

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة

Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach, Alger



Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en science agronomique

Option : phytopathologie

Présenté par : BACHIR Adel

Etiologie de la maladie du bois strié de la vigne en Algérie

Soutenu à l'ENSA, le : 15./ 03 / 2023

devant le jury composé de :

Président : BOUREGHDA Houda

Professeur à l'ENSA

Directeur de Thèse : LEHAD Arezki

Maître de conférences à l'ENSA.

Co-Directrice de thèse : MAHFOUDHI Naïma

Professeur à l'INRAT de Tunis.

Examineurs : BICHE Mohamed

Professeur à l'ENSA

ROUAG Noureddine

Professeur à l' UFA de Sétif

YAHIAOUI Bilel

Maître de conférences à l'UFA de Sétif

Dédicace

Je dédie ce travail :

A Mes très chers parents

A Ma chère femme.

A Mes chers enfants : Safaa, Abderrahmane, Israa et Hanane.

A mes frères et sœurs

A toute la famille BACHIR

Et tous mes amis

Adel bachir

Remerciements

Avant toute ligne, toute phrase, je tiens à remercier ma directrice thèse Madame le Professeur **Mériem Louanchi Allah Yarhamha**, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis reconnaissant de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence. A Dieu nous appartenons, à Lui nous retournons.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse monsieur LEHAD A, Maître de conférences classa A à ENSA Alger. Tout au long de ce travail, il a su m'apporter un soutien constant, une disponibilité, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de ses compétences et de ses réelles qualités humaines.

Je suis très honoré à remercier Mahfoudhi N. « Professeur à l'INRAT de Tunis» pour avoir accepté d'être ma co-Directrice de thèse et pour toute son aide précieuse. Merci pour votre générosité, votre gentillesse et tout le savoir que vous m'avait transmis.

Je suis très honoré à remercier de la présence à mon jury de thèse et je tiens à remercier:

Mme. BOUREGHDA H., Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach, Alger, pour avoir accepté d'honorer la présidence de mon jury de soutenance. Qu'elle trouve dans ce travail l'expression de mon respect et de mes sincères remerciements.

Monsieur BICHE M, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-Harrach, Alger, pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse en qualité d'examineur de mon travail. Ce m'est un agréable devoir de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour cette participation.

Monsieur ROUAG N, Professeur à l'université Ferhat Abbas Setif 1, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse. Je tiens à l'assurer de ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

Monsieur YAHIAOUI B, Maître de conférences classa A, à l'université Ferhat Abbas Setif 1, pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse en qualité d'examineurs de mon travail. Ce m'est un agréable devoir de lui exprimer ma profonde reconnaissance pour cette participation.

J'ai reçu toute l'aide compétente du Dr. SELMI I. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements. Sans oublier, je tiens à remercier tout le personnel du Laboratoire de Protection des Végétaux de l'Institut National de Recherche Agronomique de Tunisie.

Mes remerciements vont également à chères amis de l'ITGC pour leurs aides et pour avoir suivi de très près l'évolution de ce travail.

Même si cette thèse est un travail personnel, je souhaite ici rendre hommage et exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation et à son aboutissement.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction	1
1.1 Origine et domestication de la vigne	3
1.2 Importances économique et socio-économique de la viticulture	4
1.3 La viticulture en Algérie	5
1.3.1 Situation actuelle de la viticulture en Algérie	5
1.3.2 Principaux cépages de vigne cultivés en Algérie	7
1.4 Les ravageurs de la vigne :	7
1.5 Cochenilles farineuses	9
1.6 Les maladies de la vigne :	10
1.6.1 Maladies fongiques :	10
1.6.2 Maladies bactériennes et à phytoplasmes	13
1.6.3 Maladies virales	14
1.7 La maladie du bois strié de la vigne	16
1.7.1 Symptomatologie	16
1.7.2 Les virus associés à la maladie du bois strié de la vigne	18
1.7.2.1. Grapevine virus A (GVA)	19
1.7.2.2. Grapevine virus B (GVB)	19
1.7.2.3. Grapevine virus D (GVD)	19
1.7.2.4. Grapevine virus E (GVE)	19
1.7.2.5. Grapevine virus F (GVF)	20
1.7.2.6 Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)	20
1.7.3 Historique de la maladie	20
1.7.4 Taxonomie	22
1.7.5 Structure et expression du génome	23
1.7.7.1 Transmission par cochenilles	25
1.7.8 Cytopathologie et interactions virus-hôte	26
1.8 Diversité génétique des virus du bois strié	27
1.9 Techniques de diagnostic	29
1.9.1. Indexage biologique sur hôtes ligneux	29
1.9.2. Méthodes sérologiques	30

1.9.3. Technique de polymerase chain reaction (PCR)	30
1.10. Moyens de lutte	31
1.10.1 La certification du matériel de multiplication de la vigne	31
1.10.2. Culture de méristème et embryogenèse somatique	32
1.10.3 Thermothérapie	32
1.10.4 Lutte contre les vecteurs.....	33
1.10.5 Lutte culturale	33
2. Matériel et méthodes	35
2.1 Prévalence des virus associés à la maladie du bois strié de la vigne en Algérie.....	35
2.1.1. Les isolats des virus GVA, GRSPaV et GVD.....	35
2.1.2. Identification des virus GVA, GRSPaV et GVD par reverse transcription-PCR	36
2.1.2.1 Extraction des acides nucléiques totaux	36
2.1.2.2 Vérification de la qualité des TNA par électrophorèse.	36
2.1.2.3. Synthèses de l'ADN complémentaire	36
2.1.2.4 Amplification du génome viral par PCR.....	37
2.2. Etude de la diversité génétique de Grapevine rupestris stem pitting-associated virus.....	39
2.2.1 Amplification du gène CP.....	39
2.2.2 Séquençage.....	39
2.2.3 Analyse bio-informatique des séquences	40
2.2.3.1 Analyse nucléotidique :.....	40
2.2.3.2 Etude phylogénétique.....	42
2.3 Inventaire des espèces des cochenilles potentiellement vectrices des virus de de la vigne	43
2.3.1 Sites d'étude :	43
2.3.1.1 Caractéristiques climatiques des régions d'étude :	45
2.3.2 Collecte et conservation des cochenilles	45
2.3.3 Identifications morphologiques des cochenilles	45
2.3.4. Identification moléculaire des cochenilles	45
2.3.4.1. Extraction des acides nucléiques.....	45
2.3.4.2. Amplification de l'ADN des cochenilles par PCR	46
3. Résultats et discussions	48
3.1 Prévalence des virus associés à la maladie du bois strié de la vigne en Algérie.....	48
3.1.1 Discussion	52
3.2 Etude de la diversité génétique du GRSPaV	54
3.2.1 Comparaison nucléotidique.....	54

3.2.2 Etude phylogénétique	56
3.2.3 Discussion	58
3.3 Inventaire des cochenilles farineuses potentiellement vectrices des virus de la vigne	60
3.3.1 Prospections	60
3.3.2. Identification morphologique	61
3.3.3. Identification moléculaire	64
3.3.4. Discussion	65
Conclusion.....	67
Référence bibliographique	70
Annexes	
Publication	
Résumé	

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux cépages de table cultivés en Algérie.	8
Tableau 2 : Les maladies fongiques de la vigne.	11
Tableau 3 : Les maladies bactériennes et a phytoplasmes de la vigne	13
Tableau 4 : les différents vignobles et nombre d'échantillons obtenus durant l'étude.....	35
Tableau 5 . Amorces utilisées pour la détection de GVA, GVD et GRSPaV	37
Tableau 6 : les isolats du GRSPaV sélectionnés pour les analyses phylogénétiques des gènes de la protéine de capsid (CP).....	39
Tableau 7 : les séquences représentatives et les séquences du GRSPaV sélectionnés pour les analyses phylogénétiques du gène de la protéine de capsid (CP).....	42
Tableau 8 : Les coordonnées géographiques des parcelles prospectés.....	44
Tableau 9 : Amorces utilisées pour la détection de <i>P. ficus</i> et <i>P. citri</i>	46
Tableau 10 : Taux d'infection des échantillons testés par les virus GRSPaV, GVA et GVD	48
Tableau11 : Taux d'infections mixtes d'échantillons de vigne par les différents virus associés à la maladie du bois strié	50
Tableau 12 : Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et les isolats représentatifs des groupes phylogénétiques du GRSPaV.	55
Tableau 13 : Pourcentage de similitude moyen au sein du groupe (%) pour le gène CP du virus GRSPaV	56
Tableau 14 : Pourcentage de similitude moyen entre groupe pour le gène CP du virus GRSPaV.	58

Liste des figures

Figure 1 : Les grands pays viticoles du monde en 2019.....	4
Figure 2 : Evolution de la superficie récoltée de raisin durant la période 1998 et 2018	6
Figure 3 : Infestation par les cochenilles farineuses <i>Planococcus</i> spp. sur tronc (a), sur feuille (b), sur racine (c) et sur grappe (d) de vigne	10
Figure 4 : Symptômes de la maladie du bois strié de la vigne	18
Figure 5 : Schéma de l'organisation du génome des genres constitutifs de la famille des <i>Betaflexiviridae</i>	22
Figure 6 : Représentation schématique du génome GVA	23
Figure 7 : Condition de polymérisation des amorces du GVA, GVD et GRSPaV	38
Figure 8 : Chromatogramme de l'isolat N°09.	40
Figure 9 : Capture de l'interface web du BLAST	41
Figure 10 : localisation des régions prospectées au Nord-ouest Algérien.	43
Figure 11 : Condition de polymérisation des amorces de <i>P. ficus</i> et <i>P. citri</i>	47
Figure 12 : Taux d'infections du bois strié dans les wilayas prospectées.	49
Figure 13 : Comparaison entre les infections simples et les infections multiples	50
Figure 14 : Prévalence de GRSPaV dans les régions prospectées	51
Figure 15 : Prévalence de GVA dans les régions prospectées.	51
Figure 16 : Arbre phylogénétique des isolats du GRSPaV	57
Figure 17 : Fourmis et masse cotonneuse de cire blanche sous l'écorce.	60
Figure 18 : Infestation du tronc, rameaux et feuilles par les cochenilles farineuses <i>Planococcus</i> spp.	62
Figure 19 : Observation sous la loupe de <i>Planococcus</i> sp.	63
Figure 20 : Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des produits de la PCR de cochenilles farineuses analysée.	64

Liste des abréviations

- *CoV* : Cordyline virus 1
- EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique
- HSP70h: *heat shock protein 70* homolog
- OIV : Organisation Internationale de la Vigne
- ORF: Open Reading Frame
- PVP: Polyvinylpyrrolidone
- RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
- CP: Coat protéine
- Kb: Kilo base
- kDa: kilo Dalton
- NLS: Dodecylsulfat-Natriumsalz
- Pb: Paire base
- Tpm: Tour par minute
- UTR: Untranslated region

Introduction

Introduction

La vigne (*Vitis vinifera* L.) est l'une des plus anciennes cultures du monde, elle joue un rôle important dans l'économie, la culture et l'histoire de nombreux pays. Selon l'organisation internationale de la vigne (2020), la production mondiale de raisins frais (raisins destinés à tous types d'utilisations) en 2019 était de 85 millions de tonnes pour une surface récoltée de 7.3 millions d'hectare.

L'Algérie par ses potentialités pédoclimatiques, constitue un habitat naturel pour la vigne. Le développement de la viticulture algérienne est lié à la situation géographique et au brassage des populations et des civilisations. Les premières traces de culture de la vigne algérienne remontent à l'antiquité, sous la domination de la Phénicie puis de l'Empire romain. Durant la période arabo-musulmane, la vinification fut réduite mais au détriment de la vigne de table (Mouats, 2003). Ensuite, pendant la période de la colonisation française, la viticulture Algérienne a connu une expansion considérable, allant jusqu'à près de 400 000 hectares de vignes de cuve dans les années 1938. L'Algérie était alors le quatrième producteur de vin après la France, l'Italie et l'Espagne et le premier exportateur de vins au monde, la France étant le principal client (Mouats, 2003). Après l'indépendance, le blocage des vins d'Algérie en France et l'absence d'un marché intérieur incita le gouvernement Algérien à reconsidérer sa politique vitivinicole. Les superficies consacrées à la vigne diminuent d'une manière importante et graduelle (Abrous, 1993). Actuellement, la viticulture algérienne constitue la quatrième culture pérenne sur le plan de superficie et représente le deuxième poste à l'exportation après les dattes. La totalité de la production algérienne est destinée au marché frais (raisin de table), alors que moins de 15% de la production viticole est destiné à la fabrication du vin (MADRAP 2019). Les productions de raisins frais en Algérie restent largement inférieures aux potentialités pédoclimatiques des régions viticoles. Plusieurs facteurs sont responsables de cette faible production, nous pouvons citer : les facteurs climatiques, techniques, phytosanitaires et surtout à l'utilisation du matériel végétal de multiplication infecté.

La maladie du bois strié est la troisième maladie virale la plus dommageable pour la viticulture, après la dégénérescence infectieuse et l'enroulement foliaire. Cette maladie est considérée comme très néfastes pour la pérennité du patrimoine viticole car les virus responsables de la maladie attaquent les organes pérennes de la vigne, provoquant à plus ou

moins long terme la mort du cep (Meng et al., 2017a). Le complexe du bois strié provoque quatre types de syndromes qui peuvent être distingués par greffage sur des indicateurs spécifiques tels que Kober 5BB, *Vitis rupestris* et LN33 (Martelli et Boudon- Padieu, 2006). Elle est causée par six virus : Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB), Grapevine virus D (GVD), Grapevine virus E (GVE), Grapevine virus F (GVF) et Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) qui appartiennent aux deux genres *Vitivirus* et *Foveavirus* de la famille *Betaflexiviridae* (Martelli et al., 2007; Meng et al., 2017a). Le matériel végétal infecté par les virus du bois strié constitue le moyen de transmission le plus efficace à courte et à longue distance. Le complexe de la maladie du bois strié est fréquemment associé à d'autres virus responsables du complexe d'enroulement viral de la vigne, et cette association est principalement due à la transmission par les cochenilles (Le Maguet et al. 2012). À ce jour, les cochenilles sont les seuls insectes identifiés comme vecteurs des virus responsables de la maladie du bois strié (Meng et al., 2017a). En effet l'absence de stratégie de lutte et de programmes de certification a joué un rôle primordial dans la dissémination des virus associés à cette maladie à travers le monde.

En Algérie peu de travaux ont été réalisés sur cette maladie, alors que toutes données sur la maladie du bois strié sont d'une grande importance pour tous les programmes nationaux d'amélioration et de protection de la viticulture. L'étude menée par Lekikot et al. (2012) sur la maladie du bois strié s'est limitée à des démarches préliminaires, consistant à évaluer la fréquence des virus GVA et GVB en Algérie en utilisant des tests ELISA. Le GVA était le plus fréquent dans cette étude avec un taux d'infection de 28%. Pour une meilleure connaissance de tous les aspects de cette maladie de la vigne, notre étude s'est fixée pour les objectifs suivants :

- Étudier la prédominance et la distribution des trois principaux virus associés à la maladie du bois strié GVA, GVD et GRSPaV dans les régions viticoles les plus importantes en Algérie.
- Étudier la diversité génétique de virus Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) en ciblant le gène de la protéine capsidiale (CP) moyennant la RT-PCR et le séquençage.
- Identification des espèces de cochenilles farineuse associées à la viticulture Algérienne et potentiellement vectrices des virus de bois strié et ce par le biais de l'identification morphologique et les techniques moléculaires.

Synthèse bibliographique

1.1 Origine et domestication de la vigne

La vigne est une plante très anciennement cultivée. Bien avant sa cultivation, la vigne sauvage était exploitée par l'Homme. La domestication de la vigne a vraisemblablement commencé au cours de la période Néolithique (5000 à 6000 ans av. JC.) lorsque l'homme se sédentarisait et développait l'agriculture dans les régions du Sud du Caucase et du croissant fertile (Mc Govern, 2003). A partir de ces régions, la viticulture va se disperser au fil des civilisations autour du bassin méditerranéen et au Moyen-Orient. Vers l'Est, en Asie, ce sont les Perses et les Phéniciens qui propageront la vigne. Vers l'Ouest, la viticulture s'implante en Egypte puis en Grèce et en Italie où les Romains la diffuseront à l'ensemble de la Méditerranée. (Mc Govern, 2003 ; Ghillean, 2005).

Le développement de la viticulture algérienne est le reflet fidèle de l'histoire de ce pays, il est lié à la situation géographique et au brassage des populations et des civilisations. Avant l'introduction de la culture de vigne, le sol algérien portait des vignes sauvages ou lambrusque appartenant toutes à l'espèce commune *Vitis vinifera* (Benabderabou, 1971 ; Mouats, 2003). Selon Birbent (2001), les premières vignes cultivées furent certainement ramenées par les phéniciens lors de l'installation des premiers comptoirs sur la côte de l'Ifriqiya et plus tard après la fondation de Carthage en 814 avant J-C. A l'instar des phéniciens, les romains et les arabes vont à leur tour enrichir les cépages par des apports successifs.

Après la reconversion à l'islam, la vinification fut réduite ainsi la culture de la vigne de cuve pâtra jusqu'à la colonisation française. Les colons français qui s'installèrent aux abords de la Mitidja eurent pour premiers réflexes d'installer une agriculture de subsistance. Les attaques du phylloxéra sur les vignobles français (1880) faisaient diminuer la superficie et la production. Cette crise favorisa alors le développement des cépages de cuve en Algérie coloniale. À cette époque, le vignoble algérien a atteint 350 000 ha pour une production annuelle de vin allant de 14 à 18 millions d'hectolitres (Aouf, 1984). En 1962, l'Algérie ayant hérité d'un vignoble colonial, a adopté une nouvelle politique viticole qui consiste à réduire la superficie viticole à moins de 50 000 hectares en éliminant les vignes de cuves pour les remplacer par d'autres cultures stratégiques et à améliorer la production des raisins de table (Belhout, 1990).

1.2 Importances économique et socio-économique de la viticulture

La vigne est l'une des cultures fruitières les plus cultivées au monde. Elle est consommée en raisin de table et en jus, mais son utilisation principale repose sur l'industrie du vin. Selon le rapport de l'OIV (2022), la superficie viticole mondiale en 2019 est de 7,3 millions d'hectare. Cinq pays représentent actuellement plus de 50% des vignobles mondiaux : L'Espagne préempte toujours la première place du classement avec 969 000 hectares de vignes, juste devant la Chine qui affiche 875 000 hectares, suivi par la France, l'Italie et la Turquie (Fig. 1). Depuis 2014, la superficie de vignoble mondial a connu une baisse constante induite notamment par la diminution de la superficie viticole en Turquie, en Iran, aux États-Unis, au Portugal et chez plusieurs pays américains. La Chine et l'Italie font l'exception, ils ont continué à augmenter la superficie de son vignoble (OIV, 2019).

La production mondiale de raisins frais (raisins destinés à tous types d'utilisation) en 2019 est de 85 millions de tonnes. Depuis 2000, la tendance de la production de raisins est en hausse avec un taux d'élévation est de 1% par an. La Chine est le premier producteur mondial avec 14,5 millions de tonnes soit 15% de la production mondiale de raisins, suivie par l'Italie, les États-Unis, l'Espagne et la France (Fig. 1) (OIV 2022).

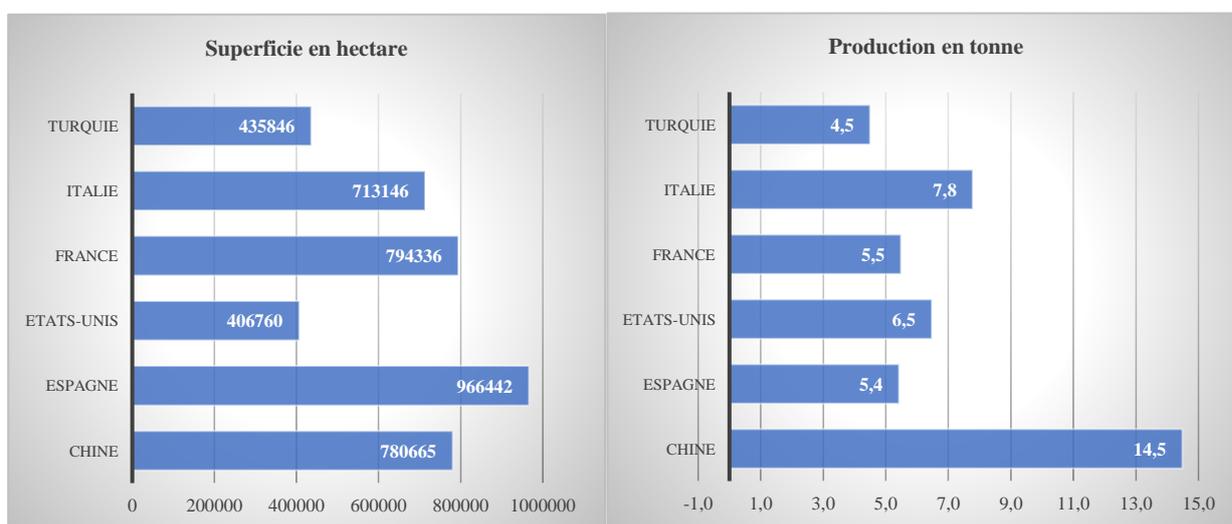


Figure 1 : Les grands pays viticoles du monde en 2019 (OIV 2022).

Selon les chiffres publiés par l'OIV (2019), l'année 2018 est une année record avec 292,3 millions d'hectolitres de vin produits. Côté consommation et échanges internationaux, le paradigme reste quasiment inchangé depuis quelques années. L'Union Européenne est le plus grand producteur de vin au monde et le plus grand exportateur mondial de produits vitivinicoles. Le secteur rapporte ainsi à l'économie de l'Union environ 15 milliards d'euros par an.

La viticulture algérienne constitue la quatrième culture pérenne sur le plan de superficie et représente le deuxième produit destiné à l'exportation après les dattes. Elle occupe une superficie de 68 649 ha et représente 19% de la SAU occupée par les plantations. Selon les statistiques du Ministère de l'Agriculture, du développement rural et de la pêche en 2019, la production de raisins frais en Algérie est de 549833 tonnes. Plus de 85,90% de la production Algérienne est destiné au marché frais (raisin de table) et sec (raisin sec), alors que 14% de la production viticole est destiné à la fabrication du vin.

Cependant, l'importance de la viticulture dans l'économie mondiale ne se mesure pas uniquement en termes financiers. Il contribue aussi de façon significative aux volets socio-économique, environnemental et culturel de la société : dans toutes les régions plantées de vignes, le secteur viticole crée des centaines de milliers d'emplois. Ces emplois touchent des secteurs très variés, comme la construction et l'entretien d'engins viticoles, les verriers, les laboratoires d'analyse œnologique, les fabricants de produits phytosanitaires, les commerciaux, les plantations et les différents travaux viticoles, les transporteurs, le marketing ou encore la communication (Baudouin, 2012).

1.3 La viticulture en Algérie

1.3.1 Situation actuelle de la viticulture en Algérie

La viticulture a connu dans les années 1980 une forte régression qui s'est traduite non seulement par la faiblesse des programmes de plantations, mais également à l'arrachage systématique de milliers d'hectares de vignes, pourtant cette culture était la locomotive de l'économie algérienne durant l'époque coloniale et les premières années de l'indépendance. (Mouats, 2003).

Dernièrement, le pouvoir public a fortement encouragé la viticulture par des actions de remodelage. Deux programmes de soutien ont été mis en place : programme national de développement agricole (PNDA) et le fonds national de régulation et de développement agricole (FNRDA). Depuis 2000, les superficies récoltées de raisin frais ne cessent d'augmenter. Elles sont passées de 51 000 hectares à 62 532 hectares en 2003/2004 et ont atteint 76 754 hectares en 2006/2007. Durant les derniers dix ans la superficie récolte de vigne a connu une régression remarquable mais reste toujours supérieure à 65 000 ha (FAOSTAT 2020).

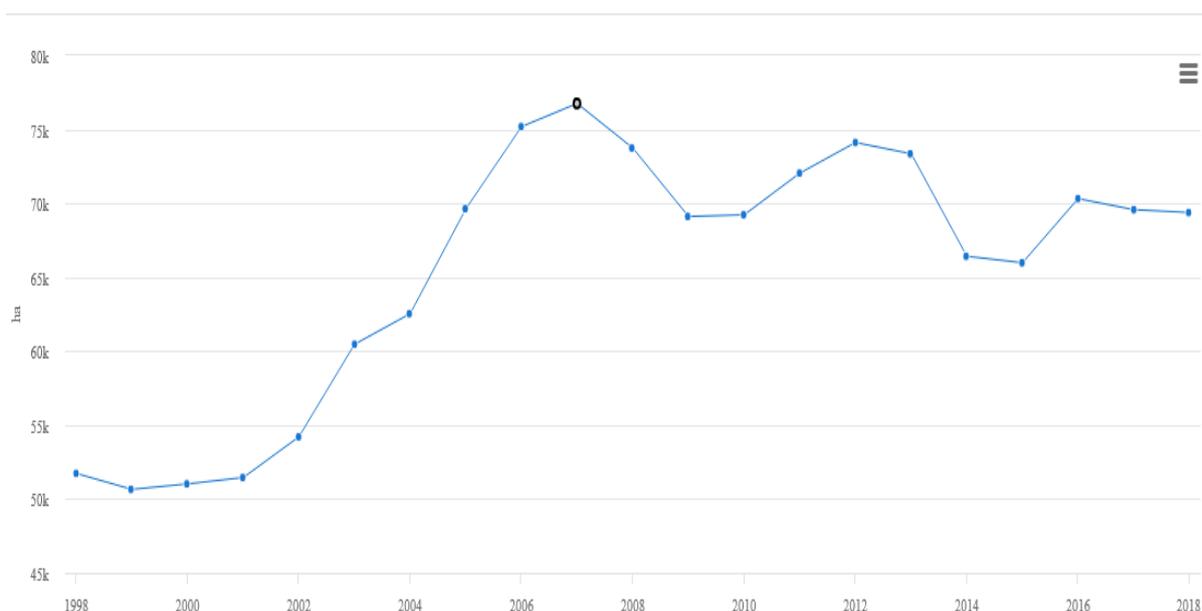


Figure 2 : Evolution de la superficie récoltée de raisin durant la période 1998 et 2018 (FAOSTAT 2020).

Actuellement, la moitié (50%) des terres viticoles est située à l'ouest ; Aïn Témouchent, Mascara, Mostaganem, Sidi Bel Abbas, Tlemcen et Oran, alors que 40% sont situées au centre Médéa, Tizi Ouzou, Boumerdes, Blida, Chlef, Tipaza, Ain Defla et Alger et 7% dans la région est Jijel, Skikda et Annaba (MADRP 2019).

Les rendements de la vigne de table n'ont cessé d'augmenter pour atteindre des rendements de 12,17 T/ha à l'inverse de la vigne de cuve qui connaît une recrudescence pour atteindre 2,27 T/ha. Ces rendements restent largement inférieurs au rendement moyen des grands pays viticoles du monde (18,8T/ha) (FAO, 2007, MADRP 2019). Plusieurs facteurs sont

responsables de ce faible rendement, parmi lesquels nous pouvons citer les facteurs techniques, l'âge avancé du vignoble algérien, l'insuffisance et l'irrégularité de la pluviométrie enregistrée au cours de ces dernières décennies et surtout les maladies qui provoquent chaque année des pertes considérables.

1.3.2 Principaux cépages de vigne cultivés en Algérie

L'Algérie par ses potentialités pédoclimatiques, constitue un habitat naturel pour la vigne. Elle est dotée d'un patrimoine viticole très diversifié constitué par les cépages de cuve, les cépages de table, les cépages destinés au séchage et un grand nombre de variétés autochtones réparties essentiellement en zone de montagnes. Ces vignes locales, malheureusement ont subi une forte régression.

La date de maturité du raisin joue un rôle économique et commercial, et permet aussi de classer les cépages en cépages précoces (maturité : Mi-juin/début juillet), cépages de saisons (maturité : Fin juillet/début novembre) et cépages tardifs (mi à fin décembre). Selon l'arrêté du Ministère de l'Agriculture (9 Ramadhan 1427 correspondants au 2 octobre 2006), 86 variétés de vignes (40 variétés vigne de table, 31 variétés vignes de cuve, variétés 5 vignes de séchage et 10 variétés pour les portes greffes) sont autorisées à la production et à la commercialisation en Algérie. Les principaux cépages de table cultivés en Algérie sont regroupés dans le tableau (1)

1.4 Les ravageurs de la vigne :

Les ravageurs de la vigne sont essentiellement des insectes et des acariens. Les plus célèbres pour ses dommages causés à la vigne sont le phylloxera et les cochenilles. Ils causent le plus souvent des dommages directs, mais certains d'entre eux sont également des vecteurs de maladies virales.

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux cépages de table cultivés en Algérie (Levadoux et al., 1971 ; ITAF, 2000).

