

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



Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques

Spécialité : Protection des végétaux

Option : biologie et génétique de l'interaction pathogène/plante hôte

Sujet :

**Identification des virus impliqués dans la maladie
du court noué de la vigne par des critères sérologiques et
biochimiques**

Par : Tahirine Mohamed

Soutenu à l'ENSA, le : 01/07/2015 devant le jury composé de :

Président	M. BOUZNAD Z.,	Pr. ENSA
Directeur de Thèse	Mme. LOUANCHI M.,	MC. ENSA
Examineurs	Mme. KRIMI Z.,	Pr. USDB
	Melle Bouraghda H,	MC. ENSA

2014-2015

Dédicace

À la femme qui m'a donné la vie

.....*Ma mère*

À la femme qui m'a donné la force de poursuivre mes rêves

.....*Madame Aitouada*

Remerciement

Tout d'abord à Allah, sans sa miséricorde ce travail n'aura pas abouti.

Je tiens à ma profonde reconnaissance à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

A Mme Louanchi pour avoir accepté de m'encadrer, pour sa patience, son soutien et ses conseils ;

A Madame Aitouada, pour m'avoir aidé le long de ce travail ;

A Monsieur Chelah de l'ITAF qui m'a aidé pendant l'échantillonnage ;

A Monsieur Bouznad pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury ;

A Madame Krimi et Madame Bouraghda qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail ;

A M^{elle}Lassouane, Fatima, Nesserine qui m'ont aidé pendant l'expérimentation au laboratoire ;

A mes amis : Rahal, Khoualed, Khenioui, Ben Hassane et Toumi qui m'ont soutenu le long de l'expérimentation.

Liste d'abréviation

ArMV:	Arabis Mosaic Virus
ARN:	Acide ribo-nuléique
CP :	Protéine capsid
da :	dalton
DAS-ELISA:	double assize sandwich-enzyme linked immuno-sorbent essay,
g:	gramme
GFLV :	Grapevine Fan Leaf Virus,
kda:	Kilo Dalton
log :	logarithme népérien
mg:	milligramme
ml :	millilitre
mm :	millimètre
MP:	protéine de mouvement
nm:	nanomètre
ph:	potentiel hydrique
PNPP:	Para nitrophényl phosphate
SDS :	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE:	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis
TRIS :(ou THAM) :	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Liste des figures

Figure 1 : Evolution des superficies viticoles dans le monde et en Algérie entre 1961 et 2011	4
Figure 2 : Evolution de production de raisin dans le monde et en Algérie entre 1961 et 2011	4
Figure 3 : Evolution des rendements en raisin dans le monde et en Algérie entre 1961 et 2011	5
Figure 4 : Structure et expression des ARN 1 et 2 du Grapevine Fanleaf Virus (GFLV).....	12
Figure 5 : Transport du GFLV à travers la paroi pecto-cellulosique d'une cellule végétale infectée.....	14
Figure 6 : Model du virion du GFLV et de la protéine capside.....	14
Figure 7 : Partie antérieure des Longidoridae.....	18
Figure 8 : symptôme de bougeon double (Red Globe)	36
Figure 9 : Une plage de plant a croissance lente sur cepage Ahmar de Mascara.....	37
Figure 10 : un plant chétif (cépage Alfance Laval)	37
Figure 11 : symptôme de vein-banding sur le cepage Alicante Bouschet.....	37
Figure 12 : symptôme de chlorose sur un sarment de Cardinal.....	37
Figure 13 : symptôme de mosaïque sur les feuilles du cépage Sabel.....	38
Figure 14 : Les fréquences d'infection échantillons prélevés par wilaya.....	40
Figure 15 : Les fréquences de réactions positives des échantillons collectés par cépage	41
Figure 16 : Gel de la SDS-PAGE de la protéine capside.	43
Figure 17 : L'évaluation des Log (PM) en fonction des distances de migrations.	43

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux ravageurs de la vigne	6
Tableau 2 : Les principales maladies fongiques de la vigne	7
Tableau 3 : Les principales espèces bactériennes pathogènes pour la vigne	8
Tableau 4 : Les principaux nématodes affectant la vigne.	9
Tableau 5 : Les maladies virales et les affections similaires de la vigne.	10
Tableau 6 : Les échantillons testés et leurs origines géographiques.	24
Tableau 7 : Les protéines marqueuses utilisées dans le SDS-PAGE	27
Tableau 8 : La disposition des échantillons sur le gel d'électrophorèses.....	30
Tableau 9 : Les résultats des tests sérologiques réalisés par deux antisérums.	39

Liste des planches

Planche 1 : Conservation des échantillons végétaux selon la méthode de Bos (1969)

Planche 2 : protocole utilisé en DAS-ELISA (Ternynck et Avrameas, 1991)

Planche 3 : La préparation des gels (Laemelli, 1970)

Planche 4 : la visualisation des bandes (Laemelli, 1970) :

Liste des annexes :

Annexe I : Réglementation de la sélection sanitaire de la vigne en algérie

Annexe II : La composition du Kit Bioreba ® ainsi que le protocole fourni.

Annexe III : Les lectures des DO du test ELISA obtenues

Sommaire

Introduction	1
I. Synthèse bibliographique :	3
I.1. Généralités sur la vigne :	3
I.2. Les principaux ennemis de la vigne :	5
I.2.1. Les Ravageurs de la vigne :	5
I.2.2. Les Maladies de la vigne :	7
I.2.2.1. Maladies dues à des champignons et des organismes similaires :	7
I.2.2.2. Maladies bactériennes	8
I.2.2.3. Nématodes :	9
I.2.2.4. Maladies à virus et les affections similaires :	9
I.3. La maladie du court noué :	11
I.3.1. Les virus responsables	11
I.3.2. Le cycle viral du GFLV :	11
I.3.3. Les symptômes :	15
I.3.4. Les vecteurs	15
I.3.4.1. Biologie de <i>Xiphinema index</i> vecteur du GFLV	15
I.3.4.2. La transmission des Nepovirus	16
I.3.4.2.1. Caractéristiques générales de la transmission :	16
I.3.4.2.2. Caractéristiques de rétention des virus :	17
I.3.5. Epidémiologie	19
I.3.6. Méthodes de lutte :	19
I.3.6.1. Lutte contre le vecteur :	19
I.3.6.2. La résistance variétale :	20
I.3.6.2.1. Résistances naturelles chez les Vitaceæ aux virus et à leurs vecteurs : ..	20
I.3.6.2.2. Résistance induite par le transfert de gènes viraux :	20

I.3.6.3. La prémunition :	21
I.3.6.4. La thermothérapie :	21
I.3.6.5. La culture in vitro :	21
I.3.6.6. Sélection sanitaire :	22
II. MATERIELS ET METHODES	24
II.1. MATERIELS	24
II.1.1. Matériel végétal	24
II.1.1.1. Echantillonnage :	24
II.1.1.2. Conservation :	25
II.1.2. Les tampons et solutions utilisés pour les tests immunoenzymatiques :	25
II.1.2.1. Les sera utilisés :	25
II.1.2.2. Les tampons et autres solutions :	25
II.1.3. Tampons et solutions utilisés pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes :	26
II.1.3.1. Les protéines marqueuses :	26
II.1.3.2. Les tampons et autres solutions :	27
II.2. METHODES	29
II.2.1. Les tests sérologiques	29
II.2.2. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide	30
III. Résultats et discussion :	36
III.1. Résultats	36
III.1.1. La prospection des vignobles :	36
III.1.1.1. Etat général des vignobles prospectés :	36
III.1.1.2. L'échantillonnage	38
III.1.2. Tests immuno-enzymatiques	38
III.1.2.1. Fréquences d'infection des échantillons prélevés par la maladie du court noué:	39

III.1.2.2. Fréquences d'infection des échantillons prélevés des vignobles par wilaya :	40
III.1.2.3. Fréquences d'infection des échantillons prélevés par variété	41
III.1.3. Test biochimique (SDS-PAGE) :	41
III.2. Discussion.....	44
III.2.1. La prospection des vignobles :	44
III.2.2. Les tests sérologiques :	44
III.2.3. La caractérisation biochimique :	47
Conclusion et perspectives :	49
Les références bibliographiques	51
Annexes	

Introduction

générale

Introduction

Autrefois l'Algérie trônait parmi les plus grands producteurs de raisins destinés à la vinification, avec un intérêt économique considérable (Robinson, 1986). Actuellement la réalité est toute autre, l'agriculture Algérienne et surtout la viticulture est en proie à des problèmes, d'ordre naturels (climat, maladies et ravageurs) et techniques (opérations culturales inadéquates, diminution des superficies suite aux opérations de reconversion).

Aujourd'hui, la grande majorité des vignobles Algériens sont sujets à des maladies dégénératives, telles que l'eutypiose, la maladie de l'Esca, le court noué et le virus de l'enroulement foliaire qui risquent d'aggraver la situation présente.

Le court noué est une maladie principalement causé par deux népovirus (virus polyhédrique transmis par nématodes) : le GFLV et l'ArMV. Ces derniers causent des dégâts considérables aussi bien en termes de production en raisin qu'en termes de plant détruits (Martelli et Boudon-Padieu, 2006).

Contrairement aux maladies virales affectant les espèces annuelles, les recherches consacrées à celles touchant aux cultures pérennes et notamment à la vigne sont peu nombreuses. Néanmoins, des études touchant à certains de leurs aspects ont été menées à l'école nationale supérieure agronomique. Parmi celles-ci :

Les travaux de Benchiha (1976), sur *Xiphinema index* COBB, vecteur de la dégénérescence infectieuse de la vigne dans la région de Mostaganem ; et ceux de Labdelli (1989) sur les nématodes phytophages sur vigne en pépinière et en plein champ.

L'étude de Bousalem (1981) qui a visé la recherche du virus du court noué de la vigne (GFLV) au niveau de quelques pépinières dans la zone algéroise.

D'autres recherches ont été menées sur les méthodes de diagnostic et de lutte contre le virus du court noué de la vigne, telles celles de Beneddra (1978), de Gherbi (1990), de Haddadj et Haddou (1994) et de Morsli (1995) .

Benfreha-Zemouli en 1983, montrent les modifications ultrastructurales entraînées par les virus de la vigne, et en autres le GFLV.

Plusieurs autres travaux ont eu comme objet la culture *in vitro* de quelques cépages de vigne ,et son utilisation dans le cadre de la production de matériel végétal indemne de virus (Jellali , 1996 ; Amrarene, 1997; Nacef, 2003; Ferihi,2004; Ameziane,2005 ; Bourenane, 2007) une techniques qui a de très bonne résultats en terme de méthodes de lutte contre les maladie virale et surtout pour les cépages en voie de disparition.

Enfin, Lehad en 2008 et 2012 ; et Mousselmal en 2011 se sont intéressés à la maladie de l'enroulement des feuilles de la vigne.

