre total de plants testés. Les différents isolats sont désignés par les deux premières lettres du nom de leur région d'origine.

#### III.2.1.2 Caractérisation biologique par inoculation mécanique

L'indexage biologique ou biotypage est considéré comme une étape primordiale dans le diagnos-

tic viral, basé essentiellement sur l'observation visuelle des symptômes typiques causés par les différentes souches du PVY inoculées sur des plantes indicatrices au stade sensible à l'infection. Les symptômes en cause peuvent donc être reproduits soit par inoculation mécanique, soit par le biais des pucerons vecteurs comme a déjà été montré dans le paragraphe II.2.4.6.

Dans le but de caractériser les biotypes des isolats PVY testés précédemment en ELISA et identifiés comme du sérotype (O) et ou du sérotype (N), nous avons réalisé deux essais de transmission mécanique séparés dans le temps utilisant l'un une gamme restreinte d'hôtes du virus et l'autre utilise seulement le tabac comme plante indicatrice comme suit:

#### **– Inoculation mécanique du PVY sur une gamme d'hôtes indicatrices**

Dans cet essai préliminaire de transmission mécanique, nous avons utilisé comme source d'inoculum seulement deux isolats PVY, le PVY<sup>O</sup>-Br représentant le sérotype O et le PVY<sup>N</sup>-AD du sérotype N et provenant respectivement de la région de Bouira et de la région d'Ain Defla. Ils ont été inoculés sur une gamme d'hôtes constituée principalement de solanacées cultivées et sauvages: *Nicotiana tabacum* var. xanthi, *Solanum tuberosum* var. Spunta et Désirée ; *Capsicum olean-der*, *Lycopersicum esculentum* var. marmande, *Datura stramonium* .L et *Chénopodium* sp. Les plants inoculés ont été maintenus au niveau de la serre de l'ENSA sous la lumière du jour et une température variant entre 23 et 28°C jusqu'à l'apparition des symptômes. Des plantules de la même gamme de plantes hôtes non inoculées ont également été utilisées comme témoins négatifs.

#### **– Inoculation mécanique de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi.**

L'utilisation des plants de tabac comme plante indicatrice lors de l'indexage biologique permet, à elle seule, la distinction des différents groupes de souches connues pour le virus Y de la pomme de terre, comme indiqué dans la majorité des travaux (Kerlan, 2008). Pour cela, lors de ce deuxième essai, nous avons inoculé séparément une sélection de 38 isolats PVY provenant des cinq régions prospectées sur une série de plantules de tabac âgées de 4 feuilles, au stade sensible à l'infection.

Les isolats utilisés appartiennent en majorité au sérotype YN (soit 35) et trois (3) isolats seulement sont du sérotype YO. Chaque isolat a été inoculé sur cinq plantules de tabac, soit un total de 190 plantules de tabac inoculées avec l'ensemble des isolats. Les plantules ainsi inoculées ont été placées séparément dans une chambre de culture où la température était fixée à 22°C, à l'abri des insectes avec 16 h de lumière et 8 heures d'obscurité. Ces conditions favorisent une forte multiplication du virus avec l'extériorisation rapide des symptômes (Astier *et al.*, 2001). Après une durée de 20 jours, les symptômes apparus ont été notés et les plants inoculés ont été soumis à l'analyse par le test ELI-

SA utilisant les sérums anti-PVY pour vérifier si l'infection a lieu. La notation des symptômes foliaires sur le tabac et sur la gamme d'hôtes inoculés sont effectuées trois semaines de l'inoculation des plants et ce en considérant les paramètres suivants :

- Les modifications morphologiques induites par le PVY<sup>N</sup> et ou par le PVY<sup>O</sup>.
- Les symptômes de lésions nécrotiques sur les feuilles inoculées de deux variétés de pomme de terre utilisées (Spunta et Désirée), et sur les plantules de poivron, de tomate et du plant de chénopode.
- Les symptômes de nécrose internervaire et ou de mosaïque (légère ou sévère) sur les feuilles inoculées de tabac, variété Xanthi pour distinguer la souche nécrotique PVY<sup>N</sup> de la souche commune PVY<sup>O</sup>

Les plantules de tabac inoculées séparément avec chacun des 38 isolats du PVY ainsi que les plantules témoins non infectées ont été conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les tests moléculaires.

### III.2.1.3. Caractérisation moléculaire par RT-PCR

Le repérage des sérotypes PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> a été fait en fonction des symptômes induits sur les plantules de tabac et de pomme de terre, suite à l'inoculation mécanique combinée aux réponses sérologiques au moyen des deux anticorps monoclonaux discriminant les souches N et O.

Cependant, ces deux tests ne permettent pas la détection des variants recombinants du type PVY<sup>NTN</sup> ou PVY<sup>NW</sup>, d'où le recours à l'outil moléculaire qui est très utilisé pour une détection plus précise du rang de variants résultant d'une recombinaison génétique du virus parental PVY.

Parmi, les différentes techniques moléculaires, nous avons appliqué la RT-PCR selon la méthode décrite par Glais *et al.* (2000) et par Boukhris-Bouhachem., *et al.* (2010) pour identifier le type de souche ou variants, présent dans la collection de 31/38 isolats sélectionnés au cours de ce travail. Notons que les 8 autres isolats ont été retirés de la collection puisqu'ils n'ont pas donné de réponses positives après le test ELISA traduisant que l'infection n'a pas eu lieu.

Le test moléculaire par RT-PCR est principalement réalisé en trois étapes fondamentales.

#### ▪ Extraction de l'ARN

Les 31 isolats PVY utilisés pour cette étude ont été d'abord caractérisés sur le plan sérologique et biologique puis conservés à -80 °C sous forme de disques foliaires de tabac de 100 mg dans des tubes eppendorff hermétiquement fermés.

L'extraction de l'ARNs total (plante hôte et virus) a été réalisée avec un disque filaire de 100 mg de chaque isolat utilisant le "Plant mini Kit Qiagen RNeasy" en suivant les étapes et recommandations du fournisseur (Annexe 10). L'ARNs a également été extrait à partir d'un disque foliaire de tabac confirmé indemne de virus par l'examen sérologique.

#### ▪ Réaction de polymérisation en chaîne en transcription reverse (RT-PCR)

Plusieurs protocoles de PCR ont été développés pour le typage moléculaire des différents isolats PVY, d'origine géographique différente. Au cours de ce travail, les ARNs correspondant aux 31 isolats, ont été amplifiés et analysés avec les 4 paires d'amorces (Tableau 7) décrites par Glais *et al.* (1996, 1998, 2000, 2002).

**Tableau 7** Description des amorces utilisées pour le typage moléculaire des isolats PVY

| Primer   |  | Sequence 5'-3' |                                 | Genomic location <sup>a</sup> | Expected PCR product (bp) | Reference   |
|----------|--|----------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---|
| Used for | Acronym  | Polarity       |                                 |                               |                           |   |
| RT       | Oligo-(dT) <sub>20</sub>                             | Antisense      | TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT            | /                             |                           |   |
| PCR      | FR <sub>2000</sub> /F <sub>2</sub> d                 | Sense          | TCAAACCTCTCGTAAATTGCAGA         | 159-180                       | 815                       | Glais <i>et al.</i> 2001, Boukhris-Bouhachem <i>et al.</i> 2010 |
|          |  | Antisense      | TG(CT)GA(CTA)CCACGCACTATGAA     | 955-974                       |                           |   |
|          | 1227/46 Y <sup>N</sup> F<br>2547/68 Y <sup>O</sup> R | Sense          | CTTGCCAGCCAGTGACTTAC            | 1227-1246                     | 1341                      | Glais <i>et al.</i> 2001, Boukhris-Bouhachem <i>et al.</i> 2010 |
|          |  | Antisense      | CAACA(GA)GTAAGGCT CATCTAAC      | 2547-2568                     |                           |   |
|          | 5606/27 Y <sup>O</sup> F<br>6343/67 Y <sup>N</sup> R | Sense          | TGGAA(GC)AA(AG)TCATTAGTGGC(CT)A | 5606-5627                     | 761                       | Glais <i>et al.</i> 2001, Boukhris-Bouhachem <i>et al.</i> 2010 |
|          |  | Antisense      | TCCATATTCA(AG) CAGACACTTTTACT   | 6343-6367                     |                           |   |
|          | 9132/51 Y <sup>N</sup> F<br>9481/00 Y <sup>O</sup> R | Sense          | TCGTAATCTGCGCGATGGAA            | 9132-9151                     | 368                       | Glais <i>et al.</i> 2001, Boukhris-Bouhachem <i>et al.</i> 2010 |
|          |  | Antisense      | CCCTGCCACCTCTATCTATT            | 9481-9500                     |                           |   |

La détection spécifique des souches recombinantes et des souches non recombinantes du PVY a été effectuée d'abord avec la paire d'amorce F<sub>r2000</sub>/F<sub>2-d</sub>, qui cible le polymorphisme des séquences nucléotidiques observés au niveau de la région terminale 5'NTR/P1 (Glais *et al.*, 1996).

La détection spécifique des isolats recombinants PVY<sup>NTN</sup> a été conduite avec trois autres paires d'amorces qui reconnaissent trois régions de recombinaison comme suit :

- l'amorce (1227/46 Y<sup>N</sup>F/2547/68 Y<sup>O</sup>R) pour la région HC-Pro/P3
- l'amorce (5606 Y<sup>O</sup>F/6343/67 Y<sup>N</sup>R) pour la région CI/Nia
- l'amorce (9132/51 Y<sup>N</sup>F/9481/00 Y<sup>O</sup>R) pour la région CP/3'NTR.

Les amorces 1227/46 Y<sup>N</sup>F, 6343/67 Y<sup>N</sup>R et 9132/51 Y<sup>N</sup>F servent à amplifier la séquence nucléotidique

du groupe PVY<sup>N</sup>, alors que les amorces <sub>2547/68</sub> Y<sup>O</sup>R, <sub>5606/27</sub> Y<sup>O</sup>F et <sub>9481/100</sub> Y<sup>O</sup>R servent à amplifier la séquence nucléotidique du groupe PVY<sup>O</sup>.

Les séquences d'amorces ont été déduites par comparaison des séquences nucléotidiques de trois isolats PVY de références : PVY<sup>NTN</sup>-H (numéro d'accès : M95491) (Thole *et al.* 1993), PVY<sup>N</sup>-605 (numéro d'accès : X97895) (Jakab *et al.* 1997) et PVY<sup>O</sup>-139 (numéro d'accès : UO9509) (Sing & Sing, 1996).

#### ▪ Transcription reverse (RT)

Elle a été réalisée dans un volume final de 20µl de tampon utilisant le "First Strand cDNA synthesis Kit" (Geneon, GMBH Germany). L'amorce "oligo-dT15-25" commune à tous les isolats du PVY, va se fixer à l'extrémité 3' du gène codant la protéine P1. Cet ADNc correspondant aux 1000 premiers nucléotides du génome PVY servira de matrice pour l'analyse de la région 5'NTR/P1. La composition du milieu réactionnel de la transcription réverse ou MIX RT est donnée en Annexe 10. La mixture de la RT est placée dans la plaque de microtitration puis mise à incuber dans une étuve à 42° C pendant 10 min, suivie d'une seconde incubation à 50° C pendant 60 min selon le protocole proposé par (Lorensen *et al.*, 2006). L'ADN complémentaire produit pour chaque isolat a été ensuite amplifié par PCR suivant les étapes suivantes:

#### - Amplification (PCR)

Les amplifications des ADNc par PCR ont été effectuées avec les amorces conçues pour le typage moléculaire des différents isolats PVY chez la pomme de terre. Elles sont réalisées dans un volume final de 12,5 µl contenant 1U GoTaq Hot Start polymérase et 0,5 µl du tampon 1X (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) contenant 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs pour chacune des amorces et de l'ADN complémentaire de chaque isolat. Les amplifications ont été conduites pour 30 cycles dans un Thermocycler (Biorad, USA) et chaque cycle comprend une étape de dénaturation initiale de 5 min à 95 °C, 30 s de dénaturation à 95 °C, 1 min d'hybridation (ADN/amorces) à 57°C min et une phase d'élongation terminale de 10 min à 72 °C. La révélation est réalisée en considérant un volume de 10 µl des produits PCR soumis à une électrophorèse sur un gel d'agarose de 1,5%. Après migration, le gel est coloré au bromure d'ethidium puis photographié avec un transilluminator pour la visualisation des bandes électrophorétiques obtenues.

L'appartenance des isolats PVY au groupe des recombinants PVY<sup>NTN</sup> est révélée par amplification avec les trois paires d'amorces qui ciblent respectivement les trois sites de recombinaisons RJ2 , RJ3 et RJ4 comme suit : la région HC-Pro/P3 par l'amorce (1227/46 YNF/2547/68yYoR), la région

CI/NiA avec l'amorce (5606YoF/6343/67YNR) et la région CP/3'NTR avec l'amorce (9132/51YNF/9481/00YOR), selon le protocole proposé par Glais *et al.* (2001) et Glais *et al.* (2002). Les produits PCR révélés au niveau des gels sont ensuite séquencés avec les mêmes paires d'amorces.

### **- Séquençage partiel des isolats PVY**

En fonction de la disponibilité des moyens nécessaires pour compléter la caractérisation moléculaire des 31 isolats PVY, par l'analyse de certaines de leurs séquences, nous nous sommes limités à une dizaine d'isolats PVY sélectionnés en fonction de leur région d'origine et de leurs propriétés biologiques, sérologiques et moléculaires identifiées. Les amplifiats ou produits PCR obtenus pour chacun des isolats retenus pour le séquençage, ont été traités avec 1 µl aliquote d'exonucléase III et 1 µl EXOSAP puis ajoutés à chaque réaction PCR. Après homogénéisation, ils ont été incubés à 37° C pendant 45 mn. Les séquences nucléotidiques des dix isolats PVY, ont été obtenus après amplification de trois régions de recombinaison RJ2, RJ3 et RJ4 pour les deux formes Forward et Reverse des amorces utilisées lors de l'amplification.

Les données résultant du séquençage des différents isolats ont été traitées avec le logiciel de type Sanger (Ngs, illumina), qui est basé sur la comparaison linéaire des séquences obtenues pour les isolats PVY étudiés avec celles des souches de références disponibles dans la base de données "GenBank". Les séquences obtenues sont alors déposées dans cette banque désignées de leurs numéros d'accès.

L'alignement des 10 séquences nucléotidiques a été fait en utilisant les programmes Bio Edit associé au "ClustalW" et le "Sequence Identity Matrix". La détermination de leur identité est réalisée en comparaison de 31 PVY isolats enregistrés dans la banque de gènes dont la majorité est originaire de Syrie, d'Arabie Saoudite et d'Egypte (Tableau 8).

L'analyse phylogénétique est basée sur la méthode du "Neighbor- Joining" du "MEGA program" version 7.0 (Kumar *et al.*, 2016). Les supports relatifs des groupes obtenus par "Neighbor- Joining" sont estimés par l'utilisation de 1000 répliquions de la procédure "bootstrap" pour visualiser la relation entre nos isolats PVY et ceux décrits précédemment par d'autres auteurs ailleurs dans le monde.

**Tableau 8** Liste des 31 séquences du génome complet du PVY obtenus dans la base des données de Gen-Bank pour l'analyse moléculaire des isolats PVY d'origine Algérienne.

| Isolate name | Accession number | Origin       | PVY strain group | Genotype     |
|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| Alt          | AY884985         | USA          | Wi               | N:O          |
| AST          | JF928460         | Brazil       | NTN              | NTNa         |
| Egypt7       | KY863549         | Egypt        | NTN              | NTN-NW       |
| Egypt11      | KY863548         | Egypt        | Wi               | N:O          |
| Egypt24      | KY863550         | Egypt        | Wi               | N:O          |
| Egypt35      | KY863551         | Egypt        | NTN              | NTNa         |
| Gr99         | AJ890343         | Poland       | NTN              | NTNb         |
| H            | M95491           | Hungary      | NTN              | NTNa         |
| HN2          | GQ200836         | USA          | NTN              | NTN-NW       |
| Iso5         | AJ890350         | Germany      | Wi               | N-Wi         |
| Lw           | AJ890349         | Poland       | Wi               | N-Wi         |
| L26          | FJ204165         | USA          | Z                | NTNa         |
| MON          | JF928458         | Brazil       | E                | NTNa         |
| M3           | KF850513         | Mexico       | Z                | NTNa         |
| N-Jg         | AY166867         | Canada       | N                | N-NA         |
| NE-11        | DQ157180         | USA          | NTN              | N-NA-unknown |
| NZ           | AM268435         | New Zealand  | NTN              | N            |
| N605         | X97895           | Switzerland  | N                | N            |
| Or-1         | DQ157179         | USA          | Wi               | N:O          |
| O-139        | U09509           | Canada       | O                | O5           |
| PVY-12       | AB185833         | Syria        | E                | NTNb         |
| SASA-110     | AJ585195         | UK           | O                | O5           |
| SCRI-O       | AJ585196         | UK           | O                | O            |
| SYR-NB-16    | AB270705         | Syria        | NTN              | NTN-NW       |
| SYR-II       | AB461451         | Syria        | NTN              | NTN-NW       |
| SYR-III      | AB461454         | Syria        | NTN              | NTN-NW       |
| S2           | KP793715         | Saudi Arabia | NTN              | NTN-NW       |
| S9           | KP793716         | Saudi Arabia | NTN              | N-NA-unknown |
| Tu660        | AY166866         | Canada       | NTN              | N-NA         |
| 1104         | KC296436         | China        | NTN              | N-NA-unknown |
| 12-94        | AJ889866         | Poland       | NTN              | NTNb         |

### III.3. RESULTATS

#### III.3.1. Caractérisation sérologique des différents isolats du PVY

L'identification des deux sérotypes PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> a été effectuée sur 185 isolats PVY issus de la collection des échantillons provenant des différentes régions prospectées. Ces isolats ont été soumis à l'examen par le test DAS-ELISA et aux moyens des anticorps spécifiques de Bioreba (Mab-anti PVY<sup>N</sup> et Mab-anti PVY<sup>O</sup>) dirigés contre les deux grands groupes de souches PVY<sup>N</sup> (Nécrotique) et PVY<sup>O/C</sup> (Ordinaire /Commune).

Les réponses obtenues par ce test ont révélé, 96,7 % des isolats appartenait au sérotype N et seulement 3,2% étaient du sérotype O du total d'échantillons testés (Tableau.9, Fig. 27). Cette dominance du groupe N a été retrouvée dans toutes les régions prospectées avec des taux variant de 82,3 % à 100% et ce quel que soit la variété de pomme de terre des isolats testés. Par contre le sérotype O s'est avéré moins présent avec des valeurs variant entre 0% à 17,6% ; dans les régions d'Alger, Ain Defla et Bouira. La présence du sérotype O n'a été révélé seulement la variété Spunta, qui est la plus ancienne des autres variétés et qui est largement cultivée en Algérie.

**Tableau 9** Diversité du sérotypes des Isolats PVY algériens par région et l'origine de l'hôte.

| Origine des échantillons |                | Taux d'infection par les Sérotypes |                     |
|--------------------------|----------------|------------------------------------|---------------------|
| Région                   | Variété        | N                                  | O                   |
| Alger                    | Spunta         | (14/17) <sup>a</sup>               | (3/17) <sup>a</sup> |
|                          | Fabula         | (20/20)                            | (0/20)              |
| Ain Defla                | Spunta         | (24/25)                            | (1/25)              |
| Bouira                   | Spunta         | (11/13)                            | (2/13)              |
|                          | Ultra          | (27/27)                            | (0/27)              |
| Boumerdes                | Fabula         | (32/32)                            | (0/32)              |
|                          | Spunta         | (25/25)                            | (0/25)              |
| Tipaza                   | Désirée        | (32/32)                            | (0/22)              |
|                          | Condor         | (4/4)                              | (0/4)               |
| TOTAL                    | 96,7 (179/185) | 3,2 (6/185)                        |                     |

<sup>a</sup> Nombre d'isolats ayant réagi positivement avec les sera monoclonaux/ nombre total d'isolats ayant répondu positivement avec le sérum polyclonal anti-PVY

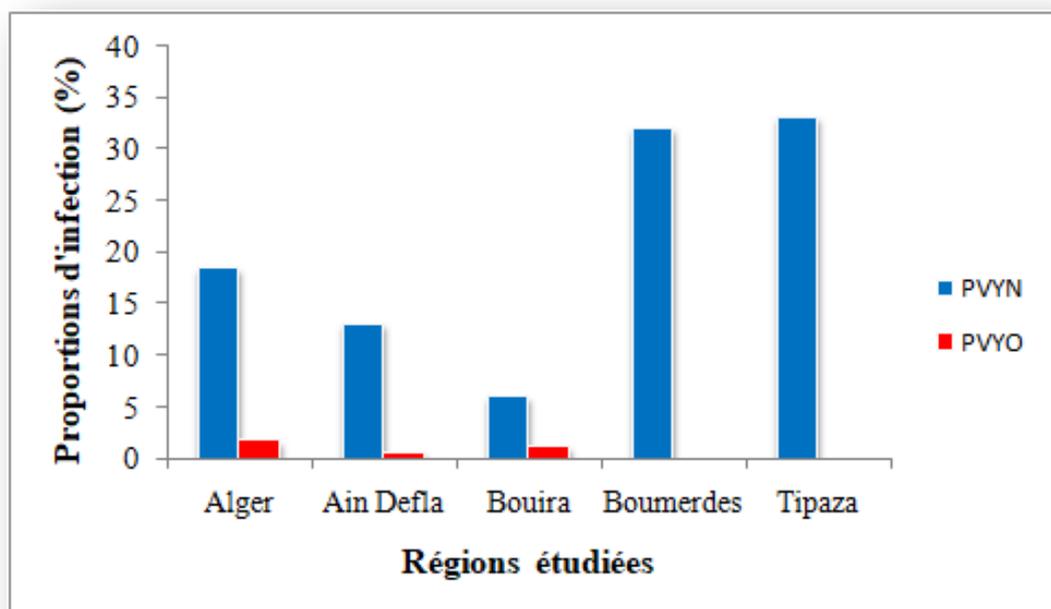


Figure 27 Diversité des souches du PVY chez la pomme de terre en fonction des régions

## II.3.2. Caractérisation biologique des isolats PVY

### III.3.2.1. Indexage biologique préliminaire du PVY sur une gamme de plantes hôtes

L'indexage préliminaire de la gamme d'hôtes par les isolats PVY<sup>N</sup>-Ad (d'Ain Defla) et PVY<sup>O</sup>-Br (de Bouira), a clairement montré la variabilité biologique du virus Y à travers les symptômes induits sur les plants hôtes et ce au bout de la troisième semaine qui suit l'inoculation par les deux isolats utilisés (Figs. 28A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L). Les processus de l'infection et de la multiplication du PVY ont été également confirmés par les réponses positives obtenues par ces plantes hôtes testées en ELISA en présence des sera spécifiques aux deux sérotypes auxquels appartiennent les deux isolats.