Cépage	Couleur	Maturité	Porte-greffe	Zone de culture
Chasselas	Jaune ambré	Mi-juin début juillet	B09	Zones littorales Hivers doux et étés tempérés
Cardinal	Rose	1 ^{ère} Semaine de juillet	P 9971 B 09	Zones chaudes et bien exposées au soleil Zones littorales
Alphonse Lavallée « Gros Noir »	Noire	Fin de Juillet début aout	OS0 R997 R 11	Plaines sub Littorales Vallées intérieures
Italia	Blanche doré	Fin juillet début septembre	R99 R997 P9971	Plaines littorales et Zone de montagne Zones littorales Zone de montagne
Muscat d'Alexandrie	Jaune vert	Mi-août Mi- septembre	OS0 B09	Zones littorales
Kings Ruby	Rouge	Début août	OS0	Zones à étés chaudes et secs
Ahmerbou Amar	Rose ou rouge vif	Mi- septembre à mi- novembre	B09 P9971	Zone de montagnes
Valensi	Jaune doré	Mi- septembre à fin décembre	R997 P9971 B09	Zone de montagnes et plaines sèches

Les dégâts sont causés par un insecte hémiptère aphidien appelée "*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch". Ce puceron est originaire des États-Unis et a été introduit en Europe avec l'introduction de la vigne américaine (Reynier, 2005). L'infestation des cépages de vigne par *Daktulosphaira vitifoliae* entraîne sa mort en trois ans. Ce sont les générations radicales (les pucerons qui vivent sur les racines) de l'insecte qui sont dangereuses. Leurs piqûres sur les jeunes racines provoquent la formation de tubérosités qui par la suite s'infectent et précipitent la mort du pied (Forneck A et al., 2001). Les vignobles européens, probablement évolués sans

Phylloxéra, ont montré une grande sensibilité à l'attaque de ce nouveau ravageur, tandis que les vignes aux Etats-Unis ont une résistance naturelle efficace. Actuellement, le phylloxéra est présent dans quasiment l'intégralité du vignoble européens mais il ne fait plus de dégâts sur les systèmes racinaires des vignes greffées sur des portes greffes résistants d'origine américaine (Forneck *et al.*, 2001 et Ocete *et al.*, 2011).

Le Cochylis (*Sparganothis pilleriana*) est une espèce de lépidoptères. Sa chenille est un ravageur de la vigne, connu sous le nom de « ver de la grappe » ou de « tordeuse », était le plus gros ravageur de la vigne avant l'apparition du phylloxera. Elles s'attaquent aux bourgeons gonflés, dans lesquels elles pénètrent au moment du débourrement, puis aux feuilles et aux grappes, qu'elles trouent et ensèrent par paquets dans des fils de soie. En se nourrissant ainsi des feuilles, elles provoquent d'importants dégâts allant jusqu'à leur destruction (Reynier, 2005).

1.5 Cochenilles farineuses

Les cochenilles sont des ravageurs importants des cultures. Elles peuvent causer de sérieux problèmes dans les vignobles des régions chaudes, où plusieurs générations se succèdent au cours du cycle végétatif de la plante hôte. Selon Kozstarab (1990) les dégâts de cochenilles farineuses sont difficilement quantifiables. Toutefois, ces ravageurs sont présents sur toutes les parties de la plante que ce soit sur feuille, fruit, tronc, tige ou racine (Fig. 3). Une même espèce peut être présente, en même temps, sur différents organes de la plante, ou en fonction de son stade phénologique (Bentley *et al.*, 2002). On constate des dégâts directs dû à la spoliation de sève provoquant un dépérissement de la plante et des dégâts indirects comme les écarts de triage des fruits ou la présence de miellat ou de fumagine (Bentley *et al.*, 2002 Kozstarab, 1990). Leur capacité de transmettre les virus les rend plus dangereuses que les espèces non vectrices. Plusieurs espèces ont été identifiées comme telles : *Planococcus ficus* Signoret, *P. citri* Risso et *Phenacoccus aceris* Signoret (Hemiptera, *Pseudococcidae*).

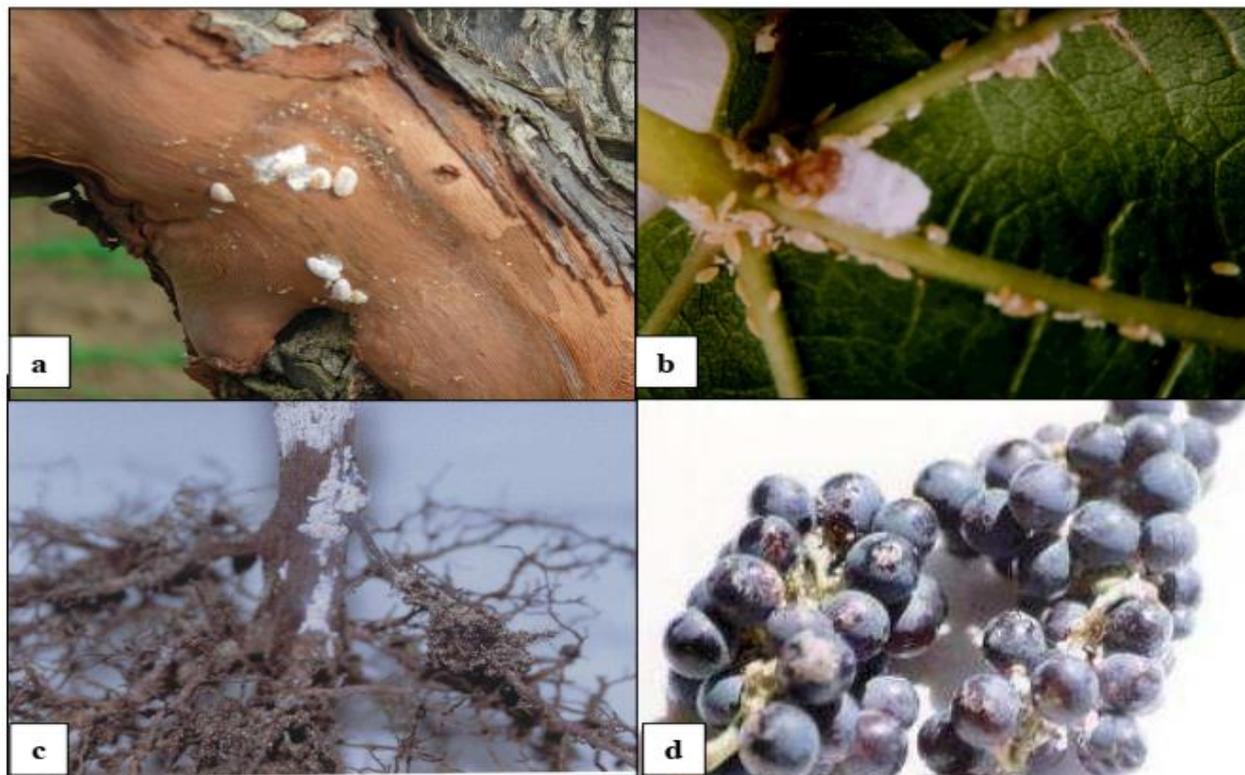


Figure 3 : Infestation par les cochenilles farineuses *Planococcus* spp. sur tronc (a), sur feuille (b), sur racine (c) et sur grappe (d) de vigne (Mahfoudhi, 2008).

1.6 Les maladies de la vigne :

La vigne est une plante sensible à une large gamme d'agents pathogènes, champignons, bactéries, virus et phytoplasmes.

1.6.1 Maladies fongiques :

La vigne est une culture sensible aux maladies. Toutefois, cette sensibilité varie en fonction des cépages. Généralement, lorsque aucun moyen de lutte n'est employé, les dégâts peuvent être considérables. Le mildiou, l'oïdium et la pourriture grise sont les maladies fongiques les plus rencontrées, causant chaque année des pertes considérables. Ces maladies constituent une menace constante pour les vignobles et font l'objet de nombreux traitements phytosanitaires (Dubos, 2002) (Tableau 2) :

Tableau 2 : Les maladies fongiques de la vigne (Dubos, 2002).

Maladies	Agents causales
Pourriture grise et pourriture noble	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.
Anthraxose	<i>Elsinoe ampelina</i> (de Bary) Shear
Oïdium	<i>Erysiphe necator</i> Schwein.
Black rot	<i>Guignardia bidwellii</i> (Ellis (en)) Viala & Ravaz,
Excoriose	<i>Phomopsis viticola</i> (Sacc.) Sacc.
Rot blanc	<i>Pilidiella diplodiella</i> (Speg.) Crous & Van Niekerk
Mildiou	<i>Plasmopara viticola</i> (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni,
Pourriture à Aspergillus	<i>Aspergillus niger</i> var. <i>niger</i> Tiegh.
	<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom
Pourriture à Cladosporium	<i>Cladosporium herbarum</i> (Pers.) Link
Pourriture à Colletotricum (Ripe rot)	<i>Colletotricum</i> spp
Pourriture à Monilia	<i>Monilinia fructigena</i> Honey
	<i>Monilia laxa</i> (Ehrenb.) Sacc. et Voglino
Pourriture à Rhizopus	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
Pourriture à Penicillium	<i>Penicillium</i> spp.
Moisissure rose	<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link
Brunissement de la rafle	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) G. Arnaud
Eutypiose	<i>Eutypalata</i> (Pers.) Tul. & C. Tul.
Champignons associés à l'esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams
	<i>Phaeo acremonium</i> (2) <i>aleophilum</i> W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai
	<i>Fomitiporia punctata</i> (P. Karst.) Murrill
	<i>Fomitiporia mediterranea</i> M. Fisch.
	<i>Stereum hirsutum</i> (Willd.) Pers.
Dépérissement à Botryosphaeria	<i>Botryosphaeria</i> spp.
Pourridié	<i>Armillaria mellea</i> (Vahl) P. Kumm.
	<i>Rosellinia necatrix</i> Berl. ex Prill.
	<i>Roesleria hypogea</i> Thum. et Pass
Pied noir	<i>Ilyonectria liriodendra</i> (Halleen, Rego & Crous) P. Chaverri & C. Salgado

1.6.1.1 Pourriture grise de la vigne : est une maladie causée par le champignon ascomycète *Botrytis cinerea* qui est connue depuis l'Antiquité. Ce champignon provoque des nécroses brunes sur les jeunes branches. Au printemps, l'attaque des feuilles se manifeste par la formation de taches brun-rouge à la périphérie des feuilles. Sur inflorescences, l'attaque commence par une nécrose sur le pédoncule qui se développe en une pourriture humide, avec exsudation d'un liquide. *B. cinerea* peut contaminer également les baies après la véraison, les grains brunissent et pourrissent en se recouvrant d'efflorescences grises (Leroux et al., 1999 et Dubos 2002).

1.6.1.2 Le mildiou de la vigne est sans aucun doute la maladie la plus répandue pour les viticulteurs. Cette maladie est provoquée par un oomycète biotrophe, *Plasmopara viticola*. C'est un parasite peut se développe sur tous les organes herbacés de la vigne, les feuilles, les vrilles ou bourgeons, les grappes et même sur mauvaise herbes (Dubos, 2002).

1.6.1.3 L'Oïdium de la vigne, est la maladie de la vigne la plus répandue dans le monde, son impact peut être considérable aussi bien en termes de rendement que de qualité. Cette maladie est causée par *Erysiphe necator*, qui peut attaquer tous les organes verts de la vigne, en particulier les jeunes baies (Galet, 1999). Le premier symptôme visible sur les feuilles c'est des petites tâches éparses, duveteuses qui se développent sur la face inférieure, puis supérieure des feuilles. Le bord du limbe s'enroule vers le haut (limbe involuté) et des tâches blanc grisâtres, poudreuses, apparaissent sur les deux faces de la feuille. Les inflorescences et les baies de raisin peuvent être gravement attaquées si les conditions environnementales sont favorables au développement de la maladie (Galet, 1977 et Dubos 2002).

1.6.1.4 Les maladies du bois de la vigne

Les maladies du bois de la vigne sont considérées très néfastes pour la pérennité du patrimoine viticole car les champignons responsables de ces maladies attaquent les organes pérennes de la vigne, provoquant à plus ou moins long terme la mort du cep (Larignon et al., 2009). Dernièrement, Esca et eutypiose, sont devenues l'objet de préoccupations majeures pour les chercheurs et la filière viti-vinicole dans plusieurs pays du monde (Bertsch et al., 2013). Berraf et al., (2011) ont identifié par des analyses moléculaires l'existence de plus de 15 espèces fongiques de l'Esca et l'eutypiose dans les vignobles algériens.

L'eutypiose est l'une des maladies récemment identifiées sur vigne. Cette maladie de dépérissement est causée par un champignon ascomycète de la famille des Diatrypacées, *Eutypalata*. Elle a été signalée dans les grands pays viticoles du monde. Son incidence et sa sévérité varient d'une région à l'autre et semblent être liée à la sensibilité du cépage et à la pluviométrie qui régit l'humectation du bois et donc la formation des périthèces (Moller et al., 1978). Les symptômes apparaissent au printemps. Cette maladie se manifeste par le rabougrissement des rameaux (entre-nœuds courts) qui présentent des feuilles nettement plus petites que la normale et chlorosées, déchiquetées avec des nécroses marginales qui peuvent se généraliser sur l'ensemble du limbe. L'inflorescences parfois érigées, coulure et millerandage.

Au niveau du bois, l'eutypiose se caractérise par la formation de tissus nécrosés très marquées et des périthèces de champignon sur le bois dénudé de son écorce.

L'esca est l'une des plus anciennes maladies de la vigne. Cette maladie est signalée dans de nombreux pays viticoles où elle provoque la destruction totale des ceps. Plusieurs champignons qui interviennent successivement pour dégrader le bois : *Phaemomoniella chlamydospora*, *Phaeocremonium aleophilum*, *Formitiporia mediterranea*, *Eutypalata* et *Stereum hirsutum*. Donc, il s'agit d'une maladie très complexe et les rôles respectifs des différents agents restent à ce jour mal connus (Larignon et Dubos, 1997, Mugnai et al., 1999). Les symptômes sur feuilles apparaissent en deux formes : La forme lente de la maladie caractérisée par des décolorations variables des feuilles, le limbe prenant une teinte jaune ou rouge sur cépages blancs, et jaune sur cépages noirs. Ces décolorations peuvent être associées par de lésions foliaires nécrotiques formant des digitations inter-nervaires à l'origine de l'aspect tigré des feuilles. Une forme foudroyante ou apoplectique à l'origine du flétrissement et du dessèchement soudain et total de toutes les feuilles des ceps malades et conduisant à leur mort. Une coupe transversale des ceps présentant des symptômes foliaires typique d'esca permet d'observer diverses lésions nécrotiques dans le bois. Cette maladie se repère par des nécroses sectorielles ou centrales présentant une zone claire et tendre (amadou) entourée d'une zone brune ou brun rose (Larignon et Dubos, 1997, Larignon et al., 2009).

1.6.2 Maladies bactériennes et à phytoplasmes

En plus des maladies causées par des champignons, la vigne subit souvent les attaques des bactéries et des phytoplasmes (Tableau 3).

Tableau 3 : Les maladies bactériennes et a phytoplasmes de la vigne (Boudon-Padieu et al., 2000)

Maladie	Agent causal
Nécrose bactérienne	<i>Xylophilus ampelinus</i> .
Crown-Gall	<i>Agrobacterium vitis</i> Ophel. et Kerr.
Crown-Gall	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Smith et Townsend) conn.
Maladie de Pierce	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>Fastidiosa</i>
Flavescence dorée	<i>Phytoplasma vitis</i> 16SrV-C IRPCM
Bois noir	<i>Bois noir phytoplasma</i> (16SrV-D)
Stolbur phytoplasma	<i>Stolbur phytoplasma</i> (16SrXII-A)
Grapevine yellows phytoplasma	<i>Grapevine yellows phytoplasma</i> (16SrV-A)

La principale maladie bactérienne de la vigne est **la maladie de Pierce** causée par *Xylella fastidiosa* (Varela et al., 2001). Cette bactérie, très polyphage, elle a été signalée sur de nombreuses espèces végétales sur le continent américain, de l'Argentine à l'Ontario (au Canada), mais aussi en Asie, et plus récemment en Italie. *X. fastidiosa* semble capable d'affecter plusieurs espèces du genre *Vitis* : *V. vinifera*, ainsi que les espèces américaines *V. labrusca* et *V. riparia*.

La flavescence dorée est une maladie de quarantaine de la vigne qui peut entraîner de graves pertes à la récolte. Cette maladie est causée par un phytoplasme localisé dans le tissu phloème de la plante. Ces phytoplasmes sont transmises par un insecte vecteur : la cicadelle *Scaphoïdeus titanus* (Hevin et al., 1978, Kuszala 1996). Les symptômes de la maladie apparaissent généralement en été. Ces symptômes présents simultanément sur un ou plusieurs rameaux. Les feuilles se durcissent, s'enroulent, deviennent cassantes et tendent à se chevaucher. Elles prennent une coloration jaune dorée dans les cultivars à raisin blanc et rouge dans les cultivars à raisin noir, sur toutes les parties les plus exposées au soleil (Pearson et Goheen 1988). Les nervures prennent une teinte jaune crème. Non aoûtement des rameaux provoquant un port retombant. Dessèchement des inflorescences ou flétrissement des baies.

1.6.3 Maladies virales

Les phytovirus présentent une véritable menace pour la pérennité des vignobles. Ces virus sont à l'origine de pertes et des dégâts considérables d'ordre quantitatif et qualitatif. A ce jour, 70 virus de la vigne ont été décrits et caractérisés dans le monde, dont environ la moitié (31 virus) sont associés aux quatre principales maladies : 12 virus responsables des maladies de dégénérescence et de dépérissement, cinq virus responsables de l'enroulement viral de la vigne. Six virus associés au complexe du bois strié et quatre virus de la marbrure de la vigne GFKV (Grapevine Fleck Virus). En revanche, sept viroïdes ont été décrits et caractérisés, dont deux seulement induisent des symptômes visibles. La plupart des vitivirus ont des génomes d'ARN monocaténaire de polarité positif ou négatif qui sont encapsulés dans des particules isométriques ou filamenteuses (Martelli, 2014a; Meng et al., 2017b).

1.6.3.1. Maladie du court-noué de la vigne (Dégénérescence infectieuse)

Le GFLV (Grapevine fanleaf virus) et L'ArMV (Arabis mosaic virus), deux virus appartenant à la famille des Secoviridae au Genre Nepovirus, sont responsables de la maladie du court-noué de la vigne, la plus anciennement connue des maladies virales de la vigne. Ces virus ont été signalé chez la plupart des pays producteur de vigne (Etienne et *al.*, 1991). L'ArMV et le GFLV provoquent les mêmes symptômes et sont transmis par des nématodes vecteurs, respectivement *Xiphinema diversicaudatum* et *Xiphinema index* (Andret-Link et *al.*, 2004; Marmonier et *al.*, 2010; Taylor, 1963). Les symptômes visibles sur le cep infecté, diffèrent en fonction des souches. Les cultivars infectés perdent progressivement leurs vigueur, ce qui conduit à la dégénérescence puis à la mort de la plante. La maladie du court-noué se caractérise par des décolorations de couleur jaune à la surface des feuilles, parfois accompagnées d'un développement anormal des nervures. Elle provoque aussi un développement anormal des entrenœuds, plus courts ou doubles (Galet, 1977, Lázár & Bisztray, 2011).

1.6.3.2. Maladie de l'enroulement foliaire de la vigne

La maladie de l'enroulement foliaire est aussi importante que le court-noué. L'impact économique de cette maladie est comparable à celle de l'infection par le GFLV, et c'est probablement la maladie virale la plus répandue dans le monde, où elle n'épargne quasiment aucun vignoble (Meng et *al.*, 2017b). Elle est causée par cinq espèces virales associées à cette maladie (le GLRaV-1, -2, -3, -4 et -7) répartie sur trois genres différents : Ampleovirus, Closterovirus et Velarivirus. La maladie est transmise par le greffage et par les cochenilles selon le mode semi-persistant (Golino et *al.*, 2002). L'expression des symptômes de l'enroulement foliaire de la vigne varie selon les types de cépages. Les feuilles infectées prennent une couleur rouge sur les cépages rouges et jaune sur cépages blancs. Le limbe foliaire s'épaissit, devient gaufré et cassant, et s'enroule vers la face inférieure. À la fin de l'été, les feuilles les plus atteintes peuvent brunir et présenter une nécrose de l'épiderme supérieur (Le Maguet et *al.*, 2012). Cependant, certains cépages blancs n'extériorisent pas de symptômes (Alabi et *al.*, 2016). La maturation des fruits est retardée et les grappes sont plus petites que la moyenne. La sévérité des symptômes peut être liée au cépage et à la combinaison greffon/porte-greffe ainsi qu'à la souche virale (Golino, 1993).

1.6.3.3. La maladie de la marbrure :

La maladie de la marbrure pendant longtemps été considérée comme une maladie due à un seul virus, le GFkV (Grapevine Fleck Virus) qui est d'ailleurs toujours appelé virus de la marbrure (Martelli et *al.*, 2002). La marbrure stricto-sensu (Fleck) se manifeste, notamment sur *Vitis rupestris* « du lot » où « Saint-Georges » qui servent d'indicateurs, par éclaircissement des nervures de troisième et quatrième ordre produisant des taches translucides localisées, qui sont mieux visibles en tenant les feuilles à la lumière. Les souches sévères induisent également divers degrés de retard de croissance (Hewitt et *al.*, 1972).

1.7 La maladie du bois strié de la vigne

C'est une maladie liée à l'altération du bois de la vigne, collectivement appelées le complexe du bois strié (Rugose wood RW), comprennent différents syndromes affectant le cylindre ligneux, les tissus du cambium et l'écorce. Les symptômes tels que le gonflement des tissus à l'union de greffe et une prolifération plus ou moins intense et la fissuration de l'écorce sont apparents principalement après le greffage (Martelli, 2014b). La maladie du bois strié de la vigne est causée par les virus : GVA, GVB, GVD, GVE, GVF et GRSPaV qui appartiennent aux deux genres *Vitivirus* et *Foveavirus* de la famille *Betaflexiviridae*.

1.7.1 Symptomatologie

Le complexe du bois strié est considéré comme très dommageables pour la pérennité du patrimoine viticole car les virus responsables de cette maladie attaquent les organes pérennes de la vigne, provoquant à plus ou moins long terme la mort du cep (Martelli, 2014b). Elles se manifestent par différents symptômes qui apparaissent soit sur le greffon, soit sur le porte-greffe, soit sur l'ensemble porte-greffe/greffon. Ces symptômes peuvent varier par des petites piqûres au niveau des tiges allant jusqu'à des cannelures profondes accompagnées de protubérances de la face cambiale de l'écorce, qui semble parfois excessivement liégeuse et spongieuse (Bonavia et *al.* 1996). Selon Martelli (1993), le complexe du bois strié est constitué de quatre syndromes qui peuvent être séparés en fonction des réponses différentielles obtenues sur un ensemble d'indicateurs, y compris *Vitis rupestris* St. George, LN 33, et Kober 5BB (*V. berlandieri* × *V. riparia*) (Fig. 4). Ces syndromes sont :

- L'écorce liègeuse (Cork ybark CB), caractérisée par un gonflement internodal et la fissuration des jeunes pousses, qui se développent quelques mois après le bourgeonnement de copeaux sur LN 33, accompagné d'un rabougrissement et d'un rainurage du bois. Les symptômes foliaires sont des taches jaunâtres et un peu de rougissement.
- Cannelures sur la tige (Kober stem grooving (KSG) caractérisé par un rainurage du bois des plantes Kober 5BB.
- Les cannelures de la tige LN 33 (LN 33 stem grooving (LNSG), caractérisé par le sillage du tronc des plantes LN 33 inoculées, mais sans la prolifération du phloème et le gonflement internodal induits par la CB.
- La piqûre de la tige de Rupestris (Rupestris stem pitting (RSP), caractérisé par des piqûres basales limitées au point d'inoculation observée chez plantes de *V. rupestris*.

Plusieurs auteurs ont signalé une association de virus GVA avec le KSG (Garau et *al.*, 1994; Chevalier et *al.*, 1995; Credi, 1997), alors que le virus GVB était fortement associé à la CB (Boscia et *al.*, 1993; Bonavia et *al.*, 1996) et GVD était soupçonnée d'être associée d'une façon ou d'une autre à la CB (Abou-Ghanem et *al.*, 1997; Boscia et *al.*, 2001). La découverte de variants moléculaires de GVE dans une vigne présentée des piqûres sur tiges et dans une vigne apparemment saine au Japon a ajouté une certaine confusion à la compréhension du rôle étiologique des virus de complexe du bois strié (Nakaune et *al.*, 2008).

La sévérité de la maladie augmente si l'on trouve sur un même cep une infection mixte de plusieurs virus. Les essais de Rosa et *al.*, (2011) ont révélé que l'infection mixte des trois virus GVB, GVD et GRSPaV a provoqué une réduction remarquable du diamètre du tronc. Les travaux de Walter et Martelli (1996) ont montré que l'influence des conditions climatiques joue un rôle primordial dans l'expression des symptômes. En effet, dans un climat chaud, la maladie peut entraîner la mort du cep, alors que dans les climats froids, les symptômes sont souvent presque négligeables.



Figure 4: Symptômes de la maladie du bois strié de la vigne (Martelli, 2014b et Meng et *al.*, 2017b)

(A et F) Corky bark symptoms on LN33, (B) Kober Stem Grooving (KSG), (C) LN 33 stem grooving (LNSG), (D) Rupestris Stem Pitting Disease.

1.7.2 Les virus associés à la maladie du bois strié de la vigne

La maladie du bois strié de la vigne est causée par six virus appartenant à la famille des *Betaflexiviridae* et sont répartis dans deux genres. GVA, GVB, GVD, GVE et GVF ont été placés dans le genre des *Vitivirus*, cependant le GRSPaV a été assigné au genre des *Foveavirus* (Martelli, 2014b).

1.7.2.1. Grapevine virus A (GVA)

Le Grapevine virus A (GVA) est l'espèce type du genre *Vitivirus*, est l'agent responsable de la cannelure sur la tige de l'indicateur Kober 5BB (Garau et al., 1994). Il a été identifié pour la première fois au cours des années 1980 (Conti et al., 1980). Il est constitué de particules filamenteuses et allongées de 800 nm de longueur (Roscliglione et al., 1983 ; Tanne et al., 1989 ; Minafra et al., 1997). L'information génétique est portée par un ARN simple brin à polarité positive composé d'environ 7351 nucléotides (Minafra et al., 1997).

1.7.2.2. Grapevine virus B (GVB)

Le Grapevine virus B(GVB) appartient au genre *Vitivirus*, il induit sur l'indicateur LN33 des gonflements internodaux et la fissuration des jeunes pousses (Bonavia et al., 1996, Martelli, 2014b). Il a été identifié pour la première fois en 1993 (Boscia et al., 1993). Ce virus est composé par des particules filamenteuses de 800 nm de longueur. L'information génétique est portée par un ARN simple brin de polarité positive compose d'environ 7599 nucléotides (Saldarelli et al., 1996 ; Goszcynski, 2015).

1.7.2.3. Grapevine virus D (GVD)

Le Grapevine virus D(GVD)appartient au genre *Vitivirus* de la famille des *Betaflexiviridae*. Le GVD a été identifié pour la première fois au sud de l'Italie sur des vignes montrant des symptômes du bois strié. Le rôle du GVD dans l'étiologie de la maladie du bois strié demeure peu connu alors qu'il possède un effet important sur la réduction de la croissance des ceps atteints (Abou-Ghanem et al., 1997). Il est constitué de particules virales filamenteuses de 825 nm de longueur et 12 nm de diamètre. La taille partielle de son génome (ARN simple brin) est d'environ de 7479 nucléotides (Meng et al., 2017a).

1.7.2.4. Grapevine virus E (GVE)

Le Grapevine virus E appartient au genre *Vitivirus* de la famille des *Betaflexiviridae*. Il a été identifié pour la première fois au Japon à partir de vigne montrant des symptômes de la maladie du bois strié (Nakaune et al., 2008). Son information génétique est portée par un ARN simple brin de polarité positive ayant une taille de 7564 nucléotides. Le rôle du GVE dans l'extériorisation des symptômes du bois strié reste encore inconnu alors qu'il participe dans le rabougrissement des ceps dans des cas des infections mixtes(Nakaune et al., 2008).

1.7.2.5. Grapevine virus F (GVF)

Le Grapevine virus F (GVF) appartient au genre *Vitivirus* de la famille des *Betaflexiviridae*. Le rôle de GVF dans l'étiologie de la maladie du bois strié demeure peu connu alors qu'il a été isolé à partir d'échantillons de vignes présentant des symptômes d'incompatibilité au greffage (Al Rwahnih *et al.*, 2012). Son information génétique est portée par un ARN simple brin de polarité positive ayant une taille de 7551 nucléotides (Al Rwahnih *et al.*, 2012)

1.7.2.6 Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)

Le Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) appartient au genre *Foveavirus* de la famille des *Betaflexiviridae* (Meng *et al.*, 2006). Il induit sur l'indicateur *V. rupestris* des piqûres basales limitées au point d'inoculation (Meng *et al.*, 1998). Le GRSPaV est constitué de particules filamenteuses, en forme de bâtonnets ayant une longueur de 723 nm (Zhang *et al.*, 1998). Son information génétique est portée par un ARN simple brin de polarité positive ayant une taille de 8725 nucléotides (Zhang *et al.*, 1998).

Le GRSPaV est associé aussi aux deux autres syndromes sur vigne : Grapevine vein necrosis (GVN) (provoque des nécroses sur la face inférieure des feuilles et au niveau des vrilles avec le dépérissement des jeunes pousses vertes) (Martelli, 1993 ; Bouyahia *et al.*, 2006) et Syrah decline (SD) (provoque le rougissement foliaire et le gonflement du point de greffe avec l'apparition des nécroses) (Lima *et al.*, 2006 ; Beuve *et al.*, 2013).