Suite à ces travaux, nous avons décidé dans le cadre de cette étude de nous intéresser à la distribution du virus du court noué au niveau des vignobles algériens, permettant une meilleure conception des stratégies de lutte. Les objectifs que nous nous sommes fixés sont les suivants :

1. La réalisation d'échantillonnages dans les différentes régions viticoles du nord algérien, l'observation des symptômes, et la notation des techniques culturales appliquées ;
2. L'exécution d'un screening des échantillons prélevés à l'aide du test vis-à-vis du virus du court noué ;
3. la caractérisation biochimique du virus du court noué isolé à partir des échantillons révélés positifs par le test immuno-enzymatique.

Synthèse bibliographique

I. Synthèse bibliographique :

I.1. Généralités sur la vigne :

La vigne appartient à la famille des ampélicées (vitacées). Les vitacées sont considérées, en général, comme des lianes, s'attachant à des supports variés grâce à des vrilles oppositifoliées, simples ou le plus souvent ramifiées. Cette famille comprend dix-neuf genres (Galet, 2001 ; Burger *et al.*, 2009), parmi lesquels, le genre *Vitis* lui-même est divisé en trois groupes en fonction de leur origine géographique (Huglin et Schneider, 1998):

- Les vignes américaines (*V. riparia*, *V. labrusca*, *V. berlandieri*, *V. rupestris*...), introduites en Europe au début du XIX^{ème} siècle, à titre de curiosité dans les jardins botaniques ou chez les amateurs, elles sont responsables de l'introduction de l'Oïdium (1845), du Phylloxéra (1868), du Mildiou (1878) et du Black rot (1885) dans la région méditerranéenne. Ces vignes d'origine américaines sont utilisées aujourd'hui comme porte-greffe pour leur résistance aux maladies venues d'Amérique.

- Les vignes asiatiques : malgré leur sensibilité vis-à-vis les maladies d'origine américaine (Oïdium, Mildiou, Black-rot...), elles sont parfois utilisées dans les programmes de croisement interspécifique pour leur résistance au froid (*Vitis amurensis*).

- La vigne européenne ne comprend que l'espèce *Vitis vinifera* cultivée (*sativa*) et sauvage (*sylvestris*).

En termes d'histoire, la vigne est si ancienne qu'elle se confond avec l'histoire de l'homme. On ne peut déterminer avec précision où et quand on a commencé à cultiver la vigne. (Prince et Nesbitt, 2005 ; Toussaint-Samat, 2009). Des témoignages assurent que depuis l'antiquité, l'Afrique du Nord était connue par la production des vins qu'elle exportait vers les territoires bordant la méditerranée. De petites amphores de terre cuite, datant de 3.000 à 4.000 ans avant J.-C, et ayant contenu des traces de vin furent retrouvées. Ainsi donc, comme le prouvent l'archéologie et les vieux auteurs, la vigne était cultivée couramment dans les pays qui forment aujourd'hui la Tunisie, l'Algérie et le Maroc (Belhout, 1990).

Après 1492, la culture de la vigne et la fabrication de vins se sont développés en Amérique du Nord et du Sud puis ont gagné de nouveaux territoires comme l’Afrique du Sud, l’Australie (Prince et Nesbitt, 2005).

La vigne est l’arbre fruitier le plus cultivé dans le monde (Muro *et al.*, 1995), elle couvre près de sept millions d’hectares , avec une production qui dépasse 67 millions de tonnes seulement pour le raisin de table (Fig.s 1 et 2) (Anonyme, 2012)

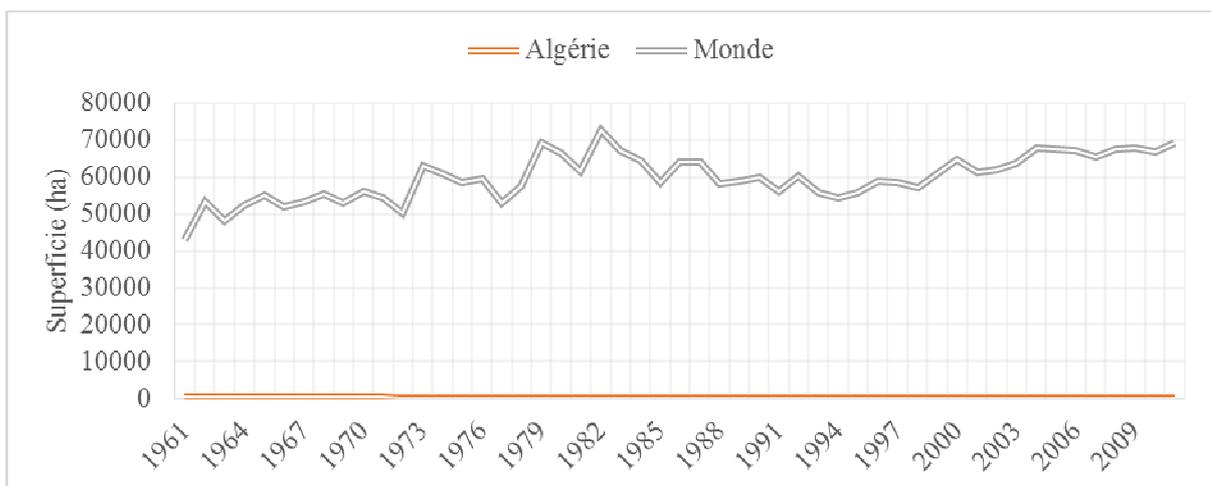


Figure 1 : Evolution des superficies viticoles dans le monde et en Algérie entre 1961 et 2011 (Source : faostat.org)

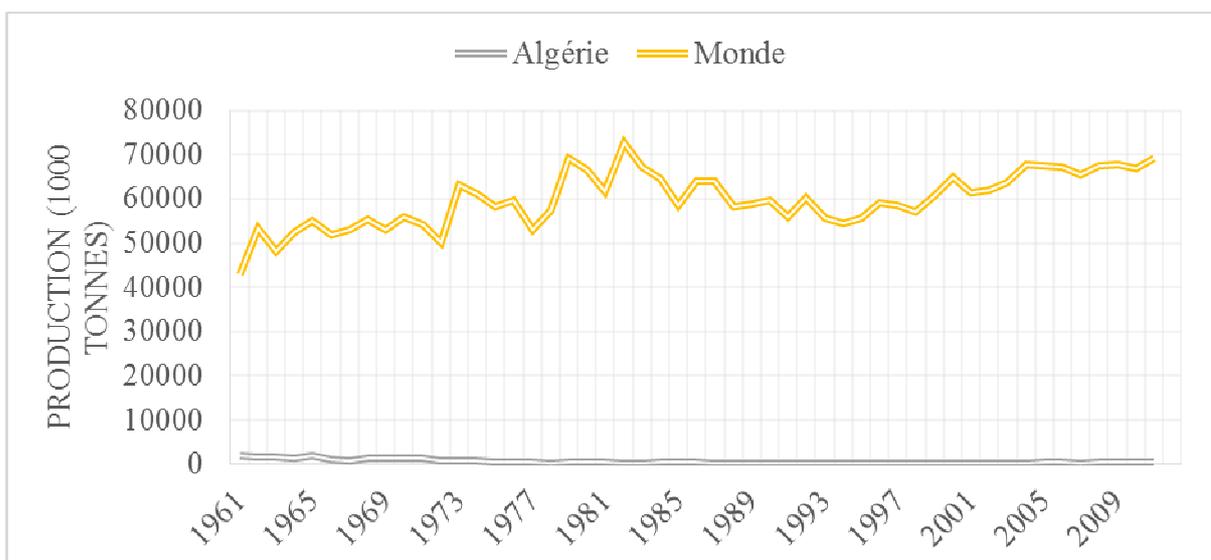


Figure 2 : Evolution de production de raisin dans le monde et en Algérie entre 1961 et 2011 (Source : faostat.org)

Si la production en raisin (aussi bien de table que de cuve) en Algérie reste importante, elle a une tendance à baisser depuis l'indépendance. Cette baisse est due en majeure partie à la politique de l'autogestion et à l'arrachage de vigne au cours des années 1970. Tandis que la production de raisin ne cesse de diminuer en Algérie (Bensafir et Bouziane, 2008, Imache *et al.*, 2011), la production mondiale continue à s'améliorer, grâce à l'application de nouvelles méthodes culturales, et à l'utilisation de molécules plus efficaces pour la lutte contre les maladies et les ravageurs (Fig. 3) (Anonyme, 2013).

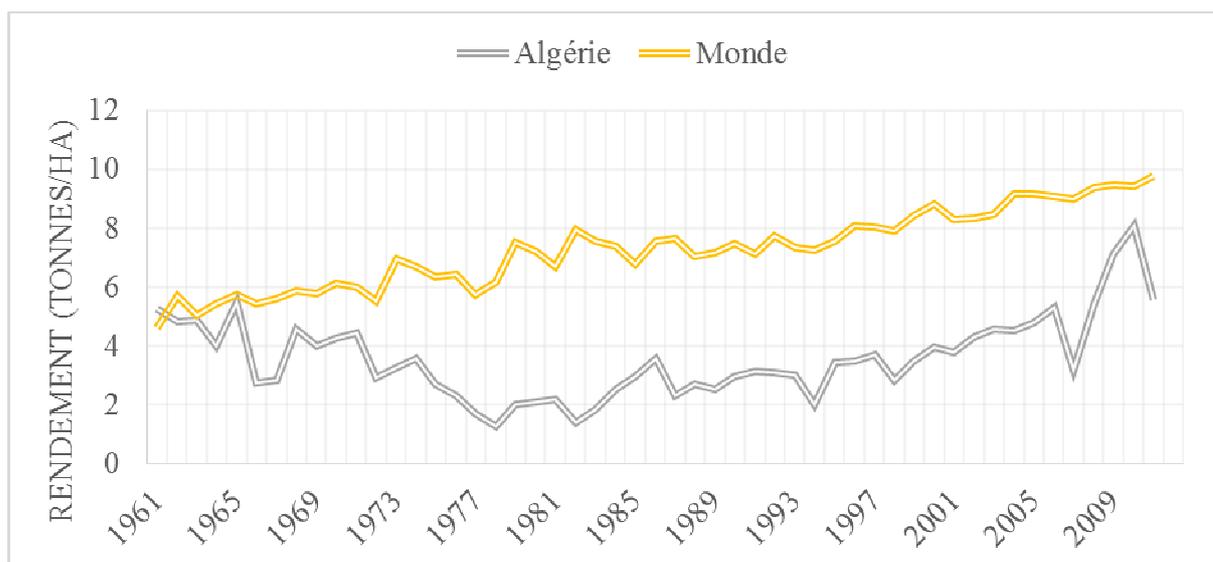


Figure 3 : Evolution des rendements en raisin dans le monde et en Algérie entre 1961 et 2011 (Source : faostat.org)

I.2. Les principaux ennemis de la vigne :

Malgré sa rusticité, la vigne est sensible à plusieurs maladies ainsi qu'à certains ravageurs. Les principaux ennemis de la vigne appartiennent à plusieurs groupes, ainsi pour les ravageurs on trouve des insectes, et des arachnides ; et pour les maladies, divers agents sont impliqués, tels des némathelminthes, des champignons et des organismes similaires, des bactéries, des virus, des viroïdes et des phytoplasmes.