La figure 27, illustrant les symptômes induits chez la gamme d'hôtes étudiée, montre que l'isolat PVY<sup>N</sup>-Ad a provoqué un jaunissement avec des taches nécrotiques généralisées sur pomme de terre en (C) et un éclaircissement internervaire évoluant en une nécrose sur tabac en (L). En revanche, l'isolat PVY<sup>O</sup>-Ada causé un jaunissement avec des nécroses localisées sur les feuilles de pomme de terre (A, B) et une mosaïque légère et ou chlorose avec déformation foliaire sur les feuilles de tabac (J, K). Toutefois, l'inoculation séparée par les deux isolats du sérotype N et O ont induit les deux des



**Figure 28** Symptômes induits par PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup> chez différentes plantes hôtes. **A., B., C.**, Jaunissement, nécrose foliaire sur *Solanum tuberosum*. **D.** Jaunissement et nécrose sur *Lycopersicon esculentum*. **E., F.** Lésions nécrotiques localisées sur *Capsicum oleander*. **G.** Lésions nécrotiques localisées sur *Datura stramonium*. **H., I.** Lésions chlorotiques localisées sur *Chenopodium album*. **J.** Mosaïque légère. **K., L.** Eclaircissement et nécrose internervaire sur *Nicotiana tabacum*.

taches localisées nécrotiques sur le poivron et la stramoine (E, F, G) et des Lésions localisées chlorotiques sur le chénopode (H, I) et une chlorose déformante sur la tomate.

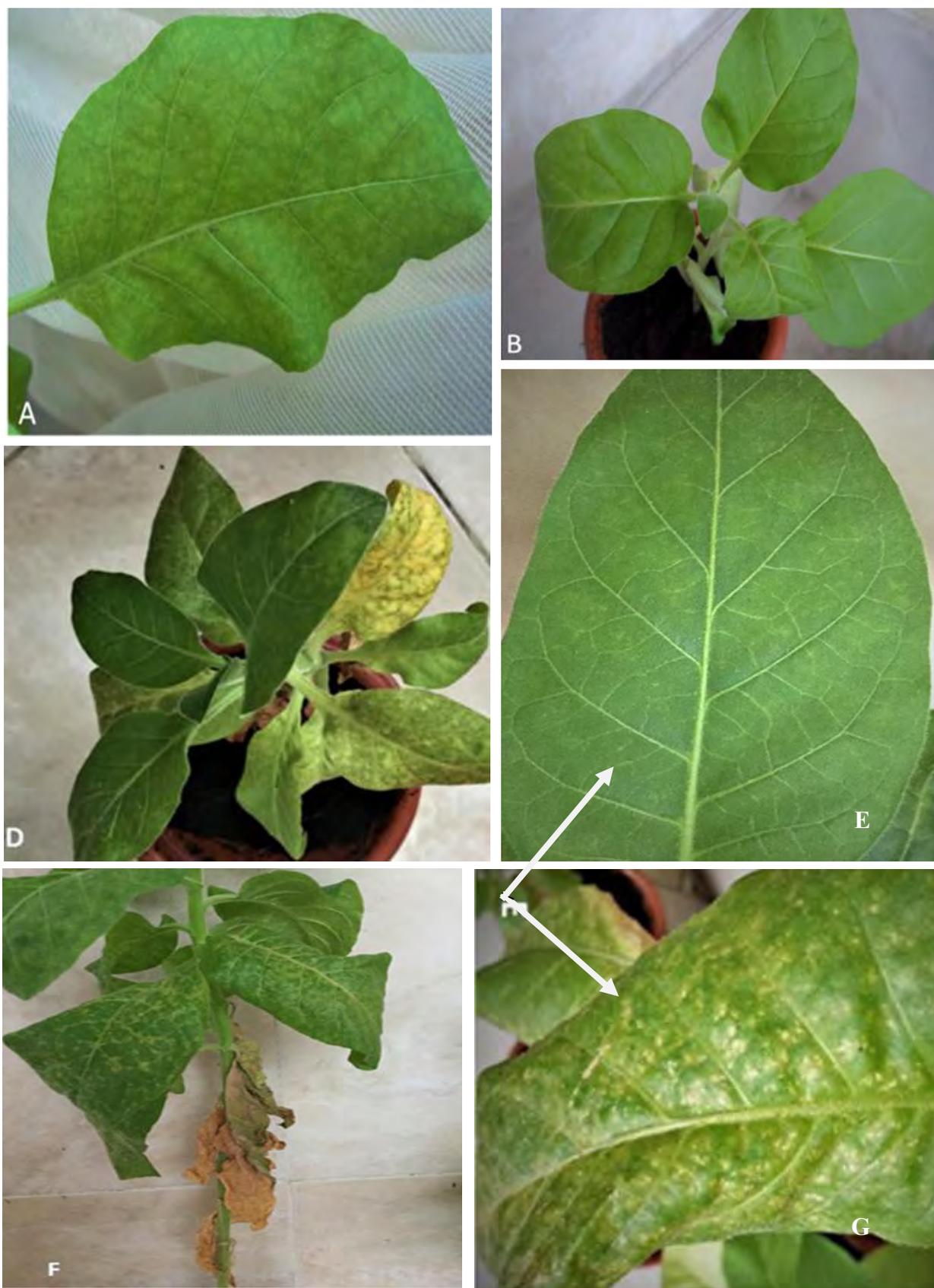
L'ensemble de ces observations permettent de conclure que les symptômes les plus discriminants entre les deux sérotypes O et N, ont été obtenus avec le tabac et la pomme de terre. Ce résultat intéressant obtenu dans nos conditions expérimentales, a été reconduit avec une collection plus grande représentée par 31 isolats, dont les sérotypes initialement identifiés soit 28 PVY<sup>N</sup> et 3 PVY<sup>O</sup>).

### **III.3.2.2. Bio typage des différents isolats PVY de pomme de terre sur la variété Xanthi du tabac.**

Suite au test d'indexage préliminaire effectué sur une gamme restreinte de plantes hôtes du PVY, la variabilité symptomatologique observée avec les deux isolats PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup> nous a conduit à rechercher le biotype d'une collection diversifiée d'isolats PVY provenant des cinq régions étudiées et de différentes variétés de pomme de terre représenté par 38 isolats PVY, dont 35 d'entre eux du sérotype N et 3 seulement du sérotype O. Pour cet essai, nous avons retenu, le tabac Var. Xanthi comme plante indicatrice de choix pour la distinction entre les souches du PVY. Pour chaque isolat nous avons inoculé cinq plantules de tabac, d'où le nombre total des tabacs inoculés est de 190 plantules.

Au bout de deux semaines qui suivent l'inoculation, nous avons noté que parmi les 35 isolats du sérotype N, sept (7) d'entre eux n'ont causé aucun symptôme visible. Afin de contrôler si l'infection a eu lieu même en absence de symptômes, ces isolats soumis à l'analyse sérologique par ELISA ont aussi réagi négativement en présence du sérum anti-PVY. Cela, signifie, que l'inoculation mécanique n'a pas réussi pour ses 7 isolats ayant peut être perdu leur pouvoir infectieux lors de l'extraction, d'où, ils ont été retirés de la collection pour la suite de ce travail. Cependant, les 28 isolats du Sérotype N, ont induit un éclaircissement internervaire ou "vein clearing" qui évolue une semaine plus tard en une nécrose internervaire ou "vein necrosis" accompagnée parfois d'une déformation des feuilles des tabacs inoculés (Fig.29).

Par ailleurs, l'isolat AIdfdz provenant de la région d'Ain Defla et appartenant au sérotype O, a provoqué un jaunissement et une mosaïque légère sur les feuilles de tabac. Alors que les deux autres isolats (Aeh5dz et Bra3dz) du même sérotype, ont induit les deux une nécrose internervaire avec une déformation des feuilles comparables aux isolats du sérotype N. Ce résultat intéressant, laisse penser que ses deux derniers isolats du sérotype O et manifestant anormalement un biotype N, appartiennent



**Figure 29** Symptômes distinctifs entre les souches PVY<sup>O</sup> et PVY<sup>N</sup> sur *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. A., B. Mosaïque légère., E., F., Nécrose internervaire (flèches).

à un groupe de souche à part qui n'a pas été identifié par voie sérologique. Ceci, nous a conduit à l'utilisation de l'outil moléculaire pour permettre une meilleure caractérisation des isolats étudiés.

### III.3.3. Caractérisation moléculaire des isolats PVY

A l'issue des études sérologiques et biologiques des 31 isolats de PVY, dont 28 d'entre eux ont été classés dans le sérotype N et 3 autres dans le sérotype O, nous avons poursuivi ce travail avec une analyse moléculaire par RT-PCR. La méthode adoptée dans notre cas est basée essentiellement sur l'amplification spécifique de la région génomique 5'NTR-P1 en plus de trois régions de recombinaison RJ2, RJ3 et RJ4 qui correspondent aux régions respectives HC-Pro/P3, VPg/Nia et CP au niveau du génome PVY.

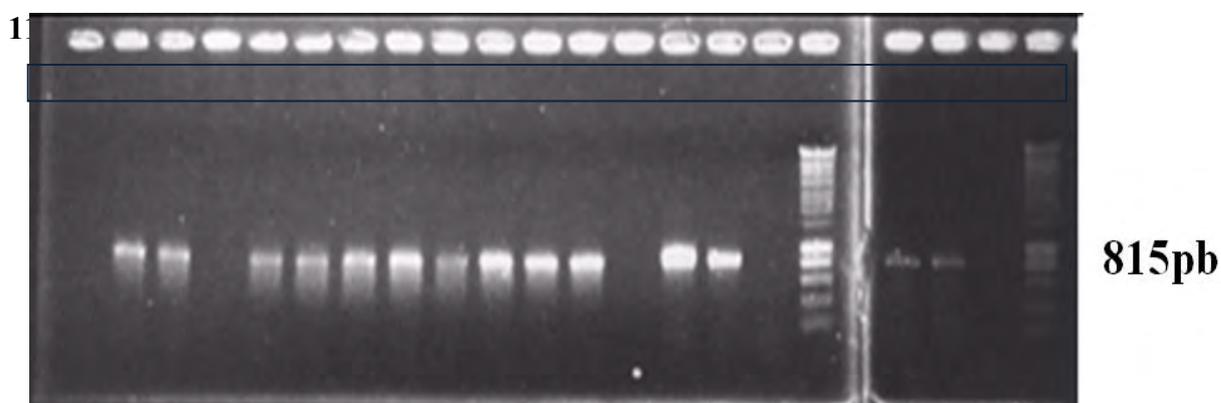
La région 5'NTR-P1 est commune aux souches PVYE, PVYNTN et PVYZ, responsables de la nécrose annulaire des tubercules ou PTNRD, d'où l'importance d'examiner cette région face à l'émergence de ses souches dans le monde.

Les résultats de cette analyse sont représentés par les profils électrophorétiques obtenus pour les régions RJ1, RJ2, RJ3 et RJ4 et montrés par les figures respectives 30, 31, 32 et 33. La lecture de ces profils permet d'identifier le type de souche de chaque isolat analysé en fonction de la présence de bandes spécifiques correspondantes aux régions génomiques étudiées. Les noms de souches identifiés pour chaque isolat sont ainsi reportés au niveau du tableau 10 et viennent donc compléter les résultats obtenus avec les études biologiques et sérologiques menées précédemment sur ces mêmes isolats. Il en ressort que, 28/31 isolats du sérotype N, ont révélé le produit d'amplification commun de la taille attendue de 815pb et ce en présence de la paire d'amorce FR2000/F2-d ciblant une séquence nucléotidique dans le polymorphisme de la région 5'NTR/P1 au niveau du génome PVY (Fig.30). Toutefois, aucun produit n'a été obtenu avec les trois isolats restant du sérotype O (Aeh5dz, AIdf51dz et Bra33dz) confrontés avec cette même paire d'amorce.

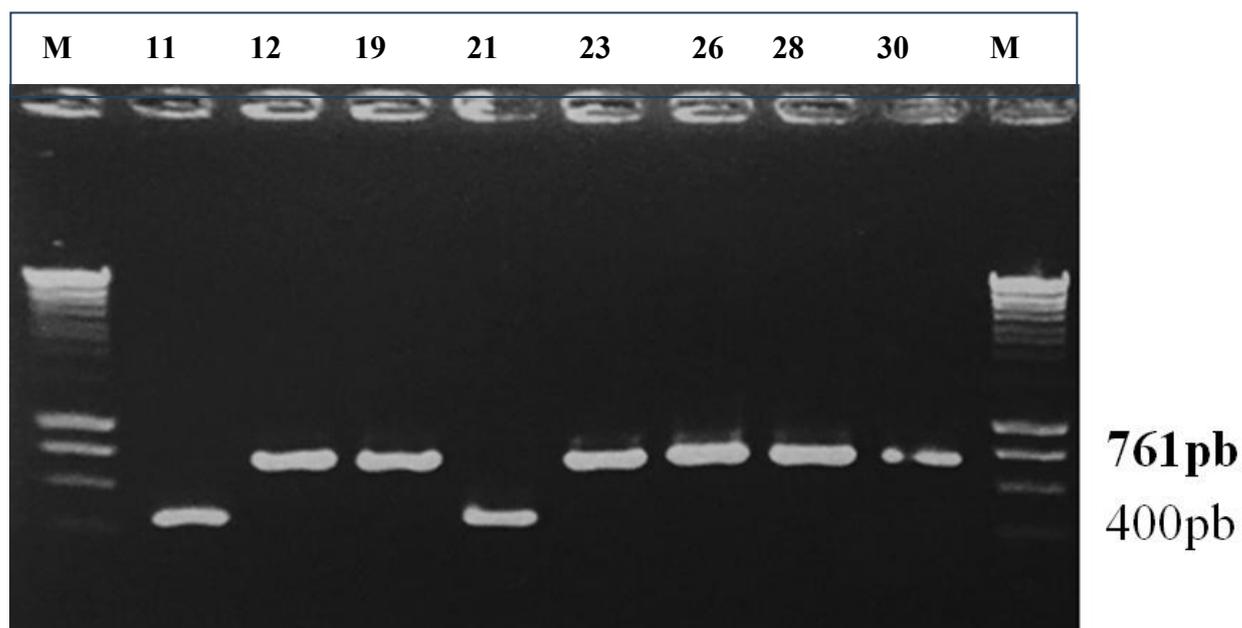
La présence des trois régions recombinantes RJ2, RJ3 et RJ4 a également été révélé avec les 28 isolats du sérotype N, présentant les produits d'amplification respectifs de 1300 paires de bases, 700 paires de bases et 300 paires de bases qui correspondent aux tailles des bandes attendues en présence des paires d'amorces ciblant les régions de recombinaisons respectives HC-Pro/P3, VPg/Nia et CP (Fig. 31, 32, et 33).

Concernant les trois isolats du sérotype O, seuls les isolats Bra33dz et Aeh5dz qui ont révélé la présence d'un fragment PCR d'environ 1300 paires de bases et ce en présence de l'amorce ciblant la région de recombinaison RJ2 ou HC-Pro/P3. Toutefois l'amplification n'a généré aucun produit PCR

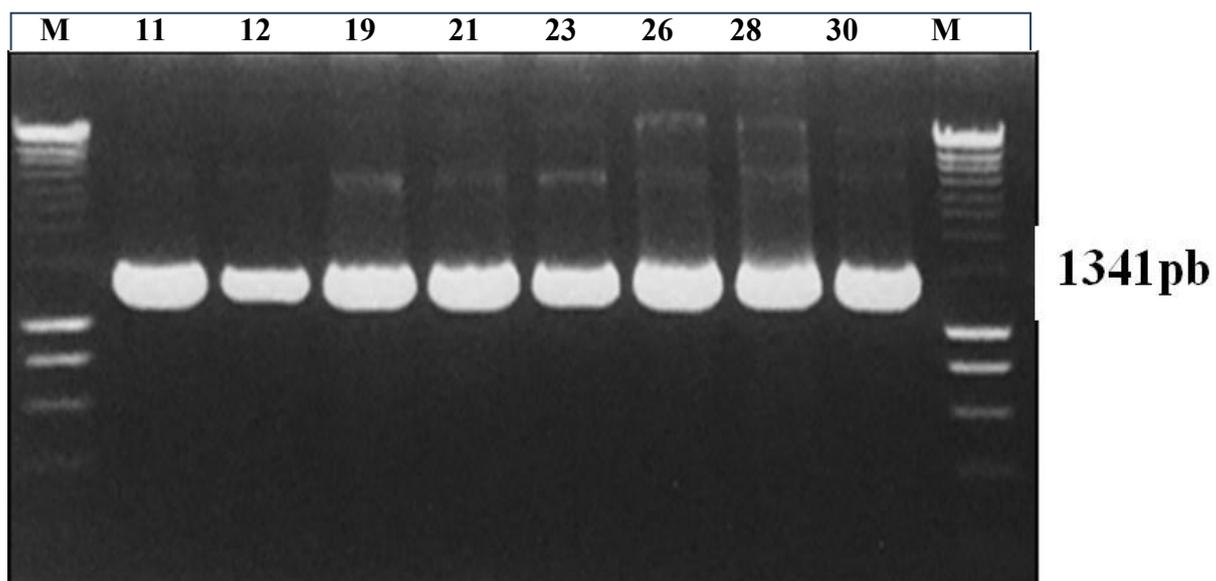
correspondant aux deux autres régions recombinantes RJ3 et Rj4 (Fig. 32 et Fig. 33). Un produit PCR de taille non attendu (près de 400 paires de bases) a été aussi observé au niveau de la région d'amplification RJ3 avec ses deux isolats du sérotype O (ce qui correspond à un "misannealing" de l'amorce utilisée) comme est montré par la figure 31. *Contrario*, le troisième isolat



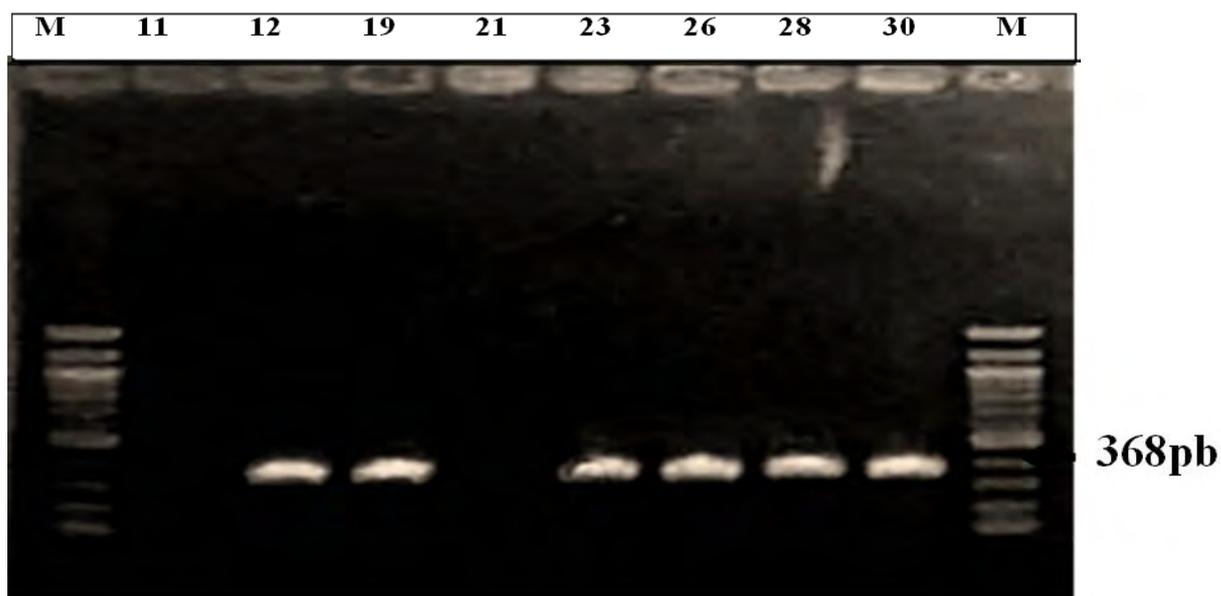
**Figure 30** Profil du gel d'électrophorèse des produits de RT-PCR amplifiés à la base du polymorphisme dans la région RJ1 (5'NTR/P1) du génome PVY. (1: Isolât Bra33dz, 21: Aeh5dz et 22: Aldf51dz, T: témoin négatif, M : Marqueur Smart Ladder (EuroGentec), les autres isolats correspondant aux numéros listés dans le tableau 12).