1.7.3 Historique de la maladie

Pendant des millions d'années, les virus ont co-évolué avec leurs hôtes sauvages. Ce processus évolutif progressif a permis aux virus de s'adapter de façon très fine aux évolutions de leurs hôtes, en intégrant les aspects les plus complexes de leur biologie (Cooper & Jones, 2006). La sélection de cépages de vignes plus résistantes aux maladies et mieux adaptées aux changements climatiques a profondément perturbé cette coévolution, en modifiant les relations entre les variétés cultivées, les virus et leurs vecteurs, qui ont dû s'adapter aux nouvelles conditions et aux changements des pratiques culturales de plus en plus sophistiquées ((Meng *et al.*, 2017b). Selon Martelli *et al.*, (1994) l'utilisation des porte-greffes américaine pour lutter contre la propagation du phylloxéra était probablement la cause principale de l'émergence de maladies du bois strié dans les vignobles européens. Cependant, il y a aussi des preuves qui

indiquent que le bois strié est une maladie du vieux monde (Meng et al., 2017b). Des travaux de recherche d'Hewitt ont révélé des altérations du bois en Californie où la maladie virale de l'écorce liègeuse a été décrite pour la première fois (Hewitt et Neja, 1971). Ensuite, en Italie les symptômes des piqûres et les cannelures ont été extériorisés chez les cépages greffés sur le porte-greffe legnoriccio (Graniti et Martelli 1965). En Californie, une autre altération du cambium a été décrite sous le nom de l'écorce de liège par Beukman et Goheen. Cette altération est apparue chez les cépages greffés par le indicateur LN33 (Couderc 1613 × Thompson Seedless) (Meng et al., 2017b).

Au cours des dernières décennies, des scénarios de maladies anecdotiques ont été amenés à l'ère de l'identification et de la caractérisation des virus associés aux symptômes du bois strié (Martelli, 2014b). Cela a été possible grâce à l'utilisation des indicateurs (*V. rupestris*, LN33 et Kober 5BB) qui peuvent être utilisés pour différencier les différents syndromes de type viral (Garau et al., 1994; Martelli 1993). La microscopie électronique a révélé la présence de particules virales allongées, limitées par le phloème, dans de minces sections de tissus de la vigne affectés par le bois strié ou l'enroulement des feuilles (Martelli 1993 ; Scagliusi et al., 2002). Plusieurs études portant sur la caractérisation du virus du bois strié de la vigne ont été menées. Cependant, il s'est avéré que cette maladie est causée par plusieurs virus appartenant à la famille des Betaflexiviridae (Meng et al., 2017b). Conti et coll. (1980) ont inoculé mécaniquement des plantules de *Nicotiana benthamiana* par un virus filamenteux issu de sève d'une vigne présentant des symptômes sous forme des piqûres au niveau des tiges. Ce virus a été nommé par la suite Grapevine virus A (GVA). Deux autres virus, le Grapevine virus B (GVB ; Boscia et al., 1993) et le Grapevine virus D (GVD, Bonavia et al. 1996 ; Abou-Ghanem et al. 1997), ont été transmises mécaniquement à *Nicotiana* et caractérisées.

De nouveaux outils ont été mis au point pour étudier la manière dont les virus associés aux bois striés et leur plante hôte interagissent pour produire une les symptômes. Les génomes complets de GVA et le GVB ont été clonés, et il a été démontré que leurs transcrits synthétisés in vitro ou leurs clones d'ADNc sous des promoteurs eucaryotes étaient infectieux chez les hôtes herbacés et la vigne (Galiakparov et al., 1999; Moskovitz et al., 2008; Saldarelli et al., 2000). Ainsi, il est devenu possible de remplir les postulats de Koch et de déterminer le rôle de ces virus dans la cause des syndromes associés au complexe RW - seuls ou en combinaison avec d'autres virus (Meng et al., 2017b).

1.7.4 Taxonomie

Les virus du bois strié GVA et GVB ont été classés initialement selon leur forme comme des virus appartenant à la famille *Closteroviridae* au genre *clostérovirus*. Cependant, le séquençage des deux virus GVA et le GVB a révélé que l'organisation génomique de ces virus différait de celle des autres membres de genre *clostérovirus* (Martelli et al., 1997). Adams et al., (2004) ont proposé la création d'une nouvelle famille des *Flexiviridae* qui regroupe les virus qui partagent essentiellement la même taille, la même organisation du génome et une protéine de réplication variant de 150-250 kDa. Par la suite la famille des *Flexiviridae* a été divisée par les analyses phylogéniques en trois nouvelles familles au sein de l'ordre des Tymovirales : les *Alpha-*, *Beta-* et *Gamma-flexiviridae* (Martelli et al., 2007). La famille *Betaflexiviridae* renferme uniquement les virus de plantes avec un génome polyadénylé ssARN+ monopartite (6,5-9,5 kb) et des virions flexibles et filamenteux. Il existe actuellement 7 genres qui se distinguent principalement par la phylogénie de la réplicase, le nombre et la disposition des gènes (Fig. 5) (Adams et Kreuze, 2015). Actuellement, six virus différents ont été identifiés comme associés au bois strié de la vigne qui appartiennent aux deux genres *Vitivirus* (GVA, GVB, GVD, GVE et GVF) et *Foveavirus* (GRSPaV) de la famille *Betaflexiviridae* (Martelli, 2014b).

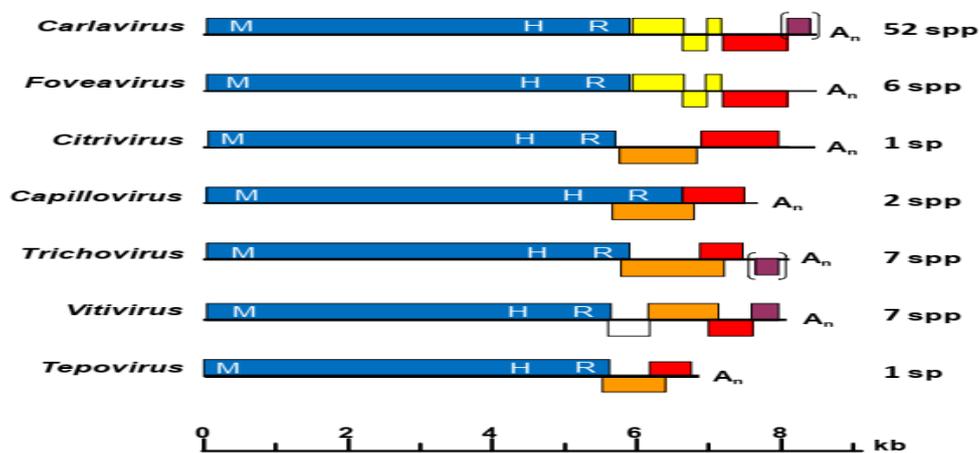


Figure 5 : Schéma de l'organisation du génome des genres constitutifs de la famille des *Betaflexiviridae* (Adams et Kreuze, 2015).

Les blocs représentent les cadres de lecture ouverts (ORF) prévus. Les protéines de réplicase sont représentées dans des protéines de mouvement bleues de type "30K" en orange, des protéines à triple bloc génétique (TGB) en jaune, des protéines de revêtement en rouge et des protéines de liaison à l'ARN en violet. Les autres ORF sont blancs. Les domaines méthyltransférase (M), hélicase (H) et ARN polymérase (R) ARN-dépendante de la réplicase sont également présentés. Les crochets indiquent les ORF qui manquent à certains membres du genre.

1.7.5 Structure et expression du génome

Le génome des *vitivirus* est ARN monocaténaire à polarité positive, d'une longueur variante de 7,4 à 7,6 kb qui est encapsidé par des particules virales flexibles. La particule virale a une longueur variant entre 700 à 850 nm et un diamètre de 12 nm. (Adams et Kreuze, 2015; Martelli *et al.*, 2007). Le séquençage des deux virus GVA et GVB ont révélé la présence de cinq cadres de lecture ouverts (ORF) distincts, dont les courts fragments se chevauchent souvent (Saldarelli *et al.*, 1996 ; Minafra *et al.*, 1997). Chez le GVA, l'espèce type du genre *Vitivirus*, les régions non traduites (UTR) 5' et 3' ont une taille de 86 et 68 nt, respectivement. Les génomes des ARN GVA et GVB possèdent un signal de polyadénylation (AAUAAA) situé dans l'UTR 3', en amont de la queue poly-A (Fig. 6).

Le gène le plus important, ORF1, couvre 5124 nt codant pour 1707 acides aminés, avec une taille de protéine de 195,5 kDa. Chez les *Vitivirus*, les produits de traduction de l'ORF1 comprennent un ensemble des protéines responsable de l'architecture générale et la répllication des virus. Les protéines identifiées sont : méthyltransférase, hélicase et ARN polymérase ARN-dépendante (Martelli *et al.* 2007). Une seconde caractéristique de l'ORF1 est la présence d'un domaine AlkB en amont de l'hélicase (à l'exception de GVE qu'est incorporé à l'intérieur du domaine de l'hélicase). Le rôle de ce domaine est inconnu or que *in vitro*, il active la réparation de l'ADN alkylé dans de nombreux systèmes cellulaires (Alabi *et al.* 2013) (Bratlie et Drabløs 2005). Meng *et al.*, (2017c) ont admis l'hypothèse que le domaine AlkB est le responsable de la réparation enzymatique de l'ARN viral dans la sève du phloème.

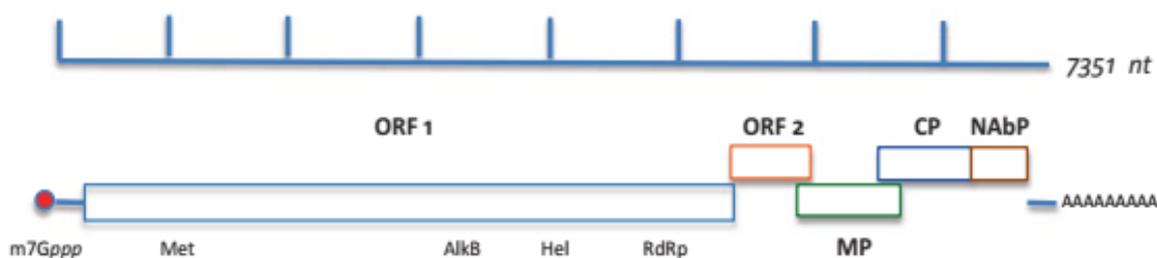


Figure 6 : Représentation schématique du génome GVA (Meng *et al.*, 2017a).

ORF : Les cadres de lecture ouverts (1-5). **Met** méthyltransférase, **AlkB** : domaine AlkB, **Hel** : hélicase, **RdRp** : ARN polymérase ARN dépendante, **MP** : protéine de mouvement, **CP** : protéine de revêtement, **NabP** : protéine de liaison à l'acide nucléique. La queue poly-A est indiquée en 3'. Le point rouge représente le capuchon méthyl-7-guanosine à l'extrémité 5'.

Le deuxième cadre de lecture ouvert (ORF2) est présent uniquement chez les virus qui appartiennent au genre *Vitivirus*. Il code un polypeptide de 19,8 k Da de taille. Les essais de Galiakparov et *al.*, (2003) sur plantes de tabac ont montré que les produits de la traduction de l'ORF2 n'interviennent pas dans le processus de réplication *Vitivirus*. Ils ont donné l'hypothèse que l'ORF2 peut jouer un rôle dans la transmission du virus par les insectes vecteurs ou une fonction spécifique lors de l'infection.

Les deux cadre ORF3 et ORF4 codent pour une protéine de mouvement (MP) et protéine capsidiale CP. La protéine de mouvement du virus, MP ou K30, est capable de moduler la taille d'exclusion limite des plasmodesmes. Elle a aussi la capacité de s'associer aux ARN monocaténaire simple brin du virus pour former un complexe nucléo-protéinique dont les dimensions sont compatibles avec une translocation au travers des plasmodesmes. Galiakparov et *al.*, (2003) ont montrés qu'en l'absence de CP, le mouvement du virus est limité, ce qui indique que la MP n'est pas le seul déterminant de la propagation du virus au sein de l'hôte.

L'ORF5 code pour une petite protéine de liaison à l'ARN 10 kDa (p10, 90 aa). Cette protéine contient un motif basique riche en arginine et un domaine typique à doigt de zinc (Galiakparov et *al.* 2003c). Bien que les mutations de l'ORF5 n'aient pas affecté la réplication globale de l'ARN viral dans les protoplastes de tabac, ces virus mutants ont causé une infection sans symptôme et une réduction marquée de l'accumulation de MP dans les plantes infectées de *N. benthamiana* (Galiakparov et *al.* 2003c).

1.7.6 Distribution géographique de la maladie du bois strié dans le monde

La maladie du bois strié de la vigne est l'une des principales maladies affectant la vigne à travers le monde. Cette maladie est actuellement la plus dominante dans les vignobles, et considérée comme la maladie d'importance économique dans plusieurs pays, en particulier en Tunisie (Selmi et *al.*, 2017) Afrique du Sud (Jooste et *al.*, 2015), le Portugal (Digiario et *al.*, 1999), en Espagne (Fiore et *al.*, 2016), en Italie (Digiario et *al.*, 1999), au Kosovo (Dida et *al.*, 2012) et récemment en Russie (Dimitrenko et *al.* 2016) et Corée du sud (Jo et *al.* 2017). Les virus du bois strie semble capable d'infecter plusieurs espèces du genre *Vitis* : *V. vinifera*, ainsi que les espèces américaines *V. labrusca* et *V. riparia* (Pacifico et *al.*, 2016; Selmi et *al.*, 2017).

1.7.7 Transmission des virus associée à la maladie du bois strié de la vigne

Les virus du complexe du bois strié et comme la plupart des virus de la vigne se propagent par deux voies de transmission : transmission par multiplication de matériel végétal infecté et par un organisme vecteur

1.7.7.1 Transmission par multiplication de matériel végétal infecté

Le matériel végétal infecté par les virus du bois strié constitue le moyen de transmission le plus efficace à courte et à longue distance. Martelli (1993) rapporte que la multiplication végétative des rameaux ou des sarments prélevés à partir des variétés de vignes infectées par les virus du bois strié joue un rôle important dans l'émergence et la propagation de la maladie du bois strié dans les vignobles européens. Cependant, les virus GVA, GVB et le GVD peuvent être transmis mécaniquement chez plusieurs plantes herbacées (essentiellement *Nicotiana* sp.). Ce type de transmission est difficile en raison de la faible concentration de virus et à la présence des inhibiteurs dans la sève de la vigne (Monette et al., 1992).

1.7.7.1 Transmission par cochenilles

Le complexe du bois strié est souvent associé à d'autres virus responsables du complexe de l'enroulement viral de la vigne (GLRaV-1 et le GLRaV-3). Cette association est liée principalement aux transmissions par cochenilles (Le Maguet et al., 2012). En 1983, les cochenilles infectées par les deux virus GVA et du GLRaV3 a provoqué sous serre une propagation de l'écorce liègeuse (CB) et l'enroulement foliaire de la vigne. Par la suite de cet événement, Rosciglione et al., (1983) ont décrit pour la première fois que la transmission de GVA est assurée par *Pseudococcus longispinus*. Par la suite, les études de transmission de la maladie du bois strié ont permis d'identifier plusieurs espèces de cochenilles, qui sont impliquées dans la transmission des virus GVA, GVB et le GVE. Ces cochenilles appartiennent aux deux familles *Pseudococcidae* et *Coccidae*, où le stade mobile L1 est le plus efficace en termes de véction. On sait actuellement que le virus GVA est transmis par : *Heliococcus bohemicus*, *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus comstocki*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus affinis*, *Parthenolecanium corni*, *Neopolvinaria innumerabilis* et *Phenacoccus aceris* (Engelbrecht et Kasdorf, 1990; Garau et al., 1995; Goszczynski et Jooste, 2003; Goszczynski et Jooste, 2003b; Nakan, et al., 2003; Zorloni et al., 2006; Hommay et al., 2008; Le Maguet et al. 2012). Le GVB est transmis par *Planococcus citri*, *Planococcus ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *Pseudococcus affinis* et *Phenacoccus aceris* (Boscia et al., 1993;

Tanne et *al.*, 1993 ; Garau et *al.*, 1995; Le Maguet et *al.*, 2012). Alors que *Pseudococcus comstocki* est le seul vecteur décrit pour le GVE (Nakaune et *al.*, 2008). Jusqu'à présent, aucun vecteur n'a été identifié pour les autres virus associés au complexe du bois strié (GVD, GVF et GRSPaV).

1.7.8 Cytopathologie et interactions virus-hôte

Les modifications cellulaires induites par les vitivirus ont été largement étudiées, principalement chez les hôtes herbacés. Faoro (1997) a indiqué que l'utilisation de plantules cultivées *in vitro* est le seul moyen efficace d'étudier les altérations de la vigne causées par les vitivirus, puisque la probabilité d'observer des cellules infectées est encore plus faible que la probabilité d'observer des Closteroviridae dans les tissus prélevés sur le terrain.

Les virus du bois strié induit une cytopathologie similaire chez les espèces de *Nicotiana*. Chez ces plantes, ils ne sont pas limités au phloème, mais se multiplient également dans le xylème et le mésophylle. Dans le mésophylle, ils forment des agrégats rubanés. La structure et l'aspect extérieur des principaux organites des cellules infectées étaient apparemment normaux. Les particules virales sont apparues sous forme de filaments, qui étaient dispersés ou agrégés en petits faisceaux (Roscliglione et *al.* 1983 ; Monette et Godkin 1992 ; Castellano et *al.* 1995).

En revanche, dans les faisceaux vasculaires (tubes criblés, cellules compagnes ou cellules de bordure des veines), les agrégats viraux étaient plus gros. Boscia et *al.* (1997) rapportent que les principales caractéristiques cytopathologiques communes aux trois vitivirus GVA, GVB et GVD sont les suivantes :

- Des agrégats de particules virales de taille variable, qui forment des faisceaux, des verticilles, des corps en bande et des couches empilées qui peuvent parfois remplir toute la lumière cellulaire ;
- Un épaissement de la paroi cellulaire d'extension variable provenant du dépôt de substances semblables à la callose ;
- La prolifération et l'accumulation de membranes cytoplasmiques ;
- Des invaginations vésiculaires du tonoplaste qui font saillie dans la vacuole et contiennent un matériel fibrillaire qui ressemble à de l'ARN.

Les relations moléculaires entre les mécanismes de réplication du virus et les facteurs épigénétiques de la vigne ont été élucidées en évaluant les informations expérimentales et l'annotation du génome de la vigne (Jaillon et al. 2007 ; Velasco et al. 2007). L'expression artificielle ectopique de protéines virales nous a permis de comprendre leur localisation et leur interaction avec la fonction cellulaire. Haviv et al. (2012) ont observé des protéines de mouvement MPs de GVA et GVB marquées par fluorescence dans des protoplastes infectés et ont décrit l'apparition de structures tubulaires et ponctuées. Cette étude a permis de révéler aussi que ces protéines se localisaient de manière similaire à la périphérie des cellules. Plusieurs auteurs ont montré le rôle fondamentale du produit ORF5 dans l'interférence avec les mécanismes d'extinction des virus et dans le contrôle moléculaire de l'infection virale des virus du bois strié de la vigne (Galiakparov et al. 2003c ; Zhou et al. 2006; Haviv et al. 2012)

1.8 Diversité génétique des virus du bois strié

Les *Vitivirus*, comme tous les virus de la vigne, existent sous forme de population très hétérogène, cette variabilité peut être due aux mélanges de différentes souches suite aux pratiques de greffage, échange du matériel végétal, transmission par insectes et la recombinaison génétique (Shi et al., 2004). La compréhension de la dynamique d'évolution des populations des virus de vigne présente un grand intérêt dans tous les programmes d'amélioration génétique de la culture.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser la diversité génétique des virus du complexe du bois strié. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), la Ribonucléase Protection Assay (RPA), l'Heteroduplex Mobility Assay (HMA) sont les techniques les plus utilisées (Vigne et al., 2004, Jooste et Goszczynski, 2005 et Narayanasamy, 2011). La plupart des études de la diversité génétique des virus du bois strié de la vigne ont été réalisées sur la base de la variabilité des gènes RNA dépendant RNA polymérase (RdRp), capsid virale (CP) et la transmission mécanique sur tabac.

Plusieurs auteurs ont révélé une forte variabilité génétique pour le virus GVA. Goszczynski et Jooste (2003) rapportent que la transmission mécanique sur *Nicotiana benthamiana* a permis de regrouper les isolats en trois groupes phylogénétiques (I, II et III) selon le degré de sévérité des symptômes sur plantes du tabac. Les isolats des groupes phylogénétiques I et II ont provoqué des symptômes plus sévères sous forme d'éclaircissement

de nervures, apparition de chloroses et de nécroses et enroulement des feuilles supérieures, par rapport aux symptômes causés par les isolats de groupe phylogénétiques III qui provoquent des éclaircissements de nervures plus au moins légers. Plusieurs auteurs sont décrits, sur la base de l'étude phylogénétique du gène capsidique virale (CP), quatre groupes phylogénétiques (Goszczyński et Jooste, 2003 ; Murolo et *al.*, 2008 ; Goszczyński et Habili, 2012 ; Alabi et *al.*, 2014). Alabi et *al.*, (2014) ont révélé par des analyses phylogénétiques des isolats basé sur les séquences du gène RdRp une hétérogénéité élevée par rapport aux séquences du gène CP. Six groupes phylogénétiques distincts ont été caractérisés par l'analyse du gène RdRp (Selmi et *al.*, 2020 ; Alabi et *al.*, 2014).

La première étude de la diversité génétique pour le virus GVB a été réalisée par inoculation mécanique sur la variété du tabac *Nicotiana occidentalis* (Boscia et *al.*, 1993). Cette étude a permis d'identifier l'isolat GVB-Italy. Goszczyński, (2010) a révélé une forte variabilité génétique du GVB par l'analyse phylogénétique du gène RdRp où les isolats de cette étude ont été regroupés en six groupes phylogénétiques distincts. Cette large variabilité a été confirmée par l'identification d'au moins trois groupes génétiques basés sur l'étude de la capsidique virale a été rapportée (Selmi et *al.*, 2020).

Les résultats de plusieurs études d'analyses phylogénétiques des isolats du GRSPaV ont montré qu'il y a un polymorphisme important de ce virus. Afin d'obtenir un tableau plus complet de la diversité génétique du GRSPaV, plusieurs chercheurs ont procédé à une analyse plus approfondie de la diversité génétique du GRSPaV en ciblant soit la séquence HEL (hautement conservée), soit le gène CP (Meng et *al.* 2006 ; Terlizzi et *al.* 2010 ; Nolasco et coll. 2006 ; Alabi et *al.* 2010). Les isolats du GRSPaV ont été classés en quatre groupes phylogénétiques désignés par les noms : GRSPaV-1, GRSPaV-SG1, GRSPaV-BS et GRSPaV-VS (Meng et *al.* 2006). Plus récemment, l'analyse de la diversité génétique du domaine RdRp par les amorces RSP35/RSP36 a révélé la présence de huit groupes phylogénétiques distincts de variants GRSPaV et que d'autres sous-groupes sont présents dans certains de ces groupes phylogénétiques (Meng et *al.*, 2017a ; Selmi et *al.*, 2020).

Peu d'études ont été consacrées à la diversité génétique du GVE. La première étude sur la diversité génétique de ce virus fut réalisée par Nakaune et *al.*, (2008) qui ont séquencé entièrement l'isolat: TvAQ7 (NC011106). Après quelques années, Trois autres isolats du GVE ont été entièrement séquencés : le GVE-SA94, le GVE-GFMG-1 et le GVE-WAHH2 (Alabi et *al.*, 2013). Une étude récente menée en Californie et à New York, a montré une liaison étroite

partagée entre 20 isolats américains de GVE et une identité nucléotidique dépassant 98% avec l'isolat Sud-africain GVE-SA94, ce qui suggère une variabilité génétique limitée de ce virus (Vargas-Ascencio et *al.*, 2016).

Les études sur la diversité génétique du GVF demeurent limitées, seuls quatre isolats de GVF ont été entièrement séquencés jusqu'à maintenant. L'isolat AUD46129, qui représente la première séquence du GVF, a été isolé à partir du *Vitis sp.* aux Etats Unis (Al Rwahnih et *al.*, 2012). Le second isolat est le GVF-V5 isolé en Afrique du Sud à partir du *Vitis vinifera cv.* Chenin blanc (Molenaar et *al.*, 2015). Récemment deux nouveaux isolats g12 et g13 ont été inscrite dans la base des donné NCBI par Chiaki et Ito (2021).

Le GVD demeure le seul Vitivirus dont le séquençage de son génome est partiel. Le nombre des isolats séquencés est limité et sont caractérisés par une variabilité génétique limitée (Fajardo et *al.*, 2012). Actuellement, seulement 8 séquences partielles de la CP de 8 isolats de GVD sont disponibles dans la banque de gènes internationale : deux isolats italiens (GVD-Y07764 et GVD-CH), trois isolats brésiliens (GVD-Dolc, GVD-Garg et GVD-RM-BR), deux isolats turcs (GVD-TR202 et GVD-TR167) et l'isolat GVD-GR-Vitro2 isolé en Grèce (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.9 Techniques de diagnostic

La détection des maladies virales sur la base de symptômes n'est pas toujours fiable et est très imprécise. Des tests de diagnostic au champ et au laboratoire sont donc nécessaires pour confirmer l'origine virale de l'infection et déterminer l'agent impliqué.

1.9.1. Indexage biologique sur hôtes ligneux

L'indexage biologique est couramment utilisé pour identifier les maladies du bois strié (Maliogka, et *al.*, 2015). Cette technique de diagnostic représente une étape obligatoire du programme de certification de la vigne. La méthode consiste à greffer les cépages à tester sur des indicateurs ligneux spécifiques pour détecter les virus associés à la maladie du bois strié (Maliogka, et *al.*, 2015). Cependant ces tests prennent beaucoup de temps, sont coûteux et ne sont pas totalement fiables car des symptômes légers peuvent passer inaperçus et les virus individuels ne peuvent pas être détectés sans équivoque. Cette méthode a été initiée pour la première fois par Graniti et Martelli (1965) pour extérioriser les symptômes des piqûres et les rainures chez les cépages greffés par le porte-greffe legnoriccio. Actuellement les trois

indicateurs : *Vitis rupestris*, LN33 et Kober 5BB sont largement utilisés pour différencier les quatre syndromes du bois strié : Rupestris stem pitting (RSP), Kober stem grooving (KSG), Corkybark (CB, ou écorce liégeuse) et LN33 stem grooving (Martelli, 2014b).

1.9.2. Méthodes sérologiques

Plusieurs méthodes sérologiques sont utilisées en diagnostic des phytovirus dont la plus communément utilisée est l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). La Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA) et la Triple Antibody Sandwich ELISA (TAS-ELISA).

Comme la plupart des virus limités au phloème, tous les virus associés au bois strié sont distribués de manière irrégulière dans les tissus végétaux infectés, et leur concentration augmente pendant la période végétative pour atteindre son maximum en automne. Par ailleurs, les *Vitivirus* sont décrits comme de mauvais immunogènes, produisant des antisérums qui ne sont pas toujours adaptés à l'utilisation en ELISA (Maliogka, et al., 2015). Le GVA est le premier virus associé à la maladie du bois strié de la vigne pour lequel la technique ELISA a été appliquée (Goszczyński, et al., 1996).

1.9.3. Technique de polymerase chain reaction (PCR)

L'utilisation de l'amplification de séquences d'ADN spécifiques par PCR (Polymerase Chain Reaction) pour le diagnostic des maladies virales tend à se répandre en raison de sa plus grande sensibilité par rapport aux méthodes biologiques et aux tests ELISA ainsi que de sa facilité d'utilisation. La PCR est particulièrement utile si les antisérums pour les tests ELISA ne sont pas disponibles ou ne conviennent pas. Le principe de la PCR consiste à l'amplification d'une manière sélective d'un fragment cible et ce, en utilisant une paire d'amorces spécifiques choisies d'une séquence bien définie de l'ADN génomique du virus et une enzyme thermostable "Thermus aquaticus DNA polymerase" (taq polymerase) (Saiki et al., 1988). La réaction d'amplification se déroule en trois étapes ; la dénaturation de la molécule cible, l'hybridation entre la molécule de l'ADN à amplifier et les amorces utilisées et enfin l'extension ; qui se répètent pendant plusieurs cycles. Dans le cas des virus à ARN, une étape de transcription inverse est nécessaire pour transformer l'ARN en ADN complémentaire (ADNc). Il s'agit de la « Reverse Transcription-PCR ».

La détection rapide et sensible des virus associés à la maladie du bois strié a été possible grâce à la RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques initialement conçues sur la base d'une seule séquence d'isolats de GVA (Minafra et *al.*, 1992). Lorsque de plus grands ensembles de séquences partielles et complètes de *Vitivirus* sont devenus disponibles, des amorces plus robustes ont été conçues (Meng et *al.*, 2017b). La détection des virus associée à la maladie du bois strié de la vigne a également été poursuivie par l'utilisation de procédures de PCR multiplex, dans lesquelles des ensembles d'amorces soigneusement optimisés et conçus pour des cibles spécifiques ont été mélangés dans la même réaction. Cette technique de multiplexage a été appliquée dans la PCR standard (Gambino et Gribaudo 2006), ainsi que dans la PCR quantitative en temps réel (Osman et *al.* 2013).

1.10. Moyens de lutte

En l'absence de tout moyen de traitement des vignes infectées, la lutte contre la maladie du bois strié de la vigne repose essentiellement sur l'utilisation de matériel végétal provenant de ceps de vigne testés, sains et exempts de virus. Les mesures préventives ont pour but d'assainir le vignoble. Elles consistent en un dépistage systématique des vignes malades. Aucune source de résistance contre l'un des virus bois strié n'a été identifiée chez les espèces de vignes sauvages ou cultivées (Maliogka et *al.*, 2015).