I.2.1. Les Ravageurs de la vigne :

Le phylloxéra de la vigne (*Dactylosphaera vitifolii* SHIMER, synonyme: *Phylloxera vastatrix* PLANCHON) est probablement l'un des insectes phytophages les plus connus du fait de sa responsabilité dans la destruction du vignoble français à la fin du XIXe siècle (Powell *et al.*, 2007). Le greffage des cépages autochtones appartenant à l'espèce *Vitis vinifera* L. très sensible au parasite, sur des porte-greffes issus d'espèces américaines

résistantes a permis de reconstituer rapidement les vignobles détruits et constitue l'un des plus grand succès de la lutte génétique contre les parasites et ravageurs des plantes cultivées (Granett *et al.*, 2001). D'autres ravageurs peuvent s'attaquer à la vigne causant des dégâts dont l'importance diffère selon l'espèce déprédatrice, le cépage de la vigne et les conditions pédoclimatiques (Tableau 1).

Tableau 1 : Les principaux ravageurs de la vigne

Ravageur	Nom scientifique	Dégâts	Références
Phylloxéra	<i>Dactylosphaera vitifoliae</i> Fitch	Galle sur les espèces américaines uniquement (porte-greffe) Nodosité sur racine des espèces européennes	Powell <i>et al.</i> , 2013.
Tordeuse de la grappe	<i>lepidoptera</i> : <i>Lobesia botrana</i> <i>Eupoecilia ambiguella</i> <i>Cryptoblabes gnidiella</i>	Destruction des bourgeons floraux par les larves ce qui engendre des ouvertures libres pour les champignons de stockage et des pertes en qualité de raisin	Von Arx <i>et al.</i> , 2011 Buchholz <i>et al.</i> , 1994 Wysoki <i>et al.</i> , 1988
Puceron	<i>Aphis gossypii</i> Glover	Chute de rachis de grappe Nécrose, déformations sur les grains de raisin L'apparition de fumagine sur les miellats secrétés par les pucerons	Koo, 2014.
Guêpe	<i>Polistes gallicus</i> L. <i>Vespula germanica</i> F	Piqûre sur les grains de raisins Les blessures constituent une porte d'entrée pour les maladies (pourriture grise, pourriture secondaire ...etc)	Toledo, 2007.
Acarien jaune commun	<i>Tetranychus urticae</i> Koch.	Zone vert-jaune avec des points nécrosés sur feuilles Vieillessement rapide des feuilles (senescence), Exuvie blanchâtre	Minakuchi <i>et al.</i> , 2006.
Acarien rouge	<i>Panonychus ulmi</i> Koch	Zones nécrosées entourées d'une décoloration sur l'ensemble du limbe des feuilles. Un mauvais aoutement des sarments et une mauvaise alimentation des bourgeons.	Marshall et Lester, 2001
Acariose	<i>Calepitrimerus vitis</i> Nal. <i>Syn.</i> : <i>phyllocoptes vitis</i> Nal.	Croissance ralentie de l'ensemble du plant, Feuilles ondulées et gonflées, entre-nœuds courts Avortement des fleurs et mal formation des baies.	Rae Cho <i>et al.</i> , 2013.

I.2.2. Les Maladies de la vigne :

I.2.2.1. Maladies dues à des champignons et des organismes similaires :

La vigne peut être attaquée par différentes espèces fongiques ou des espèces similaires occasionnant des maladies qui sont dommageables à la récolte. Les principales sont le Mildiou, l'Oïdium et le Botrytis. Seuls les cépages interspécifiques sont peu ou pas sensibles au mildiou et à l'oïdium. Ces maladies parasitaires sont liées à des espèces qui ne se développent qu'en conditions humides, les régions sèches sont donc peu concernées (Tableau 2).

Tableau 2 : Les principales maladies fongiques de la vigne

Maladie	Nom scientifique	Dégâts	Références
Mildiou	<i>Plasmopara viticola</i> Berl. Et Toni	Taches huileuses caractéristiques sur la face supérieure des feuilles en regard des quelles (sur la face inférieure) une poussière blanche qui peut apparaitre aussi sur les grappes si le temps est humide	Boso, et al, 2014.
Oïdium	<i>Erysiphe necator</i> Schwein.	Poussière blanchâtre ou grisâtre sur la face inférieure ou supérieure des feuilles, des tiges et des grappes.	Debieu <i>et al.</i> , 1995 ; Délye <i>et al</i> , 1998
Ethypiose	<i>Eutypa lata</i> Pers.	Raccourcissement des entrenœuds ; Chlorose des feuilles ; Inflorescences à port érigé	Amorabé <i>et al.</i> , 2001
Esca	<i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , <i>Phaeoacremonium aleophilum</i> et <i>Fomitiporia mediterranea</i>	coloration internervaire, jaune sur cépages blancs, et rouge sur cépages noirs, qui évolue progressivement vers un dessèchement ; Des necrose sur le bois.	Pierron <i>et al.</i> , 2015.
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	Nécroses étalées sur les bords des feuilles et des sarments leurs donnant un aspect brûlé. Mauvais aoutement des sarments. Pourriture caractéristique sur les grains de raisin, avec développement de moisissure grisâtre typique.	Zheng <i>et al.</i> , 2011
Anthracnose maculée	<i>Elsinoe ampelina</i> Shear	Lésions caractérisées par la présence d'une zone centrale blanchâtre auréolée de noir sur les organes verts de la plante.	Gao <i>et al.</i> 2012
Black rot	<i>Guignardia bidwellii</i> Viala et Ravas	Sur les feuilles, taches blanches et/ou grises qui virent au rouge brique, entouré d'une fine bande noire. Sur les grains de raisin, taches allant du gris au violet suivies par un dessèchement complet.	Buckel <i>et al.</i> , 2013

Excoriose	<i>Phomopsis viticola</i> Sacc.	Sur les feuilles, taches sombres au niveau des nervures principales. Sur les grappes, une mauvaise nouaison, voir un dessèchement de la grappe.	Perazzolli <i>et al.</i> , 2008
Pourriture des racines	<i>Armillaria mellea</i> Vahl	Pourriture humide des racines. Sous l'écorce, des plaques nacrées en forme d'éventail (fructification)	Pertota <i>et al.</i> , 2008

I.2.2.2. Maladies bactériennes

Peu d'espèces bactériennes dont les dégâts sont dévastateurs, sont décrites chez la vigne (Tableau 3). Cependant une espèce, *Agrobacterium spp.*, peut causer des pertes considérables aussi bien en terme de production en raisin qu'en terme de nombres de plants détruits (Otten *et al.*, 2008).

Tableau 3: Les principales espèces bactériennes pathogènes pour la vigne

maladie	Agent causal	Symptôme	Références
Nécrose bactérienne	<i>Xylophilus ampelinus</i> Panagopoulos, Willems <i>et al.</i>	Avortement des bourgeons et débourrement difficile Nécroses sur les sarments avec le contour généralement humide ou huileux, voire des fissurations longitudinales libérant un grand nombre de bactéries. Taches angulaires rougeâtre ou sombres sur les feuilles Nécroses sur les rafles des grappes.	SERFONTEI N <i>et al.</i> , 1997.
Crown-gall	<i>Agrobacterium spp.</i> Smith et Townsend, Conn (Biotype 3)	Tumeurs lisses ou rugueuse, isolées ou regroupées sur le collet, les racines et les sarments entraînant un développement réduit de l'ensemble de la plante.	Tolba et Zaki, 2011
Maladie de pierce	<i>Xylella fastidiosa</i> Wells <i>et al.</i>	Chlorose sur les feuilles Petite taille et malformation des feuilles Sur les grappes, dessèchement des grappes de raisin Développement irrégulier et mauvais aoutement des sarments	Buzkan <i>et al.</i> , 2005

I.2.2.3. Nématodes :

Les nématodes parasites des plantes sont des organismes filiformes, microscopiques, non segmentés, qui se nourrissent des racines des plante en perçant et suçant le contenu des cellules avec leurs stylets. Parmi les nématodes détectés dans les vignobles, les *Meloidogyne*, *Trichodorus*, *Xiphinema* sont les genres les plus important (Tableau 4). Le genre *Xiphinema*, connu sous le nom du némtode poignard (Dagger nematod), cause chez la vigne des dégats primaires directs (dus au puisement de la sève de la plante) et des dégats secondaire indirects en transmettant des virus du genre *Nepovirus*.

Tableau 4: Les principaux nématodes affectant la vigne.

Ordres	Agent causal	Symptômes	Références
Tylenchides	<i>Meloidogyne arenaria</i> Chitwood ; <i>M. incongnita</i> Chitwood; <i>M. hapla</i> Chitwood.	Hypertrophie des cellules de l'écorce des racines Galle sur le système racinaire Croissance ralentis du fait de l'affaiblissement du système racinaire.	Mervat <i>et al.</i> , 2012.
Dorylamides	<i>Xiphinema</i> <i>Trichodorus</i> <i>Longidorus</i>	Dégâts directs peu importants allant de l'aspect coralliforme des racines au symptôme de "Balais de sorcières" sur les tiges. Dégâts indirectes d'importance majeure car ils transmettent des virus dangereux tel que le virus du court noué (GFLV).	Demangeat <i>et al.</i> 2004; Martelli et Uyemoto, 2008.

I.2.2.4. Maladies à virus et les affections similaires :

Ce groupe comprend les maladies causées par les virus, les viroïdes et les phytoplasmes. Plus que 58 virus ont été décrit sur la vigne, la plupart d'entre eux sont des virus circulant dans le phloème (Martelli et Boudon-Padieu 2006; Gombino *et al.*, 2010). Le court noué et l'enroulement sont les principales maladies virales qui affectent la vigne partout dans le monde là où la vigne est cultivée (Rowhani *et al.*, 1997 ; Engel *et al.*, 2010 ; Coetzee *et al.*, 2010). Le tableau ci-dessous, englobe les principales maladies à virus et les affections similaires qui touchent la vigne dans le monde.