**Figure 31** Profil électrophorétique des produits PCR au niveau de la région génomique (RJ2) ou Hc-Pro/P3



**Figure 32** Profil électrophorétique des produits PCR au niveau de la région génomique (RJ3) ou VPg/Nia. Légende identique que le profil précédent de la figure 31.



**Figure 33** Profil électrophorétique des produits PCR au niveau de la région génomique (RJ4) ou CP. Légende identique que le profil précédent de la figure 31.

**Tableau 10** Récapitulatif des résultats de la caractérisation biologique, sérologique et moléculaire de 31 isolats PVY isolés sur pomme de terre en Algérie.

| Isolats |          |           |         | Serotype | Symptômes sur tabac | Type moléculaire |     |     |     | Nom de souche                  |
|---------|----------|-----------|---------|----------|---------------------|------------------|-----|-----|-----|--------------------------------|
| Nombre  | Acronyme | Région    | variété |          |                     | 5'NTR-PI         | RJ2 | RJ3 | RJ4 |                                |
| 1       | Adj16dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 2       | Adj26dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 3       | Adj27dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 4       | Adj49dz  |           | Fabula  | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 5       | Adj50dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 6       | Adj55dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 7       | Adj99dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 8       | Aeh1dz   |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 9       | Aeh2dz   | Alger     |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 10      | Aeh4dz   |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 11      | Aeh5dz   |           |         | O        | VN                  | -                | +   | -   | -   | PVY <sup>N-W1</sup>            |
| 12      | Aeh7dz   |           | Spurta  | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 13      | Aos16dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 14      | Aos29dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 15      | Aos34dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 16      | Aos51dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 17      | Aos90dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 18      | Aldf15dz |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 19      | Aldf18dz | Ain edefa | Spurta  | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 20      | Aldf19dz |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 21      | Aldf51dz |           |         | O        | Mo                  | -                | -   | -   | -   | PVY <sup>1</sup>               |
| 22      | Bra33dz  | Bouira    | Spurta  | O        | VN                  | -                | +   | -   | -   | PVY <sup>N-W1</sup>            |
| 23      | Bra34dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 24      | BMk59dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 25      | BMk60dz  | Boumerdes | Ultra   | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 26      | BMk88dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 27      | BMk89dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 28      | Tst15dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 29      | Tst17dz  | Tipaza    | Spurta  | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 30      | Tst19dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |
| 31      | Tst50dz  |           |         | N        | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>N1N</sup> |

(Aldf51dz) du sérotype O, n'a montré aucun produit d'amplification au niveau d'aucunes des régions recombinantes RJ1, RJ2, RJ3 et Rj4 du génome PVY (Tableau 11).

### **III.3 .1. Analyse de la séquence nucléotidique des trois régions de recombinaison.**

La séquence de nucléotides qui borde chacune des trois régions de recombinaison de la HC-Pro/P3 (RJ2), VPg/NIa (RJ3) et le CP (RJ4) a été séquencée pour 10 isolats de PVY sélectionnés (Tableau 12). Les séquences de ces trois régions n'ont pas été obtenues pour tous les isolats sélectionnés de la collection du départ et ce pour des raisons de disponibilité de puits utilisés même lorsqu'un produit de PCR de la taille attendue a été généré.

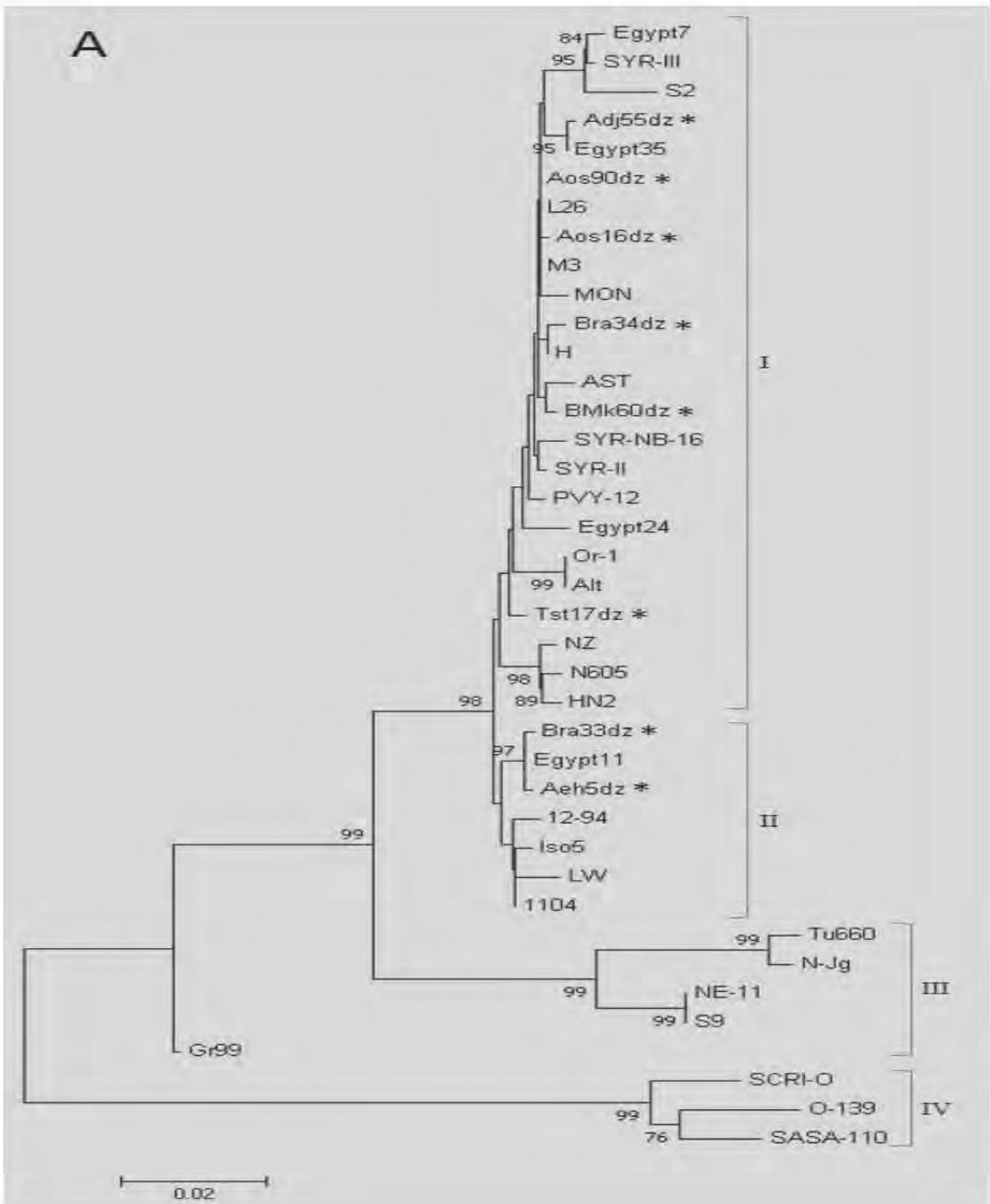
Plusieurs essais de séquençages ont été effectués et certains ont échoué et il était impossible de les reprendre en raison de l'épuisement total du matériel biologique. Aucune séquence de nucléotides n'a été obtenue pour les régions RJ3 et Rj4 par les isolats Aeh5dz et Bra33dz, car aucun produit PCR n'a été généré. Concernant la région RJ2, située entre les nucléotides 1624 à 2458, les séquences PVY disponibles dans GenBank, ont été divisées en quatre groupes en considérant les valeurs de bootstraps supérieures à 80 (Figs. 34A, B, C).

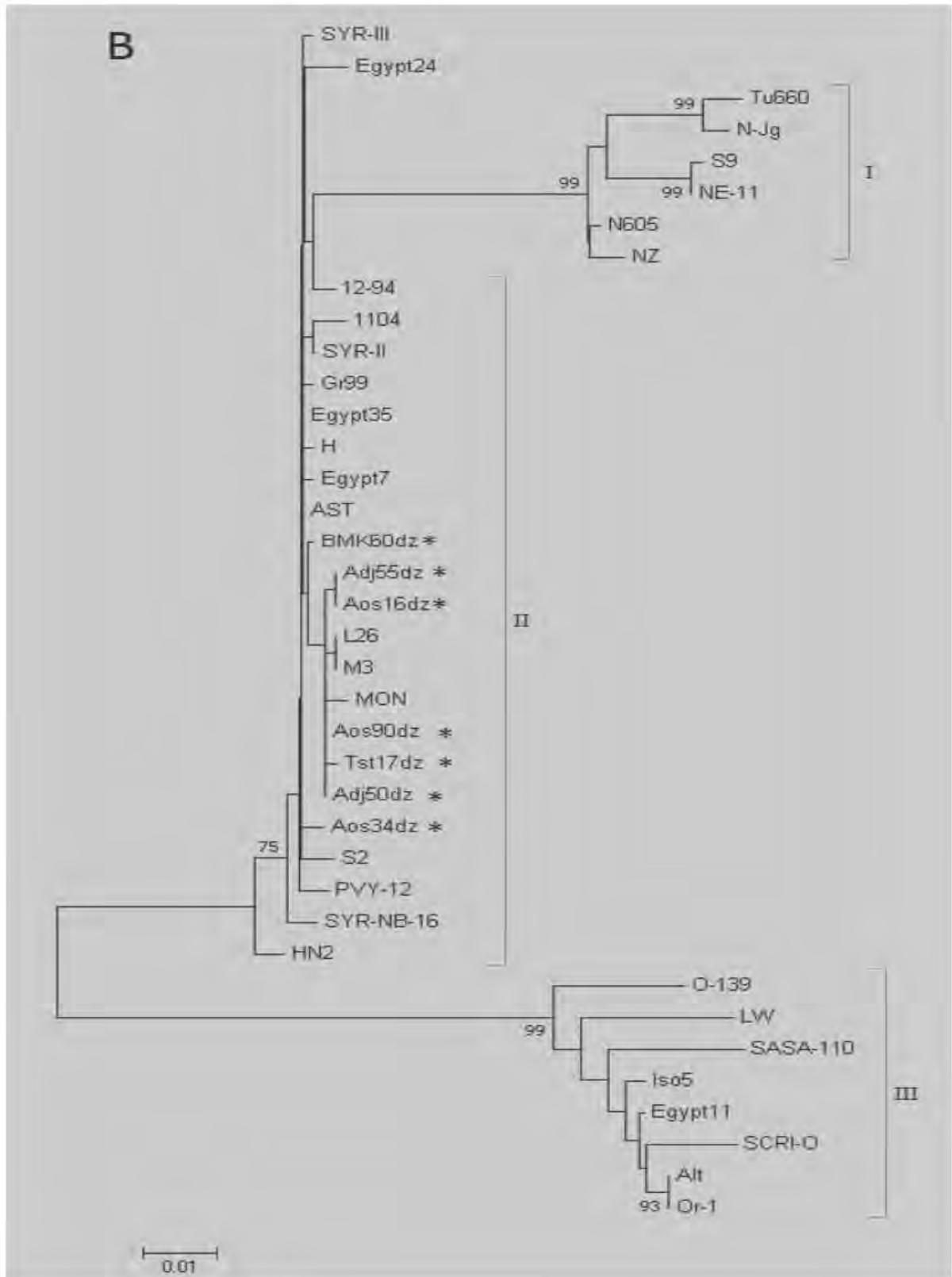
Le groupe I rassemble principalement des isolats de N, NTN (génotype NTN avec 3 régions recombinantes RJ2, RJ3 et RJ4, le génotype NTN-NW) et les deux groupes de souches Z et E; le groupe II correspond principalement aux isolats du groupe de la souche Wilga ; le groupe III, pour les isolats de la souche PVY<sup>NTN</sup> qui partage avec un groupe d'Amérique du Nord-N-génotype inconnu (Fig. 34A) et le groupe IV pour les isolats du groupe de souche O.

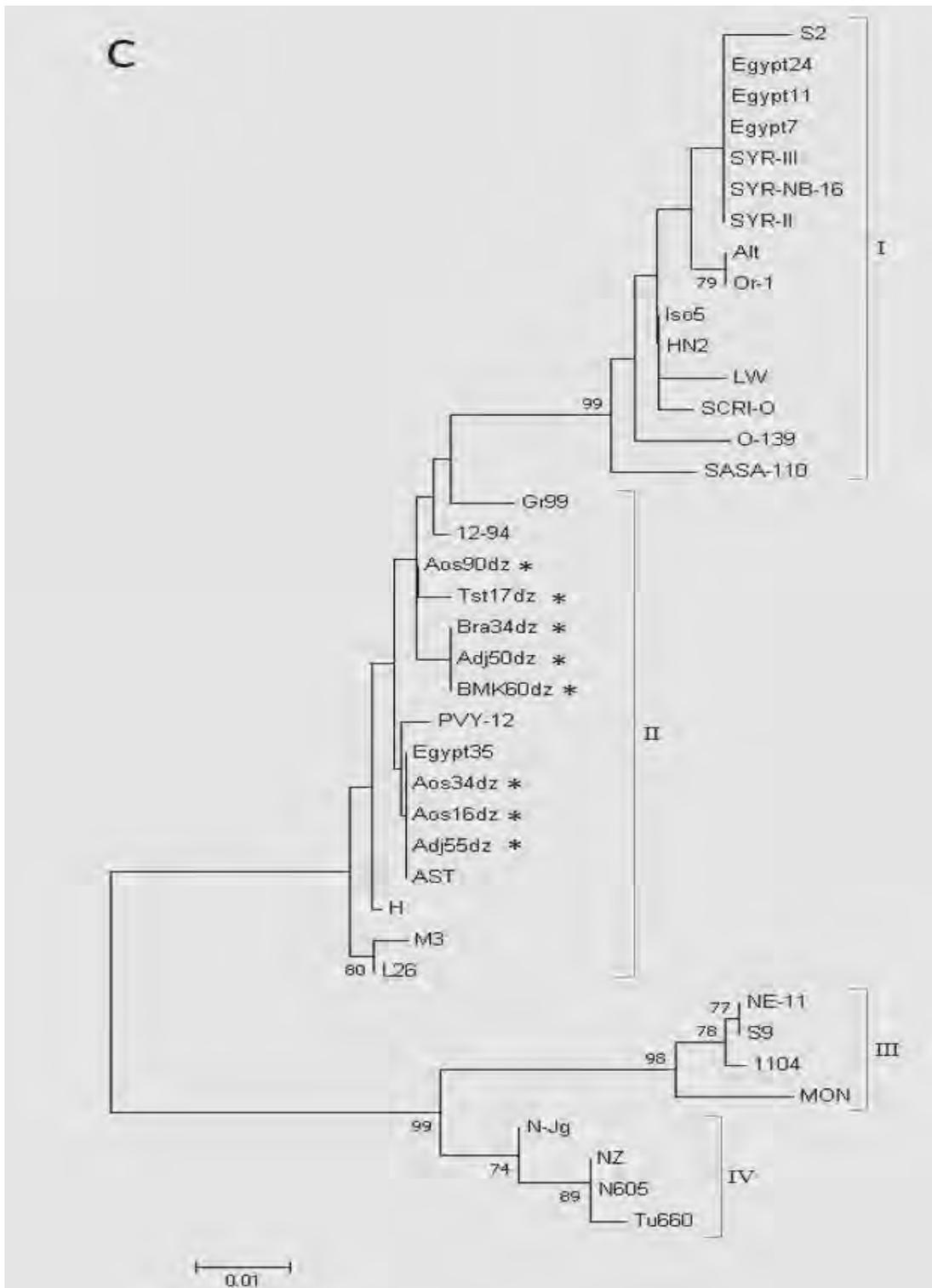
Les isolats PVY algériens sont répartis en deux clades, avec une majorité (Adj55dz, l'Am16dz, l'Am90dz, Bra34dz, BMK60dz, Tst17dz) présentant une identité partagée avec le plus haut pourcentage d'isolats du Groupe I (98,8 %), et les deux autres isolats (Bra33dz, Aeh5DZ) partagent l'identité nucléotidique moyenne la plus élevée de (98%) avec les isolats du groupe II.

Pour la région RJ3, correspondant aux nucléotides de 5626 à 6303, les séquences PVY de référence ont été classées en trois groupes (Fig. 34B).

Le premier groupe correspond aux isolats des souches NTN et N qui partagent les génotypes N inconnus d'Amérique du Nord. Le second groupe représente les isolats du groupe de souche NTN (génotype NTN avec 3 connecteurs RJ et NTN-NW génotype) et les isolats du groupe de souches Z et E, alors que le troisième groupe est représenté par les isolats des groupes de souches O et Wi.







**Figure 34** Arbres phylogénétiques basés sur l'analyse de la séquence des nucléotides. (A)1624-2458 ; (B) 5626-6303 et (C)9136-9433 correspondant aux régions de recombinaison RJ2, RJ3 et Rj4. Les astérisques indiquent les isolats PVY algériens séquencés dans ce travail ; les chiffres au niveau des nœuds indiquent les valeurs de bootstrap supérieure à 70%. Les accolades désignent les groupes définis avec les valeurs de bootstrap.

Il en résulte que tous les isolats PVY algériens sont réunis dans le groupe II, où ils affichent une identité nucléotidique moyenne de plus de 99 % des membres de ce clade.

Dans la région RJ4 située entre les nucléotides correspondant à 9136 à 9433, quatre groupes ont été obtenus (Fig.34 C) :

- Le groupe I qui correspond à des isolats des groupes de souches O, Wi et NTN (NTN-NW génotype).
- Le groupe II correspond aux groupes de souches PVY NTN, PVY Z et PVY E.
- Le groupe III comprend essentiellement des isolats de la souche NTN partageant le groupe N du génotype d'Amérique du Nord.
- Le groupe IV représente les isolats de la souche NTN et la souche N d'Amérique du Nord.

Il en ressort que tous les isolats PVY algériens, partagent l'identité la plus élevée (99 %) avec des isolats de Cluster II.

L'alignement des séquences nucléotidiques a révélé que la majorité des isolats PVY algériens présente une mutation au niveau des trois régions génomiques RJ indiquées par la figure 35.