1.10.1 La certification du matériel de multiplication de la vigne

Depuis le début des années 1960, le lourd tribut que représentent les maladies virales sur la production viticole a poussé les autorités vers l'établissement d'une chaîne d'approvisionnement contrôlée ou certifiée, en commençant par des stocks de plantation propres et en terminant dans les pépinières et les fermes. La certification des plants de vigne repose sur le contrôle de la multiplication de cépages et de clones sains et ayant une valeur agronomique, et technologique répondant aux critères de la viticulture actuelle. L'utilisation du matériel certifié demeure le moyen le plus efficace pour lutter contre les virus. Toutefois, la production du matériel végétal certifié nécessite des sources primaires indemnes des virus qui sont obtenues suite à la sélection sanitaire. Plusieurs pays ont suivi une stratégie de certification de la vigne exigeant l'absence des virus associés à la maladie du bois strié de la vigne et des syndromes qui y sont associés, respectivement, dans le matériel végétal certifié. Aux Etats Unis d'Amérique, les *Vitivirus* sont interdits par la législation alors que la présence du GRSPaV dans le matériel végétal certifié est tolérée. L'Italie, l'Australie et le Chili suivent des stratégies de

certification qui exigent l'absence du GVA et du GVB. Une tolérance à la présence des virus associés à la maladie du bois strié de la vigne est accordée au matériel végétal certifié par les programmes de certification de l'Union européenne (exceptée l'Italie) (Maliogka *et al.*, 2015).

1.10.2. Culture de méristème et embryogenèse somatique

L'assainissement viral consiste à obtenir des plantes indemnes de virus par la culture de méristèmes ou par l'embryogenèse somatique. La culture de méristèmes consiste en la régénération de plantes indemnes de virus à partir de cellules méristématiques. Alors que l'embryogenèse somatique se base sur l'utilisation de cellules somatiques à savoir des anthères, des ovaires, racines, graines, feuilles ou pétioles (Gribaudo *et al.*, 2006 ; Bouamama *et al.*, 2007 ; Panattoni *et al.*, 2013). L'utilisation de ces techniques a permis l'élimination de plusieurs virus de la vigne telle que le GLRaV-1, le GLRaV-3, le GRSPaV, le GVA et le GFLV (Maliogka *et al.*, 2015 ; Bouamama-Gzara *et al.*, 2017).

La culture de méristèmes a permis d'obtenir des taux d'assainissement égaux à 87,5% pour le GLRaV-1, 85% pour le GFLV et 29% pour le GRSPaV (Gribaudo *et al.*, 2006 ; Youssef *et al.*, 2009). Cependant, l'embryogenèse somatique appliquée pour l'élimination des virus GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3, GRSPaV et GVA a permis d'obtenir des plants indemnes à 100%. (Gambino *et al.*, 2006 ; Bouamama-Gzara *et al.*, 2017).

1.10.3 Thermothérapie

La thermothérapie est la technique la plus utilisée dans les programmes d'assainissement viral. Elle consiste à l'exposition du matériel à des températures assez élevées, n'affectant pas le tissu végétal, pour éliminer les agents pathogènes (Panattoni *et al.*, 2013).

La thermothérapie a permis l'élimination des virus GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GRSPaV et GFLV. La thermothérapie *in vitro* à 37°C durant 48 jours a permis d'obtenir des taux d'assainissements égaux à 100% pour le GFLV, 72,2% pour le GVA, 25,1% pour le GLRaV-1 et 24,7% pour le GLRaV-3 (Panattoni et Triolo, 2010).

La thermothérapie *in vivo* (à 38°C durant une période de 40 à 95 jours) et *in vitro* (à 34°C durant une période de 43 à 115 jours) a donné des taux d'assainissement de GRSPaV, respectivement, égaux à 23,6% et 9,1% (Gribaudo *et al.*, 2006). Pour améliorer l'efficacité de la lutte contre ce virus, la thermothérapie a été associée à la culture de méristèmes (Maliogka *et al.*, 2009).

1.10.4 Lutte contre les vecteurs

Le contrôle des vecteurs des virus est considéré parmi les approches de base qui sont utilisées contre les virus qu'ils transmettent (Maliogka *et al.*, 2015). La lutte contre les vecteurs de virus ainsi que l'élimination de leurs foyers naturels tels que les plantes adventices sont indispensables pour limiter la propagation des virus. Dans le cas de la maladie du bois strié de la vigne, les virus associés ne sont transmissibles que par les cochenilles appartenant aux familles des Pseudococcidae et Coccidae (Tanne *et al.*, 1989 ; Englbrechet et Kasdorf, 1990 ; Hommay *et al.* 2008).

1.10.5 Lutte culturale

Diverses mesures culturales peuvent être appliquées pour réduire les populations de cochenilles. Ces dernières sont caractérisées généralement par leur tendance à se cacher sous l'écorce du tronc, à l'aisselle des feuilles et au niveau des racines à l'abri des insecticides, des ennemis naturels et des conditions environnementales (Daane *et al.*, 2012). Pour lutter contre la cochenille vectrice, il serait nécessaire de commencer par la diminution des formes hivernantes sous l'écorce, l'élimination des déchets et des mauvaises herbes, associée à un suivi permanent des populations de la cochenille afin d'identifier précocement les stades les plus sensibles aux traitements.

Le contrôle de la vigueur des vignes est considéré parmi les pratiques culturales visant le contrôle des populations des insectes vecteurs. En fait, l'excès de feuillage aide à diminuer la température de la face inférieure des feuilles, par conséquent, fournir un excellent abri pour les cochenilles. D'un autre côté, l'excès d'azote contribue à l'augmentation de la taille des femelles qui contribue à son tour à l'augmentation du nombre d'œufs (Maliogka *et al.*, 2015).

Matériel et Méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1 Prévalence des virus associés à la maladie du bois strié de la vigne en Algérie

2.1.1. Les isolats des virus GVA, GRSPaV et GVD

Les isolats des virus GVA, GRSPaV et GVD faisant l'objet de cette étude ont été obtenus à partir de 202 échantillons de vignes collectées pendant la période de taille dans les principales régions viticoles de l'ouest et du centre de l'Algérie. L'échantillonnage a été réalisé de façon aléatoire dans les vignobles au mois de décembre 2012., et les ceps échantillonnés ont été marqués en vue de toutes investigations ultérieures.

L'échantillonnage a porté sur des vignobles commerciaux, comprenant cinq variétés de raisin de table, quatre variétés raisin de cuve, et 18 variétés autochtones issues de la collection de matériel génétiques de l'ITAF, le nombre d'échantillons collecté par cépage autochtone au niveau de la collection de l'ITAF varie selon le nombre de cep disponible (Annexe 01) (Tableau 4)

Tableau 4 : les différents vignobles et nombre d'échantillons obtenus durant l'étude

Type de cépage	Variété	Nombre d'échantillons testés	Origine
Vigne Table	Gros noir	50	Alger, Tizi Ouzou et Mascara
	Dattier	35	Alger, Boumerdes et Tizi-Ouzou
	Muscat	25	Aïn Témouchent, Mascara
	Cardinal	22	Boumerdes, Alger
	Kings Rubi	8	Boumerdes
Vigne de cuve	Alicante	14	Aïn Témouchent, Mascara
	Carignan	10	Aïn Témouchent
	Valensi	8	Mascara
	Merseguerra	7	Aïn Témouchent
Autochtone	Autochtone	23	ITAF Mascara
Total		202	

2.1.2. Identification des virus GVA, GRSPaV et GVD par reverse transcription-PCR

En vue de déterminer la prévalence du GVA, GRSPaV et GVD dans les vignes Algériennes nous avons réalisé une RT-PCR.

2.1.2.1 Extraction des acides nucléiques totaux

Les acides nucléiques totaux sont obtenus par extraction à partir des tissus phloémiques des échantillons à tester selon le protocole de Foissac *et al.* (2001). Pour cela 0,2 g de phloème cortical ont été décortiqués à l'aide d'un scalpel sur des boutures de vignes aoutées et ont été broyées avec de l'azote liquide dans un mortier. L'échantillon a été homogénéisé avec 1 ml de tampon d'extraction (Annexe 02) contenant 0,2% de méta bisulfite de sodium. Le mélange transféré dans un tube eppendorf contenant 100 µl de Sodium Lauryl Sarkosyl (NLS) 10% et incubé à 70°C pendant 10 min avec agitation continue, puis placé dans la glace pendant 5 mn. La solution a été centrifugée à 13 000 tpm pendant 10 min ensuite, 300 µl du surnageant ont été récupérés dans de nouveaux tubes dans lesquels on a ajouté une solution composée de 150 µl d'éthanol absolu, 300 µl NaI (6M) et 35 µl silica (Annexe 02) et agiter avec un vortex. Le mélange a été agité à l'aide d'un agitateur à température ambiante pour 30 min et centrifugé à 6000 tpm pendant 20 sec. Le culot, composé du TNA et du silica, est lavé 3 fois, en suspendant le culot dans 500 µl de tampon de lavage (Annexe 02) et en centrifugeant à 6000 tpm/20 sec, après la dernière centrifugation à 6000 tpm pendant 20 sec, et après séchage, le culot a été suspendu dans 120 µl d'eau distillée stérile, puis incubé à 70°C pendant 3 min dans un bain-marie et centrifugé rapidement à 13000 tpm pendant 3 min. finalement, 100 µl du surnageant (solution TNA) ont été transférés dans de nouveaux tubes eppendorf et conservés à -20°C.

2.1.2.2 Vérification de la qualité des TNA par électrophorèse.

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

2.1.2.3. Synthèses de l'ADN complémentaire

Une linéarisation des ARN a été réalisée en utilisant des amorces aléatoires (Invitrogen, USA). Pour chaque échantillon, 10 µl d'acides nucléiques totaux (TNA) sont ajoutés à 2,5 µl du

Mix I composé de 1 µl Rp (amorce aléatoire) (1 µg.µl⁻¹) et 1,5 µl d'eau distillée stérile. Deux tubes témoins contenant de l'eau distillés et stérilisés sont également utilisés à la place des TNA comme contrôle négatif. Les tubes sont incubés à 90°C pendant 5 minutes.

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

2.1.2.4 Amplification du génome viral par PCR

Pour chaque échantillon, 2,5 µl d'ADNc sont ajoutés au milieu réactionnel suivant : 5 µl de tampon 5X, 1 µl de MgCl₂ 25mM, 1 µl de dNTPs 10mM, 0,5 µl de l'amorce sens (10mM), 0,5 µl de l'amorce antisens (10mM), 0,25 µl de la Taq polymérase 5 U.µl⁻¹ et 14,25 µl d'eau distillée stérile.

Pour détecter les virus GVA, GVD et GRSPaV nous avons utilisé les amorces présentées dans le tableau suivant (05) :

Tableau 5. Amorces utilisées pour la détection de GVA, GVD et GRSPaV

Virus	Amorces	Séquences	Amplification (bp)	La région cible	Reference
GVA	H7038 C7273	AGGTCCACGTTTGCTAAG CATCGTCTGAGGTTTCTACTAT	236	la région conservée de la polymérase ARN-dépendante	Mackenzie (1997)
GVD	CP7V CP471C	CTTAGGACGCTCTTCGGGTACA CTGCTCTCCAACCGACGACT	474	Le gène de la protéine capsidique (CP)	Abou-Ghanem, et al.(1997)
GRSPaV	RSP-H48 RSP-C49	AGCTGGGATTATAAGGGAGGT CCAGCCGTTCCACCACTAAT	331	Le gène de la protéine capsidique (CP)	Lima et al.,(2006)

L'identification du GVA, GVD et GRSPaV est réalisée selon les conditions d'amplification qui consistait en une première dénaturation réalisée à 94°C pendant 5 minutes. Elle est suivie de 35 cycles d'amplification dans les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 52 °C/45 s, 54 °C/45 s, et 52 °C/45 s respectivement pour les virus GVA, GVD et GRSPaV, et une élongation à 72°C pendant 1

minute. Pour terminer, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes (Fig. 7). Les témoins négatifs et positifs proviennent de la collection du laboratoire de virologie végétale de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Tunis (INRAT).

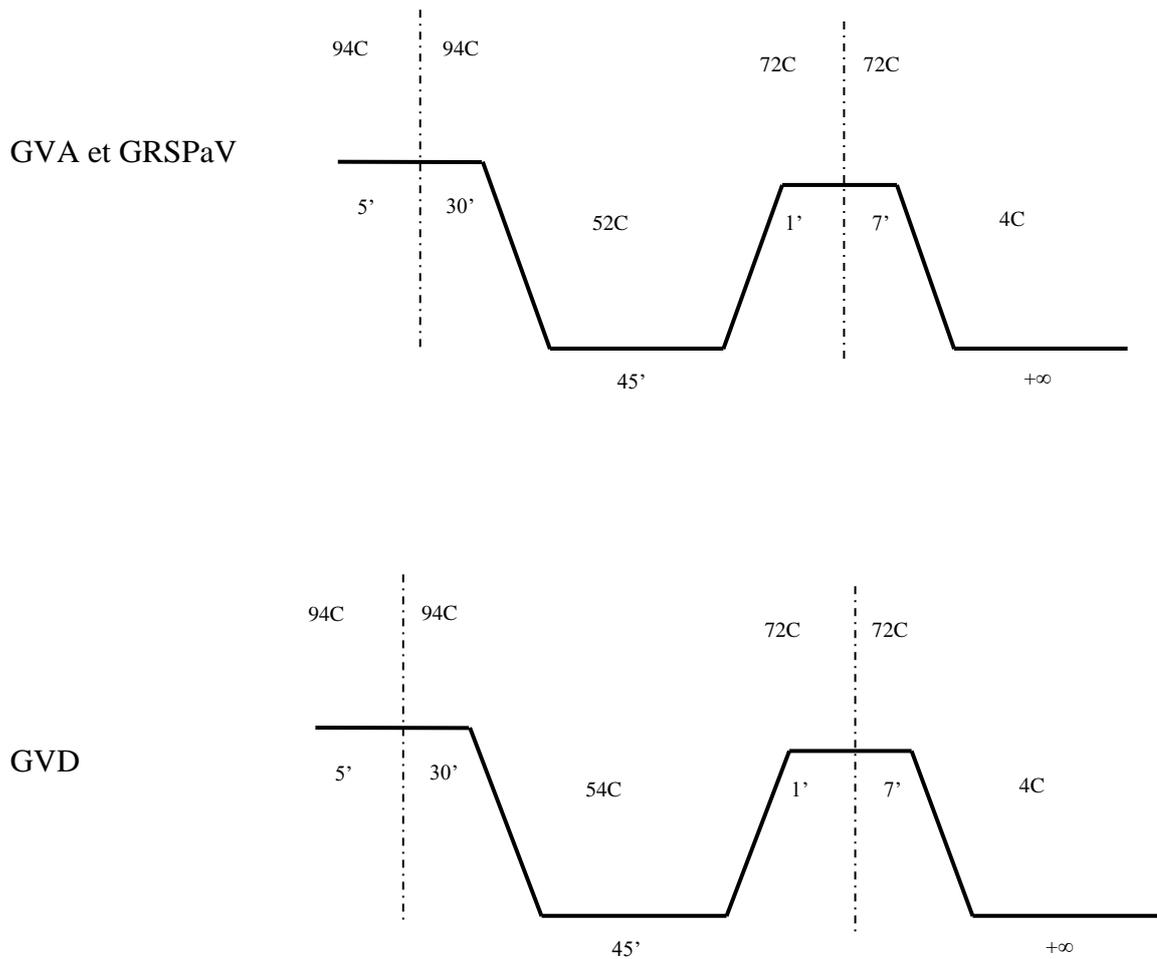


Figure 7 : Condition de polymérisation des amorces du GVA, GVD et GRSPaV.

Les amplicons ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%. L'électrophorèse a été réalisée à 140 volts pendant 30 minutes. La visualisation des bandes a été réalisée par coloration du gel au bromure d'éthidium à 0,5 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ et visualisé sous la lumière UV.

2.2. Etude de la diversité génétique de Grapevine rupestris stem pitting-associated virus

2.2.1 Amplification du gène CP

Pour étudier la diversité génétique du GRSPaV, nous avons amplifié par RT-PCR le gène complet de CP moyennant des amorces spécifiques RSP52F et RSP53R (Alabi et *al.*, 2010). Neuf isolats positifs ont été sélectionnés par cette étude (Tableau 6).

L'identification du GRSPaV a été menée selon les conditions d'amplification qui consistait en une première dénaturation réalisée à 94°C pendant 5 minutes. Elle est suivie de 35 cycles d'amplification dans les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 35 secondes, hybridation des amorces à 52 °C/45 s, et une élongation à 72°C pendant 1 minute. Pour terminer, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes (Fig. 6). La visualisation des bandes a été réalisée par coloration du gel au bromure d'éthidium à 0,5 µg.ml⁻¹ et visualisé sous la lumière UV.

Tableau 6 : les isolats du GRSPaV sélectionnés pour les analyses phylogénétiques des gènes de la protéine de capsid (CP).

N°	Cépage	Type de cépage
1	Dattier de Beyrouth	Raisin de table
2	Cardinal	
3	Cardinal	
4	Cardinal	
5	Dattier de Beyrouth	
6	Gros noir	
7	Dattier de Beyrouth	
8	Valensi	Raisin de cuve
9	Carignan	

2.2.2 Séquençage

Le séquençage de fragments des gènes CP a été réalisé pour 20 isolats par la méthode de Sanger. Au total 09 séquences ont été obtenues (Fig. : 08).

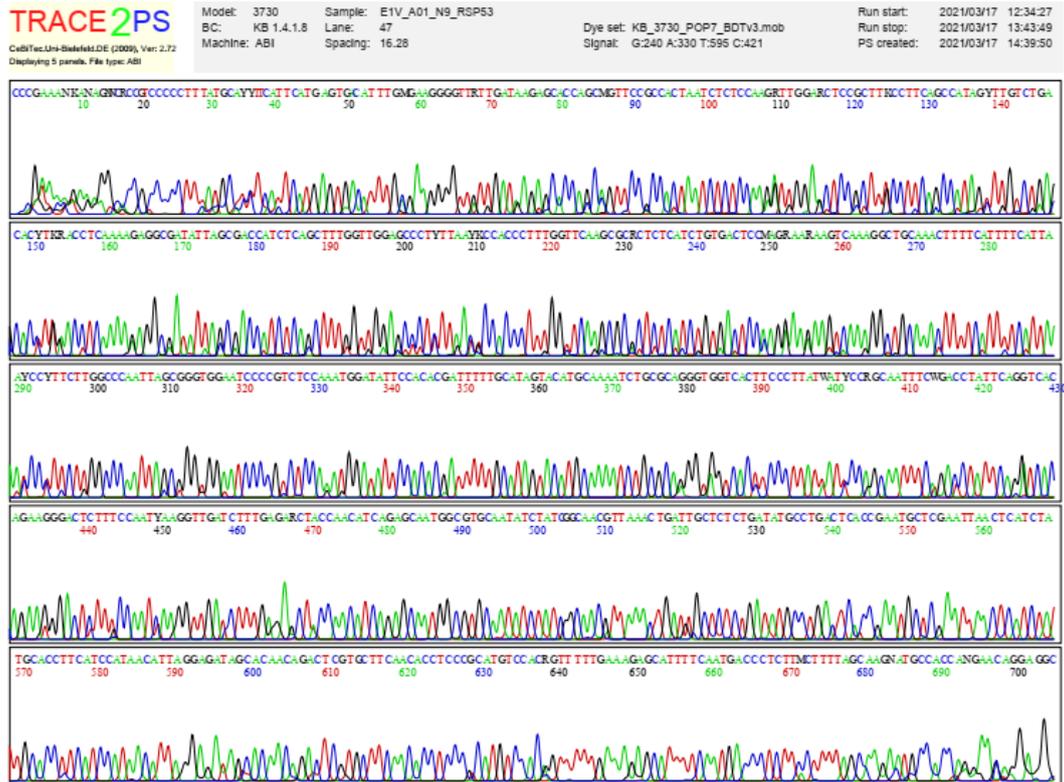


Figure 8 : Chromatogramme de l'isolat N°09.

2.2.3 Analyse bio-informatique des séquences

2.2.3.1 Analyse nucléotidique :

En vue de montrer la similitude des séquences obtenues lors de cette étude avec des séquences provenant de diverses régions du monde et inscrites dans la banque de gène GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a été réalisé pour chaque séquences obtenues lors de cette étude. Le principe de base du BLAST est de rechercher dans GenBank les séquences présentant des segments similaires à la séquence à étudier en réalisant des alignements binaires et en faisant un classement par ordre de pertinence (Fig. 9).

The image shows the BLAST web interface. At the top, there is a navigation bar with the NIH logo and the text 'U.S. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information'. A user profile 'a.bachir@edu.ensa.dz' is visible in the top right. Below the navigation bar, there is a COVID-19 information banner with links for 'Public health information (CDC)', 'Research information (NIH)', 'SARS-CoV-2 data (NCBI)', 'Prevention and treatment information (HHS)', and 'Español'. The main content area is titled 'BLAST®' and includes a 'Home', 'Recent Results', 'Saved Strategies', and 'Help' menu. The central part of the page features the 'Basic Local Alignment Search Tool' description, which states that BLAST finds regions of similarity between biological sequences. Below this, there is a 'Web BLAST' section with three main options: 'Nucleotide BLAST' (nucleotide to nucleotide), 'blastx' (translated nucleotide to protein), and 'Protein BLAST' (protein to protein). A 'NEWS' box on the right side of the page announces 'ElasticBLAST is here!' and provides a link to 'More BLAST news...'. The date 'Mon, 07 Feb 2022 12:00:00 EST' is also visible.

Figure 9 : Capture de l'interface web du BLAST

Les neuf séquences nucléotidiques des isolats du GRSPaV ont été enregistrées dans la plateforme ENA (EuropeanNucleotideArchive <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) sous les numéros d'accessions : OU862947 jusqu'au OU862955.

Une comparaison au niveau nucléotidique du gène CP des isolats algériens du GRSPaV avec les séquences représentatives des différents groupes phylogénétiques décrits jusqu'à ce jour a été menée par le logiciel MEGAX10 version 10.2.2. Les isolats de référence du GRSPaV utilisés dans cette étude ont été sélectionnés selon les travaux de diversité génétique rapportés dans la littérature (Tableau 7).

Tableau 7 : les séquences représentatives et les séquences du GRSPaV sélectionnées pour les analyses phylogénétiques du gène de la protéine de capsid (CP)

N° d'accession	Isolats	Plante hôte	Origine	Séquences représentatives	Référence
OU862947.1	DZ-GRSPaV-N9	Dattier	Algérie	/	/
OU862948.1	DZ-GRSPaV -N10	Cardinal	Algérie		
OU862949.1	DZ- GRSPaV -N11	Cardinal	Algérie		
OU862950.1	DZ-GRSPaV -N13	Cardinal	Algérie		
OU862951.1	DZ-GRSPaV-N14	Dattier	Algérie		
OU862952.1	DZ-GRSPaV-N15	Gros noir	Algérie		
OU862953.1	DZ-GRSPaV-N16	Dattier	Algérie		
OU862954.1	DZ-GRSPaV-N17	Valensi	Algérie		
OU862955.1	DZ-GRSPaV-N18	Carignan	Algérie		
KR054735.1	LSL	<i>V. vinifera</i> cv. Riesling	Chine	Groupe VII	Hu et al., (2015)
FJ943356.1	ORPN24b	<i>Vitis vinifera</i>	USA	Groupe VI	Alabi et al., (2010)
LT855243.1	AV99	Autochtones accession AV99	Tunisie	Groupe VIII	Selmi et al., (2020)
FR691076.1	MG	<i>V. vinifera</i> cv. Moscato Giallo	Italie	Groupe II	(Morelli et al., 2011)
AY368590.1	Strain_Syrah	<i>V. vinifera</i> cv. Syrah	USA	Groupe IV	(Lima et al., 2006)
AY881627.1	BS	Hybrid Bertille Seyve 5563	USA	Groupe III	Meng et al., (2005)
AF057136.1	CG1	<i>V. rupestris</i> cv. St. George	USA	Groupe I	Meng et al., (2006)
AY368172.2	PN	<i>V. vinifera</i> cv. Pinot noir	USA	Groupe V	Lima et al. (2009)

2.2.3.2 Etude phylogénétique

En vue d'étude la répartition phylogénétique des isolats algériens, un arbre phylogénétique a été construit, pour cela, un alignement multiple a été construits avec des séquences provenant de différentes régions à travers le monde téléchargés à partir de la banque de gène Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Un alignement de 662 nt pour le gène CP a été réalisé à l'aide du programme Clustalw intégré dans le logiciel MEGAX10 (Kumar et al., 2016).

Le pourcentage d'identité a été obtenues à l'aide des méthodes de distance p de MEGX version 10, qui calculent automatiquement les distances pour les séquences de nucléotides et d'acides aminés. L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide de la méthode Neighbor Joining (NJ) avec Kimura à 2 paramètres (avec 1 000 répétitions boots trap).

2.3 Inventaire des espèces des cochenilles potentiellement vectrices des virus de de la vigne

En Algérie, les cochenilles farineuses sont très peu étudiées, alors que ces insectes provoquent des dégâts directs à travers le prélèvement de la sève et des dégâts indirects par la transmission des viroses et la sécrétion du miellat et ce qui induit à l'affaiblissement général et par conséquent la chute des rendements. Des études ont permis de mettre en évidence la transmission des virus associés à la maladie du bois strié par plusieurs espèces de cochenilles appartiennent aux familles des *Pseudococcidae* et *Coccidae* (Le Maguet et al., 2012). A cet égard, pour limiter la propagation des virus dans les vignobles et éviter la réinfection du matériel végétal de multiplication, une attention particulière est accordée à l'étude des espèces de cochenilles farineuses associées à la viticulture Algérienne.

2.3.1 Sites d'étude :

L'étude a été effectuée durant la campagne viticole 2020-2021 au Nord-ouest Algérien dans 10 vignobles appartenant à deux régions différentes où plusieurs prélèvements furent réalisés (Fig. 10). Le choix des variétés est dicté par leur importance en termes de superficie cultivée.

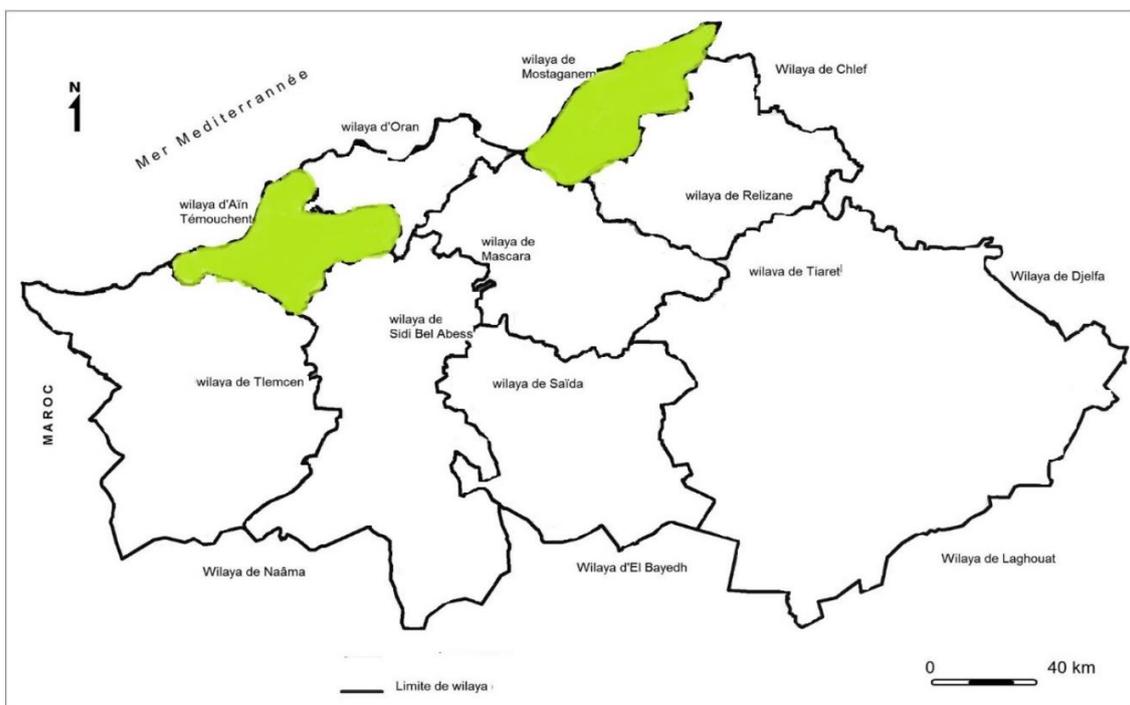


Figure 10 : localisation des régions prospectées au Nord-ouest Algérien.

La région d'El AMRIA (wilaya d'Aïn Témouchent). Cinq vignobles faisant l'objet des prospections appartiennent aux agriculteurs privés de la région. Les parcelles échantillonnées se présentent comme suit :

Les parcelle 1 et 2 : sont occupées respectivement par des variétés de vigne de cuves : Valencie et Alicante Bouschet, de superficies de 2 et 5 ha respectivement. Ces parcelles ont été plantées en ligne en 2000 dans le cadre de projets P.N.D.A. Les coordonnées géographiques sont : 35°32'16.5"N 1°01'02.2"W, 133 m élévation pour la parcelle N°01 et 35°32'10.6"N 1°00'59.6"W, 129 m élévation pour la parcelle N°02 (Tableau 6).

Les parcelle 3, 4 et 5 sont occupées respectivement par les variétés de vigne de table : Muscat d'Italie, Victoria et Cardinal, ayant de superficies de 02 ha chacune âgés de 04 ans, conduit en pergola et irrigué au goutte à goutte. Les coordonnées géographiques des parcelles sont mentionnées dans le Tableau (6).

La région El Hadjadj est la principale région viticole à Mostaganem. Les prospections dans cette région ont porté sur cinq parcelles plantées avec de trois cépages : deux variétés raisin de cuve représentés par le Cinsault et Carignan. Alors que le raisin de table est représenté par la variété Gros noire (Tableau 8).

Tableau 8 : Les coordonnées géographiques des parcelles prospectés.