Tableau 5 : Les maladies virales et les affections similaires de la vigne.

maladie	Agent causal	Symptôme	Vecteurs	Références
Court noué	GFLV, ArMV	Raccourcissent des entrenœuds. Jaunissement des feuilles Les feuilles avec un aspect d'éventail Réduction en qualité ainsi qu'en quantité de la production en raisin.	Nématodes: <i>Xiphinema index</i> , <i>X. italiae</i>	Valat <i>et al.</i> 2000 ; Agrios, 2005
Enroulement de la vigne	Grapevine leafroll-associated viruses 1 à 9 (GLRaV-1 à 9)	Enroulement des feuilles vers le bas Rougisement ou jaunissement des tissus foliaires entre les nervures. Mauvais aoutement. Incompatibilité entre le greffe et le porte-greffe.	Certains insectes du genre <i>Pseudococcus</i>	Constable et Rodoni, 2011; Jarugula1 <i>et al.</i> , 2010.
Complexe du bois strié	<i>Grapevine rupestris stem pitting-associated virus</i> (GRSPaV), <i>Grapevine virus A</i> (GVA), GVB, GVC, GVD	Présence de rugosités sur les sarments Un mauvais aoutement Détachement de l'écorce des sarments chez certains cépages (Kober 5BB).		Martelli et Gallitelli, 2008; Ryoji <i>et al.</i> , 2008.
Complexe Fleck	<i>Grapevine fleck virus</i> (GFkV)	Eclaircissement des nervures secondaire des feuilles.		Haenni et Dreher, 2008.
La nécrose des nervures	Une souche spécifique du GRSPaV.	Des nécroses sur les nervures principales et secondaires		Gombino <i>et al.</i> , 2010.
Vein banding de la vigne	Complexe de deux viroïdes : <i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i> (GYSVd-1) et GYSVd-2	Sur les feuilles, marbrure jaunâtre au tour les nervures principales.		Hajizadeh <i>et al.</i> , 2012.
flavescente dorée	Phytoplasme : <i>Flavescence dorée (FD) phytoplasma</i>	Jaunissement de l'ensemble du feuillage.	Cicadelle : <i>Scaphoideus titanus</i>	Cousin et Boudon-Padieu, 2002 ; Narayanasamy, 2011.
Bois noir	Phytoplasme : <i>Candidatus phytoplasma solani</i>	Jaunissement de l'ensemble du feuillage.	<i>Hyalesthes obsoletus</i>	Maixner, 1994 ; Sforza <i>et al.</i> , 1998.

I.3. La maladie du court noué :

I.3.1. Les virus responsables

La maladie du court-noué est répandue partout dans le monde là où la vigne est cultivée, et est l'une des maladies à virus les plus dommageables pour la viticulture (Mekuria *et al.*, 2009 ; Andret-Link *et al.*, 2004a). Elle fut rapportée pour la première fois par Casalis-Allut en 1865. En 1883, Rathay a rapporté que la transmission de la maladie était d'origine tellurique. (Hewitt, 1950). En Algérie, avec le peu d'études réalisées sur la maladie du court noué, l'incidence de ce dernier reste inestimable.

Seize espèces virales peuvent causer la maladie du court-noué chez la vigne, dont quinze Nepovirus et un Sadwavirus (Walter, 2000 ; Martelli et Boudon-Padieu, 2006). Le Grapevine fanleaf virus (GFLV) est le principal agent responsable de cette maladie, il est répandu mondialement et transmis de vigne à vigne exclusivement par le nématode ectoparasite *Xiphinema index* (Fuchs, 2008). L'association entre GFLV et *X. index* a été prouvée en 1958 par Hewitt et ses collaborateurs. En 1963 Dias et Harrison ont pu isoler les particules virales de GFLV à partir de plants de vigne présentant les symptômes de la maladie du court noué. Quelques années plus tard, Cohn et ses collaborateurs ont proposé une autre espèce vectrice du GFLV, *X. italiae*, sans qu'elle soit confirmée par d'autres travaux. Par conséquent, *X. index* est considéré comme le vecteur naturel exclusif du GFLV. (Martelli et Taylor, 1990).

Un autre népovirus qui peut causer la maladie du court noué chez la vigne, c'est l'Arabis mosaic virus (ArMV). Il est sérologiquement relié au GFLV et induit chez la vigne une symptomatologie similaire à celle du GFLV (Dias et Harrison, 1963). Il est répandu sur tout le territoire européen mais également au Moyen-Orient, en Asie, au Japon, au Canada et aux USA (Californie). L'ArMV possède une organisation génétique similaire à celle du GFLV. En revanche, il est transmis spécifiquement par *X. diversicaudatum* mais pas *X. index* (Wetzel *et al.*, 2006).

I.3.2. Le cycle viral du GFLV :

Les connaissances sur la structure et l'expression du génome du GFLV sont très avancées. La majorité des données ont été acquises avec la souche F13 du GFLV, isolée à partir d'une vigne cultivée dans un vignoble de Frontignan en France (Serghini *et al.*, 1991). La

séquence du génome a été déterminée par deux groupe de travail en même année, celui Serghini et ses collaborateurs et celui de Ritzenthaler et ses collaborateur (1991).

Le génome du GFLV est constitué de deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive, dont l'extrémité 5' est liée de manière covalente à une protéine virale (1^{CVPg}) et l'extrémité 3' est polyadénylée (Andret-Link, 2004b). Une infection systémique *in planta* nécessite la présence des deux ARN (Viry *et al.*, 1993). Certains isolats, comme la souche F13 présentent un ARN3 satellite (Serghini *et al.*, 1991 ; Fritscha *et al.*, 1993, Lamprecht *et al.*, 2013). Chaque ARN est traduit en une polyprotéine clivée ensuite en plusieurs protéines fonctionnelles (Fig. 4).

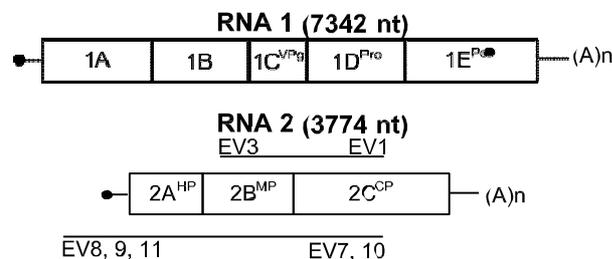


Figure 4 : Structure et expression des ARN 1 et 2 du Grapevine Fanleaf Virus (GFLV).

Les ORFs sont représenté par les rectangles. Les séquences non codantes sont représentées par des lignes pleines et la VPg par un rond noir. Chaque ARN génomique code pour une polyprotéine, qui est clivée après synthèse à plusieurs protéines fonctionnelles et constitutionnelles. VPg : protéine virale liée au génome; Pro : protéinase; Pol : ARN-polymérase ARN-dépendant; HP : protéine helper; MP, protéine de mouvement; CP, protéine capsid. Les ADNc correspondants aux gènes de la CP et l'ORF de l'ARN2 sont représentés par des lignes distinctes avec les amorces respectives utilisées pour la synthèse.

Source : Vigne *et al.*, 2005.

L'ARN1, code pour une polyprotéine P1, cette dernière est clivée en cinq protéines : hélicase (88 kDa), protéine virale liée au génome (3 kDa), protéase (24 kDa) et l'ARN polymérase ARN dépendant (92 kDa). Pour la cinquième protéine, des études de comparaison entre le GFLV et des virus proche ont suggéré qu'elle a un rôle de cofacteur de la protéase (Demangeat, 2007).

L'ARN2 code pour une polyprotéine P2 (122 kDa), qui est clivée en 3 protéines : la protéine 2A^{HP} (28 kDa) ayant pour fonction présumée de guider l'ARN-2 vers les complexes de réplication cellulaire, la 2B^{MP} (38 kDa) qui correspond à la protéine de mouvement, et la 2C^{CP} (56 kDa) ou protéine de capsid (Ritzenthaler *et al.*, 1991 ; Wetzel *et al.*, 2008).

La 2B^{MP} forme des tubules par oligomérisation de la protéine à l'intérieur des plasmodesmes, par lesquels les virions traversent la paroi pectocellulosique des cellules végétales (Fig. 5). La MP est adressée aux plasmodesmes par le biais du système de sécrétion (Wetzel *et al.*, 2001), et sa fixation se produit via la reconnaissance spécifique d'une famille de protéines de plasmodesmes nommées PDLP (*Plasmodesmata Located Protein*) (Kranz, 2003 ; Ueki et Citovsky, 2006 ; Taliansky *et al.*, 2008). La spécificité d'interaction entre la CP et la MP est nécessaire au mouvement du virus de cellule à cellule (Taliansky *et al.*, 2008 ; Thomas *et al.*, 2008).

La protéine capsid du GFLV (Fig. 6) est constituée de 504 acides aminés (Bol, 2008), avec un poids moléculaire égal à 56 Kda (Dunez et Le Gall, 2011). Elle est la seule protéine structurale du génome, elle peut s'auto-assembler pour former des virions sans la présence d'ARN (Gambino *et al.*, 2005). La CP est nécessaire à la transmission spécifique du GFLV par *X. index* (Maghuly *et al.*, 2006).

L'ARN satellite code pour une protéine de 37 kDa essentielle à la réplication de l'ARN3 (Mandahar, 2006 ; Lamprecht *et al.*, 2012).

Le GFLV se réplique au sein de viroplasmes (des corps d'inclusions périnucléaires) constitués de prolifération membranaire dérivant du réticulum endoplasmique sous forme de rosette (Hull, 2014). Des études en protoplastes ont montré que l'ARN1 est capable de se répliquer de manière indépendante de l'ARN2 (Viry *et al.*, 1993, Sanfaçon, 2010).

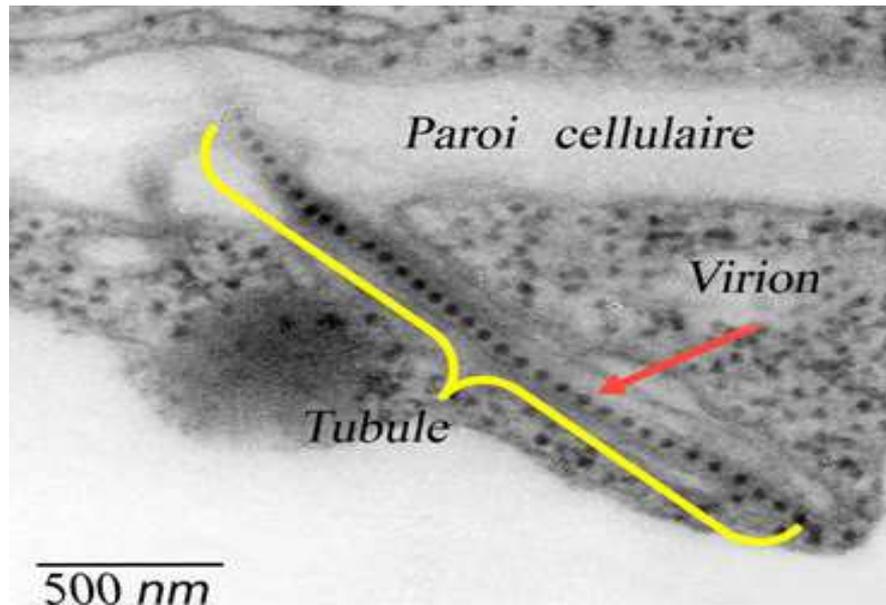


Figure 5 : Transport du GFLV à travers la paroi pecto-cellulosique d'une cellule végétale infectée.

Coupe longitudinale d'un tubule qui connecte deux cellules adjacentes au travers de la paroi pecto-cellulosique.