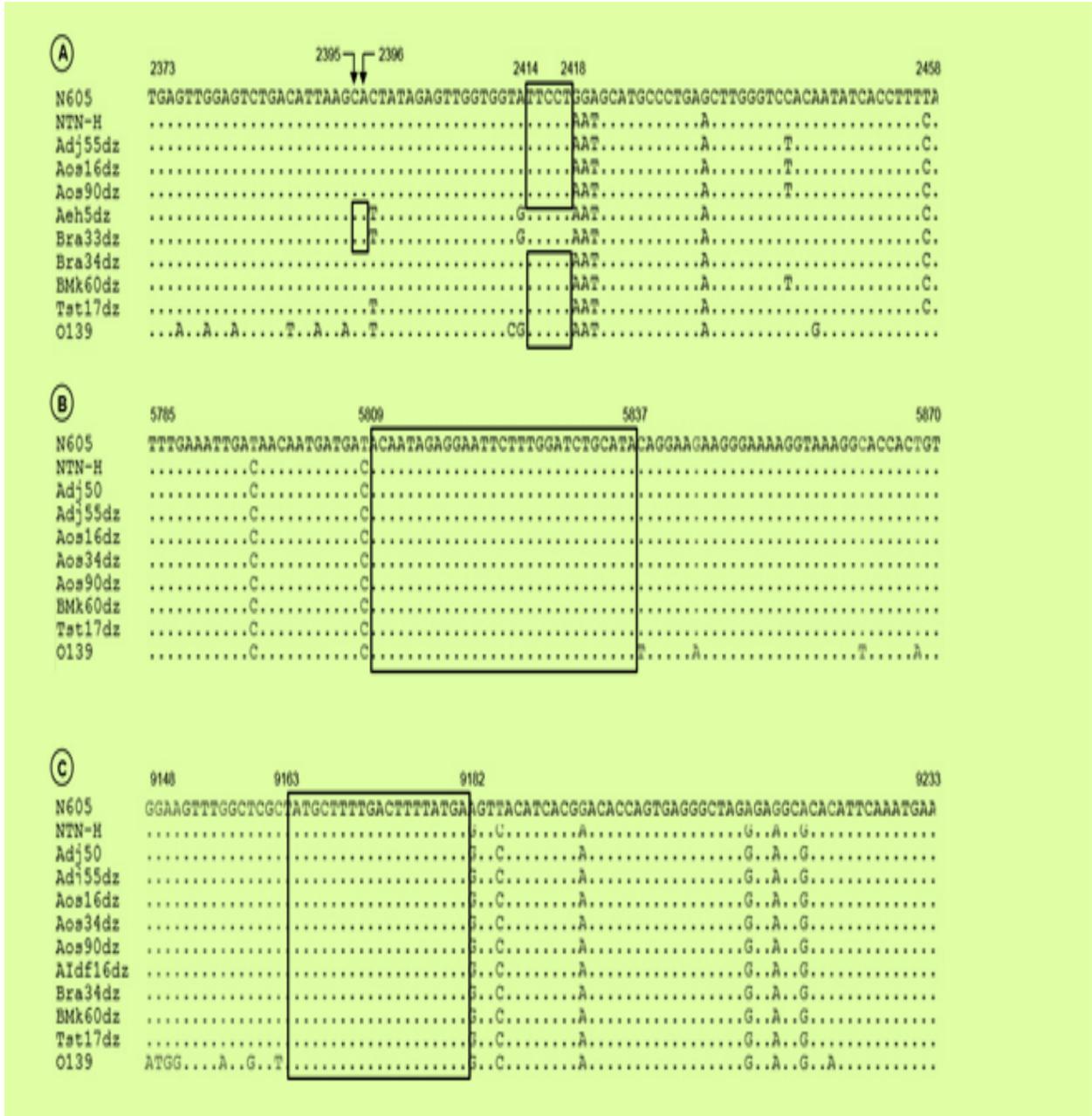
En effet, au niveau de la région RJ2, six isolats (Adj55dz, l'Am16dz, l'Am90dz, Bra34dz, BMk60dz, Tst17dz) ont montré un événement de recombinaison à la position nucléotidique 2414-2418, avec une séquence de type PVY<sup>N</sup> en aval et de type PVY<sup>O</sup> en amont. Cependant, chez les isolats, Aeh5dz et Bra33dz, la localisation génomique de cet événement de recombinaison a été déplacée vers les nucléotides 2395-2396.

Pour la région, RJ3 les séquences nucléotidiques de ces isolats sont passées du type PVY<sup>O</sup> au type PVY<sup>N</sup> des deux côtés de l'événement de recombinaison situé dans la région de nucléotides 5809-5816.

L'ensemble des isolats PVY algériens étudiés ont montré une troisième séquence de nucléotides en passant d'une mutation du type PVY<sup>N</sup> vers le type PVY<sup>O</sup> situé aux nucléotides 9182 de la région de recombinaison RJ4.

Les isolats référenciés : N605, H, L26, PVY-12, l'Egypte11, ou-1, ISO5, GR99 et SCIP-O correspondent à la séquence nucléotidique des isolats PVY aux numéros d'accès respectifs, X97895, M95491, FJ204165, AB185833, KY863548, DQ157179, AJ890350, AJ890343 et AJ585196 (Tableau 11). Toutes ces séquences de référence, à l'exception de N605 et SCIP-O, sont aussi recombinantes en RJ2, RJ3 et/ou RJ4. La numérotation est basée sur la séquence. PVYN-605 ".": désigne les

nucléotides qui sont présents dans toutes les séquences du PVY et sont identiques à ceux de l'isolat PVYN-605.



**Figure 35** Schéma d’alignement des séquences nucléotidiques des isolats PVY algériens par rapport aux séquences nucléotidiques 2368-2458 (A), 5756-5846 (B) et 9148-9238 (C) en bordure des jonctions de recombinaison respectives RJ2, RJ3 et RJ4. La zone encadrée représente l’emplacement des régions génomiques de recombinaison observées chez les isolats

**Tableau 11** Pourcentage d'identité nucléotidique des 10 isolats PVY algériens par comparaison de trois isolats PVY de références sur la base des séquences de nucléotides : 1624-2458, 5626-6303 et 9136-9433 correspondant aux régions de combinaison RJ2, RJ3 et RJ4.

| Isolate |          |           | RJ2 (nt 1624-2458)* |                |                  |                  | RJ3 (nt 5626-6303) |      |      |                  | RJ4 (nt 9136-9433) |      |      |                  |
|---------|----------|-----------|---------------------|----------------|------------------|------------------|--------------------|------|------|------------------|--------------------|------|------|------------------|
| Number  | Acronyme | Origin    | O <sup>a</sup>      | N <sup>b</sup> | NTN <sup>c</sup> | Accession number | O                  | N    | NTN  | Accession number | O                  | N    | NTN  | Accession number |
| 5       | Adj50dz  | Algiers   | ~                   | ~              | ~                | ~                | 89                 | 95.8 | 99.5 | LT839606         | 96.7               | 91.5 | 99   | MF279202         |
| 6       | Adj55dz  |           | 83.7                | 98.2           | 99.4             | MF871640         | 89                 | 95.8 | 99.5 | MF871641         | 96.2               | 92.6 | 99.6 | MF871642         |
| 11      | Ach5dz   |           | 84.9                | 98.4           | 98.9             | LT852414         | ~                  | ~    | ~    | ~                | ~                  | ~    | ~    | ~                |
| 13      | Aos16dz  |           | 84                  | 98.5           | 99.7             | LT852417         | 89                 | 95.8 | 99.5 | LT852707         | 96.2               | 92.6 | 99.6 | MF279204         |
| 15      | Aos34dz  |           | ~                   | ~              | ~                | ~                | 89.3               | 95.8 | 99.5 | LT839604         | 96.2               | 92.6 | 99.6 | MF279199         |
| 17      | Aos90dz  |           | 84.1                | 98.6           | 99.8             | LT852419         | 89                 | 95.8 | 99.5 | LT852709         | 96.6               | 92.2 | 99.3 | MF279206         |
| 22      | Bra33dz  | Bouira    | 84.6                | 98             | 98.9             | LT852412         | ~                  | ~    | ~    | ~                | ~                  | ~    | ~    | ~                |
| 23      | Bra34dz  |           | 84.3                | 98.5           | 99.7             | LT852413         | ~                  | ~    | ~    | ~                | 96.2               | 91.9 | 98.9 | MF279197         |
| 25      | BMk60dz  | Boumerdes | 84.3                | 98.4           | 99.6             | LT852416         | 89.3               | 96.1 | 99.8 | LT852706         | 96.2               | 91.9 | 98.9 | MF279202         |
| 29      | Tst17dz  | Tipaza    | 84.3                | 98.8           | 99.5             | LT852415         | 88.9               | 95.7 | 99.4 | LT839605         | 96.2               | 91.9 | 98.9 | MF279201         |

\*Nombre suivant le génome de l'isolat PVYN-605 (Jakab *et al.*, 1997 ; nombre d'accès X97895)

<sup>a</sup>Référence de l'isolat PVY<sup>O-139</sup> (Singh & Singh 1996; nombre d'accès U09509)

<sup>b</sup>Référence de l'isolat PVY<sup>N-605</sup> (Jakab *et al.*, 1997; nombre d'accès X97895)

<sup>c</sup>Référence de l'isolat PVY<sup>NTN-H</sup> (Thole *et al.*, 1993; nombre d'accès M95491)

~ Pas d'obtention de séquence nucléotidique

#### III.4. DISCUSSION GENERALE

Cette première étude a porté sur la caractérisation des isolats PVY pour définir la diversité des groupes et de variants de souches présents en Algérie, étant donné la fréquence élevée de ce virus dans notre pays et le fait qu'il est incontestablement considéré comme l'un des 10 virus les plus dommageables des plantes (Scholthof *et al.*, 2011).

Les analyses sérologiques ont montré la dominance fréquente du sérotype-N par rapport au sérotype O (Fig. 27). Cette observation correspond à l'évolution des populations PVY signalée depuis des décennies dans la plupart des pays européens comme l'Espagne (Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998), la France (Kerlan *et al.*, 1999), la Belgique (Rolot & Steyer, 2008), les Pays-Bas (Van der Vlucht *et al.*, 2008), la Suisse (Rigotti *et al.*, 2011) et l'Écosse (Lacomme *et al.*, 2014), ou dans d'autres pays comme la Syrie (Chikh Ali *et al.*, 2006), le Brésil (Avila *et al.*, 2009), l'Afrique du Sud (Visser & Bellstedt, 2009), la Tunisie (Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2008, 2010, Tayahi *et al.*, 2016) et le Japon (Ogawa *et al.*, 2012 ; Chikh Ali *et al.*, 2013).

Les essais biologiques, effectués sur le tabac avec un ensemble d'échantillons infectés par le PVY, ont révélé que tous les essais de sérotype PVY<sup>N</sup> exprimaient des symptômes nécrotiques sur les feuilles de tabac et identifiés comme PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>NTN</sup> en accord avec les résultats de Kerlan *et al.*, (1999). Ce résultat s'oppose à l'absence des souches PVY<sup>Z</sup> et PVY<sup>E</sup> dans nos isolats, parce qu'aucun des isolats du sérotype-N n'exprimait un bio type-O comme a déjà été montré pour les souches PVY<sup>Z</sup> et PVY<sup>E</sup> (Kerlan *et al.*, 2011; Galvino-Costa *et al.*, 2012).

L'une des trois souches de sérotype-O (Aldf51dz) a également exprimé des symptômes de type O et elle est considérée comme un isolat PVY<sup>O</sup> typique. Par contre les deux autres isolats (Bra33dz, Aeh5DZ) du sérotype O expriment des symptômes de type N sur le tabac, indiquant qu'elles doivent correspondre à des isolats du PVY<sup>N-Wi</sup> (Chrzanowska, 1991, 1994). Cette hypothèse a été confirmée par la caractérisation moléculaire de ces isolats. En effet, pour la région RJ2, les deux isolats algériens sont réunis dans le même groupe des isolats de la souche Wi (groupe Iso5, de l'Égypte 11, LW) (Fig. 34). De plus, l'analyse de l'alignement des séquences a montré que ces isolats partageaient la même position de la région de recombinaison avec l'isolat d'Égypte (11, LW) chez la pomme de terre et qui est considéré comme un isolat (Wi-PVY<sup>N</sup>) ; Elwan *et al.*, 2017).

Ce résultat est d'un grand intérêt car à notre connaissance, c'est le premier rapport du PVY<sup>N-Wi</sup> isolé dans le Nord de l'Afrique. En Tunisie, certaines enquêtes ont déjà été réalisées de 2002 à 2016 et aucun isolat de la souche PVY<sup>N-Wi</sup> n'a été identifié (Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010, Djilani-Khouadja *et al.*, 2010 ; Tayahi *et al.*, 2016). Il serait intéressant de mener une nouvelle enquête en Tunisie pour vérifier l'absence ou la présence de ces isolats, et de déterminer si des isolats PVY<sup>N-Wi</sup> présentent une véritable identité géographique spécifique, ou qu'ils n'ont émergé que récemment.

Afin de différencier entre les isolats PVY<sup>N</sup> de PVY<sup>NTN</sup>, de nombreux tests de détection par des marqueurs moléculaires ont été rapportés, souvent soit sur le polymorphisme des protéines structurales (Boonham *et al.*, 2002) ou sur des échanges de séquences dans l'ensemble du génome viral (Beach Baret *et al.*, 2002 ; Schubert *et al.*, 2007).

Nos résultats ont montré que les 28 isolats du sérotype et biotype N génèrent des produits de PCR de la taille attendue pour les quatre régions génomiques analysées. Par conséquent, ces isolats correspondent aux souches recombinantes PVY<sup>NTN</sup>, appelés Eu-PVY<sup>NTN</sup> (Weidemann & Maiss, 1996) car ils affichent une co-mutation de séquence N:O dans les régions HC-Pro / P3 (RJ2), VPg / NIa (RJ3) et CP (RJ4) comme chez l'isolat de référence PVY<sup>NTN-H</sup> (Glais *et al.*, 2002).

Le séquençage des produits de PCR correspondant à RJ2, RJ3 et RJ4 de certains de nos isolats Algériens PVY<sup>NTN</sup>, a confirmé qu'il s'agissait de recombinants, avec des sites de recombinaison exactement aux mêmes endroits que ceux des isolats de PVY<sup>NTN-H</sup>, AST, 423-3 ou NIB ( RJ2: en position de nucléotide 2414/2418; RJ3: 5809/5816; RJ4: 9182) (Glais *et al.*, 2002; Lorenzen *et al.*, 2006; Galvino-Costa *et al.*, 2012). Ces résultats mettent en évidence la forte prévalence des isolats de PVY<sup>NTN</sup> en Algérie.

Même si les analyses n'ont pas été appliquées aux 179 isolats PVY de sérotype et biotype N, il est très probable que la plupart, sinon tous, correspondent à des isolats PVY<sup>NTN</sup>. Cette observation est intéressante mais pas surprenante, car des situations similaires avaient déjà été rapportées dans un pays voisin, en Tunisie (Djilani-Khouadja *et al.*, 2010 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010 ; Larbi , Tayahi *et al.*, ). Par contre, il est beaucoup plus surprenant que la diversité de PVY observée dans d'autres pays voisins, comme la Jordanie (Anfoka *et al.*, 2016), l'Égypte (Elwan *et al.*, 2017), la Syrie (Chikh Ali *et al.*, 2010) et l'Arabie saoudite (Chikh Ali *et al.*, 2016), ne se trouve pas également en Algérie.

En effet, dans l'arbre phylogénétique, ces isolats algériens semblent être plus proches des PVY<sup>NTN</sup> présentant le génotype NTN avec 3RJ que ceux présentant le génotype NTN-NW, tels que les isolats syriens ou égyptiens. Pour confirmer cette observation, l'ensemble du génome de certains isolats algériens de PVY devrait être séquencé.

Comparé à certains pays européens où l'incidence de PVY<sup>NTN</sup> est responsable d'environ 60 % des infections à PVY (Blanco-Urgoiti *et al.*, 1998 ; Lindner et Billenkamp, Rolland *et al.*, 2008 ; Van derVlugt *et al.*, Bahrami Kamangar *et al.*, 2014), la situation signalée en Algérie est plus critique, cela pourrait s'expliquer par le fait que certains agriculteurs utilisent des semences de pomme de terre non certifiées et soit des semences nationales, qui ne sont pas soumises au système de certification nationale.

Malgré la forte prévalence des isolats de PVY<sup>NTN</sup>, aucun symptôme de PTNRD n'a été signalé dans les champs de pommes de terre algériens à ce jour. La capacité de PVY<sup>NTN</sup> à induire une nécrose des tubercules dépend notamment de la sensibilité de la variété de pomme de terre à l'expression de ce symptôme (Beczner *et al.*, 1984). La variété Spunta, qui est très répandue en Algérie, tolère cette maladie, mais constitue un bon réservoir pour le PVY car il favorise la multiplication du virus, favorisant ainsi la propagation de l'infection à d'autres variétés (telle que 'Nicola') de pomme de terre sensibles au PTNRD.

## CONCLUSION GENERALE

A l'issue de ce travail qui vient enrichir le domaine des recherches établies sur les virus de la pomme de terre et qui a été peu abordé en Algérie depuis plus d'une vingtaine d'années, nous avons apporté de nouvelles informations sur la diversité des espèces virales émergentes entravant la croissance et la production normale de cette culture sous l'effet des principaux facteurs favorisant leur propagation dans le temps et dans l'espace.

Les informations que nous avons obtenues au cours de cette dernière décennie permettent, en effet, une meilleure connaissance sur les mécanismes de l'infection virale des plants de pomme de terre pour évaluer les risques dans les champs de multiplication locale de semences de pomme de terre. Par conséquent raisonner une lutte plus efficace contre ce virus mal contrôlé par nos agriculteurs. Les facteurs mis en cause relèvent en partie des différents objectifs abordés au cours de ce travail en dehors de certains enjeux politiques dans la gestion des programmes économiques alloués au développement de cette culture.

L'étude a d'abord porté sur l'identification des cinq principaux virus rencontrés dans les champs de pomme de terre des cinq régions productrices du centre du pays, cinq virus ont été identifiés le PVY, PVX, PVS, PVA, et PLRV le long de trois campagnes agricoles (2013/2016). Dans toutes ces régions, le PVY s'est avéré la plus dominant des infections virales enregistrant en moyenne une incidence de 96% estimée par les différents tests sérologiques utilisés.

Deux types d'infection ont été identifiées, simple et ou combinée regroupant au moins deux des cinq virus suspectés, mais la combinaison la plus rencontrée est celle du PVY avec le PVX soit 41% des infections totales. Ces données enrichissent nos connaissances sur la diversité et l'incidence des virus précédemment recensés en Algérie et nous ont conduits à orienter nos investigations vers le PVY afin d'étudier les conséquences particulières de sa répartition spatiale en relation avec les vecteurs efficaces de sa propagation et les foyers hébergeant naturellement ce virus.

Lors de nos prospections, une variabilité symptomatologique remarquable a été observée sur les cultures de pomme de terre dans toutes les régions prospectées et ce quel que soit le type de variété cultivée. En absence de maladies physiologiques ou de carences nutritionnelles et ou d'autres facteurs abiotiques, les symptômes peuvent être attribués à la présence d'au moins un des virus suspec-

tés. Des hypothèses ont donc été établies puis confirmées par des tests sérologiques permettant l'identification de l'agent responsable d'un ou plusieurs symptômes observés. Toutefois, la présence de symptômes n'était pas toujours liée à la présence de virus comme a été démontré pour certains échantillons symptomatiques. Au contraire, certains échantillons faiblement symptomatiques ou asymptomatiques étaient infectés par au moins un des virus testés. Cela pourrait traduire une latence dans l'expression des symptômes au moment des prélèvements des échantillons, représentent un risque de propagation d'un inoculum viral supplémentaire dans les générations suivantes.

Les données du test sérologique utilisant le sérum polyclonal anti-PVY et deux autres sérums monoclonaux reconnaissant spécifiquement les groupes PVY<sup>N</sup> et PVY<sup>O</sup>, ont en effet confirmé les hypothèses quant à la variabilité des symptômes montrée par une majorité des plants collectionnés était principalement liée à la présence du PVY avec ses deux groupes de souches avec cependant une prépondérance des souches nécrotiques PVY<sup>N</sup> de 97% contre 3% seulement pour les souches communes PVY<sup>O</sup>.

Vu l'importance de ce virus et sa dominance détectée dans l'ensemble des régions prospectées, une évaluation particulière et approfondie du risque d'infection par le PVY a été limitée à la région d'Ain Defla traditionnellement productrice de semences certifiées qui connaissent actuellement un déclassement inhabituel dans les programmes de surveillance des maladies. Pour mieux comprendre le pathosystème (PVY, cycle pomme de terre, sources d'inoculum et vecteurs) et pouvoir l'améliorer, nos investigations ont été répétées le long de trois années consécutives dans les conditions de culture au niveau de cette région. Un tel choix a eu l'avantage de démontrer les différences enregistrées entre les années et entre les saisons culturales en relation avec le stade physiologique des plants de pomme de terre, l'abondance des populations de pucerons et les sources naturelles hébergeant l'inoculum viral entre les différentes cultures. Des différences intéressantes ont certes été observées entre les années mais c'est plutôt une convergence qui ressort de notre étude.

Nos résultats ont montré que le potentiel infectieux du PVY sur la pomme de terre, variété Spunta « Elite » majoritairement cultivée dans cette région, est le résultat de la présence simultanée du virus dans les plantes sources (repousses de pommes de terre et autres hôtes secondaires) et des pucerons vecteurs durant les deux saisons culturales considérées et de manière beaucoup plus intense en arrière-saison, certainement due à la présence cumulée lors des cultures de saisons des cultures précédentes.

Le stade d'émergence enregistre les valeurs les plus élevées du taux d'infection par le PVY coïncide avec une forte sensibilité des plantes à l'infection virale et sa faible immunité contrairement à une plante où l'infection survient tardivement.

L'utilisation des différentes techniques sérologiques au laboratoire nous a permis de déterminer le type d'infection virale, primaire ou secondaire selon les périodes considérées lors des différents prélèvements dans la région étudiée. En effet, l'infection par ce virus a été détectée aussi bien sur les feuilles issues de la culture mère que sur les feuilles des jeunes plantules germant des tubercules récoltés en fin de culture, suggérant le passage du virus d'une génération à une autre, entraînant donc une infection secondaire par ce virus. Nos résultats montrent également, une nette augmentation du taux d'infection du PVY, depuis l'émergence des plants jusqu'à la fin de culture et après défanage sur les produits de récolte au cours des trois campagnes agricoles. Cette augmentation est plus importante en arrière-saison, de l'ordre de 34.2% de l'émergence à la récolte de l'année 2014-2015. Ceci est probablement lié aux températures clémentes en faveur d'une forte pullulation aphidienne. Nos résultats ont également montré que la forte incidence du PVY est le résultat de la présence simultanée du virus dans les plantes sources (adventices identifiées et autres repousses de pommes de terre hôtes secondaires) et des pucerons vecteurs durant toutes les saisons de culture de pomme de terre. Nous avons détecté la présence du PVY sur une large gamme d'hôtes spontanées et avec une incidence considérable chez le chénopode, la morelle noire ainsi que la stramoine. Cela fournit des sources initiales d'infections virales qui peuvent être transmises par des insectes vecteurs aux cultures voisines de pomme de terre. Avec les recherches en virologie qui englobent maintenant l'étude des mauvaises herbes, on signale plus d'infections virales spécifiques sur des espèces adventices. Nos résultats rapportent aussi, la dominance du groupe de souche PVY<sup>N</sup> de 36.4% et ce dans la majorité des plants infectés. Ces sources cumulent leurs effets et mettent en péril la qualité sanitaire de la semence produite.