Région	N° de la parcelle	Nom du cépage	Position géographique	Année de plantation	Superficie (ha)	Elévation (m)
El Amria, Aïn Témouchent	01	Valencie	35°32'16.5"N 1°01'02.2"W	2000	2,0	133
	02	Alicante	35°32'10.6"N 1°00'59.6"W	2000	5,0	129
	03	Muscat d'Italie	35°28'48.7"N 1°01'25.2"W	2018	2,0	97
	04	Victoria	35°28'38.4"N 1°01'29.2"W	2018	2,0	88
	05	Cardinal	35°28'35.8"N 1°01'39.5"W	2018	2,0	96
El Hadjadj (BOSQUET) Mostaganem	06	Cinsault	36°05'48''N 0°18'22''E	2001	2,22	283
	07	Cinsault	36°05'55''N 0°19'06''E	2001	2,01	284
	08	Carignan	36°05'48''N 0°19'02''E	2001	2,06	284
	09	Carignan	36°05'45''N 0°18'23''E	2001	1,01	282
	10	Gros noir	36°06'10''N 0°19'00''E	2001	1,02	270

2.3.1.1 Caractéristiques climatiques des régions d'étude :

Sur le plan climatique, El Amria et Aïn El Hadjadj appartiennent à l'étage méditerranéen semi-aride avec des précipitations pluviométriques irrégulières allant de 300 à 350 mm par an. La période chaude et sèche couvre au moins cinq mois de l'année. La température annuelle moyenne des régions prospectées oscillent entre 25 et 30°C en été et de 6 à 13°C pendant l'hiver (ONM, 2021).

2.3.2 Collecte et conservation des cochenilles

Dans les vignobles échantillonnés, les ceps présentant des signes de présence de cochenilles ont été examinié avec attention. Selon le stade phénologique de la vigne, les différentes parties de la plante sont surveillées. Des spécimens sont prélevés avec des petits morceaux du végétal. Une fois amenées au laboratoire, les cochenilles sont récoltées soigneusement avec un pinceau de laboratoire humectée de l'alcool pour que les espèces ne soient pas brisées. Plus de 50 femelles de chaque parcelle ont été conservées, jusqu'à leurs montages, dans de l'alcool 70°, accompagnés d'une étiquette portant les indications complètes.

2.3.3 Identifications morphologiques des cochenilles

Les cochenilles montées sous la loupe, en vue de les identifier moyennant des clés spécifiques aux cochenilles farineuses (Cox, 1989). Aussi, des échantillons ont été envoyées au INRAE centre Alsace de Colmar pour leur identification. La confirmation d'identification des cochenilles a été faite par Mohamed BICHE Professeur à l'Ecole National Supérieur d'Agronomie.

2.3.4. Identification moléculaire des cochenilles

Vue que l'identification morphologique des cochenilles est très difficile et nécessite une grande qualification taxonomique. La technique PCR y est efficace, surtout quand il s'agit des espèces morphologiquement très apparentées.

2.3.4.1. Extraction des acides nucléiques

L'extraction des acides nucléiques des cochenilles a été réalisée selon le protocole de Demontis et *al.*, (2008). Chaque cochenille est broyée individuellement dans un microtube à l'aide d'un pilon plastique en présence d'un tampon d'extraction TNES [50mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 075M NaCl ; 10mM Ethylene Diamine Tetra Aceticacid (EDTA) ; 2% Sodium Dodecyl

Sulphate (SDS) et 100µg/ml protéinase K]. L'extrait a été incubé pendant 30min à 65°C, ensuite les échantillons ont subi une déprotéinisation avec 1 vol : Phénol/Chloroforme/isoamyl alcool (24:24:1), suivi d'une centrifugation à 10.000 tr/min. pendant 10 min. Le surnageant contenant les acides nucléiques a été récupéré et précipité dans un volume d'isopropanol froid. Après une centrifugation à 12.000tr/min pendant 30 mn, le culot a été lavé deux fois par l'éthanol 70° conservé à froid (-20°C), séché et suspendu dans 50µl de tampon TE (10mM Tris-HCl, pH 8 ; 1mM EDTA) et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

2.3.4.2. Amplification de l'ADN des cochenilles par PCR

2,5 µl d'ADN des cochenilles ont été ajoutés au milieu réactionnel contenant :10mM Tris-HCl, pH 9.0; 50mM KCl;1.5mM MgCl₂, 200µM de chaque dATP, dCTP, dGTP et dTTP (Promega Corporation, USA) ; 1µM de chaque amorce et 1 unité de l'enzyme taq polymérase. Ce mélange est ajusté avec l'eau distillée stérile à un volume total de 25µl.

Les amorces choisies pour l'identification de *P. ficus* et *P. citri* sont présentées au tableau (9) suivant :

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la détection de *P. ficus* et *P. citri*

Espèce	Amorces	Séquences	Amplification (bp)	Région cible	Reference
<i>P. ficus</i>	FicusFor3 FicusRev3	5'-GCAATCCCTACTAGAATTAATAATTT 5'-CATAGTGAAAGTGAGCTACAACAAA	239	l'ARN ribosomal 16S	Demontis et al., (2007)
<i>P. citri</i>	CitriFor1 CitriRev1	5'-CAGGTTGAACACTTTACCCTCCT 5'-AATTGCTCTTGATAAAATTGGAA	202	l'ARN ribosomal 16S	Demontis et al., (2007)

22

L'identification de *P. ficus* et *P. citri* a été réalisée selon les conditions d'amplification qui consistait en une première dénaturation réalisée à 94°C pendant 5 minutes. Elle est suivie de 35 cycles d'amplification dans les conditions suivantes : dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 63°C pendant 30 secondes, et une élongation à 72°C pendant 30 secondes. Pour terminer, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes (Fig. 11).

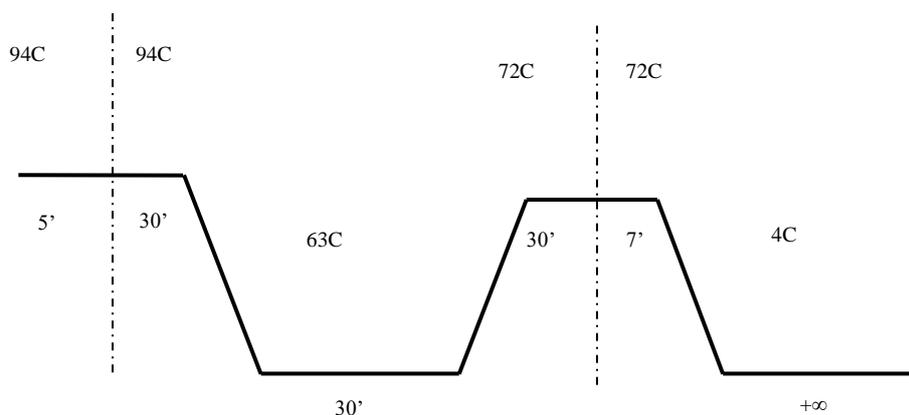


Figure 11 : Condition de polymérisation des amorces de *P. ficus* et *P. citri*.

La Révélation et visualisation des bandes ont été réalisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. L'électrophorèse a été réalisée à 100 volts pendant 25 minutes. La visualisation des bandes a été réalisée par coloration du gel au GelRed et visualisé sous la lumière UV.

Résultats et discussions

3. Résultats et discussions

3.1 Prévalence des virus associés à la maladie du bois strié de la vigne en Algérie

Les résultats de la RT-PCR obtenus pour les 202 échantillons collectés à travers les différentes régions du pays ont montré que 68,81 % soit 139 échantillons sont infectés au moins par l'un des trois virus testés. Alors que seulement 30,69% (62/202) des échantillons sont indemnes des virus étudiés (Tableau10). Le GRSPaV était le plus répandu avec un taux d'infection de 57,9 % (117 sur 202) suivi par le GVA avec un taux d'infection de 36,6 % (74 sur 202). Le GVD a été détecté pour la première fois en Algérie dans 6 échantillons sur 202 (taux d'infection de 2,97%).

Tableau 10 : Taux d'infection des échantillons testés par les virus GRSPaV, GVA et GVD

Type de raisin	Variétés	Echantillons testés	Régions	Taux d'infection%	GVA %	GVD %	GRSPaV %
Table	Gros noir	50	Alger, Mascara, Tizi-Ouzou	64 (32/50)	38	4	52
	Dattier	35	Alger, Mascara, Aïn Témouchent Boumerdes	62,86 (22/35)	25,71	2,86	57,14
	Muscat	25	Tizi Ouzou	76 (19/25)	36	4	68
	Cardinal	22	Boumerdes	63,63 (14/22)	22,73	4,55	59,09
	Kings Rubi	8	Boumerdes	100 (8/8)	100	0	62,5
Cuve	Alicante	14	Aïn Témouchent	35,71(5/14)	35,71	0	35,71
	Carignan	10	Mascara	90 (9/10)	20	0	80
	Valensi	8	Aïn Témouchent, Mascara	76 (6/8)	0	0	75
	Merseguerra	7	Aïn Témouchent Mascara	85,71 (6/7)	71,43	0	57,14
Autochtone	Autochtone	23	Mascara	78,26 (18/23)	52,17	4,35	56,52
Total		202		68,81 % (139/202)	36,63% (74/202)	2,97 % (6/202)	57,92% (117/202)

Les résultats du test RT-PCR ont montré que les échantillons collectés à travers les wilayas de Tizi-Ouzou et Boumerdes sont les plus infectés avec respectivement 80,56 et 75% de taux d'infection, suivi par les échantillons des deux wilayas Mascara et Alger. Cependant que les échantillons de la wilaya Ain-Temouchent révèlent 56% de taux d'infection par les virus du bois strié (Fig. 12).

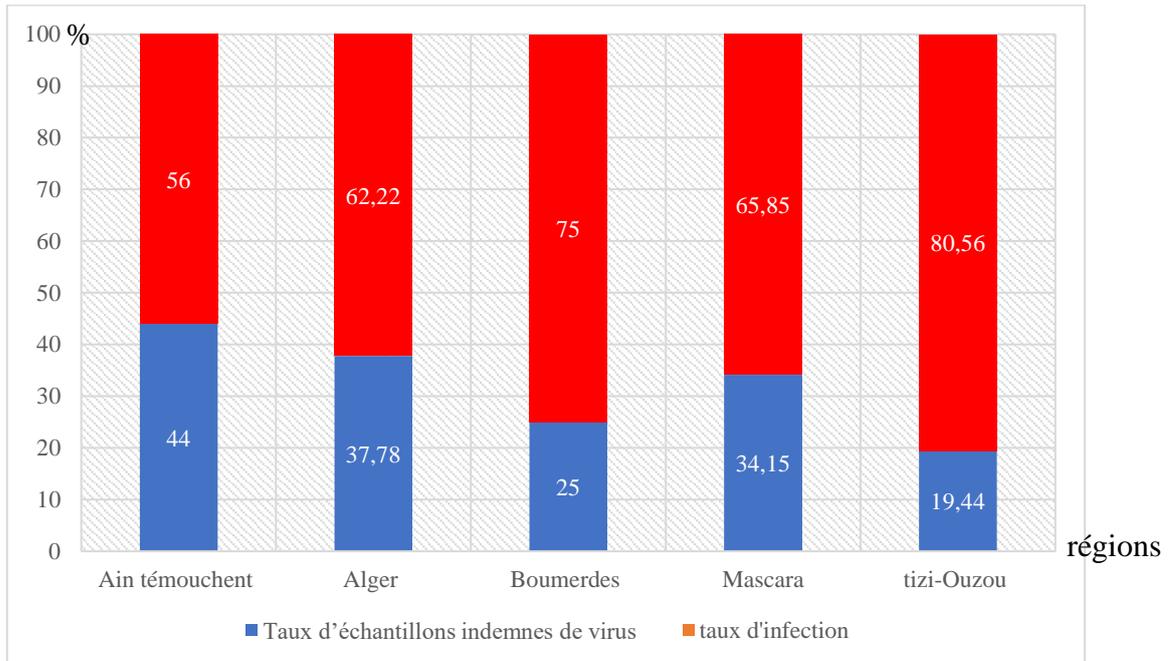


Figure 12 : Taux d'infections du bois strié dans les wilayas prospectées.

Les résultats d'analyse RT-PCR a permis de montrer que les variétés de la collection autochtone sont les plus infectées par les trois virus testés (78,26%), suivie les variétés de raisins de table (67,85%) et les variétés de raisins de cuve (66,66 %). La variété Kings Rubi s'est avérée être la plus infectée avec un taux d'infection totale de 100 %, suivie par le cépage Carignan (85,71 %), le cépage Merseguerra (85,71 %), le cépage Valensi (76%), et le cépage muscat (76%). Pour les autres variétés le taux d'infection varie de 64% pour le Gros noir à 35.71% pour Alicante Bouschet (Tableau 10).

Les résultats ont également révélé que sur les 139 échantillons infectés, 41% (57/139) ont des infections mixtes provoquées par au moins deux virus et 59% (82/139) présentent des infections simples (Fig. 13). L'infection multiple des virus GVA et du GRSPaV était la plus élevée avec un taux d'infection de 26,73 %. Cependant, l'infection multiple de GVA et le GVD a montré un taux très faible (0,1 %). Un seul échantillon a été signalé dans les infections mixtes

entre le GVD et le GRSPaV (0,05 %). Nous n'avons relevé aucune infection mixte des trois virus GVA, GVD et GRSPaV dans tous les échantillons étudiés (Tableau 11).

Tableau11 : Taux d'infections mixtes d'échantillons de vigne par les différents virus associés à la maladie du bois strié

Virus	GVD%	GRSPaV%	GVA%
GVD%	/	0,05 (01/202)	0,1 (02/202)
GRSPaV%	/	/	26,73 (54/202)
GVA%	/	/	/

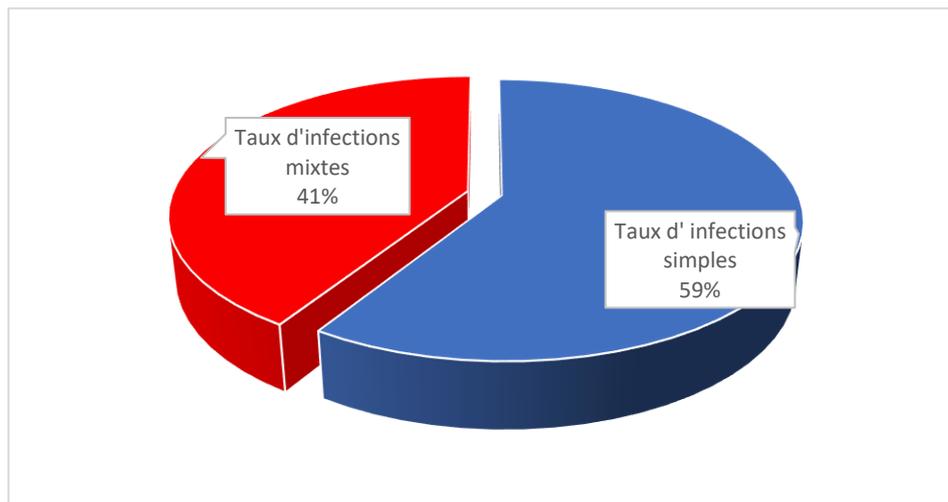


Figure 13 : Comparaison entre les infections simples et les infections multiples

Le GRSPaV est le virus le plus répandu avec un taux d'infection de 57,92% (117/202). Il a été détecté chez tous les vignobles prospectés avec des taux d'infections supérieurs à 50% à l'exception du cépage Alicante, qui a un taux d'infection de 35,71 %. Les variétés Carignan, Valensi et Dattier sont les plus infectées par le GRSPaV avec respectivement 80%, 75% et 60% de taux d'infection. La collection des variétés autochtones de l'ITAFV présente un taux élevé d'infection dépassant 56% (Tableau 10). Avec 84.38% de taux d'infection les vignobles de la wilaya de Tizi-Ouzou sont les plus touchés par ce virus suivie par les wilayas Boumerdes (62.5%), Mascara (56.10%) et Alger (51.11%). Notons que la wilaya Ain Témouchent a montré le taux d'infection (44%) la plus faible par ce virus (Fig. 14).

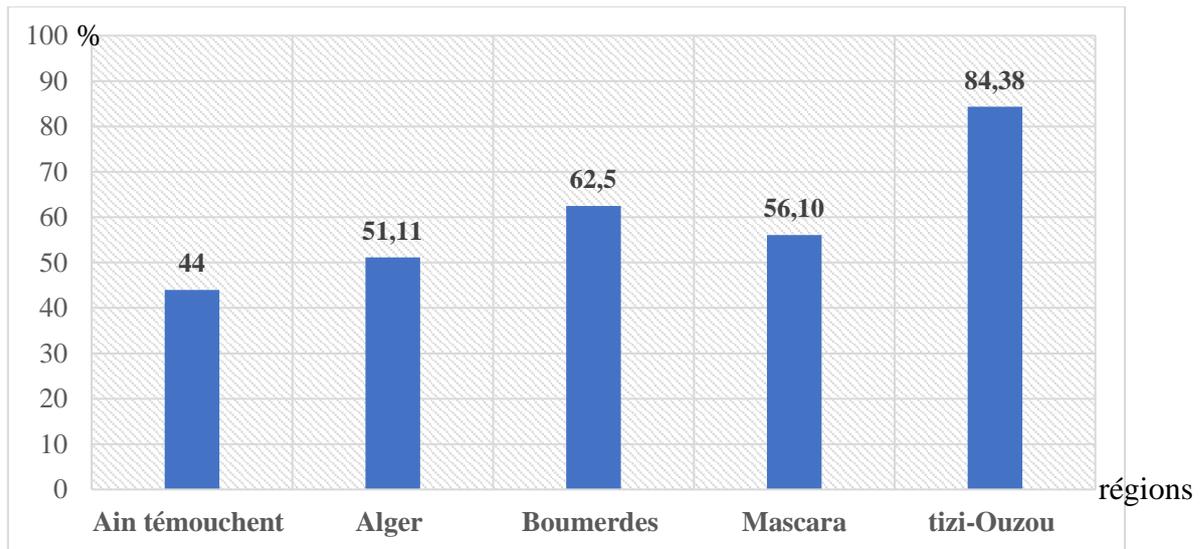


Figure 14 : Prévalence de GRSPaV dans les régions prospectées

Le GVA est le deuxième virus du point de vue prévalence avec 36,63% d'infection. Il est détecté chez tous les cépages testés à l'exception de cépage Valensi. Les cépages les plus infectés par ce virus sont King's Rubi (100%), Merseguerra (71,43%). La collection des variétés autochtones de l'ITAFV présente un taux élevé d'infection dépassant 52%. Pour les autres cépages le taux d'infection par le GVA est varié entre 20 et 38% (Tableau 10). Les vignobles de la wilaya d'Ain Témouchent (40,62%) et Boumerdes (40%) sont les plus affectés par ce virus, suivie par les wilayas Tizi-Ouzou (37,50 %) et Mascara (34,15%). Notons que la wilaya Alger a présenté le taux d'infection (28,89 %) la plus faible (Fig. 15).

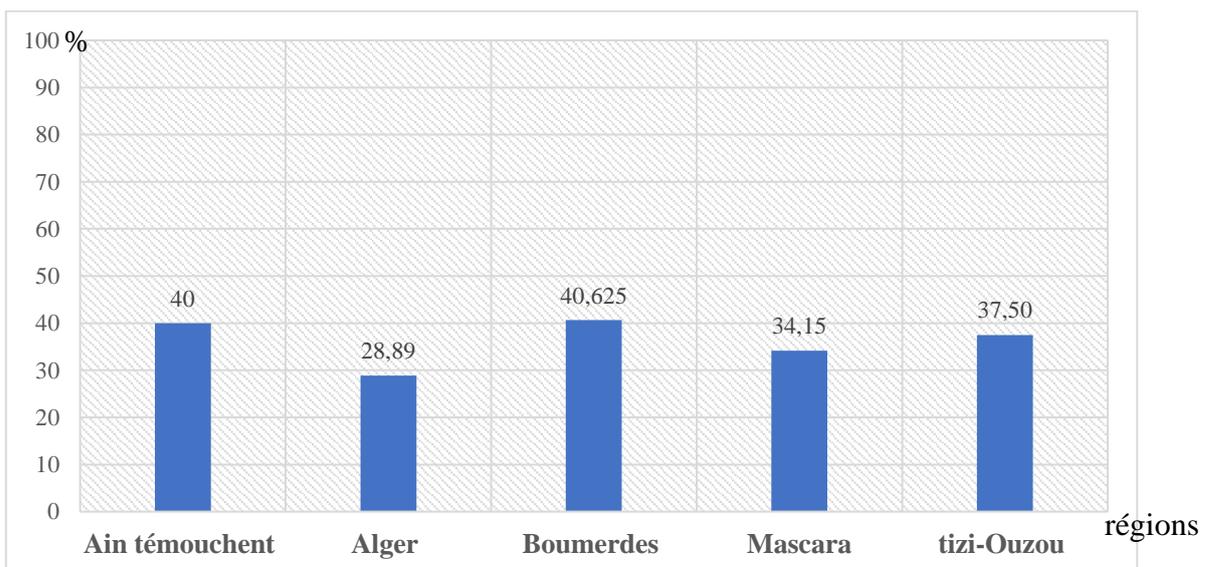


Figure 15 : Prévalence de GVA dans les régions prospectées.

Avec un taux d'infection de 2,97 %, le GVD s'est révélé être absent dans les cépages King's Rubi et les cépages de cuve Alicante, Carignan, Valensi et Merseguerra. Ce virus a été particulièrement détecté dans les variétés Muscat d'Alexandrie (4%), Dattier de Beyrouth (2,86%), Cardinal (4,55%) et Gros noir (4%). La collection des variétés autochtones de l'ITAFV présente un taux faible d'infection (4,35%) (Tableau10).

3.1.1 Discussion

Au cours de cette étude, nous avons pu prouver que la maladie du complexe du bois strié de la vigne est présente dans tous les vignobles prospectés avec un taux d'infection globale de 68,8 %. Les analyses moléculaires par RT-PCR ont permis de détecter les trois virus testés GVA, GVD et GRSPaV. Le virus GRSPaV était le plus répandu avec un taux d'infection de 57,9 % suivis par le GVA avec un taux d'infection de 36,6 %. Cette étude a permis aussi de mettre en évidence pour la première fois la présence du GVD en Algérie.

En Algérie, la maladie du complexe du bois est très peu étudiée ; seul le travail préliminaire a été réalisé par Lekikot et *al.* (2012) porté sur la prévalence des virus GVA et GVB en Algérie. Néanmoins, nous avons étudié la prévalence de deux autres virus associés au complexe du bois strié de la vigne : le GVD et le GRSPaV. Lehad et *al.* (2015) considérait la maladie de l'enroulement foliaire comme la maladie de la vigne comme étant la plus répandue en Algérie avec un taux d'infection de 55,7%. Cependant, nos résultats montrent que la maladie du bois strié semble être la plus répandue avec un taux d'infection de 68,8 %.

Le virus GRSPaV peut être considéré comme le virus de la vigne le plus prédominant signalé jusqu'à présent en Algérie avec un taux d'infection de 57,92%. La forte incidence du GRSPaV dans le vignoble algérien n'est pas surprenante puisque c'est l'un des virus les plus répandus dans de nombreux pays viticoles du monde. En effet il est le plus important du point de vue distribution dans les vignobles du Portugal (44 %) (Digiario et *al.*, 1999), Espagne (49 %) (Fiore et *al.*, 2016), Italie (74 %) (Digiario et *al.*, 1999), Kosovo (80,4 %)(Dida et *al.*, 2012). L'infection élevée des vignobles du monde par ce virus pourrait être attribuée essentiellement à la transmission par le matériel végétal de multiplication et aussi à leurs contributions avec d'autres virus à la création de plusieurs maladies virales telle que Grapevine vein necrosis (GVN) et Syrah decline (SD). Par conséquent, la détection de GRSPaV avec un taux élevé d'infection dans les vignobles prospectés suggère l'existence d'autres maladies qui n'ont pas encore été signalées en Algérie. Les mécanismes de transmission naturelle du GRSPaV sont encore

inconnu, bien que le GRSPaV soit présent avec une incidence élevée dans les régions viticoles du monde entier et même chez les vignes sauvages dans le bassin méditerranéen (Pacífico et al., 2016).

Le deuxième virus associé au bois strié en Algérie est le GVA, qui est présent avec une prévalence de 36,63%, une valeur est plus élevée par rapport aux études précédentes de Lekikot et al. (2012) (19%). Cette différence de valeurs peut être expliquée par la sensibilité des tests RT-PCR qu'on a utilisé par rapport aux tests sérologique utilisé par Lekikot et al. (2012). Le virus GVA est très répandu dans de nombreux pays viticoles. En effet il est important dans les vignobles de la Tunisie (taux d'infection : 47,9 %) (Selmi et al., 2017), au Maroc (plus de 80%) (Digiario et al., 1999), au Liban (32,4 %) (Haidar et al., 1996), en Italie (41 %) (Digiario et al., 1999), en Turquie (55 %) (Digiario et al., 1999), en Palestine (66,1 %) (Alkowni et al., 1998) et en Égypte (67,9 %) (Ahmed et al., 2004). D'autres études ont révélé une faible prévalence de GVA en Afrique du Sud (19,3%) (Jooste et al., 2015), Malte (12 %) (Digiario et al., 1999), Kosovo (11,1 %) (Dida et al., 2012), Portugal (6 %) (Digiario et al., 1999), Russie (6 %) (Porotikova et al., 2016), et la Chine (4,7 %) (Fan et al., 2013). Le taux élevé d'infection par GVA dans le vignoble Algérien est essentiellement dû à la propagation par le matériel végétal infecté et par les cochenilles. Le *P. ficus* (Signoret, 1875), une cochenille signalée comme vectrice des virus du bois strié, a été signalé en Algérie (Bissaad et al., 2017). La présence de cet insecte peut expliquer la grande distribution de cette maladie en Algérie.

Dans ce travail, le GVD a été détectée avec un taux d'infection très faible 0.2 %, une prévalence très faible a été rapporté par Abou-Ghanem et al., (1997). Cependant plusieurs auteurs ont signalé la présence de ce virus, mais avec des taux d'infection plus élevés. En Tunisie, le virus a été détecté avec un taux d'infection de 31,5 % (Selmi et al., 2017) en Italie, un taux d'infection de 31 % a été documenté (Boscia et al., 2001).

Les résultats du test RT-PCR ont montré que l'infection mixte par le GVA et le GRSPaV était assez considérable, avec un taux d'infection de 26,73 %. Cette infection mixte a été observé aussi dans plusieurs pays viticoles. En Tunisie, l'infection mixte par ces deux virus a été révélé avec un taux d'infection de 56,8 % (Selmi et al., 2017). En Italie et en Espagne, l'infections mixtes par le GVA et le GRSPaV a également été signalées (Fiore et al., 2016; Sabella et al., 2018). Ces résultats suggèrent qu'il y a une corrélation positive de prévalence entre ces deux virus.

3.2 Etude de la diversité génétique du GRSPaV

3.2.1 Comparaison nucléotidique

Dans le but d'étudier les relations nucléotidiques existantes entre les isolats séquencés, nous avons réalisé une matrice de similitude nucléotidique par le logiciel MEGA X version 10. Ainsi, sur la base d'un alignement de 662 nucléotides du gène de la protéine capsidiale, nous avons réalisé une comparaison nucléotidique entre les isolats algériens séquencés et les séquences représentatives des groupes phylogénétiques décrits par Selmi et *al.*, (2020). Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de similitude entre les séquences est varié de 76-99%. L'isolat Algérien DZ-GRSPaV-N18 a montré une similitude plus importante dans cette étude avec l'isolat CG1 (99% d'identité). Alors que la plus faible valeur de similitude est enregistrée entre les deux isolats Algériens DZ-GRSPaV-N15 et DZ-GRSPaV-N17 avec un taux de 76%. On note que la comparaison nucléotidique entre les 09 isolats algériens a révélé un pourcentage de similitude variant de 76-97% (Tableau 12).

L'analyse de de similitude entre les séquences des isolats DZ-GRSPaV-N09, DZ-GRSPaV-N10, DZ-GRSPaV-N14 et DZ-GRSPaV-N15 montrent un pourcentage allant de 91 à 96%. Ces isolats présentent 92% d'identité avec l'isolat représentatif du groupe IV strain syrah, par contre ils ne présentent que 83.5 % avec l'isolat représentatif du groupe ICG1, 85 % avec l'isolat représentatif du groupe II MG et 83 % avec l'isolat représentatif du groupe III BS (Tableau 12).

Les séquences des isolats DZ-GRSPaV-N16 et DZ-GRSPaV-N18 révèlent des pourcentages de similitude respectivement de l'ordre de 79-94% et 77-99% avec tous les isolats analysés lors de cette étude. L'isolat DZ-GRSPaV-N16 présentent une d'identité importante avec l'isolat représentatif du groupe II MG (94%) alors que l'isolat DZ-GRSPaV-N18 montrent une d'identité importante avec l'isolat représentatif du groupe de groupe I CG1(99%). La comparaison nucléotidique a révélé que les isolats GRSPaV-N16 et GRSPaV-N18 présentaient une identité de l'ordre de 90% (Tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentage d'identité entre les isolats algériens et les isolats représentatifs des groupes phylogénétiques du GRSPaV.