Source : Thomas *et al.*, 2008

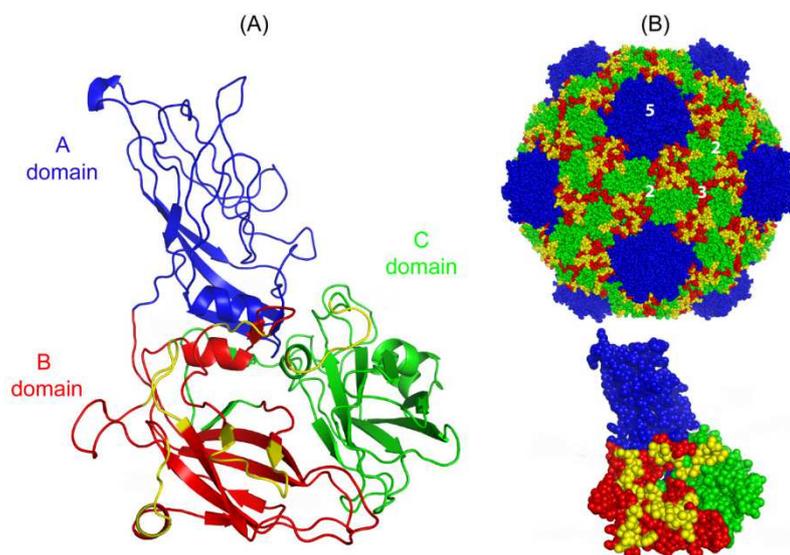


Figure 6 : Model du virion du GFLV et de la protéine capsid.

(A) Représentation en ruban de la protéine capsidiale du GFLV. (B) Model spatial de la configuration quaternaire de l'icosaèdre du virion du GFLV (en haut) et la protéine capsid en configuration tertiaire (en bas)

Source : Schellenberger *et al.*, 2010

I.3.3. Les symptômes :

Le GFLV infecte toutes les variétés de vignes. Des symptômes variables sont observés sur les feuilles, les rameaux et les grappes des vignes infectées. L'expression des symptômes varie en fonction de l'isolat viral, du cépage et des conditions pédoclimatiques. Par exemple, ils seront plus importants sur un cep de Chardonnay que sur du Riesling ou du Pinot noir. De plus, ils ne touchent pas forcément la plante entière et peuvent s'exprimer uniquement sur un ou deux sarments, bien que la plante entière soit infectée (Schellenberger *et al.*, 2010).

Sur les feuilles, les symptômes primaires correspondent à des décolorations (jaunissement, panachures réticulées, tâches annulaires) ou des déformations du limbe. Les sinus pétiolaires sont élargis et les nervures primaires sont rapprochées. On peut également observer une déformation des bords de la feuille leur donnant une forme en éventail d'où la dénomination de la maladie en anglais « fanleaf ».

Sur les sarments, on remarque fréquemment un raccourcissement des entre-noeuds (d'où le nom de la maladie du court-noué), des doubles noeuds et des symptômes de fasciations. Les vignes infectées peuvent subir après plusieurs années une réduction significative de la végétation entraînant des difficultés lors de la taille, surtout lorsqu'elle est mécanisée. Au niveau des grappes, une réduction de leur nombre et de leur taille, des symptômes de coulure (avortement des ovules) et de millerandage (retards de la maturation des baies) sont couramment observés. L'infection virale se traduit encore par des altérations du métabolisme de la plante. Les plus connues concernent la photosynthèse, les processus respiratoires, les activités enzymatiques, les transports à longue distance par le phloème, les équilibres hormonaux, la nutrition minérale (Demangeat *et al.*, 2005a).

Enfin, la maladie provoque un affaiblissement progressif de la souche qui réduit ainsi la longévité de la plante et peut conduire à sa mort. L'ensemble de ces phénomènes conduisent à des pertes de récolte pouvant dépasser les 80% et altérer la qualité du vin (Andret-Link *et al.*, 2004a).

I.3.4. Les vecteurs

I.3.4.1. Biologie de *Xiphinema index* vecteur du GFLV

L'aire d'origine de *X. index* est vraisemblablement le Moyen-Orient d'où l'espèce semble avoir été disséminée avec la culture de la vigne (Demangeat, 2007). Le nématode *X. index*

a une gamme d'hôte très étroite. Il est inféodé à la vigne qui est aussi l'hôte naturel du GFLV. Le figuier est également une plante hôte mais cette espèce végétale n'est pas un hôte du virus (Cooper, 1975 ; El-Borai et Duncan, 2005 ; Crozzoli, 2009). *X. index* affectionne les sols lourds car il subirait moins la dessiccation à laquelle il est sensible. Après éclosion des œufs pondus isolément dans le sol, le nématode passe par quatre stades larvaires (Magunacelaya, 2009 ; Hübschen *et al.*, 2004). Les adultes et tous les stades larvaires sont capables d'acquérir et de transmettre le GFLV (Ziegler-Graff et Brault, 2008). Chez *X. index*, les mâles sont très rares et ne participent que très occasionnellement à la reproduction qui est majoritairement de type parthénogénique (Daijlasso, 1975 ; Hull, 2002). Dans les conditions les plus favorables, le cycle complet (œuf à adulte) dure 2 à 3 mois mais il peut être prolongé par des périodes de quiescence à n'importe quel stade de développement lorsque *X. index* rencontre des conditions très défavorables (Lee, 2002 ; Esmenjaud et Bouquet, 2009).

L'analyse de la distribution verticale de *X. index* a été réalisée dans plusieurs parcelles de vignes naturellement infectées. Ces analyses ont permis de montrer que *X. index* est souvent absent des horizons supérieurs et que les effectifs les plus importants sont retrouvés dans la rhizosphère des racines en croissance, c'est-à-dire entre 50 et 100 cm de profondeur (Pitcher, 1975 ; Wyss, 2002 ; Aballay *et al.*, 2012 ; Askary *et al.*, 2012).

I.3.4.2. La transmission des Nepovirus

I.3.4.2.1. Caractéristiques générales de la transmission :

Les népovirus sont des virus non enveloppés icosaédriques, d'un diamètre d'environ 30 nm. Le virion est composé d'une seule protéine de capsid (CP) avec un génome bipartite à ARN simple brin de polarité positive, la transmission se fait selon un mode semi-persistant. Le terme « nepovirus » désigne les virus icosaédriques transmis par nématode, puisque nepovirus provient de l'abréviation de « nematode-transmitted polyhedral particles virus », cependant, la plus part des virus regroupés dans ce genre ne sont pas effectivement transmis par nématode (Schellenberger *et al.*, 2010 ; Sastry, 2013a).

En effet, beaucoup de nématodes ne transmettent que 2 ou 3 espèces virales différentes. C'est le cas pour *X. diversicaudatum* qui transmet l'ArMV et le SLRV (Adekunle *et al.*, 2006). Le niveau de spécificité peut même aller jusqu'au niveau de l'isolat : les isolats écossais et anglais du Raspberry ringspot virus (RpRSV) sont transmis spécifiquement par *Longidorus elongatus* et *L. macrosoma*, respectivement (Scott *et al.*, 2000).

Ainsi, la transmission des Nepovirus par nématodes selon le mode semi persistant non circulant est très spécifique. Cette particularité reflète une interaction de haute affinité entre les virus et les sites de rétention au niveau de l'appareil alimentaire du vecteur. La deuxième singularité de cette association nepovirus/nématodes est le temps de rétention extrêmement long du virus chez les *Xiphinema*. Ces derniers sont capables de rester virulifères pendant de longues périodes : neuf mois pour *X. americanum*, deux ans pour *X. rivesi*, et probablement au moins quatre ans pour *X. index* (Wyss, 1975 ; Sanfaçon, 2008 ; Wilson et Wilson, 2014). Malgré la grande période de rétention observée, qui pourrait suggérer un mode de transmission circulant, il n'y a jamais eu aucune évidence de multiplication des virus dans les nématodes. De plus, le caractère virulifère du nématode est perdu après la mue et il n'y a pas de passage transovarien (Hull, 2014).

I.3.4.2.2. Caractéristiques de rétention des virus :

Les nématodes du genre *Xiphinema* sont des vers filiformes ectoparasites, au corps non segmenté de 2 à 12 millimètres de long (Ravichandran, 2014), dont la morphologie de l'appareil alimentaire (Fig. 7) comporte un odontostyle, aiguille creuse aux bords non soudés de 60 à 250 µm de long qui permet au nématode de se nourrir en pénétrant la paroi végétale pour atteindre le cytoplasme des cellules végétales. Suit l'odontophore, deuxième pièce creuse connectant l'odontostyle à l'œsophage. Des muscles rattachés à la base et aux cotés de l'odontophore, permettent de rétracter ou protracter l'odontostyle du corps du nématode. L'odontophore est prolongé par l'œsophage qui est un tube flexible et étroit. L'œsophage se termine par le bulbe œsophagien. Ce bulbe assure le rôle de pompe refoulante et aspirante. Il est associé à des glandes salivaires qui déversent leurs productions dans la lumière du bulbe œsophagien. Il contrôle par sa rétraction ou dilatation, respectivement l'injection de la salive dans les cellules végétales ou la ponction du cytoplasme digéré de la cellule. Enfin, l'intestin est la partie la plus longue de l'appareil alimentaire, il s'étend jusqu'au scrotum.

Les particules virales sont adsorbées en une monocouche à la surface du tractus alimentaire du nématode, mais le site de rétention diffère suivant le genre de nématode vecteur (Taylor et Robertson, 1975). Pour les vecteurs du genre *Longidorus*, les virus sont retenus dans le lumen de l'odontostyle, mais également entre l'odontostyle et la membrane guide. Chez les *Xiphinema*, les virus sont adsorbés depuis le début de l'odontophore jusqu'à la fin du bulbe œsophagien, alors que pour les *Trichodorus*, la rétention est faite tous le long de l'appareil buccal (Fig. 7).