Bien que le suivi de la diversité et de l'abondance des pucerons et virus associés sur 2 années de campagnes agricoles (2014-2016) nous semble insuffisant pour renseigner l'aphidofaune ainsi que la dynamique des populations de pucerons dans la région de Ain Defla, nos résultats concordent avec des travaux antérieurs dans régions du pays (Laarbi, 1995) et nous avons pu établir un lien quoique préliminaire sur l'effet des pucerons sur l'évolution de l'incidence du PVY. Néanmoins, l'apport intéressant de notre étude concerne l'efficacité de transmission *in vitro* des espèces de pucerons majoritaires et parmi lesquelles, *Myzus persicae* reste le vecteur le plus efficace du PVY et préférentiellement pour le groupe dominant PVY<sup>N</sup> en accord avec de nombreux travaux de par le

monde (Sigvald, 1992 ; Boukhris-Bouhachem *et al.*, 2010, Verbeek *et al.*, 2010, Fox *et al.*, 2016, Dupuis *et al.*, 2019).

Vu la forte incidence du PVY et sa variabilité symptomatologique montrée par une grande majorité des isolats représentant la collection prélevée dans les différentes régions étudiées, une deuxième partie de ce travail a été accordée à l'étude de la diversité génétique du PVY afin d'identifier et de caractériser l'identité des souches de ce virus circulant dans notre pays.

La classification préliminaire des isolats algériens appartenant à PVY<sup>NTN</sup> à l'aide de tests sérologiques, moléculaires par RT-PCR et biologique a été confirmée dans cette étude par des analyses partielles de séquences. Celles-ci partageaient une identité d'acides aminés de 99% avec les isolats de Souche PVY<sup>NTN</sup> des isolats PVY de références répertoriées dans la banque de gènes GENBANK.

Nos résultats démontrent également que la structure de la population des variants du PVY en Algérie est conforme aux études qui ont montré que les isolats recombinants sont devenus plus répandus dans le monde entier (Revers *et al.*, 1996) et que la souche PVY<sup>NTN</sup> est maintenant présent dans la plupart des pays producteurs de pommes de terre (Moravec *et al.*, 2003).

La distribution des souches de PVY n'est toutefois pas uniforme dans le monde entier, comme par exemple la souche N-Wilga est répandue aux États-Unis et représente 47% des cas de PVY (Gray *et al.*, 2013) et plus de 80% des séquences de nucléotides en Pologne (Chrzanowska, 2001).

Nos résultats, ont précédemment montré que des différences de sévérité des symptômes foliaires étaient observées entre les variétés infectées par le même isolat PVY et également entre les isolats PVY de la même variété. Nous avons démontré que certains isolats PVY<sup>N</sup> étaient pratiquement asymptomatiques (supportant une infection latente). Les inspections sur le terrain dépendant de la capacité des inspecteurs qualifiés à identifier les plantes symptomatiques, les infections sans symptôme latentes représentent un risque de propagation d'un inoculum viral supplémentaire dans les générations suivantes. L'apparition de la prévalence de PVY<sup>N-NTN</sup> en Algérie pourrait également être due à une translocation plus rapide de cette souche dans les tubercules de la descendance par rapport à la souche PVY-<sup>WI</sup> retrouvée chez quelques isolats étudiés en accord avec les travaux de Kerlan (2008) et Dupuis (2017).

Au final, même si la nomenclature des souches de PVY reste complexe, il y'a tout de même une bonne corrélation entre la phylogénie et les caractères biologiques (spécificité d'hôte, symptômes). Cette étude quoique préliminaire a fourni des informations intéressantes à la fois originale qui méritent

tent d'être complétée par des informations complètes sur l'identité et la distribution des variants du PVY chez les espèces cultivées et spontanées hôtes à ce virus en Algérie par une analyse du génome complet.

Les résultats obtenus au laboratoire et sur le terrain ouvrent de nouvelles perspectives de recherche en Algérie et les informations générées par cette étude contribueront au développement de stratégies de gestion complètes et efficaces pour contrôler les virus en milieu agricole. Dans le cadre des perspectives d'alternatives de lutte intégrée pour réduire la transmission virale, il serait intéressant :

- D'étudier l'effet des huiles minérales pour diminuer les potentialités de transmission du PVY par les pucerons qui colonisent généralement d'abord les bordures de parcelles.
- D'éliminer les adventices qui sont souvent négligés dans les agro-écosystèmes, en particulier le long des zones entourant les champs cultivés. Une gestion efficace des virus doit nécessairement inclure l'identification précise des hôtes adventices hébergeant des virus ainsi que des virus infectant ces adventices.
- D'utiliser de variétés développant très tôt une résistance de maturité à l'infection par le PVY et contrôler sérieusement l'importation de nouvelles variétés sensibles à ce virus (Nicola, Atlas, Eden, Safrane. etc.) ce qui pourrait augmenter les taux de contamination virale dans les champs, favoriser l'extension du virus et altérer la qualité des tubercules produits.
- D'identifier les souches virales présentes du PVY chez le poivron, tomate qui semblent différentes des souches « pomme de terre ».
- De développer les outils d'identification permettant la détection rapide et efficace des souches de ce virus lors des infections précoces des tubercules.

# Résumé

---

A ce jour, des données limitées sont disponibles concernant la pression virale présente dans les champs de pomme de terre en Algérie. Durant trois campagnes agricoles consécutives de 2013 à 2016, différentes prospections ont été conduites et les inspections visuelles ont montré une grande variabilité des symptômes sur les plants de pomme de terre dans les principales régions productrices du pays. Un total de 285 échantillons de feuilles de pommes de terre a été étudié pour définir la prévalence des cinq virus les plus communs des virus : *le virus Y de la pomme de terre* (PVY), l'enroulement foliaire due au (PLRV) virus, *virus de la pomme de terre X* (PVX), le *virus A de la* (PVA) et *virus de la pomme de terre* (PVS). Les résultats ont montré une incidence plus élevée de PVY comparé aux autres virus. Deux facteurs intervenant dans l'augmentation de cette incidence ont été étudiés au niveau de la région d'Ain Defla, traditionnellement la plus productrice en semences de pomme de terre ; il s'agit des pucerons vecteurs et des plantes adventices avoisinantes de la culture de pomme de terre. Six espèces sont avérées efficaces dans la transmission *in vitro* du virus Y avec des pourcentages variables, *Myzus persicae* présente le taux le plus élevé avec une préférence pour une souche particulière de ce virus PVY<sup>NTN</sup> qui s'avère la plus dominante dans les champs de pomme de terre et qui est responsable de la nécrose annulaire des tubercules. Les adventices semblent aussi jouer un rôle important dans la conservation du virus, différentes espèces ont été identifiées et analysés par DAS-ELISA, ont révélé la présence du PVY et plus majoritairement la souche PVY<sup>N</sup> et en forte concentration chez *Solanum nigrum* et *Chenopodium* sp.

La forte incidence du PVY dans toutes les régions étudiées et sa variabilité symptomatologique, ont conduit à l'étude de la diversité des populations de PVY circulant dans nos pomme de terre et ce vu l'émergence de nouvelles souches dans le monde notamment en Tunisie, pays voisin. D'un panel de 185 échantillons, sérologiquement confirmés comme étant uniquement infectées par le PVY, 96,7 % appartiennent au sérotype-N, et seulement 3,2 % de sérotype-O. Une série de 31 isolats PVY a été analysé par le biotypage sur le tabac et par typage moléculaire (RT-PCR, séquençage), ciblant le polymorphisme de la séquence des nucléotides dans le 5'NTR/P1 région et la recombinaison au sein de la jonction de trois HC-Pro/P3 (RJ2), VPg/N1a (RJ3) et le CP (RJ4). 28/31 isolats PVY de sérotype-N induisant une nécrose des nervures sur tabac ont été identifiés comme PVY<sup>NTN</sup> recombinant. Les trois autres souches étaient du sérotype PVY-O, dont deux ont été identifiées comme PVY<sup>N-wi</sup> induisant la nécrose des nervures sur le tabac. Ce résultat est d'un grand intérêt car à notre connaissance, c'est le premier rapport du PVY<sup>N-wi</sup> isolé dans le Nord de l'Afrique.

*Mots-clés* : PVYNTN, PVYN-Wi, Solanaceae, la diversité, les isolats recombinant.



# Preliminary characterization of potato virus Y (PVY) populations in Algerian potato fields

Linda Allala-Messaoudi<sup>1</sup> · Laurent Glais<sup>2,3</sup> · Mohamed Kerkoud<sup>4</sup> · Sonia Boukhris-Bouhachem<sup>5</sup> · Zouaoui Bouznad<sup>1</sup>

© Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2018

## Abstract

To date, only limited data are available concerning the viral pressure present in potato crops in Algeria. For three consecutive years, surveys were conducted in potato fields in the main Algerian potato-growing regions during the mid-season crop cycle (January to March). A total of 285 potato samples were characterized to define the prevalence of the five most common virus species: *Potato virus Y* (PVY), *Potato leaf roll virus* (PLRV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus A* (PVA) and *Potato virus S* (PVS). The results showed a higher incidence of PVY compared to the other four viruses. Because of this predominance of PVY and its distribution in all of the scouted regions, an analysis was carried out on the diversity of PVY populations. From a panel of 185 samples, serologically confirmed as being solely infected by PVY, 96.7% were found to be of serotype-N, and only 3.2% of serotype-O. A set of 31 PVY isolates was further analyzed by biotyping on tobacco and by molecular typing (RT-PCR, sequencing), targeting the nucleotide sequence polymorphism in the 5'NTR/P1 region and the three recombination junctions within the HC-Pro/P3 (RJ2), VPg/NIa (RJ3) and CP (RJ4) regions. All 28 PVY isolates from serotype-N inducing vein necrosis on tobacco were recombinant PVY<sup>NTN</sup> isolates. Among the three PVY isolates of serotype-O, two were typed as PVY<sup>N-Wi</sup> and induced vein necrosis on tobacco. This is the first report of the identification of NTN and Wilga type isolates in Algeria.

**Keywords** PVY<sup>NTN</sup> · PVY<sup>N-Wi</sup> · Solanaceae · Diversity · Recombinant isolates

## Introduction

In 2016, the potato sector in Algeria occupied an area of 156,176 ha, and produced 4.7 million tons of potatoes. With an average yield of 30 t/ha, this made Algeria the second largest potato producer in Africa after Egypt, and the fifteenth largest in the world (FAOSTAT 2016). Algerian potato production is divided into five geographical zones: Littoral, Sub-

Littoral, Tellian Atlas, High Plains and South Oases. There are three growing seasons every year. The mid-season corresponds to the period from January to March, when 63% of the planting is done; the late season from July to August with 33% of planting, and the early season from October to November with only 4% of planting. Each year, 80% of seed potatoes are imported, mainly from Europe. The majority of these seed potatoes is attributed to the mid-season crops, which rely entirely on imported seed. The rest of the seeds (10 to 20%) locally produced during the late and early seasons of potatoes, undergoes a certification process involving visual inspections and post-harvest testing. This control is carried out by the National Center for Control and Certification (CNCC) in order to prevent secondary viral infection from mother tubers.

Six major virus species affect potato crops worldwide: *Potato virus Y* (PVY), *Potato leaf roll virus* (PLRV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus A* (PVA), *Potato virus M* (PVM) and *Potato virus S* (PVS) (Kerlan 2008; Marchoux et al. 2008). Of these, PVY is considered to be one of the main yield-limiting viruses in Algeria. It causes around 24% of yield losses in cv. 'Spunta' crops (Allala et al. 2014). An

✉ Linda Allala-Messaoudi  
l.allala@ensa.dz

<sup>1</sup> Département de Botanique, Laboratoire de Virologie Végétale, École Nationale Supérieure Agronomique, Hassan Badi, 16004 El-Harrach, Algiers, Algeria

<sup>2</sup> FN3PT/RD3PT, 43-45 rue de Naples, 75008 Paris, France

<sup>3</sup> IGEPP, Agrocampus Ouest, INRA, Université de Rennes 1, 35650 Le Rheu, France

<sup>4</sup> Diag-gen, 8 Rue Le Notre, 79066 Angers, France

<sup>5</sup> INRAT, Laboratoire de Protection des Végétaux, rue Hedi Karray, 2049 Tunis, Ariana, Tunisia

American study highlighted that an increase of 1% in PVY infection in potato crop results in a yield reduction of around 0.18 t/ha, whether the symptoms of PVY infection are severe or not (Nolte et al. 2004). Several North African countries are also affected, and PVY seems to be a rather serious problem particularly in Egypt with up to 50–80% losses (Abdalla et al. 2016), and in Tunisia with 35% of yield losses in crops planted using local, self-produced seed potatoes (Djilani-Khouadja et al. 2010; Larbi et al. 2012). Besides infecting potato, PVY also severely infects pepper and tobacco crops in Morocco (Blancard 2013).

PVY, the type-member of the genus *Potyvirus*, has flexuous, rod-shaped particles containing a single-stranded, positive sense RNA genome, with one main open reading frame (ORF), flanked by two distal non-translated regions (NTR) (Hollings and Brunt 1981). The ORF codes a polypeptide, which is subsequently proteolytically processed into ten proteins (Riechmann et al. 1992).

PVY is transmitted by nearly 65 aphid species in a non-persistent manner; *Myzus persicae* is the most efficient in the transmission of the virus (Lacomme et al. 2017). PVY causes epidemics in a wide host range of economic crops (pepper, potato, tobacco, tomato) and in several species of weeds, mainly in the family Solanaceae (De Bokx and Huttinga 1981; Kerlan and Moury 2008). In potato, PVY induces mosaic or rough mosaic, mild to severe distortion (crinkling) of the leaves, vein necrosis and necrotic spots (Kerlan 2008), but some infections can remain asymptomatic depending on the PVY isolate / potato cultivar combination.

The biological and molecular characteristics of PVY have led to a complex classification of this virus. Seven strain groups PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>Z</sup>, PVY<sup>E</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, and PVY<sup>N-Wi</sup> (Glais et al. 2017) have been defined according to their capacity to induce necrosis on tobacco leaves, their ability to overcome hypersensitive resistance *N*-genes in potato plants (Jones 1990; Singh et al. 2008; Szajko et al. 2014) and according to the presence or absence of recombination events in their genome. Indeed, the systematic nucleotide sequence analysis of the whole PVY genome revealed that some recombination junctions (RJ) located in P1, HC-Pro, VPg and/or CP regions characterized PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>N-Wi</sup>, PVY<sup>Z</sup> and PVY<sup>E</sup> strain groups (Glais et al. 1998, 2002; Piche et al. 2004; Schubert et al. 2007; Kerlan et al. 2011; Galvino-Costa et al. 2012). In addition to these recombinant PVY isolates resulting from genomic fragment exchanges between O and N sequences, a huge number of PVY variants has been identified over the last 10 years, showing particular recombination patterns and/or resulting from recombination between different parents. The PVY-NE11 isolates found in the United States (Lorenzen et al. 2008) and more recently in Saudi Arabia (Chikh Ali et al. 2016) are the best examples of this complexity. The latest analyses of 396 whole genomes of PVY associated with the use of several recombination algorithms highlighted the presence of new recombination events which had been

unidentified to date, so that PVY could be defined by 36 recombinant patterns (Green et al. 2017). However, all this genomic variability is not associated to a particular biological feature.

The economic importance of PVY recombinant isolates worldwide has increased due to their ability to induce potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) that seriously affects tuber quality (Scholthof et al. 2011). On the African continent, the occurrence of recombinant PVY<sup>NTN</sup> and/or PVY<sup>N-Wi</sup> isolates has already been reported in Kenya (Were et al. 2013), in South Africa (Visser and Bellstedt 2009), in Tunisia (Boukhris-Bouhachem et al. 2010) and in Egypt (Elwan et al. 2017). With an intensive molecular characterization based on whole genome sequencing and recombination analysis performed on PVY isolates from Syria (Chikh Ali et al. 2010), Saudi Arabia (Chikh Ali et al. 2016), Jordan (Anfoka et al. 2016) and from Egypt (Elwan et al. 2017), the presence of some PVY isolates sharing genome with particular recombination patterns was revealed in these countries. It is already known that PVY is present in Algeria and that it presents a significant threat to potato production (Allala et al. 2014; Allala-Messaoudi et al. 2016), but in terms of the specific PVY isolates which are circulating in Algeria, no data has yet been reported. Therefore, the aim of this study was to define the prevalence of the different potato viruses in Algerian seed potato production and to perform a preliminary study on the diversity of PVY present in this country.

## Materials and methods

**Sampling of potato plants** Between 2014 and 2016, during three mid-season cropping cycles from January to March, a set of 285 potato leaf samples was collected randomly eight weeks after the emergence of potato plants. These samples were gathered from 14 commercial potato fields in the five main potato-growing regions of central Algeria (Fig. 1): Algiers (2 fields: cv. ‘Spunta’, 22 samples; 1 field: cv. ‘Fabula’, 27 samples), Ain Defla (2 fields: cv. ‘Spunta’, 54 samples), Bouira (2 fields: cv. ‘Spunta’, 24 samples), Boumerdes (1 field: cv. ‘Ultra’, 32 samples; 2 fields: ‘Fabula’, 52 samples) and Tipaza (2 fields: cv. ‘Spunta’, 37 samples; 1 field: cv. ‘Désirée’, 26 samples; 1 field: cv. ‘Condor’, 11 samples).

Potato plants collected in these surveys either showed virus-like symptoms (e.g. mosaic, discoloration, necrosis, yellowing, crinkle, rough mosaic and leaf roll) or were symptomless. Each sample consisted of three leaves picked from the top, middle and bottom of the foliage of a single potato plant, according to Sigvald’s procedure (1989). During field operations, samples were stored in sealed plastic bags in a cooling box until delivery to the laboratory. Excised leaf samples were individually sorted into two labeled plastic bags; one which was used for serological assays and the other which was preserved at –80 °C until required.



**Fig. 1** Main potato-growing regions in Algeria in mid-season. Black spots correspond to the sampling sites

**Serological screening of five major potato viruses** The double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) (Clark and Adams 1977) was performed to determine the occurrence of five major viruses: PVY, PVX, PLRV, PVS and PVA. All sampled leaves were tested individually using appropriate, specific polyclonal antibodies raised against these viruses and in accordance with the manufacturer's instructions (Bioreba, Basel, Switzerland) included in the commercial kits of these antisera. All samples serologically identified as being infected solely by PVY, were tested twice in DAS-ELISA, using two monoclonal antibodies specific either to serotype-O (PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N-Wi</sup>) (Adgen, Ayr, UK), or to serotype-N (PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>Z</sup>, PVY<sup>E</sup>) (Bioreba, Basel, Switzerland).

**Biotyping of PVY isolates on tobacco** In order to observe the types of symptoms produced, potato leaves infected solely with PVY were mechanically inoculated into *Nicotiana tabacum* cv. 'Xanthi' at the four-leaf stage. Non-inoculated plants were kept as healthy control. All plants were kept separately in insect-proof cages. Symptoms were observed daily and were recorded 15 to 20 days after inoculation. At the end of the experiment, control and inoculated tobacco plants were tested by DAS-ELISA to identify the systemic PVY infection. Part of the biological material was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further molecular characterization.

**Molecular characterization of PVY isolates** To define the molecular properties of Algerian PVY isolates, different reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were performed with primer sets using methodology described in previous studies (Glais et al. 1996, 2001; Boukhris-Bouhachem et al. 2010). The primer pair FR<sub>2000</sub>/F2-d, which was designed on nucleotide sequence polymorphism observed in the 5'NTR/P1 region (Glais et al. 1998), was described as allowing the detection of potato tuber necrotic isolates (PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>Z</sup>, PVY<sup>E</sup>) from PVY of serotype-N

(Glais et al. 1996, 2001); and the specific identification of PVY<sup>N-Wi</sup> isolates from PVY of serotype-O. In addition, three other primer pairs were used in order to observe the presence or absence of three recombination sites in the PVY genome: within the HC-Pro/P3 region (RJ2), with the primer pair <sub>1227/46</sub>Y<sup>N</sup>F/<sub>2547/68</sub>Y<sup>O</sup>R; within VPg/NIa region (RJ3), with primer pair <sub>5606</sub>Y<sup>O</sup>F/<sub>6343/67</sub>Y<sup>N</sup>R; and within the CP region (RJ4), with primer pair <sub>9132/51</sub>Y<sup>N</sup>F/<sub>9481/00</sub>Y<sup>O</sup>R (Glais et al. 2001; Boukhris-Bouhachem et al. 2010).