	DZ-_GRSPaV-N9	DZ-_GRSPaV-N10	DZ-_GRSPaV-N11	DZ-_GRSPaV-N13	DZ-_GRSPaV-N14	DZ-_GRSPaV-N15	DZ-_GRSPaV-N16	DZ-_GRSPaV-N17	DZ-_GRSPaV-N18	CG1	MG	BS	Strain_Syrah	PN	ORPN24b	LSL	AV99
DZ-_GRSPaV-N9	100																
DZ-_GRSPaV-N10	96	100															
DZ-_GRSPaV-N11	85	87	100														
DZ-_GRSPaV-N13	83	85	92	100													
DZ-_GRSPaV-N14	90	91	89	87	100												
DZ-_GRSPaV-N15	93	93	82	79	87	100											
DZ-_GRSPaV-N16	83	84	83	83	87	80	100										
DZ-_GRSPaV-N17	80	82	90	97	84	76	80	100									
DZ-_GRSPaV-N18	80	82	80	80	84	78	90	77	100								
CG1	80	82	80	80	85	78	90	78	99	100							
MG	81	82	80	81	84	78	94	78	89	90	100						
BS	80	82	90	95	84	76	80	96	79	78	79	100					
Strain_Syrah	94	95	86	84	92	92	85	81	82	82	83	80	100				
PN	81	83	86	88	81	77	79	87	79	80	77	86	81	100			
ORPN24b	82	84	83	83	83	79	81	83	79	79	78	84	82	80	100		
LSL	82	83	83	83	83	79	82	82	80	80	82	82	83	81	82	100	
AV99	81	82	82	82	83	77	82	81	81	82	81	79	82	81	79	81	100

CG1(AF057136.1) : isolat représentatif du groupeI ; **MG** (FR691076.1) : isolat représentatif du groupeII ; **BS**(AY881627.1) : isolat représentatif du groupeIII ; **Strain_Syrah** (AY368590.1) : isolat représentatif du groupeIV ; **PN** (AY368172.2) : isolat représentatif du groupeV ; **ORPN24b** (FJ943356.1) : isolat représentatif du groupeVI ; **LSL**(KR054735.1) : isolat représentatif du groupeVII ; **AV99**(LT855243.1) : isolat représentatif du groupeVIII.

La comparaison nucléotidique entre les séquences des isolats DZ-GRSPaV-N11, DZ-GRSPaV-N13 et DZ-GRSPaV-N17 montrent un pourcentage de similitude variant de 92-97%. Ces isolats présentent une d'identité moyenne de 94% avec l'isolat représentatif du groupe III BS, par contre ils ne présentent que 82 % avec l'isolat représentatif des groupes I CG1 ; 82 % avec l'isolat représentatif du groupe II MG et 86 % avec l'isolat représentatif du groupe IV strain syrah (Tableau 12). Cependant la comparaison nucléotidique entre les séquences des isolats représentatifs des groupes V, VI, VII et VIII (PN, ORPN24 b, LSL et AV99) montre que le pourcentage similitude est de l'ordre de 80-89% avec tous les isolats algériens.

Cette analyse suggère que les isolats algériens obtenus appartiennent au minimum à 4groupesphylogénétiques. Pour confirmer cette constatation, nous avons réalisé un arbre phylogénétique.

3.2.2 Etude phylogénétique

L'analyse phylogénétique des séquences CP des isolats du GRSPaV algériens et des séquences d'autres pays extraits de la base de données GenBank révèle la présence de neuf groupes distincts. Dont le groupes III représentent le groupe le plus importants de cette population (Fig. 16). La distance intra-groupe variait entre 99,4% et 94,2%. Cependant, la distance entre les groupes variait entre 77, 9% et 89,6% (Annexe 03). Les 09 séquences algériennes ont été réparties en quatre groupes : I ; II, III et IV, dont quatre séquences ont été regroupées dans le groupe IV, trois dans le groupe III, une séquence dans le groupe I et une autre séquence dans le groupe II.

Une analyse de la similitude entre les isolats de chaque groupe et entre les groupes a été menée à l'aide du logiciel MEGAX 10. Les résultats du pourcentage de la similitude intra groupe a montré que les groupes I et VII présentent 99% d'identité. Les Groupes VI et II présentent respectivement 97%et 95% d'identité. Les groupes III et IV présentent une identité de 94%. Ces résultats indiquent les relations importantes existant entre les isolats de chaque groupe (Tableau 13)

Tableau 13 : Pourcentage de similitude moyen au sein du groupe (%) pour le gène CP du virus GRSPaV

Groupes	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe VI	Groupe VII	Groupe VIII
Pourcentage de similitude	99	95	94	94	97	99	96

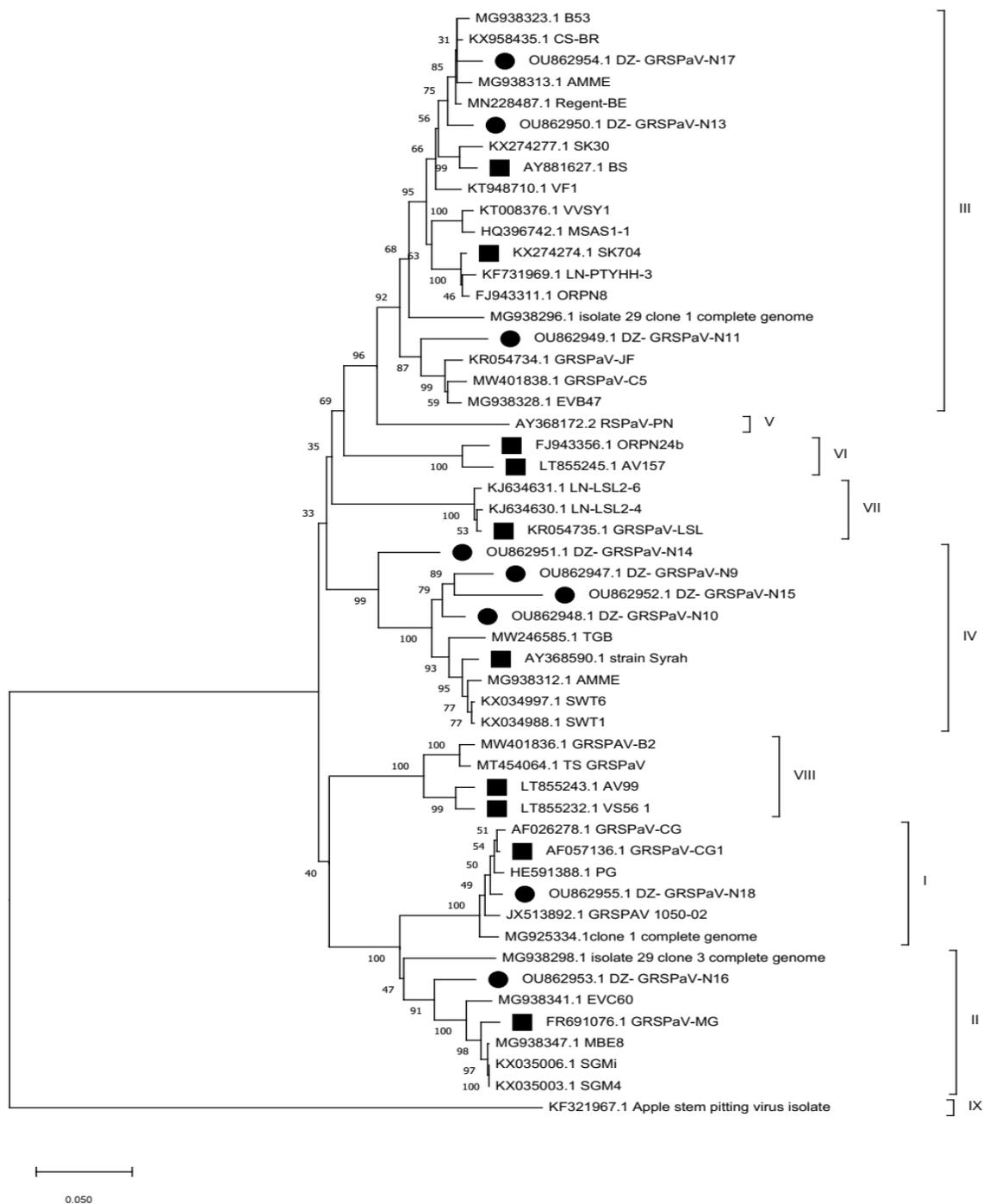


Figure 16 : Arbre phylogénétique des isolats du GRSPaV, construit avec les séquences d'un fragment de 662 nt du gène de la protéine de la capsid virale (CP) avec un pourcentage de support d'amorçage ($\geq 50\%$) et 1 000 bootstrap. ASPV (KF321967.1) a été utilisé comme outgroupe et séquence représentative du groupe (■).

L'étude de la similitude des nucléotidiques entre groupes a permis de montrer que les deux groupes I et II ont présenté le pourcentage le plus important avec 89,6% d'identité. Alors que la similitude la plus faible a été enregistré entre les groupes II et V avec un pourcentage de 77,9% d'identité. Le groupe I présente une similitude avec les autres groupes variant entre 79 et 89,6%, de 77,9 à 89,6% pour le groupe II, 79-83,7%et 80,8-82,5%respectivement pour groupe III et IV. On note que les autres groupes V, VI, VII et VIII ont présenté respectivement une similitude avec les autres groupes de 77,9 - 86,6%, 78,4-82,4%, 80,1-82,7% et 79,9-81,6%. Ces résultats montrent que les groupes définis dans cette étude présentent des différences nucléotidiques considérables (Tableau 14).

Tableau 14 : Pourcentage de similitude moyen entre groupe pour le gène CP du virus

GRSPaV.

Groupes	Groupe I	Groupe II	Groupe III	Groupe IV	Groupe V	Groupe VI	Groupe VII	Groupe VIII	Outgroup IX
Groupe I	100								
Groupe II	89,6	100							
Groupe III	79	80,1	100						
Groupe IV	81,4	82,5	81,7	100					
Groupe V	79,3	77,9	86,6	80,8	100				
Groupe VI	81,6	78,9	83,7	82,4	80,3	100			
Groupe VII	80,1	81,4	82,7	82,2	80,5	81,3	100		
Groupe VIII	81,6	81,7	81,4	81	81,1	81	81	100	
Outgroup IX	4,9	4,5	8,1	9,1	7,6	3,8	8,7	8,2	100

3.2.3 Discussion

L'étude des relations nucléotidiques pour le gène CP entre les isolats du GRSPaV montre que le pourcentage de similitude entre les séquences varie de 80 à 99%. L'isolat Algérien DZ-GRSPaV-N18 a montré une similitude la plus élevée dans cette étude avec l'isolat GRSPaV-CG1 (99% d'identité). L'analyse montre que certains isolats sont fortement liés. Ainsi, les isolats DZ-GRSPaV-N09, DZ-GRSPaV-N10, DZ-GRSPaV-N14 et DZ-GRSPaV-N15montrent une similarité nucléotidique élevée et présentent des différences considérables par rapport aux isolats isolatsDZ-GRSPaV-N11, DZ-GRSPaV-N13 et DZ-GRSPaV-N17 qui présentent une identité allant de 92-97%. Les deux isolats DZ-GRSPaV-N16 et DZ-GRSPaV-N18présentent une faible identité entre eux et avec les autre isolats Algériens. Ces résultats

rejoignent complètement ceux rapportés par plusieurs auteurs. Selmi, et *al.*, (2020) révèlent une grande variabilité des isolats tunisiens pour les gènes CP, avec une identité nucléotidique variant de 71% à 100%. Hu et *al.* (2015) révèlent également une grande variabilité des isolats chinois avec une identité nucléotidique variant de 82 % à 98%. Alabi et *al.*, (2010) montrent une variabilité génétique importante des isolats américains pour les deux gènes CP et RdRp du GRSPaV, avec une identité nucléotidique variant de 79% à 100%.

Une étude phylogénétique du gène CP a été réalisée pour les isolats séquencés lors de cette étude et des isolats téléchargés à partir de la banque de gènes GenBank. L'arbre phylogénétique construit confirme les résultats obtenus lors de la comparaison nucléotidique des isolats algériens. L'analyse révèle la présence de neuf groupes distincts. Les séquences algériennes du GRSPaV obtenu à partir des cépages de cuve et de table ont été réparties en quatre groupes : I ; II, III et IV, dont la majorité (07) des séquences ont été regroupées dans le groupe III et IV. Nos résultats concordent avec plusieurs auteurs. En Tunisie, Selmi et *al.*, (2020) ont rapporté que les séquences tunisiennes ont été réparties en quatre principaux groupes: I ; II, III et IV, dont le groupe III qui contient essentiellement les isolats issus de vignes commerciales. Cependant cette étude a révélé deux nouveaux groupes constitués d'isolats tunisiens issus de vignes cultivées, spontanées et autochtones. Ceci suggère l'hypothèse que les habitats naturels confinés pourraient constituer une nouvelle source de diversité.

Plusieurs auteurs ont étudié la distribution des variants du GRSPaV. Meng et *al.*, (2006) indique que les isolats provenant de cépage de table et de cuves des trois pays États-Unis, Canada et l'Italie sont réparties dans quatre groupes : I, II, III et IV. Ils rapportent que 68% des GRSPaV sont des variants du groupe I et II et 24 % sont des variants du groupe III, alors que seulement 08% sont des variants du groupe IV. Une autre étude récente réalisée par Hooker (2017) rapporte que plus de 50 % des variants des États-Unis sont regroupés au groupe IV et 23% des variants sont regroupés au groupe I.

Cette distribution peut être due à la grande commercialisation du matériel végétal infecté par ces variants. D'autres études supplémentaires sur le taux d'infection des variétés autochtones et de vigne sauvage sont nécessaires pour comprendre la distribution et l'évolution de ce virus dans différentes régions en Algérie. Une enquête plus approfondie sur la transmission du GRSPaV s'avère nécessaire pour comprendre son épidémiologie et la présence de nouvelles variantes génétiques dans d'autres environnements naturels.

3.3 Inventaire des cochenilles farineuses potentiellement vectrices des virus de la vigne

La recherche des cochenilles farineuses a permis de montrer que la plupart des vignobles prospectés sont attaqués par les cochenilles. Ce sont des insectes polyphages à appareil buccal du types piqueurs suceurs, qui se nourrissent du phloème. Elles sont actuellement considérées comme un parasite principal responsable de nombreux dégâts et notamment dans la transmission des virus du bois strié de la vigne.

3.3.1 Prospections

La détection des cochenilles était très difficile en raison la nature cryptique de cet insecte. Plusieurs signes nous ont permis de détecter cette cochenille dont le premier signe visible est la présence de fourmis car ces dernières sont souvent associées aux cochenilles en raison de leur attraction pour le miellat. Cependant, certains signes visibles peuvent aussi mettre en évidence leur présence telle que les masses cotonneuses de cire blanche sous l'écorce (Fig. 17).



Figure 17 : Fourmis et masse cotonneuse de cire blanche sous l'écorce.

Les prospections réalisées dans les différentes zones viticoles des régions d'étude ont révélé la prédominance des espèces de cochenilles farineuses par rapport aux autres types de cochenilles. Alors que nous avons constaté l'absence de ces cochenilles farineuses chez les parcelles de vigne de table récemment cultivées.

La détection réalisée dans différentes parcelles prospectées ont permis de collecter plus de 250 femelles de cochenilles appartenant essentiellement à la famille des *Pseudococcidae*. Les cochenilles farineuses ont été trouvées sur toutes les parties de la plante racine, tronc, rameaux et feuilles et dans tous les vignobles prospectés (Fig. 18).

Au travers des prospections qui ont été réalisées au champ sur des parcelles de Mostaganem et d'Aïn Témouchent, Il a été observé que la cochenille farineuse de la vigne redémarre son activité après une phase d'hibernation et au printemps elles commencent à se multiplier et s'alimenter de nouveau. Entre fins mars et début avril, nous avons observé la naissance des premières générations dont les individus ont commencé à migrer le long de la tige de la plante, en restant protégés sous l'écorce. Entre mai et la première décade de mois d'aout, les cochenilles ont été observées principalement sur le tiers supérieur du tronc, sur les rameaux et des bourgeons. Durant cette période les conditions deviennent favorables à leur développement (25 à 36 °C et humidité dépasse généralement les 60%) le taux d'infestation augmente avec des symptômes de suintement de miellat a été observé sur le long des ceps. Entre fin d'aout et septembre il été constaté que le développement les cochenilles est diminué de façon remarquable.

3.3.2. Identification morphologique

L'identification morphologique des cochenilles s'appuie sur des caractéristiques morphologiques spécifiques à chaque espèce. Elle est réalisée par observations à la loupe binoculaire. La plupart des caractères étudiés sont externes base sur la forme de la face postérieurs de l'insecte.



Figure 18 : Infestation du tronc, rameaux et feuilles par les cochenilles farineuses
Planococcus spp.

L'observation sous la loupe binoculaire des cochenilles a permis de caractériser un corps de consistance molle, de forme ovale, aplati et distinctement segmenté. Sur la bordure latérale du corps se situent les filaments caudaux, qui s'étirent horizontalement et deviennent progressivement plus courts vers la tête. La taille de la femelle adulte des cochenilles observés varie entre 2,5 et 4 mm de long, elle ne possède pas de division marquée entre tête, thorax et abdomen. Son corps orange clair est recouvert d'une cire pulvérulente blanchâtre qui lui donne l'aspect farineux (Fig. 19).

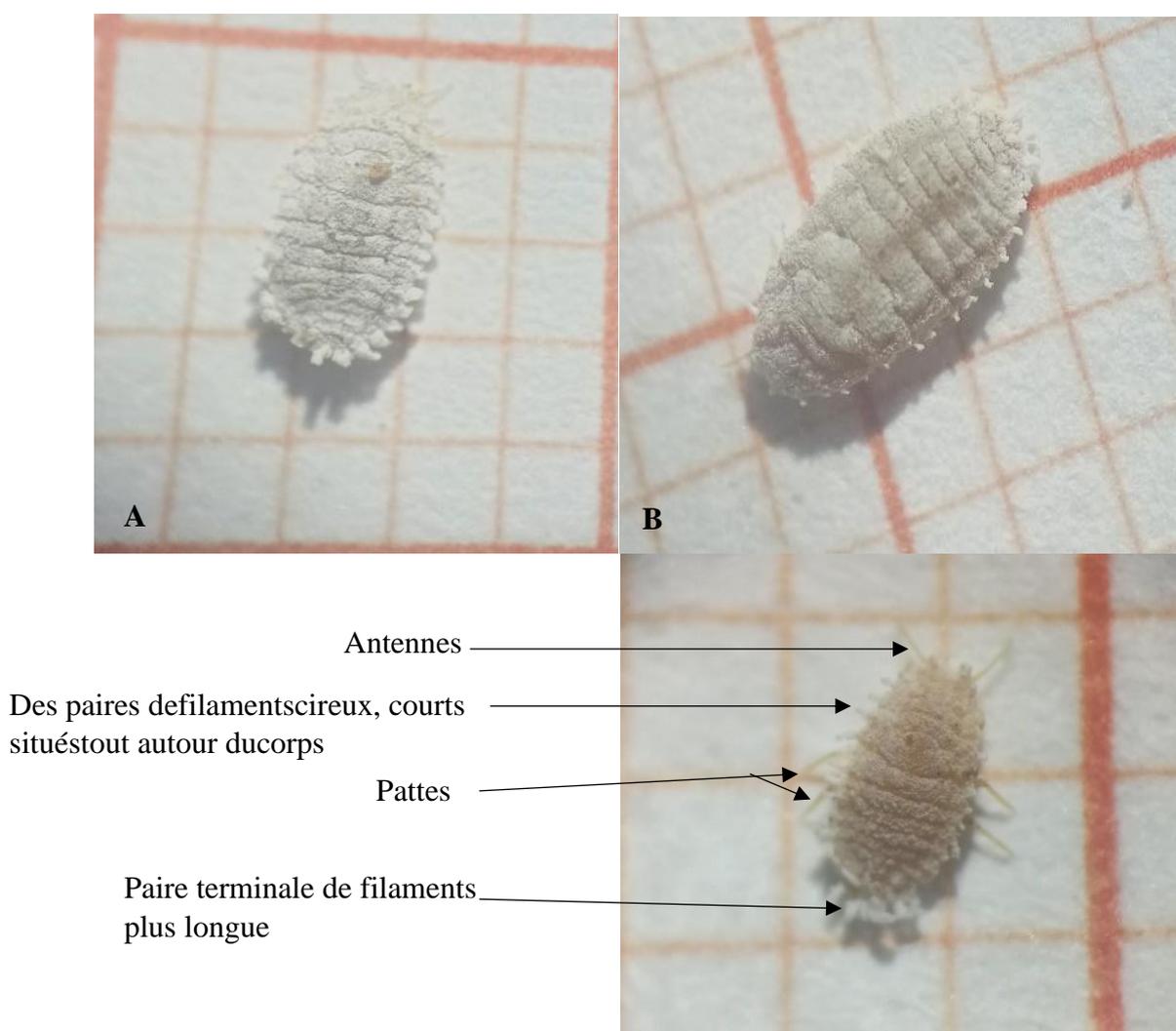


Figure 19 : Observation sous la loupe de *Planococcus* sp.

A : Cochenille de forme aplati **B** : Cochenille de forme ovale

La caractérisation morphologique ainsi que les préparations microscopiques des femelles adultes ne permettent de reconnaître que le genre *Planococcus*. L'identification des espèces était d'autant plus délicate que les vignes peuvent être attaquées par les deux espèces morphologiquement très apparentées *P. ficus* et *P. citri*. La distinction entre les deux espèces nécessite l'expertise d'un taxonomiste et se fait sur la base de critères morphologiques microscopiques qui requièrent une coloration et un montage entre lame et lamelle d'une femelle adulte. La technique moléculaire PCR est nécessaire pour faciliter la discrimination des espèces morphologiquement très similaires.

3.3.3. Identification moléculaire

L'identification moléculaire des deux espèces *P. ficus* et *P. citri*, a été réalisée par une amplification PCR d'un fragment spécifique de chacune des deux espèces (FicusFor3 et FicusRev3 et CitriFor1 et CitriRev1) et a permis de confirmer la présence *P. ficus* en Algérie. L'amorce utilisée pour la détection du *P. ficus* a amplifié une bande de 239pb observée après une migration sur gel agarose à 2% (Fig. 20).

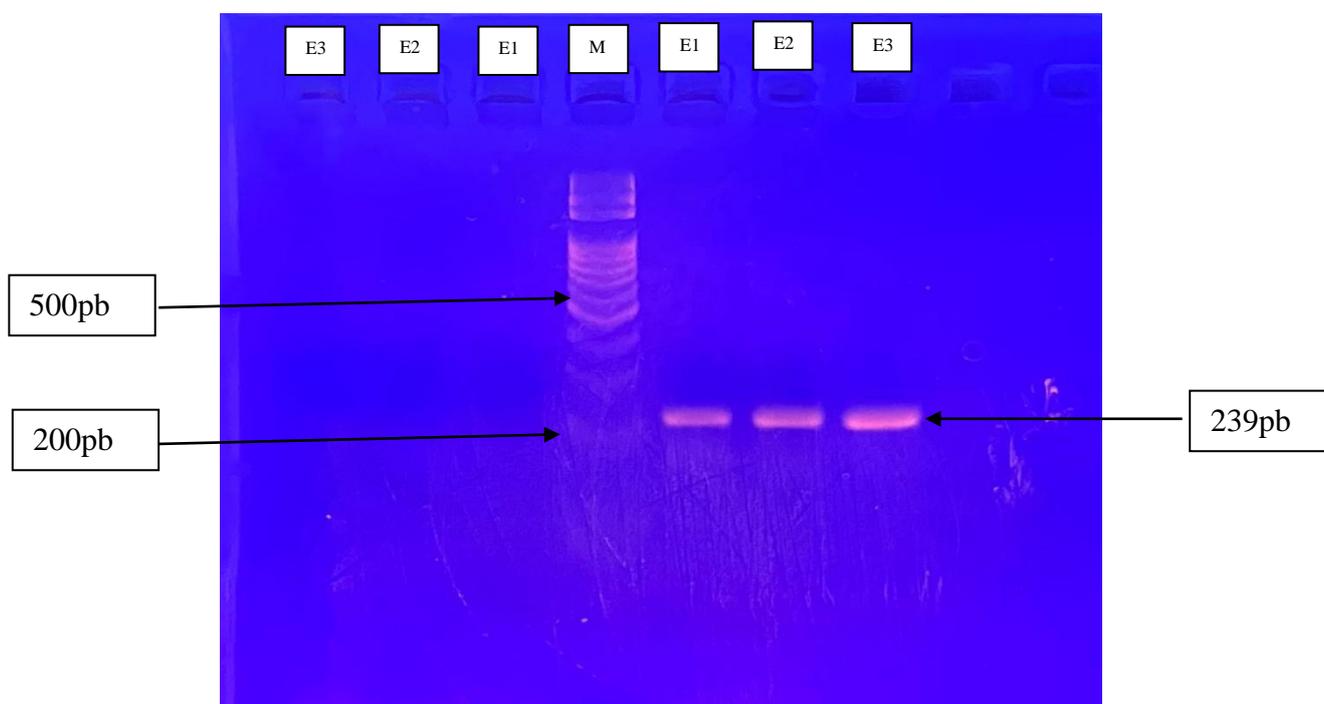


Figure 20 : Analyse électrophorétique sur gel d'agarose des produits de la PCR de cochenilles farineuses analysée.

3.3.4. Discussion

L'étude de l'inventaire des populations des cochenilles a permis de montrer que les cochenilles farineuses ont été rencontrées sur toutes les parties de la plante et dans tous les vignobles prospectés à l'exception des parcelles de vigne de table récemment cultivées. Nos résultats concordent avec plusieurs auteurs, qui confirment qu'en Algérie, les cochenilles farineuses sont l'un des groupes d'insectes qui constituent les bioagresseurs les plus importants sur de nombreuses essences fruitières et forestières (Hoceini 2015 ; Bissaad, et *al.*, 2017 et Arouaet *al.*, 2019).

Les différentes prospections menées au cours de l'année 2020 dans les régions d'étude, ont révélé l'existence d'une espèce de cochenilles farineuses *P. ficus*. Elle a pu s'installer sur toutes les variétés de vignes examinées. Cette dominance peut être attribuée à son potentiel biotique, notamment, en présence de son hôte préféré, qui est la vigne. Ben-Dov, (1994) indique que *P. ficus* est l'une des cochenilles les plus nuisibles sur le bassin méditerranéen où son attaque sévit intensivement sur une panoplie d'espèces hôtes, la vigne constitue l'un de ses principaux hôtes.

L'importance des pullulations des espèces de cochenilles varie d'un pays à un autre mais d'une façon générale, *P. ficus* demeure la cochenille la plus abondante sur vigne (Ben-Dov 1993 et Cox, 1989). Sa prédominance a été notée en Algérie (Bounaceur et *al.*, 2018), en Californie (Daane et *al.*, 2004), en Italie (Duso et *al.* 1990), Iran (Fallahzadeh et *al.*, 2009) et en Afrique du Sud (Walton & Pringle, 2004). Par contre en Tunisie *P. citri* était plus abondant dans tous les sites inspectés (Mahfoudhi 2008). Plusieurs auteurs rapportent aussi que *P. ficus* est actuellement l'espèce la plus dominante dans plusieurs pays viticoles au monde, en particulier en Californie, au Canada, l'Europe, le Moyen-Orient, l'Amérique du Sud, l'Afrique du sud et les pays méditerranéens (Ben-Dov, 1994; Cox, 1989).

Les cochenilles rencontrées sur les cepes dans les régions d'étude, ont présenté une activité intense durant la période entre mai et la première décennie de mois d'août. Cette forte contamination est également observée sur les vignobles de Mitidja par Bounaceur et *al.*, (2018) durant trois mois juillet, août et septembre. D'autres recherches ont mentionné que le pic d'infestation par les cochenilles farineuses sur vigne s'observe au cours de la période estivale (Daane et *al.*, 2004; Mahfoudhi & Dhouibi, 2009; Mansour et *al.*, 2009; Walton & Pringle, 2004). Ce décalage de mois observé dans notre étude peut être attribué aux variations

climatiques des régions d'étude. L'influence des facteurs climatiques notamment les températures et le taux d'humidité relative exercent une très forte influence sur les cochenilles farineuse(Sforza, 2000).

Plusieurs études ont montré le rôle de *P. ficus* dans la transmission des virus associés à la maladie du bois strié(Boscia et *al.*, 1993; Le Maguet et *al.*, 2012; Rosciglione et Castellano, 1985). Les premiers travaux sur son implication dans la transmission du GVA et GVB datent des années 1980(Rosciglione & Castellano, 1985).Des études de transmission des virus GVA et GRSPaV par la cochenille farineuse *P. ficus* sous les conditions contrôlées devrait être entreprise dans les prochaines années.

Conclusion

Conclusion

La maladie du bois strié de la vigne est causée par un complexe viral composé de six virus appartenant aux deux genres de la famille *Betaflexiviridae*. En Algérie, la maladie du complexe du bois est très peu étudiée, alors que toutes les données sur cette maladie sont d'une grande importance pour tous les programmes de protection. Notre travail avait pour objectif d'étudier l'étiologie de la maladie du bois strié de la vigne en Algérie.

Plusieurs études sur la prévalence des virus du bois strié de la vigne ont été menées à travers le monde et ont révélé une grande propagation de ces virus ce qui les rendent comme étant les virus les plus répandus à travers le monde. En Algérie, peu de travaux leurs ont été consacrés. L'étude de prévalence menée au cours de cette thèse nous a permis d'avoir une vue d'ensemble sur la maladie du bois strié de la vigne en Algérie. Ainsi, les résultats d'analyses moléculaires RT-PCR montrent clairement que la maladie du bois strié est présente chez tous les vignobles prospectés avec un taux d'infection globale de 68.8%. L'étude a permis de mettre en évidence l'existence de trois virus associés à cette maladie GVA, GVD et GRSPaV. L'analyse moléculaire nous a permis d'étudier la prédominance de chaque virus. Les résultats montrent que le GRSPaV est le virus le plus répandu en Algérie suivi par le GVA puis du GVD et révèle que l'infection mixite du GVA et du GRSPaV est plus importante avec un taux d'infection de 26,73 %. Le GVD a été détecté pour la première fois en Algérie dans 6 échantillons sur 202.

Une comparaison au niveau nucléotidique a été réalisée pour le GRSPaV. Les résultats obtenus montrent que le pourcentage de similitude entre les séquences varie de 80- 99%. L'analyse révèle des similitudes importantes entre certains isolats. Une étude phylogénétique a été réalisée pour mettre en évidence la structure de la population du GRSPaV et la distribution des isolats analysés dans les différents groupes phylogénétiques. L'analyse des séquences de la capsid virale (CP) du GRSPaV a permis de révéler la distribution des isolats algérien dans quatre groupes phylogénétiques, dont la majorité des séquences ont été regroupées dans le groupe III et IV.