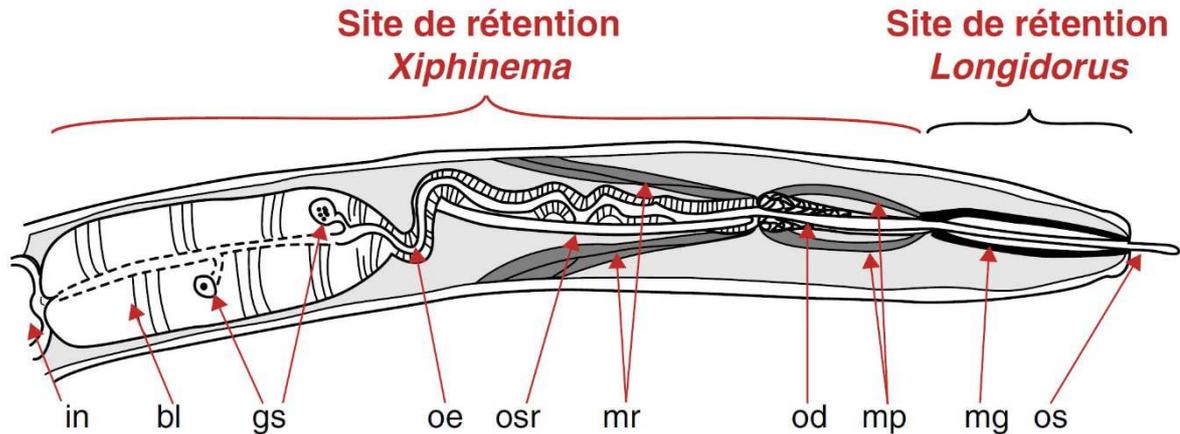


Figure 7 : Partie antérieure des Longidoridae

in : intestin ; bl : bulbe muscloglandulaire ; gs : glandes salivaires ; oe: oesophage ; osr : odontostyle de remplacement ; mr : muscle rétracteur ; od : odontophore ; mp : muscle protracteur ; mg : membrane guide ; Os : odontostyle. L'accolade noire indique la localisation des particules virales chez les Longidorus et l'accolade rouge celle chez les Xiphinema au niveau de l'appareil alimentaire du nématode.

Source: Demangeat, 2007.

Cette adsorption des Nepovirus est un phénomène sélectif, qui implique certainement des molécules spécifiques du nématode. Dans le cas de *X. diversicaudatum*, il a pu être démontré que la capacité du nématode à retenir le virus peut être héritée génétiquement. En 1986, une étude a montré que le croisement entre une population de *X. diversicaudatum* transmettant efficacement l'ArMV et une autre ne la transmettant qu'occasionnellement, générait des nématodes « hybrides » transmettant l'ArMV avec une efficacité intermédiaire. La nature biochimique des sites de rétention pourrait être des molécules polysaccharidiques (Murant *et al.*, 1996 ; Sastry, 2013b).

Chez *X. diversicaudatum*, le site de rétention des particules virales répond positivement au marquage pour les carbohydrates - composé polysaccharidique -, alors que le même site chez *L. elongatus*, vecteur du RpRSV et du TBRV, n'est pas marqué, ni d'ailleurs l'odontostyle de *X. diversicaudatum* et de *X. index* (Demangeat *et al.*, 2005b; Demangeat, 2007).

I.3.5. Epidémiologie

La maladie du court-noué est distribuée au vignoble sous forme de foyers de pieds de vigne malades. Cette répartition des plantes malades est caractéristique d'une transmission naturelle par un vecteur souterrain. L'extension de cette maladie est souvent lente mais inexorable (Sastry, 2013c).

Cette extension progressive lente est liée au déplacement très faible des nématodes dans le sol qui est estimé à quelques centimètres par an (Van Zy *et al.*, 2002). La dissémination du nématode se fait de proche en proche par le transport de terre ou avec celle qui adhère aux instruments de travail du sol. La contamination des parcelles situées en aval d'un secteur contaminé est souvent due à l'érosion du sol et au ruissellement des eaux (Cadeta et Albergelb, 1999 ; Hugo et Malan, 2010).

I.3.6. Méthodes de lutte :

Il n'existe pas de méthodes curatives efficaces pour lutter contre les maladies virales, par conséquent, les principaux efforts doivent être concentrés sur la lutte contre les vecteurs, la prévention de l'infection et la résistance variétale (Maliogka *et al.*, 2015). Les méthodes classiques de lutte contre le court noué sont basées sur les pratiques culturales (rotation et jachère) pour réduire la source d'inoculum et sur l'utilisation de produits agrochimiques contre les nématodes vecteurs du virus (Almeida *et al.*, 2013).

I.3.6.1. Lutte contre le vecteur :

La distribution verticale de *X. index*, qui est le principal vecteur du GFLV, dans le sol suit de près celle du système racinaire de l'hôte et, les populations dans les climats tempérés ne sont pas beaucoup plus affectées par la température du sol (Ali *et al.*, 2014 ; Malherbe *et al.*, 2015). Dans les sols contaminés, l'utilisation de fumigènes contre les nématodes vecteurs ne donne qu'un contrôle temporaire de la maladie et est de plus en plus remis en question pour des raisons environnementales. L'utilisation de substances chimiques efficaces comme dichlorpropan a actuellement été interdite en raison de la forte toxicité des produits chimiques et de leurs propriétés cancérigènes (Van Zyl *et al.*, 2012). Il est fortement recommandé de réaliser de nouvelles plantations sur des parcelles indemnes. La propagation locale du virus est difficile à contrôler, parce que les pratiques culturales telles que la jachère prolongée, la rotation des cultures, le labour et le désherbage n'ont pas d'effets considérables (Hull, 2014).

I.3.6.2. La résistance variétale :

Une autre tentative pour limiter la propagation du virus est de prévenir l'infection des plantes par plantation de variétés résistantes aux virus. Il existe deux approches pour introduire les gènes de résistance dans les cépages cultivés, le choix de l'approche à suivre dépend essentiellement de la source et de la nature du gène.

I.3.6.2.1. Résistances naturelles chez les Vitaceae aux virus et à leurs vecteurs :

Aucune résistance totale n'a été rapportée chez les espèces américaines de *Vitis* et leurs hybrides. Par contre un *V. vinifera* du Moyen-Orient, un cultivar de *Muscadinia rotundifolia* et un hybride *V. vinifera* x *M. rotundifolia* ont révélé une résistance vis-à-vis du virus du GFLV. (Lahogue, 1996 ; Esmenjaud et Bouquet , 2009).

L'étude du comportement vis-à-vis des nématodes révèle que plusieurs variétés de *Vitis* et de *Muscadinia* sont non hôtes de *Xiphinema index*, vecteur du GFLV. Il a été démontré que certaines de ces variétés réagissent aux piqûres de nématodes par une hypersensibilité se traduisant par la nécrose et la mort des cellules piquées, par exemple : le porte-greffes Börner (*V. vinifera* x *V. cinerea*) (Sopp et Rühl, 1994).

I.3.6.2.2. Résistance induite par le transfert de gènes viraux :

Le développement des vignes transgéniques résistantes aux GFLV par l'intégration d'un gène viral est une stratégie prometteuse et a été utilisée jusqu'à présent essentiellement pour introduire le gène de la protéine capsidique du virus dans les cépages porte-greffes et variétés (Jackson, 2014). Dans des conditions expérimentales, l'infection retardée ou un taux inférieur du virus ont été observés dans certaines lignées transgéniques de vigne (Bagewadi, 2014; Cillo et Palukaitis, 2014), mais ces résultats doivent être encore réévalués au champ. Bien que les lignées des plantes herbacées contenant la séquence complète de la CP, soit dans l'orientation sens ou antisens d'ARN (Spielmann , 2000; Winterhagen, 2009) ont montré une résistance à l'infection par le GFLV, la capacité de conférer une telle résistance chez les vignes transgéniques reste encore à être examinée. D'autre part, des essais sur terrain ont démontré la résistance des vignes transgéniques exprimant la séquence complète de la CP contre le GFLV (Mauro, 1995 ; Valat et al., 2006 ; Jackson, 2014).

I.3.6.3. La prémunition :

La prémunition, ou protection croisée, repose sur l'utilisation d'isolats hypovirulents d'un phytovirus qui, une fois inoculés à une plante, induisent chez celle-ci une protection vis-à-vis d'une surinfection par des isolats hypervirulents du même virus (Hull, 2014).

Des isolats hypovirulents d'ArMV et de GFLV ont été caractérisés et l'effet protecteur de certains d'entre eux a été démontré d'abord sur un hôte herbacé *Chenopodium quinoa* (Valat *et al.*, 2003). Des essais effectués sur vigne, soit en conditions contrôlées en serre, soit dans des vignobles atteints de court-noué, montrent que la présence d'un isolat viral hypovirulent peut induire un retard à l'infection par un isolat hypervirulent surinfectant ainsi qu'une atténuation des symptômes et un accroissement de la récolte en comparaison avec des ceps non « prémunis » mais infectés par le même isolat viral hypervirulent (Vigne *et al.*, 2009).

I.3.6.4. La thermothérapie :

La thermothérapie est l'exposition du matériel végétal infecté à la chaleur (humide ou sèche) pendant une certaine période de temps. Les principaux effets sont : un blocage ou ralentissement de la réplication et la propagation systémique du virus suite aux dommages causés par la chaleur sur les protéines CP et l'acide nucléique et le blocage des ribosomes en raison d'une concurrence entre l'ARN génomique et de l'ARN viral. En conséquence de la réduction de la réplication virale provoquée par la température plus élevée, les tissus de la plante infectée nouvellement formés peuvent être exempts de virus (Panattoni et Triolo, 2010).

I.3.6.5. La culture in vitro :

La culture in vitro de méristèmes pris à partir de bourgeons apicaux ou latéraux donne des explants méristématiques indemnes. L'absence de virus dans les régions méristématiques semble due à divers facteurs tels que l'absence de connexions vasculaires au niveau du dôme, la vitesse de réplication accrue et l'augmentation du métabolisme de ces cellules ne permettent pas la réplication virale. Le succès de cette technique de récupération dépend des dimensions des explants, du type de virus et du génotype de la plante (Torres-Viñals *et al.*, 2004 ; Panattoni *et al.*, 2013).

La technique de micro greffage est une solution alternative pour les espèces végétales qui ne tolèrent pas des températures plus élevées et / ou pour lesquelles la régénération in vitro de bourgeons apicaux est très difficile. Les explants d'apex méristématiques de la plante infectée sont greffés in vitro sur un porte-greffe sain et compatible (Wanga, 2003 ; Spilmont *et al.*, 2012).

La chimiothérapie est la technique la moins utilisée pour la récupération en raison de la mauvaise connaissance des mécanismes de la réplication virale et de la difficulté de trouver une substance antivirale qui est économiquement efficace et non toxique pour la plante (Hu *et al.*, 2012).

I.3.6.6. Sélection sanitaire :

Stratégie préventive, elle est aujourd'hui la seule méthode permettant de limiter la diffusion des virus et viroses de la vigne. La sélection sanitaire est complémentaire à la sélection génétique.

La sélection clonale a pour but de sélectionner et de propager, pour un cépage donné, les clones les mieux adaptés aux contraintes qualitatives et productives (Valat, 1972). La définition du clone de vigne retenue par l'OIV (Office international de la vigne et du vin) est la suivante : « un clone est la descendance végétative conforme à une souche choisie pour son identité indiscutable, ses caractères phénotypiques et son état sanitaire ». (Audeguin *et al.*, 2000).

Parmi les critères de sélection figure l'état sanitaire vis-à-vis des agents pathogènes et des maladies transmissibles par les voies de la multiplication végétative et notamment les virus du court noué.