#### Sequencing and analyses of targeted genomic regions

Nucleotide sequences on both sides of the recombination junctions RJ2, RJ3 and RJ4 were identified for 10 Algerian PVY isolates. These isolates were selected taking into account their geographical origin and their characteristics observed at the biological, serological and/or molecular levels (based on the presence of amplified PCR products). The PCR products obtained after amplification of the three regions (RJ2, RJ3, RJ4) were sequenced in forward and reverse directions with the same primers used for the amplification. The resulting data were deposited in GenBank under the accession numbers reported in Table 5. The nucleotide sequences were analyzed using the BioEdit sequence alignment editor associated with ClustalW multiple alignments and Sequence Identity Matrix programs to determine the nucleotide sequence identity between the 10 Algerian PVY isolates and 31 PVY sequences from the GenBank database, corresponding to reference PVY isolates from the main PVY strain groups and to PVY isolates displaying an atypical genomic structure previously found in the neighboring countries of Algeria (Syria, Egypt, Saudi Arabia) (Table 6) (Chikh Ali et al. 2010, 2016; Elwan et al. 2017). Phylogenetic analyses based on these sequence alignments were performed with the neighbor joining method in the MEGA program, version 7.0 (Kumar et al. 2016) with 1000 bootstrap replicates, to highlight the relationships between Algerian PVY isolates and the other previously identified isolates.

## Results

### Identification of viral isolates in collected potato leaves

Among the 285 samples collected, 242 were symptomatic with the expression of mild to severe leaf mosaic, yellowing or necrotic lesions, and 43 were symptomless or asymptomatic. None of the five viruses tested was detected in 47 of the 285 samples (16.5%), although 13 out of these 47 samples were symptomatic. At least one of the viruses was detected in the remaining 238 samples (Table 1).

Among the 238 infected samples, 199 were found to be infected by only one virus, usually PVY (93%, 185/199) (Table 2). PLRV, PVX, PVS and PVA were detected but at lower frequencies. Indeed, 5.5% (11/199) of samples were found to be infected by PLRV and only 0.5% (1/199) were infected by PVX, PVS or PVA. Mixed infections were detected in 39 samples out of the 238 infected-potato leaves; PVY was also the most common virus found, in combination with PVX (41%, 16/39), PVS (15.4%, 6/39) or PLRV (10.2%, 4/39). Other combinations, without PVY, were identified but with fewer incidences. PVY-infected samples, with single or mixed infections, were found in all surveyed regions, whatever the potato cultivar, with a percentage of infection ranging from 83.3% in cv. 'Spunta' in the Ain Defla region to 100% in both cv. 'Désirée' and 'Condor' in the Tipaza region and in cv. 'Spunta' in Bouira and in Algiers (Table 2). Potato leaves infected solely with PLRV were detected in almost all regions, but with a lower frequency than PVY (5.9% in Boumerdes to 16.7% in Ain Defla).

PVX- infected leaves were also detected in almost all regions but mainly in combination with other viruses. Single infections caused by PVS and PVA proved more sporadic, as only one or two samples were detected positive.

### Serological typing of singly PVY-infected potato leaves

Serological tests with two specific monoclonal antibodies raised against PVY from O- or N-serotypes showed that 96.7% (179/185) of all samples infected by PVY only reacted positively with the PVY<sup>N</sup> monoclonal antibody, vs 3.2% (6/185) with the PVY<sup>O/C</sup> monoclonal antibody (Table 3). None of the tested samples reacted positively with both serological reagents or were recognized by neither of them. O-serotype isolates were restricted to three regions (Algiers, Ain Defla and Bouira), and were only detected in cultivar 'Spunta', whereas the N-serotype was detected in all cultivars and regions.

### Tobacco biotyping of some PVY isolates

A set of 38 PVY isolates was selected among the 185 potato samples solely infected with PVY, taking into account the variability in geographical and host origins. This collection was composed of 35 PVY isolates of N-serotype and 3 of O-serotype. Seven of the 35 N-serotype isolates did not express any symptoms on tobacco cv. 'Xanthi' two weeks after mechanical inoculation, and were negative when tested by ELISA, suggesting that inoculation did not work for these isolates. These seven isolates were subsequently removed from the following analysis. The remaining 28 N-serotype PVY isolates induced vein clearing evolving into severe mosaic and vein necrosis associated with leaf deformation in tobacco leaves. One isolate of the three O-serotype isolates (AIdf51dz), induced mild mosaic and yellowing symptoms on tobacco leaves, whereas the other two (Aeh5dz, Bra33dz) induced vein necrosis and leaf deformation similar to isolates belonging to N-serotype (Table 4).

### Molecular analysis of PVY isolates

RT-PCR analyses were focused on the specific amplification of the genomic area within the 5'NTR-P1 region of potato tuber necrosis isolates (PVY<sup>NTN</sup>, PVY<sup>Z</sup>, PVY<sup>E</sup>) and on the three recombination

**Table 1** Percentages of infected and non-infected potato leaves with symptoms (Sym+) according to the geographical region and the potato cultivar of the collected samples

| Region    | Cultivar | Infected samples (%)     |                           | Non-infected samples (%) |              |
|-----------|----------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------|
|           |          | Total                    | Sym(+)                    | Total                    | Sym(+)       |
| Algiers   | Spunta   | 100 (22/22) <sup>a</sup> | 95.5 (21/22) <sup>b</sup> | 0 (0/22)                 | 0 (0/0)      |
|           | Fabula   | 92.6 (25/27)             | 92 (23/25)                | 7.4 (2/27)               | 100 (2/2)    |
| Ain Defla | Spunta   | 75.9 (41/54)             | 97.5 (40/41)              | 24.1 (13/54)             | 23.1 (3/13)  |
| Bouira    | Spunta   | 54.2 (13/24)             | 100 (13/13)               | 45.8 (11/24)             | 0 (0/11)     |
| Boumerdes | Ultra    | 100 (32/32)              | 96.8 (31/32)              | 0 (0/32)                 | 0 (0/0)      |
|           | Fabula   | 80.8 (42/52)             | 97.6 (41/42)              | 19.2 (10/52)             | 50 (5/10)    |
| Tipaza    | Spunta   | 81.1 (30/37)             | 96.6 (29/30)              | 18.9 (7/37)              | 28.6 (2/7)   |
|           | Désirée  | 92.3 (24/26)             | 91.6 (22/24)              | 7.7 (2/26)               | 0 (0/2)      |
|           | Condor   | 81.8 (9/11)              | 100 (9/9)                 | 18.2 (2/11)              | 50 (1/2)     |
| Total     |          | 83.5 (238/285)           | 96.2 (229/238)            | 16.5 (47/285)            | 27.6 (13/47) |

<sup>a</sup> Number of infected or non-infected samples/total number of collected samples

<sup>b</sup> Number of samples expressing symptom of viral disease/total number of infected or non-infected samples

**Table 2** Percentages of potato leaves infected by PVY, PLRV, PVX, PVS or PVA in single or in mixed infection

| Origin of samples | Type of infection |                |              |             |             |             |             |             |             |             |            |            |             |
|-------------------|-------------------|----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
|                   | Single            |                |              |             |             | Mixed       |             |             |             |             |            |            |             |
|                   | Cultivar          | PVY            | PLRV         | PVX         | PVS         | PVA         | PVY         | PLRV        | PVX         | PVS         | PVA        | PVS        | PVA         |
| Algiers           | Spunta            | 89.5 (17/19) a | 10.5 (2/19)  | 4.8 (1/21)  |             |             | 100 (3/3) a |             |             |             |            |            | 22/22 b     |
|                   | Fabula            | 95.2 (20/21)   |              |             |             |             |             |             | 100 (4/4)   |             |            |            | 25/27       |
| Ain Defla         | Spunta            | 83.3 (25/30)   | 16.7 (5/30)  |             |             |             | 9 (1/11)    | 27.2 (3/11) |             |             |            |            | 27.2 (3/11) |
|                   | Spunta            | 100 (13/13)    |              |             |             |             |             |             | 36.3 (4/11) |             |            |            | 41/54       |
| Boumerdes         | Ultra             | 93.1 (27/29)   | 6.9 (2/29)   |             |             |             |             |             |             |             |            |            | 13/24       |
|                   | Fabula            | 94.1 (32/34)   | 5.9 (2/34)   |             |             |             |             |             | 37.5 (3/8)  |             | 25 (2/8)   |            | 32/32       |
| Tipaza            | Spunta            | 92.6 (25/27)   |              |             | 3.7 (1/27)  | 3.7 (1/27)  |             |             | 100 (3/3)   |             |            |            | 42/52       |
|                   | Desirée           | 100 (22/22)    |              |             |             |             |             |             | 100 (3/3)   |             |            |            | 30/37       |
| Total             | Conдор            | 100 (4/4)      |              |             |             |             |             |             | 40 (2/5)    |             |            | 100 (2/2)  | 24/26       |
|                   |                   | 93 (185/199)   | 5.5 (11/199) | 0.5 (1/199) | 0.5 (1/199) | 0.5 (1/199) | 10.2 (4/39) | 15.4 (6/39) | 41 (16/39)  | 15.4 (6/39) | 5.1 (2/39) | 5.1 (2/39) | 7.7 (3/39)  |

<sup>a</sup> Number of infected plants/total number of plants infected singly or in mixed infection

<sup>b</sup> Number of infected plants/total number of collected samples

**Table 3** Serotype diversity of Algerian PVY isolates according to the geographical and host origin of samples

| Origin of samples |          | Serotype                  |             |
|-------------------|----------|---------------------------|-------------|
| Region            | Cultivar | N                         | O           |
| Algiers           | Spunta   | 82.3 (14/17) <sup>a</sup> | 17.6 (3/17) |
|                   | Fabula   | 100 (20/20)               | 0 (0/20)    |
| Ain Defla         | Spunta   | 96 (24/25)                | 4 (1/25)    |
| Bouira            | Spunta   | 84.6 (11/13)              | 15.4 (2/13) |
| Boumerdes         | Ultra    | 100 (27/27)               | 0 (0/27)    |
|                   | Fabula   | 100 (32/32)               | 0 (0/32)    |
| Tipaza            | Spunta   | 100 (25/25)               | 0 (0/25)    |
|                   | Desirée  | 100 (22/22)               | 0 (0/22)    |
|                   | Conдор   | 100 (4/4)                 | 0 (0/4)     |
| Total             |          | 96.7 (179/185)            | 3.2 (6/185) |

<sup>a</sup> Number of plants reacting positively with specific serological reagent/total PVY-infected samples

junctions RJ2, RJ3, and RJ4. This molecular characterization was performed on 31 Algerian PVY isolates corresponding to the 28 N-serotype and on 3 O-serotype isolates previously characterized biologically.

All of the 28 N-serotype isolates gave an amplification product of the expected size (815 bp) with the primer pair FR<sub>2000</sub>/F2-d targeting a nucleotide sequence polymorphism within the 5'NTR/P1 region. No amplification product was obtained with the three O-serotype isolates (Aeh5dz, Aldf51dz and Bra33dz) using these primers (Table 4).

The presence of the three recombinant junctions in HC-Pro/P3 (RJ2), VPg/NIa (RJ3) and/or in CP (RJ4) regions were also analyzed on these 31 PVY isolates. All 28 N-serotype isolates gave PCR products of 1300 bp, 700 bp and 300 bp corresponding to the expected size bands with primer pairs focusing the RJ2, RJ3 and RJ4 recombination sites, respectively (results not shown). Two of the three O-serotype isolates (Bra33dz and Aeh5dz) displayed one PCR fragment of approximately 1300 bp with the primer pair focused on the HC-Pro/P3 recombination site (RJ2), whereas neither generated amplification products matching the RJ3 and RJ4 regions. A PCR product of non-expected size was observed with the amplification of the RJ3 region of both isolates (almost 400 bp); this corresponds to a misannealing of primers. No amplification product of the RJ2, RJ3 and RJ4 regions was obtained with the third O-serotype isolate (Aldf51dz) (Table 4).

**Nucleotide sequence analysis of the recombination junctions**

The nucleotide sequence bordering each of the three known recombination junctions within the HC-Pro/P3 (RJ2), VPg/NIa (RJ3) and CP (RJ4) regions was sequenced for 10 Algerian PVY isolates (Table 5). The sequences of these three

**Table 4** Summary of biological, serological and molecular properties of the 31 Algerian PVY isolates

| Isolate |          |            |          | Serotype  | Symptoms on tobacco | Molecular typing |     |     |     | Strain designation             |   |                                |
|---------|----------|------------|----------|-----------|---------------------|------------------|-----|-----|-----|--------------------------------|---|--------------------------------|
| Number  | Acronyme | Region     | Cultivar |           |                     | 5'NTR-P1         | RJ2 | RJ3 | RJ4 |                                |   |                                |
| 1       | Adj16dz  | Algiers    | Fabula   | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 2       | Adj26dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 3       | Adj27dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 4       | Adj49dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 5       | Adj50dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 6       | Adj55dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 7       | Adj99dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 8       | Aeh1dz   | Ain edefla | Spunta   | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 9       | Aeh2dz   |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 10      | Aeh4dz   |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 11      | Aeh5dz   |            |          | O         | VN                  | –                | +   | –   | –   | PVY <sup>N-Wi</sup>            |   |                                |
| 12      | Aeh7dz   |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 13      | Aos16dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 14      | Aos29dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 15      | Aos34dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 16      | Aos51dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 17      | Aos90dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 18      | AIdf15dz |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 19      | AIdf18dz |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 20      | AIdf19dz |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 21      | AIdf51dz |            |          | O         | Mo                  | –                | –   | –   | –   | PVY <sup>O</sup>               |   |                                |
| 22      | Bra33dz  |            |          | Bouira    | Spunta              | O                | VN  | –   | +   | –                              | – | PVY <sup>N-Wi</sup>            |
| 23      | Bra34dz  |            |          |           |                     | N                | VN  | +   | +   | +                              | + | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |
| 24      | BMk59dz  |            |          | Boumerdes | Ultra               | N                | VN  | +   | +   | +                              | + | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |
| 25      | BMk60dz  | N          | VN       |           |                     | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 26      | BMk88dz  | N          | VN       |           |                     | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 27      | BMk89dz  | N          | VN       |           |                     | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 28      | Tst15dz  | Tipaza     | Spunta   | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 29      | Tst17dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 30      | Tst19dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |
| 31      | Tst50dz  |            |          | N         | VN                  | +                | +   | +   | +   | recombinant PVY <sup>NTN</sup> |   |                                |

N-/O- serotype: isolates positively detected by PVY<sup>N</sup> or PVY<sup>O</sup> monoclonal antibody, respectively. VN: symptoms of vein necrosis; Mo: mosaic. ±: presence/absence of the amplification product in specific PCR reaction. RJ2/RJ3/RJ4: recombination junctions present in HC-Pro/P3, VPg/N1a or CP regions, respectively

regions were not obtained for all isolates even when a PCR product of the expected size was generated. Several sequencing runs were carried out, but they failed and it was impossible to repeat the sequencing due to the loss of the biological material. No nucleotide sequence was obtained for the RJ3 and RJ4 regions for isolates Aeh5dz and Bra33dz, because no PCR product was generated.

In the RJ2 region, located within the nucleotides 1624 to 2458, the PVY sequences available in GenBank were divided

into four clusters taking into account the values of bootstraps greater than 80 (Fig. 2a). Cluster I mainly gathers isolates of N, NTN (NTN genotype with 3 RJ, NTN-NW genotype), Z and E strain groups; Cluster II mainly corresponds to isolates of Wi strain group; Cluster III, to isolates of NTN strain group sharing a North America-N-unknown genotype (Table 6); and Cluster IV to isolates of O strain group. In this region, Algerian PVY isolates are divided into two clusters. The majority of these isolates (Adj55dz, Aos16dz, Aos90dz,

**Table 5** Percentage of nucleotide identity in 10 Algerian PVY isolates in respect of three reference PVY isolates based on the nucleotide sequences 1624–2458, 5626–6303 and 9136–9433 corresponding to the location of the recombination junctions RJ2, RJ3 and RJ4, respectively

| Isolate |          |           | RJ2 (nt 1624–2458)* |                |                  |                  | RJ3 (nt 5626–6303) |      |      |                  | RJ4 (nt 9136–9433) |      |      |                  |
|---------|----------|-----------|---------------------|----------------|------------------|------------------|--------------------|------|------|------------------|--------------------|------|------|------------------|
| Number  | Acronyme | Origin    | O <sup>a</sup>      | N <sup>b</sup> | NTN <sup>c</sup> | Accession number | O                  | N    | NTN  | Accession number | O                  | N    | NTN  | Accession number |
| 5       | Adj50dz  | Algiers   | ~                   | ~              | ~                | ~                | 89                 | 95.8 | 99.5 | LT839606         | 96.7               | 91.5 | 99   | MF279202         |
| 6       | Adj55dz  |           | 83.7                | 98.2           | 99.4             | MF871640         | 89                 | 95.8 | 99.5 | MF871641         | 96.2               | 92.6 | 99.6 | MF871642         |
| 11      | Aeh5dz   |           | 84.9                | 98.4           | 98.9             | LT852414         | ~                  | ~    | ~    | ~                | ~                  | ~    | ~    | ~                |
| 13      | Aos16dz  |           | 84                  | 98.5           | 99.7             | LT852417         | 89                 | 95.8 | 99.5 | LT852707         | 96.2               | 92.6 | 99.6 | MF279204         |
| 15      | Aos34dz  |           | ~                   | ~              | ~                | ~                | 89.3               | 95.8 | 99.5 | LT839604         | 96.2               | 92.6 | 99.6 | MF279199         |
| 17      | Aos90dz  |           | 84.1                | 98.6           | 99.8             | LT852419         | 89                 | 95.8 | 99.5 | LT852709         | 96.6               | 92.2 | 99.3 | MF279206         |
| 22      | Bra33dz  | Bouira    | 84.6                | 98             | 98.9             | LT852412         | ~                  | ~    | ~    | ~                | ~                  | ~    | ~    | ~                |
| 23      | Bra34dz  |           | 84.3                | 98.5           | 99.7             | LT852413         | ~                  | ~    | ~    | ~                | 96.2               | 91.9 | 98.9 | MF279197         |
| 25      | BMk60dz  | Boumerdes | 84.3                | 98.4           | 99.6             | LT852416         | 89.3               | 96.1 | 99.8 | LT852706         | 96.2               | 91.9 | 98.9 | MF279202         |
| 29      | Tst17dz  | Tipaza    | 84.3                | 98.8           | 99.5             | LT852415         | 88.9               | 95.7 | 99.4 | LT839605         | 96.2               | 91.9 | 98.9 | MF279201         |

\*Numbered according to the genome of PVY<sup>N</sup>-605 isolate (Jakab et al. 1997; accession number X97895)

<sup>a</sup>Reference PVY<sup>O</sup>-139 isolate (Singh and Singh 1996; accession number U09509)

<sup>b</sup>Reference PVY<sup>N</sup>-605 isolate (Jakab et al. 1997; accession number X97895)

<sup>c</sup>Reference PVY<sup>NTN</sup>-H isolate (Thole et al. 1993; accession number M95491)

~ No nucleotide sequence was obtained

Bra34dz, BMK60dz, Tst17dz) shared identity with the highest percentage of isolates from Cluster I (98.8%) (data not shown), and the two other isolates (Bra33dz, Aeh5dz) shared the highest average nucleotide identity (98%) with isolates from Cluster II.

In the RJ3 region, corresponding to nucleotides from 5626 to 6303, reference PVY sequences were clustered into three groups (Fig. 2b). The first group corresponds to isolates of N and NTN strain groups sharing N or North America-N-unknown genotypes (Table 6). The second one mainly corresponds to isolates of NTN (NTN genotype with 3 RJ and NTN-NW genotype), Z and E strain groups; and the third group, to isolates of O and Wi strain groups. In this phylogram, all Algerian PVY isolates are gathered in Cluster II, where they displayed an average nucleotide identity of more than 99% with members of this clade (data not shown).