L'étude des cochenilles a permis de montrer que les cochenilles farineuses ont été rencontré sur toutes les parties de la plante et dans tous les vignobles prospectés à l'exception des parcelles de vigne de table récemment cultivée. La présence de fourmilières près du

vignoble et/ou de fourmis sur la plante peut être un signal indiquant des foyers de contamination par la cochenille farineuse. L'identification morphologique de *P. citri* et *P. ficus* est très difficile et nécessite une grande qualification taxonomique. L'analyse par PCR a permis d'identifier une espèce de cochenille farineuse *P. ficus* dans les vignobles prospectés. Cette étude a permis de signaler que les cochenilles farineuses sont très répandues. En tant que ravageurs, leur effet est certain

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

Le séquençage d'une partie du génome des isolats algériens a permis de les répertorier dans des bases de données internationales et fournira des données précieuses sur l'appartenance phylogénétique des différents variants. D'autres travaux sont nécessaires, notamment sur la recherche des autres virus associés à cette maladie pour une compréhension globale de cette maladie en Algérie. Les résultats permettront de mettre en place des programmes de prévention et proposer des méthodes de lutte efficaces.

Références bibliographiques

Référence bibliographique

1. **Abou Ghanem, N., P. Saldarelli, A. Minafra, N. Buzkan, M.A. Castellano, and G.P. Martelli.** (1997) Properties of Grapevine virus D, a novel putative trichovirus. *Journal of Plant Pathology* 79.15–25.
2. **Adams, M. J., Antoniw, J. F., Bar-Joseph, M., Brunt, A. A., Candresse, T., Foster, G. D., Martelli, G. P., Milne, R. G., et Fauquet, C. M.** (2004) The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology*. 149(5).
3. **Adams, M., and Kreuze, J.** (2015) Revision of family Betaflexiviridae, order Tymovirales. *Virus Taxonomy. ICTV Associate Editors*. Code assigned: 2(June), 1–34.
4. **Ahmed H.M.H., M. D. and G. P. M.** (2004) Viruses and virus diseases of grapevine in Egypt. *EPPO Bulletin*. 34, 395–398.
5. **Alabi, O. J., Casassa, L. F., Gutha, L. R., Larsen, R. C., Henick-Kling, T., Harbertson, J. F., and Naidu, R. A.** (2016) Impacts of grapevine leafroll disease on fruit yield and grape and wine chemistry in a wine grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *Plos one*. 11(2). 1–18.
6. **Alabi, O.J., M. Al Rwahnih, T.A. Mekuria, and R.A. Naidu.** (2014) Genetic diversity of Grapevine virus A in Washington and California vineyards. *Phytopathology*. 104: 548–560.
7. **Alkowni, R., Digiaro, M., & Savino, V.** (1998) Viruses and virus diseases of grapevine in Palestine. *EPPO Bulletin*. 28(1–2). 189–195.
8. **Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V., & Fuchs, M.** (2004) The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*. 320(1). 12–22.
9. **Aouf M.B.** (1984). État et perspectives de développement de la viticulture en algérie. Thèse doctorat d'état. Acad. des sciences agro. Sofia. 132 p.
10. **Aroua K., Kaydan M. B., Belguendouz r., Achiri T. D et Biche M.** (2019) Inventaire des cochenilles des agrumes (clémentinier et oranger) dans deux régions de la mitidja (Algérie). *Revue Agrobiologia*. 9 (2). 1707-1714.
11. **Baudouin, J.** (2012) Enquête : Le poids du vin en France. *La revue du Vin de France*-n°559: 34–43.

12. **Belhout M. T.** (1990) Le secteur viticole et vinicole interne en Algérie: marche et commerce international. *Medit.* N° 1.33–36.
13. **Benabderabou L.** (1971) Ampélographie algérienne : cépages de cuve et de table cultivés en Algérie. Alger : *Société générale d'édition et de diffusion*, 1, 118 p.
14. **Ben-Dov, Y.** (1993) A systematic catalogue of the soft scale insects of the world: (Homoptera: *Coccoidea*: *Coccidae*) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance (1st ed.). CRC Press.
15. **Ben-Dov, Y.** (1994) A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: *Coccoidea*, *Pseudococcidae* and *Putoidae*) with data on geographical distribution, host plants, biology and economic importance. Intercept limited, Andover, UK, 686p.
16. **Birbent P.** (2001). La vigne en Algérie. AFN Collection, N° 28. 10 pages.
17. **Bissaad F.Z., Bounaceur F., Doumandji-Mitichet B.** (2017) Dynamique spatio-temporelle de *Planococcus ficus* (signoret, 1875) dans les vignobles de la mitidja (algeria). *Lebanese Science Journal*, 18(1), 26–46.
18. **Bonavia, M., Digiario M., Boscia D., Boari A., Bottalico G., Savino V., and Martelli G.P.** (1996) Studies on “corky rugose wood” of grapevine and the diagnosis of Grapevine virus B. *Vitis* 35: 53–48.
19. **Boscia, D., A. Minafra, and G.P. Martelli.** (1997) Filamentous viruses of the grapevine: Putative trichoviruses and capilloviruses. In *Filamentous viruses of woody plants*, ed. P.L. Monette, 19–28. Trivandrum: Research Signpost
20. **Boscia, D., Digiario, M., Safi, M., Garau, R., Zhou, Z., Minafra, A., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Bottalico, G., & Potere, O.** (2001) Production of monoclonal antibodies to Grapevine virus D and contribution to the study of its aetiological role in grapevine diseases. *Vitis*, 40(2), 69–74.
21. **Boscia, D., Savino, V., Minafra, A., Namba, S., Elicio, V., Castellano, M. A., Gonsalves, D., & Martelli, G. P.** (1993) Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology*, 130(1–2), 109–120.
22. **Bounaceur, F., Ouabed, A., & Z, D. F. B. F.** (2018) Cycle interprétatif de de la cochenille farineuse *Planococcus ficus* (Homoptera : *Pseudococcidae*) sur *Vitis vinifera* en Mitidja . *Revue Ecologie-Environnement* .15 : 50–54.
23. **Castellano, M.A., Abou-Ghanem N., Martelli G.P., Boscia D., and Savino V.** (1995). Cytopathology of two filamentous grapevine viruses and their intracellular

- identification by gold immunolabelling. *Journal of Plant Diseases and Protection* .102: 23–33.
24. **Chevalier, S., Greif, C., Clauzel, J.-M., Walter, B., and Fritsch, C.** (1995) Use of an Immunocapture-Polymerase Chain Reaction Procedure for the Detection of Grapevine Virus A in Koher Stem Grooving-Infected Grapevines ZusammenfassungVerwendungeiner Immuno-Polymerase-KettenreaktionzumNachweis des Grapevine Virus A in Rebenmit. *J. Phytopathology*. 143. 369–373.
 25. **Chiaki, Y., and Ito, T.** (2021) Virome analysis of genetic resources of grapevine. (Article non publié). NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/LC617947.1>
 26. **Conti, M., Milne R.G., Luisoni E., and Boccardo G.** (1980) A closterovirus from a stem pitting diseased grapevine. *Phytopathology* 70: 394–399.
 27. **Cooper, I., & Jones, R. A. C.** (2006) Wild Plants and Viruses: Under-Investigated Ecosystems. *Advances in Virus Research*, 67(06): 1–47.
 28. **Coutin, R.** (2002). Acariens et Insectes de la Vigne. *Insectes* 3: 19–22.
 29. **Cox J.M.** (1989). The mealybug genus *Planococcus* (Homoptera: *Pseudococcidae*). Bulletin of British Museum Natural History. *Entomol.* 58, 1-78
 30. **Credi, R.** (1997). Characterization of grapevine rugose wood disease sources from Italy. *Plant Disease*. 81(11), 1288–1292.
 31. **Daane, K. M., Malakar-Kuenen, R. D., & Walton, V. M.** (2004). Temperature-dependent development of *Anagyrus pseudococci* (Hymenoptera: *Encyrtidae*) as a parasitoid of the vine mealybug, *Planococcus ficus* (Homoptera: *Pseudococcidae*). *Biological Control*. 31(2), 123–132.
 32. **Demontis, M. A., Ortu, S., Cocco, A., Lentini, A., and Migheli, Q.** (2007). Diagnostic markers for *Planococcus ficus* (Signoret) and *Planococcus citri* (Risso) by random amplification of polymorphic DNA-polymerase chain reaction and species-specific mitochondrial DNA primers. *Journal of Applied Entomology*. 131(1), 59–64.
 33. **Dida, L., Elbeaino, T., Frasher, D., and Digiario, M.** (2012). Viruses of grapevine in Kosovo. *PhytopathologiaMediterranea*, 51(1), 85–90.
 34. **Digiario, M., Martelli, G. P., Savino, V., & Symons, R. H.** (1999). Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. *Phytopathologia Mediterranea*. 51, 85–90.
 35. **Dubos, B.** (2002). Maladies cryptogamiques de la vigne. 2nd ed. Féret, Bordeaux. P208.

36. **Duso, C.** (1990). Indaginibioecologichesu *Planococcus ficus* (Signoret) nel Veneto (Indigenous bioecology of *Planococcus ficus* (Signoret) in the Veneto region). Bollettino del laboratorio di EntomologiaAgraria 'Filippo Silvestri' 46, 3–20.
37. **Engelbrecht D. J., and Kasdorf G. G. F.** (1990) Field spread of corky bark, fleck, leafroll and shiraz decline diseases and associated viruses in south african grapevines. *Phytophylactica*. 22, 347–354.
38. **Engelbrecht, D.J., and G.G.F. Kasdorf.** (1990a) Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica*. 22, 341–346.
39. **Etienne, L., Clauzel, J. M., & Fuchs, M.** (1991) Simultaneous Detection of Several Nepoviruses Infecting Grapevine in a Single DAS-ELISA Test Using Mixed Antisera. *Journal of Phytopathology*. 131(2), 89–100.
40. **Fallahzadeh, M., SAGHAEI N., SAGHAEI N., H. O.** (2009), Seasonal abundance of *Planococcus ficus* (Hemiptera, *Pseudococcidae*) in Jahrom vineyards. Fars Province-Iran. *Plant Protection Journal*. 1(3), 263–276.
41. **Fan, X. D., Dong, Y. F., Zhang, Z. P., Ren, F., Hu, G. J., & Zhu, H. J.** (2013) First Report of Grapevine Virus E From Grapevines in China. *Journal of Plant Pathology*. 95, 659–668.
42. **Faoro, F.** (1997). Cytopathology of closteroviruses and trichoviruses infecting grapevines. In Filamentous viruses of woody plants, *Journal of Plant Diseases and Protection*, 102 (1), 23-33.
43. **Fiore, N., Zamorano A., Sánchez-Diana N., González X., V. P. and, & Sánchez-Navarro J.** (2016) First detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and Grapevine rupestris vein feathering virus, and new phylogenetic groups for Grapevine fleck virus and Hop stunt viroid isolates, revealed from grapevine field surveys in Spain. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 225–238.
44. **Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq M.J., C. T.** (2001). Polyvalent detection of Tricho-, CapilloandFoveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine-containing primers. *Acta Horticulturae*, 550, 37–43.
45. **Forneck A., Walker M.A., et Blaich R.** (2001) Ecological and genetic aspects of grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Hemiptera: *Phylloxeridae*) performance on rootstock hosts. *Bulletin of Entomological Research*, 91, 445–451.
46. **Galet, P.** (1977) Les maladies et les parasites de la vigne. In Tome 1. Les maladies dûes à des végétaux. *Le Paysan du Midi*, Montpellier. 872 p.

47. **Galet, P., (1999)** Précis de pathologie viticole. 3ème édition, pp.7-1.
48. **Galiakparov, N., E. Tanne, M. Mawassi, R. Gafny, and I. Sela. (2003)** ORF5 of Grapevine virus A encodes a nucleic acid-binding protein and affects pathogenesis. *Virus Genes*, 27, 257–262
49. **Galiakparov, N., Tanne, E., Sela, I., and Gafny, R. (1999)** Infectious RNA transcripts from grapevine virus A cDNA clone. *Virus Genes*, 19 (3), 235–242.
50. **Galiakparov, N., Tanne, E., Sela, I., and Gafny, R. (1999)** Infectious RNA transcripts from grapevine virus A cDNA clone. *Virus Genes*, 19(3). 235–242.
51. **Gambino, G., and Gribaudo I. (2006)** Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* ,96,1223–1229.
52. **Garau, R., Prota, V. A., Boscia, D., & Fiori, M. (1995).** *Pseudococcus affinis* MASK., new vector of grapevine trichoviruses A and B. *Vitis*, 34 (1), 67–68.
53. **Garau, R., Prota, V. A., Piredda, R., Boscia, D., and Prota, U. (1994)** On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A. *Vitis*, 33(3), 161–163.
54. **Ghilleen P. (2005).** The cultural history of plants. *Routledge*. New York. 452P.
55. **Golino, D. A. (1993).** Potential Interactions Between Rootstocks and Grapevine Latent Viruses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44 (2), 148– 152.
56. **Golino, D. A., Sim, S. T., Gill, R., & Rowhani, A. (2002)** California mealybugs can spread grapevine leafroll disease. *California Agriculture*, 56(6), 196–201.
57. **Goszczynski, D. E., & Jooste, A. E. C. (2003a).** Identification of divergent variants of Grapevine virus A. *European Journal Of Plant Pathology*, 109, 397–403.
58. **Goszczynski, D. E., & Jooste, A. E. C. (2003b).** Identification of grape vines infected with divergent variants of Grapevine virus A using variant-specific RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 112, 157–164.
59. **Goszczynski, D.E. (2010)** Divergent molecular variants of Grapevine virus B (GVB) from corky bark (CB)-affected and CB-negative LN33 hybrid grapevines. *Virus Genes*, 41, 273–281.
60. **Goszczynski, D.E., and Habili N. (2012)** Grapevine virus A variants of group II associated with Shiraz disease in South Africa are present in plants affected by Australian Shiraz disease, and have also been detected in the USA. *Plant Pathology*, 61, 205–214.
61. **Goszczynski, D.E., and Jooste A.E.C. (2003)** Identification of divergent variants of Grapevine virus A. *European Journal of Plant Pathology* ,109, 397–403

62. **Goszczynski, D.E., Kasdorf G.G.F., and Martelli G. P.** (1996) Western Blots Reveal that Grapevine Viruses A and B are Serologically Related. *J. Phytopathology*, 144, 581–583.
63. **Graniti, A., and Martelli G.P.** (1965) Further investigations on legno riccio (rugose wood), a grafttransmissible stem-pitting of grapevine. Proceedings of the International Conference on Virus and Vector on Perennial Hosts with Special Reference to Vitis, *Davis, California, USA*, pp. 168–179.
64. Haidar M. M., Digiario M., and W. K. V. S. (1996) Viruses and virus diseases of grapevine in Palestine. *EPPO Bulletin*, 26, 147–153.
65. **Haviv, S., Y. Iddan, Goszczynski, D.E., and Mawassi M.** (2012) The ORF5 of Grapevine virus A is involved in symptoms expression in *Nicotiana benthamiana* plants. *Annals of Applied Biology* .160. 181–190.
66. **Hevin m., Moutous g., and Fos A.** (1978) Transmission de la flavescence dorée par greffage en vert et présence du corky-bark » sur un cépage corse (nielluccio). *Scaphoideus littoralis* Bali., vecteur possible de cette maladie. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 12, 2, 79-86.
67. **Hewitt, W. B., and Neja, R.** (1971) Grapevine bark and wood pitting disease found in California. *In Plant disease reporter*.
68. **Hoceini F.** (2015) Etude des cochenilles et des nématodes inféodés au genre *Vitis* dans les zones viticoles en Algérie. Thèse de Doctorat ENSA, Alger, 108 p.
69. **Hommay, G., Komar, V., Lemaire, O., & Herrbach, E.** (2008) Grapevine virus A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *Eur J Plant Pathol*, 121, 185–188.
70. **Jaillon, O., J.-M. Aury, B. Noel, A. Policriti, C. Clepet, et al.** (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449, 463–467.
71. **Jooste, A. E. C., Molenaar, N., Maree, H. J., Bester, R., Morey, L., de Koker, W. C., and Burger, J. T.** (2015) Identification and distribution of multiple virus infections in Grapevine leafroll diseased vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, 142(2), 363–375.
72. **Kuszala C.**(1996). Survie du phytoplasme de la flavescence dorée de la vigne en présence d'extraits d'hôtes insectes et végétaux. *Agronomie*, 16, 573-583.
73. **Larignon P., et Dubos B.**(1997). Fungi associated with esca disease in grapevine. *Eur. J. Plant Pathol*, 103, 147-157.
74. **Larignon P., Fontaine F., Farine S., Clément C., Bertsch C.** (2009) *C. R. Biologies*. 332, 765–783.

75. **Lázár, J., and Bisztray, G. D.** (2011). Virus and virus-like diseases of grapevine in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 17(3), 25–36.
76. **Le Maguet, J., Beuve, M., Herrbach, E., & Lemaire, O.** (2012). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology*, 102(7), 717–723.
77. **Lehad, A., Selmi, I., El Air, M., Louanchi, M., Aitouada, M. and Mahfoudhi, N.** (2015): Occurrence of Grapevine Leafroll associated Virus in Algerian vineyards. *Proc. of the 18th Congress of ICVG*, Ankara, Turkey, 7-11 September pp. 157–158.
78. **Lekikot, K., Elbeainoa, T., Ghezlib, C. and Digiario, M.** (2012) A preliminary survey of grapevine viruses in Algeria. *Proc. of the 17th congress of ICVG*, Davis, California, USA, 194–197.
79. **Leroux, P., Chapeland, F., Desbrosses, D., and Gredt, M.** (1999) Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. *Crop Prot*, 18, 687-697
80. **Levadoux, L., Benabderrabou, A. and Douaouri, B.** (1971), Ampélographie Algérienne : Cépages de cuve et de table cultivés en Algérie (SNED: Alger, Algeria).
81. **Lima, M. F., Alkowni, R., Uyemoto, J. K., Golino, D., Osman, F., & Rowhani, A.** (2006) Molecular analysis of a California strain of Rupestris stem pitting-associated virus isolated from declining Syrah grapevines. *Archives of Virology*, 151(9), 1889–1894.
82. **Lima, M., Alkowni R., Uyemoto J.K., and Rowhani A.** (2009), Genome study and detection of a new variant of Grapevine rupestris stem pitting associated virus in declining California Pinot Noir grapevines. *Journal of Plant Pathology*, 91, 155–162.
83. **Mackenzie D.J.**, (1997) A standard protocol for the detection of viruses and viroids using a reverse transcription-polymerase chain reaction technique. Document CPHBT-RT-PCR1.00. The Canadian Food Inspection Agency.
84. **Mahfoudhi, N., et Dhouibi, M. H.** (2009) Survey of mealybugs (Hemiptera: *Pseudococcidae*) and their natural enemies in Tunisian vineyards, *African Entomology*, 17(2). 154–160.
85. **Maliogka, V.I., Martelli G.P., Fuchs M., and Katis N.I.** (2015) Control of viruses infecting grapevine. *Advances in Virus Research*, 91, 175–227.
86. **Mansour, R., Grissa-lebdi, K., Entomologie, L., Tunisie, N. A. De, Nicolle, A. C., Torre, I. La, Zappalà, L., Russo, A., Fitosanitarie, T., Studi, U., & Sofia, S.** (2009) Preliminary Study on Mealybugs in Two Vineyards of the Cap-Bon Region (Tunisia). *Tunisian Journal of Plant Protection*, 4(2), 185–196.

87. **Marmonier, A., Schellenberger, P., Esmenjaud, D., Schmitt-Keichinger, C., Ritzenthaler, C., Andret-Link, P., Lemaire, O., Fuchs, M., Demangeat, G.** (2010) The coat protein determines the specificity of virus transmission by *Xiphinema diversicaudatum*. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 275–279.
88. **Martelli G.P.** (1999) Infectious diseases and certification of grapevines. In G.P. Martelli and M. Digiario (Eds.) Proceedings of the Mediterranean network on grapevine closteroviruses 1992-1997 and the viroses and virus-like diseases of the grapevine a bibliographic report, 1985-1997. Bari: *CIHEAM. Options Méditerranéennes: Série B. Etudes et Recherches*. n.29.
89. **Martelli, G. P.** (2014a) Fleck complex. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1), 1–4.
90. **Martelli, G. P.** (2014b) Rugose wood complex. *Journal of Plant Pathology*, 96, 73–88.
91. **Martelli, G. P., Boscia, D., Choueiri, E., Digiario, M., Castellano, M. A., et Savino, V.** (1994) Occurrence of filamentous viruses and rugose wood of grapevine in Yemen. *Phytopathologia Mediterranea*, 33(2), 146–151.
92. **Martelli, G. P., Minafra, A., & Saldarelli, P.** (1997) Vitivirus, a new genus of plant viruses. *Archives of virology*, 142(9), 1929–1932.
93. **Martelli, G.P.** (1993) Rugose wood complex. In Graft-transmissible diseases of grapevines. *Handbook for detection and diagnosis*, 45–53.
94. **Martelli, P., Adams, M. J., Kreuze, J. F., & Dolja, V. V.** (2007) Family *Flexiviridae*: A case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology*, 45, 73–100.
95. **Mc Govern PE.** (2003) Ancient wine: The search for the origins of viniculture. Princeton: Princeton University Press.
96. **Meng, B., Martelli, G. P., Golino, D. A., & Fuchs, M.** (2017a). Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management. In *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, Springer Cham, 1–698.
97. **Meng, B., Martelli, G. P., Golino, D. A., & Fuchs, M.** (2017b) Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, 1–698.
98. **Meng, B., Martelli, G. P., Golino, D. A., & Fuchs, M.** (2017c) Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management. *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. 1–698.
99. **Minafra, A., Hadidi, A., & Martelli, G.** (1992) Detection of grapevine closterovirus A in infected grapevine tissue by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vitis: Journal of Grapevine Research*, 31(4), 221–227.

100. **Monette, P. L., Taylor, P., & Godkin, S. E.** (1992) Ultrastructure of grapevine virus A- infected *Nicotiana benthamiana* leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14, 1–9.
101. **Monette, P.L., and Godkin S.E.** (1992) Ultrastructure of Grapevine virus A-infected *Nicotiana benthamiana* leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 14, 1–9.
102. **Moskovitz, Y., Goszczynski, D. E., Bir, L., Fingstein, A., Czosnek, H., & Mawassi, M.** (2008) Sequencing and assembly of a full-length infectious clone of grapevine virus B and its infectivity on herbaceous plants. *Archives of Virology*, 153 (2), 323–328.
103. **Mouats A.** (2003) La production vinicole Algérienne. *Rev. Tass.* 32, 53-57.
104. **Mugnai L., Graniti A., and Surico G.** (1999) Esca (Black Measles) and brown wood-streaking: two old and elusive diseases of grapevine. *Plant Dis*, 83, 404-418.
105. **Murolo, S., G. Romanazzi, A. Rowhani, A. Minafra, P. La Notte, M.B. Branzanti, and Savino, V.** (2008) Genomic variability and population structure of Grapevine virus A coat protein gene from naturally infected Italian vines. *European Journal of Plant Pathology*, 120, 137–145.
106. **Nakano, M., Nakaune, R., and Komazaki, S.** (2003) Mealybug transmission of grapevine viruses in japan. *14th ICVG Conference*. Locorotondo. 12-17th September. Italy. 118.
107. **Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M., & Nakano, M.** (2008) Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Archives of Virology*, 153(10), 1827–1832.
108. **Ocete R., M., Cantos O., Failla G., Lovicu, B., Biagini, S., Imazio, M., Lara, D., Maghradze et M., Angeles Lopez.** (2011) Considerations on the European wild grape vine (*Vitis vinifera* L. ssp. *Sylvestris* (Gmelin) Hegi) and Phylloxera infestation. University of Sevilla. Spain. *Vitis*, 50 (2), 97–98
109. **Osman, F., E. Hodzic, A. Omanska-Klusek, T. Olineka, and A. Rowhani.** (2013) Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of Grapevine virus A, B and D. *Journal of Virological Methods*, 194, 138–145.
110. **Pacifico, D., Stigliano, E., Sposito, L., Spinelli, P., Garfi, G., Gristina, A. S., Fontana, I., and Carimi, F.** (2016) Survey of viral infections in spontaneous grapevines from natural environments in Sicily. *European Journal of Plant Pathology*, 145(1), 189–197.
111. **Porotikova, E. V., Dmitrenko, U. D., Yurchenko, E. G., & Vinogradova, S. V.** (2016) First report of grapevine leafroll-associated virus 2 in russian grapevines (*Vitis vinifera*). *Plant Disease*, 100 (1), 2542.
112. **Reynier A.** (2005). Manuel de viticulture. 10eme édition. Lavoisier Tec & Doc. Paris. 600 p.

113. **Rosa, Jimenez, C., Margaria J. F., P., and Rowhani, A.** (2011) Symptomatology and effects of viruses associated with rugose wood complex on the growth of four different rootstocks. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62(2), 207–213.
114. **Rosciglione, B., and Castellano, M. A.** (1985) Further evidence that mealybugs can transmit Grapevine virus A (GVA) to herbaceous hosts. *Phytopathologia Mediterranea*, 24 (1/2), 186–188.
115. **Rosciglione, B., Castellano, M. A., Martelli, G. P., Savino, V., & Cannizzaro, G.** (1983). Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis*, 22, 331–347.
116. **Rosciglione, B., M.A. Castellano, G.P. Martelli, V. Savino, and G. Cannizzaro.** (1983) Mealybug transmission of Grapevine virus A. *Vitis*, 22, 331–347.
117. **Sabella, E., Pierro, R., Luvisi, A., Panattoni, A., D’Onofrio, C., Scalabrelli, G., Nutricati, E., Aprile, A., De Bellis, L., and Materazzi, A.** (2018) Phylogenetic analysis of viruses in tuscanvitis vinifera sylvestris (Gmel.) hegi. *Plos one*, 13 (7), 1–16.
118. **Saldarelli, P., Dell’Orco, M., & Minafra, A.** (2000) Infectious cDNA clones of two grapevine viruses. *Archives of Virology*, 145 (2), 397–405.
119. **Scagliusi, S. M. M., Vega, J., & Kuniyuki, H.** (2002) Cytopathology of callus cells infected with grapevine leafroll-associated virus 3. *Fitopatologia Brasileira*, 27 (4), 384–388.
120. **Selmi, I., Pacifico, D., Carimi, F., & Mahfoudhi, N.** (2017) Prevalence of viruses associated with grapevine rugose wood disease in Tunisia. *Tunisian Journal of Plant Protection*, 12 (2), 149–158.
121. **Sforza, R.** (2000) Cochenilles sur la vigne : bio-éthologie, impact agronomique, lutte et prophylaxie.
122. **Shi, B.J., N. Habili, R. Gafny, and R.H. Symons.** (2004) Extensive variation of sequence within isolates of Grapevine virus B. *Virus Genes*, 29, 279–285.
123. **Tanne, E., Y. Ben-Dov, and B. Raccach.** (1989) Transmission of the corky-bark disease by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica*, 17, (1), 55.
124. **Tanne, E., Y. Ben-Dov, and Raccach, B.** (1993) Mealybug transmission of corky bark disease and an associated virus to healthy grapevine. *11th Meeting of the ICVG*. Montreux. Switzerland. 59–60.
125. **Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant. Cell*. 6, 959-965.

126. **Walter B, Martelli G.P.** (1996) Sélection clonale de la vigne : sélection sanitaire et sélection pomologique. Influence des viroses et qualité. 1ère partie : effets des viroses sur la culture de la vigne et ses produits. *Bulletin de l'OIV. Oiv Office International de la Vigne & du Vin*. 947-971.
127. **Walton, V. M., and Pringle, K. L.** (2004) Vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: *Pseudococcidae*), a Key Pest in South African vineyards. A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 25 (2), 54–62.
128. **Zhou, Z.S., M. Dell’Orco, P. Saldarelli, M. Turturo, A. Minafra, and G.P. Martelli.** (2006) Identification of an RNA silencing suppressor in the genome of Grapevine virus A. *Journal of General Virology*, 87, 2387–2395.
129. **Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P. A., & Belli, G.** (2006) Transmission of grapevine virus a and grapevine leafroll-associated virus 3 by *heliococcus bohemicus*. *Journal of plant pathology*, 88, 325–328.

Site internet

- <http://www.ceev.be>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.oiv.int/oiv/cms/index>
- <http://faostat3.fao.org>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/>

Annexes

Annexes

Annexe 1 : cépage Autochtones de la collection ITAF

N°	cépage Autochtones
1	Ahmar machtras
2	Tiziounine
3	Ahchichene
4	Farana noir
5	Aberkane
6	Tadelith
7	Kabylie aldebert
8	Raisin de bouni
9	Adadi des bibans
10	Ahmar de mascara
11	Ain el couma
12	Ain el kelb
13	Farana Muscat noir
14	Muscat d'adda
15	El awali
16	Toutrisin
17	Sid ahmeddraaelmizane

Annexe 02 :

1- Tampon RT-PCR

1- Tampon d'extraction des acides nucléique totaux (TNA)

a- Tampon de broyage (pour 50 ml)

- 23,65 gr thieosanate Guanidine (4M)

- 1,36 gr NaOAc (0,2 M) Ph : 5,2-5,5

- 0,465 gr EDTA 25mM

4,9 gr KOAc 1,0 M

- 50 ml d'eau distillé stérile (ajouter lentement et avec attention)

- 1,25 gr PVP-40, 2,5 % (ajouter après avoir fait la stérilisation)

- 1,2 ml CH₃COOH pour ajuster le Ph (5,6- 5,8).