En Algérie, la sélection sanitaire de la vigne est réglementée par le décret exécutif n° 93-284 du 23 novembre 1993 fixant la réglementation relative aux semences et plants, et par l'arrêté du 7 avril 2004 modifiant et complétant l'arrêté du 21 mai 1995 fixant les normes phytotechniques et phytosanitaires à l'importation des semences et plants des espèces maraîchères, arboricoles, viticoles et des grandes cultures. Les virus pris en considération par ce dernier sont : le GFLV, les GLRV 1 et 3, le RSTaV, le GVB, le GVA et le GFKV (Annexe I)

La sélection clonale des variétés de porte-greffes est uniquement sanitaire puisque ces variétés sont d'origine récente et monoclonale ; elles sont, pour la plupart, issues d'un semis unique. Pour les cépages de *Vitis vinifera*, et selon l'Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP), la sélection clonale est à la fois sanitaire et pomologique ; elle est réalisée en plusieurs étapes:

1. repérage au vignoble de souches intéressantes, dites « têtes de clones »,
2. étude sanitaire et pomologique de chaque clone en vue de son agrément,
3. expérimentation des clones agréés,
4. conservation et multiplication.

Les analyses sanitaires de l'étape 2 se font obligatoirement par indexage biologique ; d'autres protocoles (Elisa) restent complémentaires mais néanmoins éliminatoires. La surveillance des parcelles de pieds-mères et du matériel de multiplication de l'étape 4 peut se faire par Elisa, comme décrit plus haut.

Cette sélection sanitaire est complétée par la désinfection des sols à l'aide de nématicides. Les nématicides les plus couramment utilisés sont des fumigants dont l'efficacité dépend pour une large part des conditions d'application et de la texture du sol. Les traitements nématicides restent souvent inefficaces ; de plus, ils sont coûteux et peuvent être à l'origine de pollutions souterraines. L'élimination des nématodes peut être obtenue par un repos du sol sans culture de plantes hôtes des nématodes vecteurs pendant 8 ans au moins : cette mesure est rarement acceptable d'un point de vue économique (Anonyme, 2008).

Partie

Expérimental

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. MATERIELS

II.1.1. Matériel végétal

II.1.1.1. Echantillonnage :

L'échantillonnage a été réalisé dans plusieurs régions viticoles du nord algérien. La prise des échantillons de feuilles est faite en suivant les diagonales de la parcelle sur les plants présentant des symptômes de jaunisse, nanisme, entre-nœuds courts ou aspect anormal des feuilles. Le marquage des plants testés a été réalisé avec du ruban adhésif pour des prises ultérieures d'échantillons. Le nombre d'échantillons, leurs origines géographiques et les variétés sont rapportés dans le Tableau ci-dessus.

Tableau 6 : Les échantillons testés et leurs origines géographiques.

Wilaya	Daïra	Cépage / vignoble	Nombre d'échantillons
Blida	Larbaa	Cardinal	8
		Sabel	9
		Red Glob	9
		Alphonse Lavallée	7
	Boufarik	Cardinal	7
Tlemcen	Sebdou	Alicante Bouchet (1)	9
	Chetouane	Alicante Bouchet (2)	8
		Alicante Bouchet (3)	9
	Mansourah	Alicante Bouchet (4)	8
Alger	Rouiba	Chaouche Blanc	7
Sidi Belabès	Ain El Berd	Valencie	8
		Alicante Bouchet (1)	9
	Tessala	Alicante Bouchet (2)	7
		Valencie (1)	9
Zfizaf	Valencie (2)	8	
Mostaganem	Sidi Ali	Valencie (1)	9
	Ain Tadles	Valencie (2)	8
Mascara	Tighenif	Valencie (1)	7
	Mohammadia	Valencie (2)	8
	El Bordj	Valencie (3)	8
Oran	Oued Tlilat	Ahmar de Mascara	7
		Red Glob	8
	Ain Turk	Red Glob	8
		Aneb El Kadi	8
Boumerdes	Isser	Alphonse Lavallée	9
		Cardinal	8
	Thenia	Cardinal	9

		Dattier de Beyrouth	9
Ain T'mouchant	Ain T'mouchant	Alicante Bouchet (1)	10
		Alicante Bouchet (2)	11
	Hamman Bouhadjar	Alicante Bouchet (3)	10
Relizan	Yellal	Dattier de Beyrouth	8
		Aberkane	8
		Muscat de Gustave	8
	Relizane	Aberkane	9
		Ahmar de Mascara	8
Total			300

II.1.1.2. Conservation :

Les échantillons sont conservés dans des sacs en papier, avec une étiquette mentionnant l'origine de l'échantillon, le cépage et la date de prélèvement.

Au laboratoire, les échantillons sont soit conservés à 4°C (réfrigérateur), déshydratés selon la méthode de Bos (Planche 1) (Bos, 1969 ; De Wijs et Suda-Bachmann, 1979)

II.1.2. Les tampons et solutions utilisés pour les tests immunoenzymatiques :

II.1.2.1. Les sera utilisés :

Les tests immunoenzymatiques ont été réalisés à l'aide de sera, l'un fourni par Agritest® (sérum et conjugué) l'autre par Bioreba (Kit complet)

II.1.2.2. Les tampons et autres solutions :

Pour le test mené avec le sérum fourni par Agritest, les tampons et solutions suivantes sont préparées par nos soins au laboratoire de virologie (ENSA).

✓ Tampon de sensibilisation 0,1M et pH= 9,6 :

Carbonate de sodium (Na_2CO_3) 31,8 g

Bi carbonate de sodium (Na_2HCO_3) 58,6 g

Azide de sodium (NaN_3) 0,2 g

Eau distillée 800 ml

Ajuster le pH à l'aide de HCl 1 M, puis compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée

✓ Tampon phosphate salin (PBS) 0,1M et pH= 7,4 :

Chlorure de sodium (Na Cl)	8,0 g
Phosphate mono potassique (KH ₂ PO ₄)	0,2 g
Phosphate di sodique (Na ₂ HPO ₄)	1,5 g
Chlorure de potassium (K Cl)	0,2 g
Azide de sodium (NaN ₃)	0,2 g
Eau distillée	800 ml

Ajuster le pH à l'aide de HCl 1 M, puis compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée

✓ Tampon phosphate salin-Tween PBS-T

Tampon PBS à 0,1M pH=7,4	1000 ml
Tween 20	0,5 ml

✓ Tampon du substrat 0,1M pH= 9,8

Diéthanolamine	97 ml
Azide de sodium	0,2 g
Eau distillée	800 ml

Ajuster le pH à l'aide de HCl 1 M, puis compléter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée

✓ Le substrat de l'enzyme

Le substrat utilisé est le Para-nitro-phényl-phosphate (PNPP) substrat spécifique de la phosphatase alcaline, dilué à raison de 0,6 mg dans 1 ml de tampon du substrat.

II.1.3. Tampons et solutions utilisés pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes :

II.1.3.1. Les protéines marqueuses :

Un mélange de protéine marqueuse a été utilisé, il est constitué de plusieurs protéines de tailles moléculaires différentes allant de 14 Kda à 68 Kda. (Tableau 7)

Tableau 7 : Les protéines marqueuses utilisées dans le SDS-PAGE

Protéine marqueuse	Taille moléculaire Kda
Bovine serum albumin (BSA)	68
Carbonic anhydrase	32
B-lactoglobulin	18
Lysozyme	14,5

III.1.3.2. Les tampons et autres solutions :

- **Solution 1 : Solution Acrylamide –bisacrylamide à 30%**

Acrylamide	30 g
Bisacrylamide	0,8g
Eau distillée	quantité suffisante pour 100 ml

- **Solution 2 : Tris –HCl à 1,5M et pH = 8,8**

Tris	18,15 g
Eau distillée	40 ml

Ajuster le pH à l'aide de HCl (1M), puis compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée.

- **Solution 3 : Tris-HCl à 0,5 M et pH = 6,8**

Tris	6 g
Eau distillée	40 ml

Ajuster le pH à l'aide de HCl 1 M, puis compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée

- **Solution 4 : SDS à 10%**

SDS	10 g
Eau distillée	quantité suffisante pour 100 ml

- **Solution 5 : Ammonium persulfate de sodium à 10%**

APS	10 g
Eau distillée	quantité suffisante pour 100 ml

- **Solution 6 : Tampon Laemmli (Dilution des protéines marqueuses et des extraits viraux).5X**

Tris – HCl	0,454 g
SDS à 10%	6,00 ml
Glycérol	3,00 ml
Bleu de bromophénol	20,00 ml
Ajuster le PH 6,8	
Mercaptoéthanol	50,00 ml à a ajouter juste avant utilisation.

- **Solution 7 : Tampon de migration pH= 8,8 (quantité pour 5 litres)**

Tris 0,025M	15,60 g
Glycine 1,92M	144 g
Sodium dodecyl-sulfate (SDS) à 1%	5g
Eau distillée	400 ml
Ajuster le pH à l'aide de HCl 1 M, puis compléter le volume à 500 ml avec de l'eau distillée	

Pour l'utilisation diluer 100 ml de cette solution stock dans 900 ml d'eau distillée.

II.2. METHODES

II.2.1. Les tests sérologiques

L'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) est une technique sérologique basée sur la réaction anticorps (sérum) –antigène (virus). L'adjonction d'une enzyme aux anticorps permet de révéler la présence du virus par une réaction colorée si celui-ci est présent dans l'échantillon à tester. Cette technique est également utilisée pour les analyses de vérification (Dijkstra et de Jager, 1998, Guesdon *et al.*, 1979).

Les échantillons à tester ont été analysés par la technique immunenzymatique DAS-ELISA selon les protocoles décrits par Ternynk et Avrameas (1991). Le choix de la variante directe de l'ELISA est conditionné par la disponibilité des conjugués (planche 2).

Les différents échantillons sont broyés dans le PBS, à raison de 1g d'échantillon dans 4ml du PBS, le broyat est filtré à l'aide d'une étamine.

Un autre test a été réalisé afin de confirmer les résultats du premier, est mené à l'aide du Kit complet Bioreba (GFLV-ArMV) en DAS -ELISA selon le protocole fourni avec le kit (Annexe).

La lecture des résultats est faite visuellement et par spectrophotométrie à 405nm (lecteur de plaques ELISA (Metertech) après une incubation de 30 minutes puis 1 heure à température ambiante.

La moyenne de lecture pour chaque échantillon est comparée à un seuil de détection (SD) calculé pour chaque plaque:

$$SD = \text{Moy. (D.O) témoin} + 4 \text{ ET (D.O) témoin}$$

Les fréquences d'infection pour chaque wilaya ainsi que pour chaque variété sont calculées à l'aide de la formule suivant :

$$\text{Fréquence d'infection (\%)} = \frac{\text{Nombre d'échantillons positifs} \times 100}{\text{Nombre total d'échantillon analysés}}$$

II.2.2. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide

La méthode utilisée est l'électrophorèse discontinue en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (en présence de SDS), elle permet de séparer les protéines en fonction de leurs taille moléculaire (Laemmli et Fabre, 1973). Le protocole suivi est celui de Laemmli (1970) (Planche 3). Seize échantillons sont choisis parmi ceux qui ont donné meilleurs résultat au test ELISA, les feuilles sont broyées dans le tampon Laemmli à raison de 1g pour 4 ml de tampon. Les extraits sont dénaturés au bain Marie bouillant durant 3 mn, puis sont déposés séparément dans les puits réalisés sur le gel de concentration (Tableau 8). La migration se fait à 4°, durant au moins 4 heures, à 150 volts.