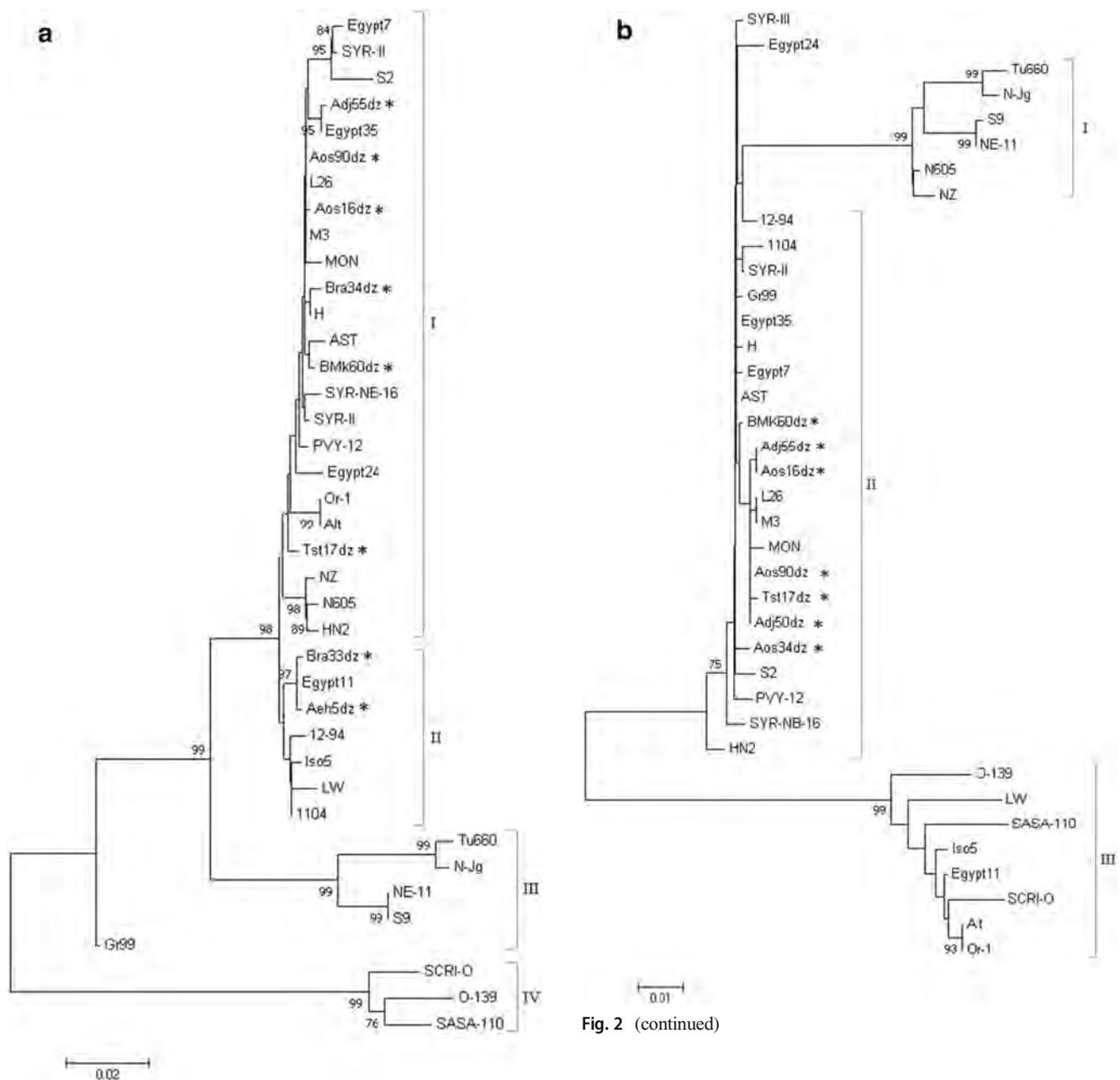
In the RJ4 region, corresponding to nucleotides from 9136 to 9433, four clusters were obtained (Fig. 2c). Cluster I corresponds to isolates of O, Wi and NTN (NTN-NW genotype) strain groups. Cluster II gathers NTN (NTN genotypes with 3 or 4 RJ), Z and E isolates; Cluster III mainly includes isolates of NTN strain group sharing North America-N-unknown genotype; and Cluster IV, to isolates of N and NTN strain groups with N or North America-N genotypes. In this region, all Algerian PVY isolates shared the highest identity (99%) with isolates from Cluster II (data not shown).

Nucleotide sequence alignments revealed that the majority of the Algerian PVY isolates displayed sequence switching in the three RJ genomic regions (Fig. 3). Indeed, in the RJ2

region, six isolates (Adj55dz, Aos16dz, Aos90dz, Bra34dz, BMk60dz, Tst17dz) showed a recombination event at nucleotide position 2414–2418, with a PVY<sup>N</sup>-type sequence downstream at this position and a PVY<sup>O</sup>-type upstream. However, in Aeh5dz and Bra33dz isolates, the genomic location of this recombination event was displaced to the nucleotides 2395–2396. For the RJ3 region, the nucleotide sequences of these isolates reverted from PVY<sup>O</sup>-type to PVY<sup>N</sup>-type on both sides of the recombination event located within the nucleotide region 5809–5816. All of the Algerian PVY isolates studied showed a third nucleotide sequence switching from a sequence of PVY<sup>N</sup>-type to PVY<sup>O</sup>-type with a recombination junction located at nucleotide 9182 for the RJ4 region.

## Discussion

For more than three decades now, a large number of studies have been carried out on PVY variability and distribution in view of the economic impact on potato production which has been widely reported in all of the potato-producing regions in the world (Valkonen 2007). With respect to the capacity of PVY isolates to reduce potato yield and the ability of some of them to induce necrosis on tubers (PTNRD), these viral infections are responsible for significant losses both in terms of yield and tuber quality (Chikh Ali et al. 2007; Piche et al. 2004; Karasev et al. 2010). In Algeria, knowledge of the variability of PVY populations present in that country was still lacking; so the main objective of our study was to report on the



**Fig. 2** Phylogenetic trees based on the sequence analyses of the nucleotides 1624–2458 (a), 5626–6303 (b) and 9136–9433 (c) corresponding to RJ2, RJ3 and RJ4 recombination junctions, respectively, of PVY genome. They were conducted with the neighbor joining statistical method and 1000 bootstrap replicates. Asterisks indicate Algerian PVY isolates sequenced in this work. Numbers at nodes indicate the bootstrap values greater than 70%. Brackets designate clades defined with bootstrap value

diversity of PVY in the different Algerian potato seed areas, and to take advantage of this work to assess the prevalence of the other most common viruses found in potatoes (PVX, PLRV, PVA, PVS).

Surveys performed from 2014 to 2016 revealed that PVY is by far the most prevalent virus in Algerian potato crops.

**Fig. 2** (continued)

Indeed, 85.3% (203/238) of infected samples (not differentiating single from mixed infections) contained PVY, whereas only 6.7% (16/238) were positively infected by PVX, 6.3% (15/238) by PLRV, 5% (12/238) by PVS and 1.2% (3/238) by PVA. Although these detection frequencies represent a state of diversity at a given time, they cover three consecutive cropping seasons and the major potato growing areas in the country. However, the specific conditions of the survey may explain the low frequency of some of the viruses. For instance, the low incidence of PVA isolates in the samples could reflect the fact that potato leaves were collected mainly from fields of cv. ‘Spunta’, identified as being resistant to PVA infection (<http://plantdepommedeterre.org>). Or it could be explained by the fact that the potato seeds were imported from

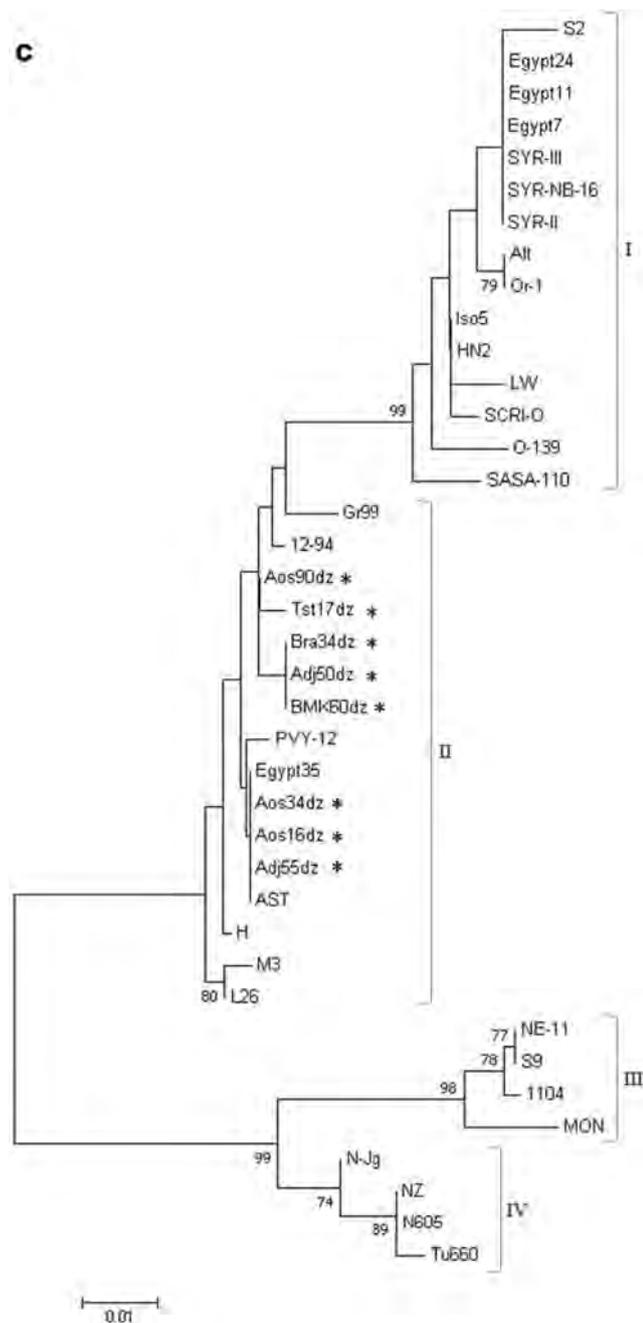


Fig. 2 (continued)

European countries where PVA infections are not frequent. However, the high prevalence of PVY and low incidence of other viruses reported in this study are also consistent with the situation previously described in Mediterranean countries such as Tunisia (Djilani-Khouadja et al. 2010), Egypt (El-Absawy et al. 2012), or Syria (Chikh Ali et al. 2006), but also in European and non-European countries (Valkonen 2007).

Our data also revealed that PVY infections were not specifically linked to a specific potato cultivar or geographical location. Indeed, PVY-positive samples were detected in all

surveyed areas and potato varieties, even those initially defined by the CNCC as non-susceptible to PVY infection on the basis of yield observations (cvs 'Fabula', 'Ultra', 'Condor'). Several hypotheses may explain this PVY prevalence. The first is the origin of seed potatoes. Although most mid-season potatoes are grown using Super Elite and Elite class seeds imported from Europe, some farmers also used non-certified or lower-grade seed tubers, which present a much higher risk of virus infection. Aphid pressure could also be one of the explanations for the widespread distribution of PVY in Algeria. Indeed, among the aphid species trapped from 2011 to 2016 in the main Algerian potato-growing regions in mid-season, *Myzus persicae* was predominant but other species were also identified, such as *Aphis nasturtii*, *Aphis frangulae*, *Macrosiphum euphorbiae* and *Brachycaudus helichrysi* (Allala-Messaoudi et al. 2016). Several studies showed that *Myzus persicae* is by far the most efficient vector for PVY transmission (Sigvald 1992; Verbeek et al. 2010), but the lower capacity of other potato aphid species does not prevent them from disseminating PVY. The presence in potato fields of weeds such as *Sanctus oleraceus*, *Convolvulus arvensis*, *Chenopodium amaranticolor*, *C. murale*, *C. album*, *Solanum nigrum*, and *Datura stramonium* (data not shown), reported to be potential reservoir plants for PVY (Edwardson and Christie 1997; Kerlan 2006; Kaliciak and Syller 2009) could also contribute to maintaining PVY infection within potato fields and to promoting its spread.

Given the high frequency of PVY in Algeria and the fact that this virus is correctly considered to be one of the 10 most damaging plant viruses (Scholthof et al. 2011), this study focused on the characterization of PVY isolates to define the diversity of strain groups and variants present in Algeria. Serological analyses showed the overwhelming prevalence of the N-serotype over the O-serotype (Table 3). This observation matches the evolution of PVY populations reported over decades in most European countries such as Spain (Blanco-Urgoiti et al. 1998), France (Kerlan et al. 1999), Belgium (Rolot and Steyer 2008), the Netherlands (Van der Vlugt et al. 2008), Switzerland (Rigotti et al. 2011) and Scotland (Lacomme et al. 2014), or in other countries such as Syria (Chikh Ali et al. 2006), Brazil (Ávila et al. 2009), South Africa (Visser and Bellstedt 2009), Tunisia (Boukhris-Bouhachem et al. 2008, 2010) and Japan (Ogawa et al. 2012; Chikh Ali et al. 2013).

The bioassay carried out on tobacco with a set of the PVY-infected samples revealed that all tested PVY of serotype-N expressed necrotic symptoms on tobacco leaves as for reference PVY<sup>N</sup> or PVY<sup>NTN</sup> isolates (Kerlan et al. 1999) (Table 4). This result precludes the absence of PVY<sup>Z</sup> and PVY<sup>E</sup> isolates, because none of the isolates expressed a serotyping-N associated with a biotyping-O as in PVY<sup>Z</sup> and PVY<sup>E</sup> isolates (Kerlan et al. 2011; Galvino-Costa et al. 2012).

**Table 6** List and details of the 31 whole PVY sequences from the GenBank database and used for the molecular analyses of Algerian PVY isolates

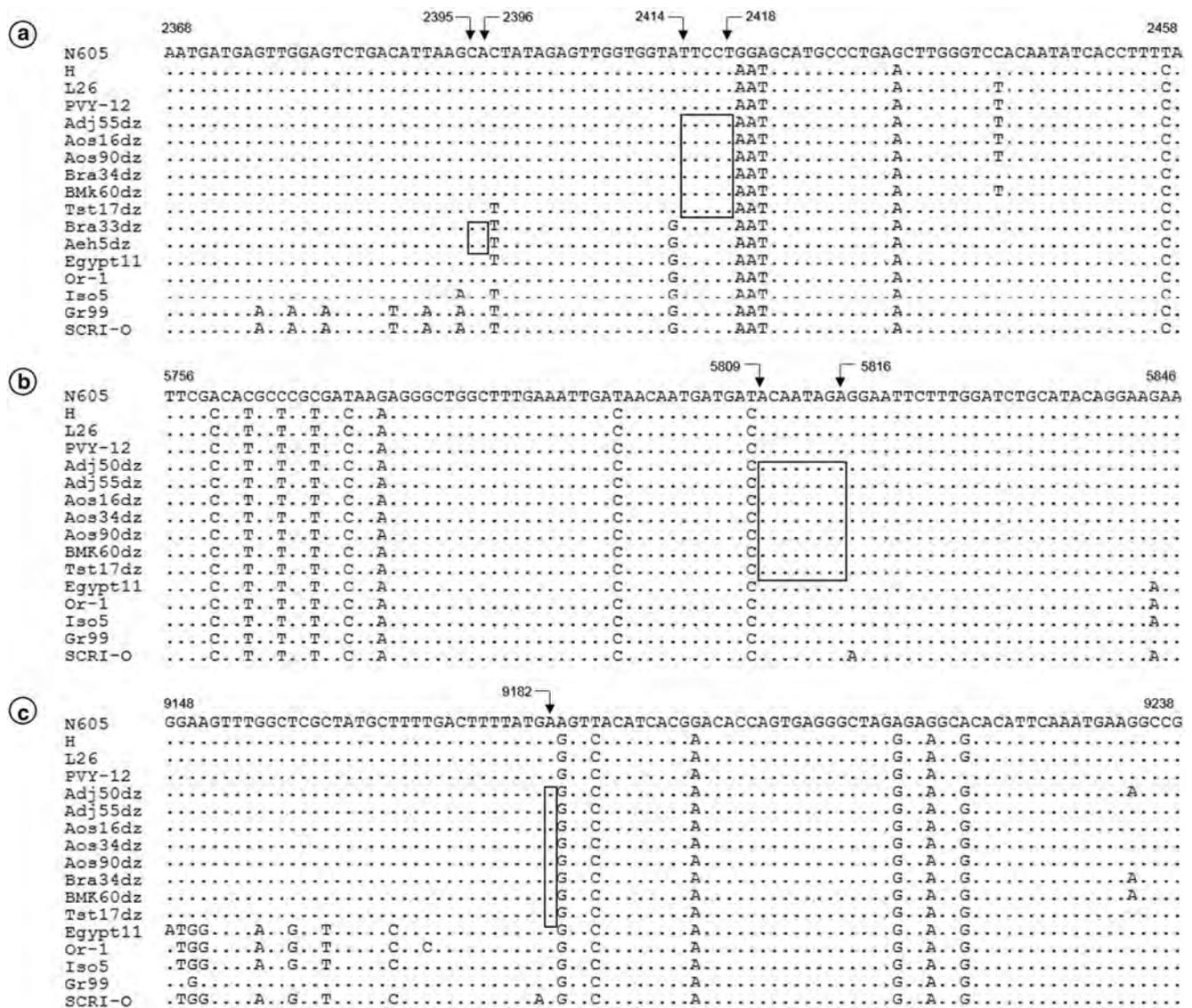
| Isolate name | Accession number | Origin       | PVY strain group | Genotype     |
|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| Alt          | AY884985         | USA          | Wi               | N:O          |
| AST          | JF928460         | Brazil       | NTN              | NTNa         |
| Egypt7       | KY863549         | Egypt        | NTN              | NTN-NW       |
| Egypt11      | KY863548         | Egypt        | Wi               | N:O          |
| Egypt24      | KY863550         | Egypt        | Wi               | N:O          |
| Egypt35      | KY863551         | Egypt        | NTN              | NTNa         |
| Gr99         | AJ890343         | Poland       | NTN              | NTNb         |
| H            | M95491           | Hungary      | NTN              | NTNa         |
| HN2          | GQ200836         | USA          | NTN              | NTN-NW       |
| Iso5         | AJ890350         | Germany      | Wi               | N-Wi         |
| Lw           | AJ890349         | Poland       | Wi               | N-Wi         |
| L26          | FJ204165         | USA          | Z                | NTNa         |
| MON          | JF928458         | Brazil       | E                | NTNa         |
| M3           | KF850513         | Mexico       | Z                | NTNa         |
| N-Jg         | AY166867         | Canada       | N                | N-NA         |
| NE-11        | DQ157180         | USA          | NTN              | N-NA-unknown |
| NZ           | AM268435         | New Zealand  | NTN              | N            |
| N605         | X97895           | Switzerland  | N                | N            |
| Or-1         | DQ157179         | USA          | Wi               | N:O          |
| O-139        | U09509           | Canada       | O                | O5           |
| PVY-12       | AB185833         | Syria        | E                | NTNb         |
| SASA-110     | AJ585195         | UK           | O                | O5           |
| SCRI-O       | AJ585196         | UK           | O                | O            |
| SYR-NB-16    | AB270705         | Syria        | NTN              | NTN-NW       |
| SYR-II       | AB461451         | Syria        | NTN              | NTN-NW       |
| SYR-III      | AB461454         | Syria        | NTN              | NTN-NW       |
| S2           | KP793715         | Saudi Arabia | NTN              | NTN-NW       |
| S9           | KP793716         | Saudi Arabia | NTN              | N-NA-unknown |
| Tu660        | AY166866         | Canada       | NTN              | N-NA         |
| 1104         | KC296436         | China        | NTN              | N-NA-unknown |
| 12-94        | AJ889866         | Poland       | NTN              | NTNb         |

One of the three serotype-O isolates (Aldf51dz) also expressed O-type symptoms and is considered to be a typical PVY<sup>O</sup> isolate. The other two (isolates Bra33dz, Aeh5dz) expressed N-symptoms on tobacco, indicating that they should correspond to PVY<sup>N-Wi</sup> isolates (Chrzanowska 1991, 1994). This hypothesis is confirmed by the molecular characterization of these isolates. Indeed, in the RJ2 region, both of these Algerian isolates are gathered in the same cluster as isolates of the Wi strain group (Iso5, Egypt11, LW) (Fig. 2a), and the analysis of the sequence alignment showed that they shared the same position of the recombinant event with the Egypt11 isolate, which is considered to be a PVY<sup>N-Wi</sup> isolate (Elwan et al. 2017).

This result is of great interest because to our knowledge, it is the first report of PVY<sup>N-Wi</sup> isolates in the North-West part of Africa. In Tunisia, some surveys were already

performed from 2002 to 2007 (Boukhris-Bouhachem et al. 2010; Djilani-Khouadja et al. 2010; Tayahi et al. 2016) and no PVY<sup>N-Wi</sup> isolates were identified. It would be interesting to carry out a new survey in Tunisia to verify the absence or presence of these isolates 10–15 years later and to find out whether PVY<sup>N-Wi</sup> isolates display a true specific geographical identity, or if these isolates have only recently emerged there.