2- Tampon de lavage (pour 10ml)

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

3 - Préparation du TBE (pour 1 L)

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

4 - Préparation du NaI

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

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

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

- 236,4 gr Guanidine thiocyanate (4M) dans 100ml I →
- 8,203 gr NaOAc (0,2 M) Anhydre dans 100ml II →
- 4,653 gr EDTA (25mM) -II 49,07 gr KOAc (1M) III →
- Mélange des composés -I- et -II- jusqu'à dissolution puis ajouter le composé -III
- Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique.
- Ajuster le volume jusqu'à 500ml
- Mettre à l'autoclave 120°C pendant 20min
- Ajouter 2,5% de Polyvinylpyrrolidone 40 (PVP 40)

7 - Préparation du silica (silica dioxyde).

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

Annexe 03 :

Tableau : Nom, origine et numéro d'accèsion des séquences des isolats du GRSPaV téléchargé à partir de GenBank utilisées dans l'étude phylogénétique.

N°	N° accession	Isolat	Groupe	Origine
1.	AY881627.1*	BS	III	Canada
2.	KX274277.1	SK30	III	Slovakia
3.	KX958435.1	CS-BR	III	Brazil
4.	MG938298.1	isolate 29 clone 3 complete genome	II	France
5.	MG938347.1	MBE8	II	France
6.	KX274274.1	SK704	III	Slovakia
7.	KT948710.1	VF1	III	Brazil
8.	MG938313.1	AMME	III	France
9.	MN228487.1	Regent-BE	III	Belgium
10.	AY368172.2*	RSPaV-PN	V	USA
11.	MG938328.1	EVB47	III	France
12.	MG938296.1	isolate 29 clone 1 complete genome	III	France
13.	KR054734.1	GRSPaV-JF	III	China
14.	KT948710.1	VF1	III	Brazil
15.	LT855245.1*	AV157	VI	Tunisia
16.	FJ943356.1*	ORPN24b	VI	USA
17.	KF731969.1	LN-PTYHH-3	III	China
18.	MG938323.1	B53	III	France
19.	MW401838.1	GRSPaV-C5	III	India
20.	FJ943311.1	ORPN8	III	USA
21.	KT008376.1	VVSY1	III	Brazil
22.	KF731969.1	LN-PTYHH-3	III	China
23.	HQ396742.1	MSAS1-1	III	Italy
24.	KR054735.1*	GRSPaV-LSL	VII	China
25.	KX274277.1	SK30	III	Slovakia
26.	LT855243.1*	AV99	VIII	Tunisia
27.	MW401836.1	GRSPaV-B2	VIII	India

28.	MT454064.1	TS GRSPaV	VIII	India
29.	LT855232.1	VS56 1	VIII	Tunisia
30.	FR691076.1*	GRSPaV-MG	II	Italy
31.	MG938347.1	MBE8	II	France
32.	MG938341.1	EVC60	II	France
33.	KX035006.1	SGMi	II	France
34.	KX035003.1	SGM4	II	France
35.	AF057136.1*	GRSPaV-CG1	I	USA
36.	MG925334.1	clone 1 complete genome	I	France
37.	AF026278.1	GRSPaV-CG	I	USA
38.	HE591388.1	PG	I	Italy
39.	JX513892.1	GRSPAV 1050-02	I	Canada
40.	AY368590.1*	strain Syrah	IV	USA
41.	MG938312.1	AMME	IV	France
42.	KX034997.1	SWT6	IV	France
43.	KX034988.1	SWT1	IV	France
44.	MW246585.1	TGB	IV	USA

* Séquence de référence

Annexe 04 :**Tableau 01 : Distance intra-groupe.**

Groupe	Groupe VII	Groupe IV	Groupe III	Groupe II	Groupe I	Groupe VI	Groupe VIII
Distance	0,00607	0,05782	0,05598	0,04618	0,01471	0,03091	0,04214

Tableau 01 : Distance entre les groupes.

	groupe_VII	groupe_IV	outgroup_IX	groupe_III	groupe_II	groupe_I	groupe_VI	groupe_VIII	groupe_V
groupe_VII									
groupe_IV	0,178								
outgroup_IX	0,913	0,909							
groupe_III	0,173	0,183	0,919						
groupe_II	0,186	0,175	0,955	0,199					
groupe_I	0,199	0,186	0,951	0,210	0,104				
groupe_VI	0,187	0,176	0,962	0,163	0,211	0,216			
groupe_VIII	0,190	0,190	0,918	0,186	0,183	0,184	0,201		
groupe_V	0,195	0,192	0,924	0,134	0,221	0,207	0,197	0,189	

**The Occurrence of Grapevine Rugose
Wood Disease in Algeria**

Publication

The Occurrence of Grapevine Rugose Wood Disease in Algeria

A. BACHIR¹, I. SELMI², A. LEHAD^{1*}, M. LOUANCHI¹ and N. MAHFOUDHI²

¹Laboratoire de Phytopathologie et Biologie Moléculaire, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie, Rue Hacén Badi, Belfort, El Harrach, 16000 Alger, Algeria

²Laboratoire de Protection des Végétaux, Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hedi Karray, 2049 Ariana, Tunisia

(Received: 21 July 2019; accepted: 4 September 2019)

Rugose wood disease constitutes one of the major grapevine disease complexes causing significant economic damage worldwide. It is widely distributed in all grapevine growing areas of the world and comprised of four individual syndromes, which may be caused by different viruses. These syndromes are Corky bark, LN 33 stem grooving, Kober stem grooving and Rupestris stem pitting (RSP). The present study focuses on the prevalence of three viruses associated with rugose wood complex (RWC) in Algeria.

Field inspections and collection of symptomatic samples were conducted on autumn 2012 in the table wine and autochthone accession in the western and central regions of Algeria. A total of 202 samples were tested by RT-PCR using specific primers for Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus D (GVD) and Grapevine rupestris stem pitting associated virus (GRSPaV).

The results of RT-PCR indicated the presence of the viruses GVA, GVD and GRSPaV with 68,81% (139 out of 202 infected samples) total average infection rate. The results also indicated the predominance of GRSPaV compared to the prevalence of GVA and GVD with an infection rate of 57,92% vs. 36,63% (74 out of 202) and 2,97% (6 out of 202), respectively. Mixed infections of these three viruses were not observed in any of the samples analysed, however the mixed infection of GVA and GRSPaV was noted with a high rate of 26.73%. The grapevine cultivars; Kings Rubi, Carignan and Merseguerra were the most infected, while the Alicante Bouschet cultivar presented the lowest infection rate. To the best of our knowledge, the present study reports for the first time on the presence of GVD in Algeria.

Keywords: GRSPaV, GVA, GVD, RT-PCR.

Rugose wood complex (RWC) is one of the most widespread graft-transmissible diseases of grapevines (Martelli, 1993), it is comprised of several disease syndromes (Grapevine Rupestris stem pitting, Kober stem grooving, Corky bark, LN33 stem grooving) (Martelli, 2014, 2017). It is caused by a complex composed of six viruses belonging to the family of *Betaflexiviridae*; *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus B* (GVB), *Grapevine virus D* (GVD), *Grapevine virus E* (GVE), *Grapevine virus F* (GVF) and *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) (Nakaune et al., 2008; Maher Al Rwahnih et al., 2012; Alabi et al., 2013). It causes a delayed bud opening in spring, after a few years of planting some grapes decline and die and others present a

Corresponding author, e-mail: a.lehad@hotmail.fr

swelling (Martelli, 2014). Some of these viruses were found to be transmissible by mealy- bugs (La Notte et al., 1997).

In several cases, plant material infected by viruses is the most effective way of dis- ease propagation at short and long distances. Indeed, the vegetative propagation of shoots taken from infected cultivars plays an important role in the spread of the RWC disease. For this reason, it is important to use healthy mother vines, rootstocks and grafts (Galet, 1977).

In addition, studies on the vectoring of rugose wood disease in vineyards have led to the identification of several species of mealybugs, insects which belong to the families of *Pseudococcidae* and *Coccidae* and involved in the transmission of GVA, GVB and GVE : GVA and GVB are transmitted by *Phenacoccus aceris*, *Planococcus citri*, *Plano- coccus ficus* (Tanne et al., 1989; Rosciglione and Castellano, 1985), *Pseudococcus affinis*, *Pseudococcus longispinus* (Rosciglione et al., 1983; La Notte et al., 1997) *Pseudococcus viburni* (Garau et al., 1994). *Pseudococcus comstocki*, *Heliococcus bohemicus* (Zorloni et al., 2006), *Parthenolecanium corni* (*Coccidae*) (Hommay et al., 2008), and *Neopulvinaria innumerabilis* (*Coccidae*) (Zorloni et al., 2006). Often, GVA, GVB and GVE transmission occurs simultaneously with *Grapevine leafroll-associated virus-1* and *Grapevine leaf- roll-associated virus-3* (GLRaV-1 and GLRaV-3) (Herrbach et al., 2016). No vector has been identified for GVD, GVF and GRSPaV (Le Maguet et al., 2012).

Some vectors of GVA and GVB were described in Algeria in several vineyards. Thus, the dynamics of *Planococcus ficus* was studied in vineyards from the west of Alge- ria (Bissaad et al., 2017)

Few studies were focused on the importance and widespread of this disease. It is essential to know whether this disease is prevalent in Algeria, in order to set up research on the diversity of the causal viruses and their vectors in Algeria. Viruses associated with the rugose wood disease were reported previously in Algeria, based on analyses of samples collected from a limited geographical area (Lekikot et al., 2012). Thus the main objective of this study is the description of the occurrence of several viruses implicated in the RWC disease (GRSPaV, GVA and GVD) and the search of the presence of additional RWC- associated viruses.

Materials and Methods

Field surveys and sample collection

In order to study the occurrence of Rugose Wood virus in Algeria, a total of 202 samples were used to study the occurrence of GVA, GVD and GRSPaV. Sample collection was conducted during the autumn of 2012 from the center and western regions of Algeria containing commercial and autochthonous cultivars (Table 2).

Molecular analyses

Total nucleic acid extraction

Total nucleic acids (TNA) were extracted using 0.2 g of phloem tissues (cortical scrapings) from each sample according to Foissac et al. (2001). The samples were ground in 1 ml extraction buffer (4 M guanidine thiocyanate, 0.2 M NaOAc pH 5.2, 25 mM EDTA, 1.0 M KOAc pH 5.0 and 2.5% w/v PVP-40) and mixed with 2% sodium meta- bisulfite as antioxidant. The mixture was transferred into an Eppendorf tube containing 100 μ l Sodium Lauryl Sarkosyl (NLS 10%) and incubated at 70 °C for 10 min, then placed on ice for 5 min. After centrifugation

at 13,000 rpm for 10 min, 300 µl of supernatant were transferred to an Eppendorf tube to which 150 µl absolute ethanol, 300 µl 6 M NaCl and 50 µl SiO₂ (12% with PH 2) were added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature and then centrifuged at 6,000 rpm for 1 min. The pellet was recovered and washed with 500 µl of washing buffer (50% STE 1X with PH 7.5, 50% absolute ethanol), re-suspended in 120 µl of sterile distilled water, incubated for 3 min at 70 °C and then centrifuged at 13,000 rpm for 3 min. The supernatant containing the total nucleic acids was transferred to new Eppendorf tubes and stored at -20 °C.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed for the detection of *Grapevine virus A* (GVA), *Grapevine virus D* (GVD) and *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV) by using the specific sets of primers listed in (Table 1).

Table 1
Primers used for the detection of the viruses associated with rugose wood disease

Virus	Primers	Sequences	Amplified product (bp)	Reference
GVA	H7038	AGGTCCACGTTTGCTAAG	236	Mackenzie (1997)
	C7273	CATCGTCTGAGGTTTCTACTAT		
GVD	CP7V	CTTAGGACGCTCTTCGGGTACA	474	Abou-Ghanem et al., (1997)
	CP471C	CTGCTCTCCAACCGACGACT		
GRSPaV	RSP-H48	AGCTGGGATTATAAGGGAGGT	331	Lima et al., (2006)
	RSP-C49	CCAGCCGTTCCACCACTAAT		

Reverse transcription and amplification

TNA (10 µl) of each sample was mixed with 1 µl random primers (1 µg/µl) and 1.5 µl of sterile water and denatured at 95 °C for 5 min. Reverse transcription was run for 1 h at 39 °C in 1 µl M-MLV (200 u/µl) (Invitrogen Corporation), 4 µl buffer (5X F_s), 2 µl DTT (0.1 M) and 0.5 µl dNTPs (10 mM) and adjusted to a final volume of 25 µl with sterile distilled water. A volume of 2.5 µl of the synthesized cDNA was used for PCR amplification using a mixture containing 2.5 µl 10X Taq polymerase buffer, 1 µl MgCl₂ (50 mM), 1 µl dNTPs (10 mM), 0.5 µl of each primer (20 pM) and 0.25 µl Taq polymerase (5 u/µl) (Invitrogen Corporation, CA, USA) and adjusted to a final volume of 25 µl with sterile distilled water. PCR reactions consisted of one cycle at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles: denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at (52 °C/45 s, 54 °C/45 s, and 52 °C/45 s for GVA, GVD and GRSPaV, respectively) and elongation at 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 7 min. The PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gels in 1xTBE buffer and visualized under UV light after staining with Ethidium bromide.

Results

Virus detection and distribution

All samples collected from the central and western regions of Algeria were tested by RT-PCR for the presence of GVA, GVD and GRSPaV. Results revealed the presence of the three viruses in Algerian vineyards. Out of 202 samples, 139 (68.81%) were infected by at least one of the above mentioned viruses. GRSPaV was the most prevalent with an infection rate of 57.9% (117 out of 202) followed by GVA with 36.6% (74 out of 202) infection rate. GVD was detected for the first time in Algeria in 6 samples out of 202 (2.97% infection rate). Furthermore, cultivar

Kin's Rubi was found totally infected by GRSPaV, followed by Carignan with 90%. The lowest rate of GRSPaV infection was found in the cultivar Alicante Bouschet (35.7%).

The highest infection rate was found in the autochthonous grapevine collection of the Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (ITAF) with 78,3% followed by the wine and table grapes which presented approximately equal prevalence. The table grape King's Rubi was most infected (100%) followed by the wine cultivar Carignan with 90%. The wine cultivar Alicante Bouschet was the least infected (35,7%).

Results also revealed that the mixed infection of the GVA and GRSPaV viruses was the highest with a rate of 26.73%. However, the mixed infection GVA and GVD showed a very low rate (0.1%). Only one sample was reported in mixed infections between GVD and GRSPaV (0.05%). We did not record any mixed infections of the three viruses GVA, GVD and GRSPaV in all samples studied (Table 3).

Discussion

Only a few studies have addressed the presence of the Rugose Wood Complex (RWC) virus disease in Algeria, although GVA and GVB have been reported previously by Lekikot et al. (2012). Therefore, the present study focused on the prevalence of two other grapevine viruses, GVD and GRSPaV. Thus, this is the first study that shows the presence of these two viruses associated with RWC in Algeria.

Previously, Lehad et al. (2015) considered the grapevine leafroll disease (GLD) as the most prevalent grapevine disease in Algeria with an infection rate of 55,7%. However, our results highlight that RWC seems to be more prevalent than GLD with an infection rate of 68.8% (Table 2). The three prospected viruses (GVA, GVD and GRSPaV) were found to occur with different infection rates, with GRSPaV being the most prevalent.

Results obtained revealed the presence of GRSPaV, GVA and GVD in Algeria with differences in their prevalence. For GVD, 6 out of 202 samples in the cultivars Gros Noir, Dattier de Beyrouth, Muscat, Cardinal and the autochthonous grapevine germplasm collection of ITAF were found to be infected (2.97 % infection rate). Up to now, no insect vectors for GVD were reported. Several countries have reported the presence of this virus (GVD) but with higher infection rates. In Tunisia, the virus was found to occur with an infection rate of 31.5% (Selmi et al., 2017), in Italy, an infection rate of 31% was documented (Boscia et al., 2001). On the other hand, the GRSPaV was found in this study to be

Table 2
Infection rates of samples tested for the presence of GRSPaV, GVA and GVD

Cultivar	No. of samples	Regions	Infection %	GVA %	GVD %	GRSPaV %	
Table cultivars	Gros noir	50	Algiers, Mascara, Tizi-Ouzou	64 (32/50)	38	4	52
	Dattier	35	Algiers, Mascara, Ain Temouchent, Boumerdes	62,86 (22/35)	25,71	2,86	57,14
	Muscat	25	Tizi Ouzou	76 (19/25)	36	4	68
	Cardinal	22	Boumerdes	63,63 (14/22)	22,73	4,55	59,09
	Kings Rubi	8	Boumerdes	100 (8/8)	100	0	62,5
Wine cultivars	Alicante Bouschet	14	Ain Temouchent	35,71(5/14)	35,71	0	35,71
	Carignan	10	Mascara	90 (9/10)	20	0	80
	Valensi	8	Ain Temouchent, Mascara	76 (6/8)	0	0	75
	Merseguerra	7	Ain Temouchent	85,71 (6/7)	71,43	0	57,14
autochthones	autochtone	23	Mascara	78,26 (18/23)	52,17	4,35	56,52
Total		202		68,81% (139/202)	36,63% (74/202)	2,97% (6/202)	57,92% (117/202)

Table 3

Rates (%) of the mixed infections of vine samples by the different viruses associated with rugose wood disease

Vitivirus	GVD	GRSPaV	GVA
GVD	/	0.05% (1/202) /	0.1% (2/202)
GRSPaV			26.73% (54/202) /
GVA			

the more prevalent virus in Algeria with an infection rate of 68,8%. In Tunisia, this virus (GRSPaV) was found to be also prevalent with an infection rate of 51.3%, while for South Africa an infection rate of 36.8% was reported (Jooste et al., 2015). In addition, infection rates for GRSPaV previously documented for different countries are as follows: Portugal (44%) (Digiario et al., 1999), Spain (49%) (Fiore et al., 2016), Italy (74%) (Digiario et al., 1999), Kosovo (80.4%) (Dida et al., 2012). Thus the virus (GRSPaV) may be considered as the most predominant grapevine virus reported up to now in Algeria (infection rate: 68,8%). In contrast, Lehad et al. (2015) reported that in Algeria GLRaV-3 has a prevalence (infection rate) of only 44%.

GVA was reported to be significantly prevalent in Tunisia (infection rate: 47.9%) (Selmi et al., 2017), Lebanon (32.4%) (Haidar et al., 1996), Italy (41%) (Digiario et al., 1999), Turkey (55%) (Digiario et al., 1999), Palestine (66.1%) (Alkowni et al., 1998) and Egypt (67.9%) (Ahmed et al., 2004). On the other hand, the virus was reported to be less prevalent in other countries, e.g. in South Africa (infection rate: 19.3%) (Jooste et al., 2015), Malta (12%) (Digiario et al., 1999), Kosovo (11.1%) (Dida et al., 2012), Portugal (6%) (Digiario et al., 1999), Russia (6%) (Porotikova et al., 2016) and China (4.7%) (Fan et al., 2013).

Importantly, the mixed infection by GVA and GRSPaV was quite considerable with an infection rate of 26.73%. Similarly, previous research has reported the association of GVA and GRSPaV in several other countries. For example, in Tunisia, this mixed infection was found to occur with an infection rate of 56.8% (Selmi et al., 2017). In Italy and Spain mixed infections between these two viruses were also reported (Fiore et al., 2016 Sabella et al., 2018). These

results showed that there is a positive correlation of prevalence between these two viruses.

The mealybug *Planococcus ficus* (Signoret, 1875) reported as a vector for RWC viruses was signalled in Algeria (Bissaad et al., 2017). The presence of vectors of this disease may explain the large distribution of this disease in Algeria.

Literature

- Ahmed, H. M. H., Digiario, M. and Martelli, G. P. (2004): Viruses and virus diseases of grapevine in Egypt. OEPP/EPPO Bulletin 34, 395-398.
- Alabi, O. J., Poojari, S., Sarver, K., Martin, R. R. and Naidu, R. A. (2013): Complete genome sequence analysis of an American isolate of Grapevine virus E. Virus Genes 46, 563-566.
- Alkowni, R., Digiario, M. and Savino, V. (1998): Viruses and virus diseases of grapevine in Palestine. OEPP/EPPO Bulletin 28, 189-195.
- Bissaad Fatima Zohra, Bounaceur Farid and Doumandji-Mitichet Bahia (2017): Dynamique spatio-temporelle de *Planococcus ficus* (signoret, 1875) dans les vignobles de la mitidja (Algeria), Lebanese Science J., Vol. 18, No. 1, 24-46.
- Boscia, D., Digiario, M., Safi, M., Garau, R., Zhou, Z., Minafra, A., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Bottalico, G. and Potere, O. (2001): Production of monoclonal antibodies to Grapevine virus D and contribution to the study of its aetiological role in grapevine diseases. Vitis, 40, 69-74.
- Dida, L., Elbeaino, T., Frasherri, D. and Digiario, M. (2012): Viruses of grapevine in Kosovo. PhytopathologiaMediterranea 51, 85-90.
- Digiario, M., Martelli, G. P. and Savino, V. (1999): Phloem limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East: a synopsis. Options Méditerranéennes 29, 83-92.
- Fan, X. D., Dong, Y. F., Zhang, Z. P., Ren, F., Hu, G. J. and Zhu, H. J. (2013): First report of grapevine virus e from grapevines in china. J. Plant Pathology, 95, 659-668.
- Fiore, N., Zamorano, A., Sanchez-Diana, N., Gonzalez, X., Pallas, V. and Sanchez-Navarro, J. (2016): First detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and Grapevine rupestris vein feathering virus, and new phylogenetic groups for Grapevine fleck virus and Hop stunt viroid isolates, revealed from grapevine field surveys in Spain. PhytopathologiaMediterranea 55, 225-238.
- Foissac, X., Svanella-Dumas, L., Dulucq, M. J., Candresse, T. and Gentil, P. (2001): Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). Acta Horticulturae (ISHS) 550, 37-43.
- Galet, P. (1977): Les maladies et parasites de la vigne, tome 1, Imprimerie du paysan du midi, Montpellier, 871 p.
- Garau, R., Prota, V. A., Piredda, R., Boscia, D. and Prota, U. (1994): On the presence of possible relationship between Kober stem grooving and Grapevine virus A. Vitis 33, 161-163.
- Haïdar, M. M., Digiario, M., Khoury, W. and Savino, V. (1996): Viruses and virus diseases of grapevine in Lebanon. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 26, 147-153.
- Herrbach, E. J., Le Maguet, J. M. and Hommay, G. (2016): Virus transmission by mealybugs and soft scales (Hemiptera, Coccoidea). In: J. K. Brown (ed.): Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens. APS Press, St Paul MN. 147-161.
- Hommay, G., Komar, V., Lemaire, O. and Herrbach, E. (2008): Grapevine virus A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. Eur. J. Plant Pathol. 121, 185-188.
- Jooste, A., Molenaar, N., Maree, H., Bester, R., Morey, L., Koker, W. and Burger, J. (2015): Identification and distribution of multiple virus infections in grapevine leafroll diseased vineyards. Eur. J. Plant Pathol. 142, 363-375.
- La Notte, P., Buzkan, N., Choueiri, E., Minafra, A. and Martelli, G. P. (1997): Acquisition and transmission of Grapevine virus A by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. J. Plant Pathology 78, 79-85.
- Le Maguet, J., Beuve, E., Herrbach, E. and Lemaire, O. (2012): Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Planococcus aceris* (Signoret). Phytopathology 102, 717-723.
- Lehad, A., Selmi, I., El Air, M., Louanchi, M., Aitouada, M. and Mahfoudhi, N. (2015): Occurrence of Grapevine Leafroll associated Virus in Algerian vineyards. Proc. of the 18th Congress of ICVG, Ankara, Turkey, 7-11 September pp. 157-158.
- Lekikot, K., Elbeaino, T., Ghezlib, C. and Digiario, M. (2012): A preliminary survey of grapevine viruses in Algeria. Proc. of the 17th congress of ICVG, Davis, California, USA, 194-197.

- Maher Al Rwahnih, Mysore, R., Sudarshana, B., Jerry, K., Uyemoto, B. and Adib, R. (2012): Complete genome sequence of a novel vitivirus isolated from Grapevine. *J. Virol.* 86, 9545.
- Martelli, G. P. (1993): Rugose wood complex. In: G. P. Martelli (ed.): *Graft-transmissible Diseases of Grape- vines. Handbook for Detection and Diagnosis.* Editions du Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, pp. 45-54.
- Martelli, G. P. (2014): Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *J. Plant Pathology* 96, 1.
- Martelli, G. P. (2017): An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. *Grapevine vi- ruses: Molecular biology, diagnostics and management.* Springer International Publishing 31-46.
- Nakaune, R., Toda, S., Mochizuki, M. and Nakano, M. (2008): Identification and characterization of a new viti- virus from grapevine. *Archive of Virology* 153, 1827-1832.
- Porotikova, E. V., Dmitrenko, U. D., Volodin, V. A., Volkov, Y. A., Gorislavets, S. M., Stranishevskaya, E. P., Risovannaya, V. I., Kamionskaya, A. M. and Vinogradova, S. V. (2016): First report of Grapevine virus A in Russian grapevines. *Plant Disease* 100, 2542.
- Rosciglione, B. and Castellano, M. A. (1985): Further evidence that mealybugs can transmit grapevine virus A (GVA) to herbaceous hosts. *PhytopathologiaMediterranea*, 24, 186-188.
- Rosciglione, B., Castellano, M. A., Martelli, G. P., Savino, V. and Cannizzaro, G. (1983): Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis* 22, 331-347.
- Sabella, E., Pierro, R., Luvisi, A., Panattoni, A., D'Onofrio, C., Scalabrelli, G., et al. (2018): Phylogenetic analysis of viruses in Tuscan *Vitis vinifera sylvestris* (Gmel) Hegi. *PLoS ONE* 13(7): e0200875. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200875>
- Selmi, I., Pacifico, D., Carimi, F. and Mahfoudhi, N. (2017): Prevalence of viruses associated with grapevine rugose wood disease in Tunisia. *Tunisian J. Plant Protection* 12, 149-158.
- Tanne, E., Ben-Dov, Y. and Raccah, B. (1989): Transmission of closterolike particles associated with grapevine leafroll by mealybugs (Pseudococcidae) in Israel. *Proc. 9th Meeting of ICVG, KiryatAnavim, Israel, 1987, 71-73.*
- Zorloni, A., Prati, S., Bianco, P. A. and Belli, G. (2006): Transmission of Grapevine virus A and Grapevine leaf- roll-associated virus 3 by *Heliococcus bohemicus*. *J. Plant Pathology* 88, 325-328.

Etiologie de la maladie du bois strié de la vigne en Algérie

Résumé

La maladie du bois strié de la vigne est l'une des principales maladies affectant la vigne à travers le monde. Une étude étiologique et épidémiologique a été réalisée en vue de déterminer l'agent causal de la maladie du bois strié de la vigne rencontré sur la majorité des vignobles algériens. Une analyse RT-PCR sur 202 échantillons a été réalisée pour déterminer la prédominance du GVA, GVD et le GRSPaV. Les résultats obtenus montrent que les trois virus sont présents dans les vignobles algériens avec des degrés différents. Sur la base des séquences obtenues, une étude phylogénétique a été menée pour le GRSPaV. Les résultats ont montré que les isolats algériens du GRSPaV se regroupent dans quatre groupes phylogénétiques. L'étude de l'inventaire des espèces des cochenilles a permis d'identifier une seule espèce de cochenille farineuse *Planococcus ficus*. Cette dernière a été rencontrée dans tous les vignobles prospectés à l'exception des parcelles de vigne de table récemment cultivées.

Mots clés: Vigne, bois strié, prévalence, RT-PCR, diversité génétique, séquençage, GRSPaV et *Planococcus ficus*.

ملخص

مرض الخلايا الجذعية في العنب هو أحد الأمراض الرئيسية التي تصيب العنب في جميع أنحاء العالم. تم إجراء دراسة مسببة ووبائية من أجل تحديد العامل المسبب للمرض الخشبي للكرمة الموجود في غالبية مزارع الكروم الجزائرية. تم إجراء تحليل RT-PCR على 202 عينة لتحديد غلبة GVA و GVD و GRSPaV. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الفيروسات الثلاثة موجودة في مزارع الكروم الجزائرية بدرجات متفاوتة. بناءً على التسلسل الذي تم الحصول عليه، أجريت دراسة علم الوراثة لـ GRSPaV. أظهرت النتائج أن عزلات GRSPaV الجزائرية تتجمع في أربع مجموعات نسجية. حددت دراسة جرد مجموعات البق الدقيقي نوعًا واحدًا من البق الدقيقي *Planococcus ficus*. تم العثور على هذا الأخير في جميع كروم العنب التي تم مسحها باستثناء قطع الأراضي المزروعة حديثًا من كروم المائدة.

الكلمات المفتاحية: العنب، الخشب المخطط، الانتشار، RT-PCR، التنوع الجيني، التسلسل GRSPaV و *Planococcus ficus*.

Abstract

Rugose wood disease constitutes one of the major grapevine disease complexes causing significant economic damage worldwide. An etiological and epidemiological study was carried to determine the agents of the Rugose wood disease of the vine found in the majority of the Algerian vineyards. 202 samples were analyzed by RT-PCR to determine the predominance of GVA, GVD and GRSPaV. The results obtained show that the three viruses are present in Algerian vineyards with different degrees. Based on the sequences obtained, a phylogenetic study was conducted for GRSPaV. The results showed that Algerian GRSPaV isolates cluster into four phylogenetic groups. The study of the mealybug population inventory allowed the identification of a single species of mealybug *Planococcus ficus*. This species was found in all the vineyards surveyed, except for the recently cultivated table grapevine plots.

Keywords: Grapevine, Rugose wood, prevalence, RT-PCR, genetic diversity, sequencing, GRSPaV et *Planococcus ficus*.