In order to differentiate PVY<sup>NTN</sup> from PVY<sup>N</sup> isolates, numerous molecular detection assays have been reported, often based either on polymorphism in one protein (Glais et al. 1996; Boonham et al. 2002) or on sequence exchanges in the whole genome (Glais et al. 2002; Schubert et al. 2007). Our results showed that the 28 serotype- and biotype-N isolates generated PCR products of the expected size for the four analyzed genomic



**Fig. 3** Multiple nucleotide sequence alignment of Algerian PVY isolates of the nucleotide sequences 2368–2458 (a), 5756–5846 (b) and 9148–9238 (c) bordering the recombination junctions RJ2, RJ3 and RJ4, respectively. The framed area represents the genomic location of the recombination regions observed in Algerian PVY isolates. N605, H, L26, PVY-12, Egypt11, Or-1, Iso5, Gr99 and SCRI-O corresponds to the nucleotide sequences of PVY isolates of accession numbers

X97895, M95491, FJ204165, AB185833, KY863548, DQ157179, AJ890350, AJ890343, and AJ585196, respectively. All of these reference sequences, except N605 and SCRI-O, are also recombinants in RJ2, RJ3 and/or RJ4. The numbering is based on PVY<sup>N</sup>-605 sequence. “.”: denotes nucleotides which are present in all PVY sequences and are identical to those of PVY<sup>N</sup>-605 isolate

regions. Therefore, these isolates correspond to recombinant PVY<sup>NTN</sup> isolates, called Eu-PVY<sup>NTN</sup> (Weidemann and Maiss 1996) because they display N-O sequence switching in HC-Pro/P3 (RJ2), VPg/N1a (RJ3) and CP (RJ4) regions as in the reference PVY<sup>NTN</sup>-H isolate (Glais et al. 2002). The sequencing of the PCR products corresponding to RJ2, RJ3 and RJ4 of some of these Algerian PVY<sup>NTN</sup> isolates confirmed that they were recombinants, with recombination sites at exactly the same locations as in PVY<sup>NTN</sup>-H, AST, 423–3 or NIB isolates (RJ2: at nucleotide position 2414/2418; RJ3:

5809/5816; RJ4: 9182) (Glais et al. 2002; Lorenzen et al. 2006; Galvino-Costa et al. 2012). These results highlight the high prevalence of PVY<sup>NTN</sup> isolates in Algeria. Even if the analyses have not been applied to all 179 PVY isolates of serotype- and biotype- N, it is very likely that most if not all of these isolates correspond to PVY<sup>NTN</sup> isolates. This observation is interesting but not surprising, because a similar situation was already reported in a nearby country, in Tunisia (Djilani-Khouadja et al. 2010; Boukhris-Bouhachem et al. 2010; Larbi et al. 2012; Tayahi et al. 2016). On the other hand, it is much

more surprising that the diversity of PVY observed in neighboring countries, such as Jordan (Anfoka et al. 2016), Egypt (Elwan et al. 2017), Syria (Chikh Ali et al. 2010) and Saudi Arabia (Chikh Ali et al. 2016), is not also found in Algeria. Indeed, in phenograms, these Algerian isolates seem to be closer to PVY<sup>NTN</sup> isolates displaying NTN genotype with 3RJ than those with NTN-NW genotype such as Syrian or Egyptian isolates (Fig. 2). To confirm this observation, the whole genome of some Algerian PVY isolates should be sequenced.

Compared to some European countries where the incidence of PVY<sup>NTN</sup> is responsible for approximately 60% of PVY infections (Blanco-Urgoiti et al. 1998; Lindner and Billenkamp 2005; Rolland et al. 2008; Van der Vlugt et al. 2008; Bahrami Kamangar et al., 2014), the situation reported in Algeria is more critical. This could be explained by the fact that some farmers do not plant certified potato seeds and use domestic seeds, which are not subjected to the national certification scheme. Despite the high prevalence of PVY<sup>NTN</sup> isolates, no PTNRD symptoms have been reported from Algerian potato fields to date. The capacity of PVY<sup>NTN</sup> to induce tuber necrosis is notably dependent on the susceptibility of the potato cultivar in the expression of this symptom (Beczner et al. 1984). The cv. ‘Spunta’, which is widely planted in Algeria, is tolerant to this disease but is a good reservoir for PVY because it supports the multiplication of the virus, thereby promoting the spread of PVY infection to other susceptible potato cultivars susceptible to PTNRD (such as cv. ‘Nicola’) and in the landscape.

**Acknowledgements** The work presented has been supported by the Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA) of Algiers and the Centre National de Certification des plants et semences (CNCC) of Algiers and Adgen (Angers). We would like to thank Dr. Laala Samia for the excellent technical assistance provided with RT-PCR assays. We are grateful to Dr. Fekih Ibtissem, Dr. Didier Andrivon, and to Ms. Jackie Vasselon-Molloy for their careful revision of the written English.

## References

- Abdalla OA, Eraky AI, Mohamed SA, Fahmy FG (2016) Molecular identification of viruses responsible for severe symptoms on potato (*Solanum* sp.) growing in Assiut governorate (Upper Egypt). *Int J Virol Stud Res* 4:29–33
- Allala L, Deghfali N, Maamar-Sameut Y, Oumessaad L (2014) Les maladies virales de la pomme de terre en Algérie, résistance et facteurs de dissémination. Deuxième congrès international de la biodiversité, Marrakech, pp 131
- Allala-Messaoudi L, Bouznad Z, Kerkoud M, Laala S, Boukhris-Bouhachem S (2016). Biological and serological characterization of different isolates of PVY collected in different regions of Algeria. Proceedings of the 13th International Plant Virus Epidemiology Symposium, Avignon: 163
- Anfoka G, Altaleb M, Abu-Obaida M (2016) First report of *Potato virus Y* strains N-Wilga affecting potato in Jordan. *Plant Dis* 100:2176
- Ávila AC, Melo PE, Leite LR, Inoue-Nagata AK (2009) Ocorrência de vírus embatataemseteestados do Brasil. *Hortic Bras* 27:490–497
- Bahrami Kamangar S, Smaghe G, Maes M, De Jonghe K (2014) *Potato virus Y* (PVY) strains in Belgian seed potatoes and first molecular detection of the N-Wi strain. *J Plant Dis Prot* 121:10–19
- Beczner L, Horvath H, Romhanyi L, Forster H (1984) Etiology of tuber ringspot disease in potato. *Potato Res* 27:339–351
- Blancard D (2013) Les maladies virales du tabac, *Potato virus Y* (PVY). *Ephytia*:1–2 <http://ephytia.inra.fr/fr/C/10814/Tabac-Virus-Y-de-la-pomme-de-terre-PVY>
- Blanco-Urgoiti B, Tribodet M, Leclere S, Ponz F, Perez de San Roman C, Legorburu FJ, Kerlan C (1998) Characterization of *Potato potyvirus Y* (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. *Eur J Plant Pathol* 104:811–819
- Boonham N, Walsh K, Preston S, North J, Smith P, Barker I (2002) The detection of tuber necrotic isolates of *Potato virus Y*, and the accurate discrimination of PVY<sup>O</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> strains using RT-PCR. *J Virol Methods* 102:103–112
- Boukhris-Bouhachem S, Khamassy N, Glais L, Kerlan C (2008) Occurrence in Tunisia of potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD) caused by variant PVY<sup>NTN</sup> of *Potato virus Y*. *Plant Pathol* 57:388
- Boukhris-Bouhachem S, Djilani-Khouadja F, Fakhfakh H, Glais L, Tribodet M, Kerlan C (2010) Incidence and characterization of *Potato virus Y* in seed potatoes in Tunisia. *Potato Res* 53:151–166
- Chikh Ali M, Katayama K, Maoka T, Natsuaki KT (2006) The occurrence of *Potato virus Y* in Syria. *Jpn J Trop Agr* 50:23–28
- Chikh Ali M, Maoka T, Natsuaki KT (2007) The occurrence and characterization of new recombinant isolates of PVY displaying shared properties of PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup>. *J Phytopathol* 155:409–415
- Chikh Ali M, Maoka T, Natsuaki T, Natsuaki KT (2010) PVY<sup>NTN-NW</sup>, a novel recombinant strain of *Potato virus Y* predominating in potato fields in Syria. *Plant Pathol* 59:31–41
- Chikh Ali M, Karasev AV, Furutani N, Taniguchi M, Kano Y, Sato M, Natsuaki KT, Maoka T (2013) Occurrence of *Potato virus Y* strain PVY<sup>NTN</sup> in foundation seed potatoes in Japanese potato cultivars. *Plant Pathol* 62:1157–1165
- Chikh Ali M, Alruwaili H, Vander PD, Karasev AV (2016) Molecular characterization of recombinant strains of *Potato virus Y* from Saudi Arabia. *Plant Dis* 100:292–297
- Chrzanoska M (1991) New isolates of the necrotic strain of *Potato virus Y* (PVY<sup>N</sup>) found recently in Poland. *Potato Res* 34:179–182
- Chrzanoska M (1994) Differentiation of *Potato virus Y* (PVY) isolates. *Phytopathol Pol* 8:5–20
- Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34:574–586
- De Bokx JA, Huttinga H (1981) *Potato virus Y*: description of plant viruses. Commonwealth mycology institute. Association of Applied Biology, Kew
- Djilani-Khouadja F, Glais L, Tribodet M, Kerlan C, Fakhfakh H (2010) Incidence of potato viruses and characterization of *Potato virus Y* variability in late season planted potato crops in Northern Tunisia. *Eur J Plant Pathol* 126:479–488
- Edwardson JR, Christie RG (1997) Viruses infecting peppers and other solanaceous crops. University of Florida Press, Gainesville
- El-Absawy EA, Amal M, Hemeida AA, Helmy M (2012) Molecular variation of *Potato virus Y* isolated from Egypt. *Int J Virol* 8:81–89
- Elwan EA, Aleem EEA, Fattouh FA, Green KJ, Tran LT, Karasev AV (2017) Occurrence of diverse recombinant strains of *Potato virus Y* circulating in potato fields in Egypt. *Plant Dis* 101:1463–1469
- FAOSTAT (2016) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- Galvino-Costa SBF, dos Reis Figueira A, Camargos VV, Geraldino PS, Hu XJ, Nikolaev OV, Kerlan C, Karasev AV (2012) A novel type of

- Potato virus Y* recombinant genome, determined for the genetic strain PVY<sup>E</sup>. *Plant Pathol* 61:388–398
- Glais L, Kerlan C, Tribodet M, Astier-Manificier S, Robaglia C (1996) Molecular characterization of *Potato virus Y<sup>N</sup>* isolates by PCR-RFLP. *Eur J Plant Pathol* 102:655–662
- Glais L, Tribodet M, Gauthier JP, Astier-Manificier S, Robaglia C, Kerlan C (1998) RFLP mapping of ten viral isolates representative of different biological groups of *Potato virus Y*. *Arch Virol* 143:1–15
- Glais L, Tribodet M, Kerlan C (2001) Molecular detection of particular PVY isolates: PVY<sup>NTN</sup> and PVY<sup>NW</sup>. In: Dedic P (ed) Proceedings of 11th EAPR virology section meeting, Trest, Czech Republic. *Potato Research*, vol 45, p 110
- Glais L, Tribodet M, Kerlan C (2002) Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup> variants are single to multiple recombinants between PVY<sup>O</sup> and PVY<sup>N</sup> isolates. *Arch Virol* 147:363–378
- Glais L, Bellstedt DU, Lacomme C (2017) Diversity, characterisation and classification of PVY. In: Lacomme C, Glais L, Bellstedt DU, Dupuis B, Karasev AV, Jacquot E (eds) *Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management*. Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp 43–77. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5>
- Green KJ, Brown CJ, Karasev AV (2017) Genetic diversity of *Potato virus Y* (PVY): sequence analyses reveal ten novel PVY recombinant structures. *Arch Virol*. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3568-x>
- Hollings M, Brunt AA (1981) *Potyvirus* group: descriptions of plant viruses. Commonwealth Mycology Institute, Association of Applied Biology, Kew
- Jakab G, Droz E, Brigneti G, Baulcombe D, Malnoe P (1997) Infections *in vivo* and *in vitro* transcripts from a full-length cDNA clone of PVY<sup>N605</sup>, a Swiss necrotic isolate of *Potato virus Y*. *J Gen Virol* 78:3141–3145
- Jones RAC (1990) Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Ann Appl Biol* 117:93–105
- Kaliciak A, Syller J (2009) New hosts of *Potato virus Y* (PVY) among common wild plants in Europe. *Eur J Plant Pathol* 124:707–713
- Karasev AV, Nikolaeva OV, Hu X, Sielaff Z, Whitworth J, Lorenzen JH, Gray SM (2010) Serological properties of ordinary and necrotic isolates of *Potato virus Y*: a case study of PVY<sup>N</sup> misidentification. *Am J Potato Res* 87:1–9
- Kerlan C (2006) *Potato virus Y*. Descriptions of Plant Viruses, No. 414. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414>
- Kerlan C (2008) *Potato viruses*. *Encyclopaedia of Virology* 5:296–309
- Kerlan C, Moury B (2008) *Potato virus Y*. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel MHV (eds) *Encyclopaedia of virology*, 3rd edn. Elsevier, Oxford, pp 287–296
- Kerlan C, Tribodet M, Glais L, Guillet M (1999) Variability of *Potato virus Y* in potato crops in France. *J Phytopathol* 147:643–651
- Kerlan C, Meacham T, Gray SM, Karasev AV (2011) Identification of the molecular make-up of the *Potato virus Y* strain PVY<sup>Z</sup>: genetic typing of PVY<sup>Z-NTN</sup>. *Phytopathology* 101:1052–1060
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874 <http://www.kumarlab.net/publications>
- Lacomme C, Davie K, Holmes R, Pickup J (2014) PVY<sup>N</sup> prevalence in potato crops: impact of strain competition and differential ability to overcome plant resistance mechanisms. *Proceedings Crop Protection in Northern Britain*, Dundee, pp 201–206
- Lacomme C, Pickup J, Fox A, Glais L, Dupuis B, Steinger T, Rolot JL, Valkonen JPT, Kruger K, Nie X, Modic S, Mehle N, Ravnikar M, Hullé M (2017) Transmission and epidemiology of *Potato virus Y*. In: Lacomme C, Glais L, Bellstedt DU, Dupuis B, Karasev AV, Jacquot E (eds) *Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management*. Springer, Dordrecht, the Netherlands, pp 141–177. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5>
- Arbi I, Djilani-Khouadja F, Khamassy N, Fakhfakh H (2012) *Potato virus* surveys and wide spread of recombinant PVY<sup>NTN</sup> variant in Central Tunisia. *Afr J Microbiol Res* 6:2109–2115
- Lindner K, Billenkamp N (2005) Changes in the spectrum of PVY strains and strain groups: could this be a cause for the increase of virus susceptibility of potato and tobacco varieties? *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 57: 245–253
- Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P (2006) A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Dis* 90:935–940
- Lorenzen J, Nolte P, Martin D, Pasche JS, Gudmestad NC (2008) NE-11 represents a new strain variant class of *Potato virus Y*. *Arch Virol* 153:517–525
- Marchoux G, Gognalons P, Gebre-Sélassié KG (2008) *Virus des Solanacées*. Du génome viral à la protection des cultures. Editions Quae, Paris, France
- Nolte P, Whitworth JL, Thornton MK, McIntosh CS (2004) Effect of seedborne *Potato virus Y* on performance of Russet Burbank, Russet Norkotah, and Shepody potato. *Plant Dis* 88:248–252
- Ogawa T, Nakagawa A, Hataya T, Ohshima K (2012) The genetic structure of populations of *Potato virus Y* in Japan, based on the analysis of 20 full genomic sequences. *J Phytopathol* 160:661–673
- Piche LM, Singh RP, Nie X, Gudmestad NC (2004) Diversity among *Potato virus Y* isolates obtained from potatoes grown in the United States. *Phytopathology* 94:368–375
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* 73:1–16
- Rigotti S, Balmelli C, Gugerli P (2011) Census report of the *Potato virus Y* (PVY) population in Swiss seed potato production in 2003 and 2008. *Potato Res* 54:105–117
- Rolland M, Lacroix C, Blanchard A, Baldwin T, Kerlan C, Jacquot E (2008) *Potato virus Y* (PVY): from its discovery to the latest outbreaks. *Virologie* 12:261–273
- Rolot JL, Steyer S (2008) First screenings of the different PVY strains in Belgium. Report of the 13th European Association for Potato Research Virology Section Meeting, Coylumbridge, Scotland. *Potato Res* 51:204–205
- Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster GD (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* 12:938–954
- Schubert J, Fomitcheva V, Sztangret-Wisniewska J (2007) Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *J Virol Methods* 140:66–74
- Sigvald R (1992) Progress in aphid forecasting systems. *Neth J Plant Pathol* 2(Supplement):55–62
- Singh M, Singh RP (1996) Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of *Potato virus Y* (PVY<sup>O</sup>). *Can J Plant Pathol* 18:209–224
- Singh RP, Valkonen JP, Gray SM, Boonham N, Jones RA, Kerlan C, Schubert J (2008) Discussion paper: the naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch Virol* 153:1–13
- Szajko K, Strzelczyk-Żyta D, Marczewski W (2014) *Ny-1* and *Ny-2* genes conferring hypersensitive response to *Potato virus Y* (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding. *Mol Breed* 34:267–271
- Tayahi M, Gharsallh C, Khamassy N, Fakhfakh H, Djilani-Khouadja F (2016) Biological, serological and molecular

- typing of *Potato virus Y* (PVY) isolates from Tunisia. *Genet Mol Res* 15:1–17
- Thole V, Dalmay T, Burgyan J, Balazs E (1993) Cloning and sequencing of *Potato virus Y* (Hungarian genomic isolate) genomic RNA. *Gene* 123:149–156
- Valkonen J (2007) Viruses: economical losses and biotechnological potential. In: Vreugdenhil D, Bradshaw J, Gebhardt C et al (eds) *Potato biology and biotechnology: advances and perspectives*. Elsevier, Oxford, UK, pp 619–641
- Van der Vlugt RAA, Verbeek M, Cuperus C, Piron PGM, De Haan D, Van de Bovenkamp GW (2008) Strains of *Potato virus Y* in Dutch seed potato culture. *Potato Res* 51:191–192
- Verbeek M, Piron PGM, Dullemans AM, Cuperus C, Van der Vlugt RAA (2010) Determination of aphid transmission efficiencies for N, NTN and Wilga strains of *Potato virus Y*. *Ann Appl Biol* 156:39–49
- Visser JC, Bellstedt DU (2009) An assessment of molecular variability and recombination patterns in South African isolates of *Potato virus Y*. *Arch Virol* 154:1891–1900
- Weidemann HL, Maiss E (1996) Detection of the potato tuber necrotic ringspot strain of *Potato virus Y* (PVY<sup>NTN</sup>) by reverse transcription and immunocapture polymerase chain reaction. *J Plant Dis Prot* 103:337–345
- Were HK, Kabira JN, Kinyua ZM, Olubayo FM, Karinga JK, Aura J, Lees AK, Cowan GH, Torrance L (2013) Occurrence and distribution of potato pests and diseases in Kenya. *Potato Res* 56:325–342

# Résumé

---

A ce jour, des données limitées sont disponibles concernant la pression virale présente dans les champs de pomme de terre en Algérie. Durant trois campagnes agricoles consécutives de 2013 à 2016, différentes prospections ont été conduites et les inspections visuelles ont montré une grande variabilité des symptômes sur les plants de pomme de terre dans les principales régions productrices du pays. Un total de 285 échantillons de feuilles de pommes de terre a été étudié pour définir la prévalence des cinq virus les plus communs des virus : le virus Y de la pomme de terre (PVY), l'enroulement foliaire due au (PLRV) virus, virus de la pomme de terre X (PVX), le virus A de la (PVA) et virus de la pomme de terre (PVS). Les résultats ont montré une incidence plus élevée de PVY comparé aux autres virus. Deux facteurs intervenant dans l'augmentation de cette incidence ont été étudiés au niveau de la région d'Ain Defla, traditionnellement la plus productrice en semences de pomme de terre ; il s'agit des pucerons vecteurs et des plantes adventices avoisinantes de la culture de pomme de terre. Six espèces sont avérées efficaces dans la transmission *in vitro* du virus Y avec des pourcentages variables, *Myzus persicae* présente le taux le plus élevé avec une préférence pour une souche particulière de ce virus PVY<sup>NTN</sup> qui s'avère la plus dominante dans les champs de pomme de terre et qui est responsable de la nécrose annulaire des tubercules. Les adventices semblent aussi jouer un rôle important dans la conservation du virus, différentes espèces ont été identifiées et analysés par DAS-ELISA, ont révélé la présence du PVY et plus majoritairement la souche PVY<sup>N</sup> et en forte concentration chez *Solanum nigrum* et *Chenopodium* sp.

La forte incidence du PVY dans toutes les régions étudiées et sa variabilité symptomatologique, ont conduit à l'étude de la diversité des populations de PVY circulant dans nos pomme de terre et ce vu l'émergence de nouvelles souches dans le monde notamment en Tunisie, pays voisin. D'un panel de 185 échantillons, sérologiquement confirmés comme étant uniquement infectées par le PVY, 96,7 % appartiennent au sérotype-N, et seulement 3,2 % de sérotype-O. Une série de 31 isolats PVY a été analysé par le biotypage sur le tabac et par typage moléculaire (RT-PCR, séquençage), ciblant le polymorphisme de la séquence des nucléotides dans le 5'NTR/P1 région et la recombinaison au sein de la jonction de trois HC-Pro/P3 (RJ2), VPg/N1a (RJ3) et le CP (RJ4). 28/31 isolats PVY de sérotype-N induisant une nécrose des nervures sur tabac ont été identifiés comme PVY<sup>NTN</sup> recombinant. Les trois autres souches étaient du sérotype PVY-O, dont deux ont été identifiées comme PVY<sup>N-wi</sup> induisant la nécrose des nervures sur le tabac. Ce résultat est d'un grand intérêt car à notre connaissance, c'est le premier rapport du PVY<sup>N-wi</sup> isolé dans le Nord de l'Afrique.

*Mots-clés* : PVYNTN, PVYN-Wi, Solanaceae, la diversité, les isolats recombinant.