La migration est stoppée lorsque le front de migration se situe à environ 3 cm de la base du gel. Le gel est retiré, fixé durant une nuit, puis coloré au bleu de Coomassie (R250) durant environ une heure, et enfin décoloré avant de relever les distances de migration de chacune des bandes protéiques obtenues (Planche 4). Les poids moléculaires de chacune des bandes protéiques sont estimés par projection sur un courbe étalon établi à partir des logarithmes des poids moléculaires des protéines marqueuses et des distances de migrations de ces mêmes protéines.

Tableau 8 : La disposition des échantillons sur le gel d'électrophorèses

N° du puits	L'échantillon déposé
1	Mélange de protéines marqueuses
2	Témoin négatif (Bioreba)
3	SBV18
4	BLRg1
5	OOTAM5
6	RYA2
7	ATATAB39
8	BTDB9
9	MSAV28
10	BIC2
11	RYAM1
12	SbV17
13	MBV12
14	MMV15
15	MBV13
16	RYA5
17	MATV24
18	BLA15

Après avoir les distances de migration des protéines marqueuses, une représentation graphique est nécessaire, les distances de migration sur l'axe des abscisses, et le logarithme des tailles moléculaires sur l'axe des coordonnées, la droite de régression est tracé et la formule est obtenue à l'aide de Microsoft Excel©, l'équation de la droite de régression est nécessaire pour avoir la taille moléculaire des protéines correspondant au bande protéine dans les autres colonnes.

Planche 1 : Conservation des échantillons végétaux selon la méthode de Bos (1969)

- ✓ Les feuilles débarrassées de leurs nervures sont découpées en fines lanières à l'aide d'une lame de rasoir
- ✓ Les lanières sont déposées à l'intérieur d'une boîte de Pétri en matière plastique sur une feuille de papier filtre couvrant une couche de silicagel ou de chlorure de calcium
- ✓ La boîte de Pétri numérotée est scellée à l'aide de parafilm puis conservée à 4°C jusqu'à déshydratation complète du matériel végétal

Planche 2 : protocole utilisé en DAS-ELISA (Ternynck et Avrameas, 1991)**1- Sensibilisation de la plaque**

Dépôt de l'anticorps spécifique dilué au 1/1000 dans le tampon carbonate bicarbonate (0,1M pH 9,6)

2- Incubation de la plaque

2 heures à 37°C ou une nuit à 4°C.

3- Lavage

3 fois 5 minutes avec le PBS-Tween.

4- Dépôt de l'antigène

Directement extrait à raison de 1g/4ml dans le PBS (0,1M pH 7,4)

5- Incubation

2 heures à 37°C.

6- Lavage

3 fois 5 minutes avec le PBS-Tween.

7- Dépôt de l'anticorps spécifique conjugué à la phosphatase alcaline

Dilué au 1/1000 dans le PBS (0,1M pH 7,4)

8- Incubation

2 heures à 37°C.

9- Lavage

3 fois 5 minutes avec le PBS-Tween.

10- Dépôt du substrat

PNPP dilué (0,6,mg/1ml) dans du tampon diéthanolamine (0,1M et pH=9,8)

11- Incubation

A température ambiante

12- lecture à 405 nm

1ère lecture au bout de 30 minutes d'incubation

2ème lecture au bout d'une heure d'incubation

13-Arrêt de la réaction

Par addition de NaOH 1N

Planche 3 : La préparation des gels (Laemelli, 1970)

Le gel de concentration à 4% : quantité suffisante pour 5 ml ;

Tris -HCl à 1M et pH = 6,8	5,00 ml
Acrylamide-bisacrylamide à 30%	2,60 ml
Eau distillée	12,00 ml
SDS à 10%	200 µl
APS à 10%	200 µl
Teemed	20 µl

Gel de séparation 12 % : quantité suffisante pour 8 ml ;

Tris -HCl à 1,5M et pH = 8,8	12.50 ml
Acrylamide-bisacrylamide à 30%	20,00 ml
Eau distillée	16,50 ml
SDS à 10%	500 µl
APS à 10%	500 µl
Teemed	50 µl

Planche 4 : la visualisation des bandes (Laemelli, 1970) :**Tampon de fixation du gel**

Acide acétique à 12% durant 1 heure à température ambiante en agitant de temps en temps.

Solution de coloration du gel

Méthanol	50%
Eau	40%
Acide acétique	10%
Bleu de Coomassie (R250)	0,1%

Solution de décoloration

Méthanol	5%
Acide acétique	7,5%
Eau distillée	77,5%

III. Résultats et discussion :

III.1. Résultats

III.1.1. La prospection des vignobles :

III.1.1.1. Etat général des vignobles prospectés :

Les prospections ont été réalisées durant les mois de mai et juin 2014 sur 22 vignobles dans 10 wilayas du centre et de l'ouest du pays. Ces wilayas produisent 58% du raisin de table et présentent 55% de la superficie consacrée au raisin de table (MADR, 2011). Les observations ont permis de différencier deux types de symptômes :

- **Des anomalies de croissance** : sur rameaux : entre-nœuds courts, double nœuds, développement de rameaux latéraux supplémentaires (Fig. 8) ; chétivité et croissance lente (Fig. 9 et 10).
- **Des anomalies de coloration** : sur feuilles : vein-banding (Fig. 11) ; jaunissement (Fig. 12) et mosaïque (Fig. 13).

Il faut noter que durant la prospection, il a été constaté que la majorité des vignobles présente au moins un foyer d'infection (Fig. 10), mais les vignobles de l'ouest semblent être plus infectés que ceux du centre.



Figure 8 : symptôme de bougeon double (Red Globe)



Figure 9 : Une plage de plant a croissance lente (les plants ont été plantés à la même période avec ceux à l'arrière) cépage Ahmar de Mascara



Figure 10 : un plant chétif (cépage Alfance Laval)



Figure 11 : symptôme de vein-banding sur le cépage Alicante Bouschet



Figure 12 : symptôme de chlorose sur un sarment de Cardinal



Figure 13 : symptôme de mosaïque sur les feuilles du cépage Sabel

III.1.1.2. L'échantillonnage

Un nombre total de 300 échantillons a été collecté durant les prospections, les vignobles ciblés sont de type raisins de table. Les échantillons sont prélevés individuellement sur des vignes présentant des symptômes de la dégénérescence infectieuse de la vigne, ou des vignes sans symptômes se trouvant à côté de vignes présentant des symptômes. (Tableau 6).

III.1.2. Tests immuno-enzymatiques

L'analyse des résultats des tests immuno-enzymatiques réalisés à l'aide des deux anti-séras cités précédemment montre que le virus du court noué seul ou en complexe avec le virus de l'arabette, est présent dans toutes les régions visitées et sur toutes les variétés testées (Annexe III).

Sur les 300 échantillons testés 141 sont positifs au sérum anti GFLV-ArMV et 135 sont positifs au sérum anti-GFLV, ce qui nous permet de dire que même si le second sérum est plus spécifique, la sensibilité du premier est plus élevée.

De plus si l'on s'intéresse aux variétés les plus répandues, Alicante Bouchet et Valencie, il semble que la variété Alicante Bouchet soit la moins sensible puisque sur 81 prélèvements, 25 sont infectés ; alors que pour Valencie sur 65 échantillons 31 se sont révélés positifs soit respectivement 30,86 % et 47,69 %.

III.1.2.1. Fréquences d'infection des échantillons prélevés par la maladie du court noué:

Les pourcentages d'échantillons infectés par rapport au nombre total prélevé par parcelle sont calculés et présentés dans le tableau 9, d'après ces résultats (qui sont détaillés dans l'Annexe III) on peut constater que tous les vignobles sont infectés par l'un des deux principaux virus du court noué, outre ces observations, on peut remarquer qu'il existe des échantillons présentant des infections par le virus de l'ArMV seul. Cela est constaté par le fait que ces échantillons réagissent positivement à l'antisérum Bioreba® qui contient des anticorps polyclonaux détectant la présence du GFLV ou l'ArMv, et négativement à l'antisérum Agritest® qui ne détecte que la présence du GFLV.

Tableau 9 : Les résultats des tests sérologiques réalisés par deux antisérums.

Wilaya	Codification de la parcelle	Nombre d'échantillons	Agritest GFLV (% +)	Bioreba GFLV/ArMV (% +)
Blida	BLCar	8	50%	25%
	BLSab	9	67%	56%
	BLRg	9	67%	67%
	BLAI	7	71%	71%
	BBCar	7	43%	43%
Tlemcen	TSAb	9	33%	44%
	TCAb1	8	25%	38%
	TCAb2	9	22%	22%
	TMAb3	8	13%	25%
Alger	ARCb	7	14%	0%
Sidi Belabbès	SbAEV	8	13%	25%
	SbAEAb1	9	11%	11%
	SbTAb2	7	0%	14%
	SbV1	9	56%	67%
	SbZV1	8	38%	38%
Mostaghanem	MSAV2	9	44%	44%
	MATV2	8	63%	50%
Mascara	MTV1	7	29%	29%
	MMV1	8	25%	25%
	MBV1	8	75%	88%
Oran	OOTAM	7	57%	57%
	OOTRG	8	75%	75%
	OATRG	8	63%	63%
	OATAK	8	75%	75%
Boumerdès	BIAL	9	89%	89%
	BIC	8	63%	63%
	BTC	9	33%	33%
	BTDB	9	67%	67%

Ain Témouchant	ATHBAB1	10	40%	30%
	ATHBAB3	11	45%	45%
	ATATAB3	10	40%	40%
Relizane	RRA	8	38%	50%
	RRDB	8	63%	63%
	RYDB	8	25%	25%
	RYA	9	33%	33%
	RYAM	8	50%	63%
Total		300	45%	46%

III.1.2.2. Fréquences d'infection des échantillons prélevés des vignobles par wilaya :

La figure 14 montre que tous les vignobles sont infectés, les fréquences d'infection différent d'une wilaya à une autre. On observe que plus de la moitié des échantillons prélevés des wilayas Blida, Oran et Boumerdès sont infectés par un des deux principaux virus du court noué. Cependant, les fréquences d'infection des wilayas de Mostaganem, Mascara et Relizane sont proches de 50%. Notons cependant qu'aucun échantillon de ceux prélevés à Alger n'a réagi positivement avec le sérum Anti-GFLV/ArMV, et qu'aucun de ceux prélevés à Sidi Belabbès (Tessala, Alicante Bouchet) n'a répondu avec le sérum anti-GFLV.

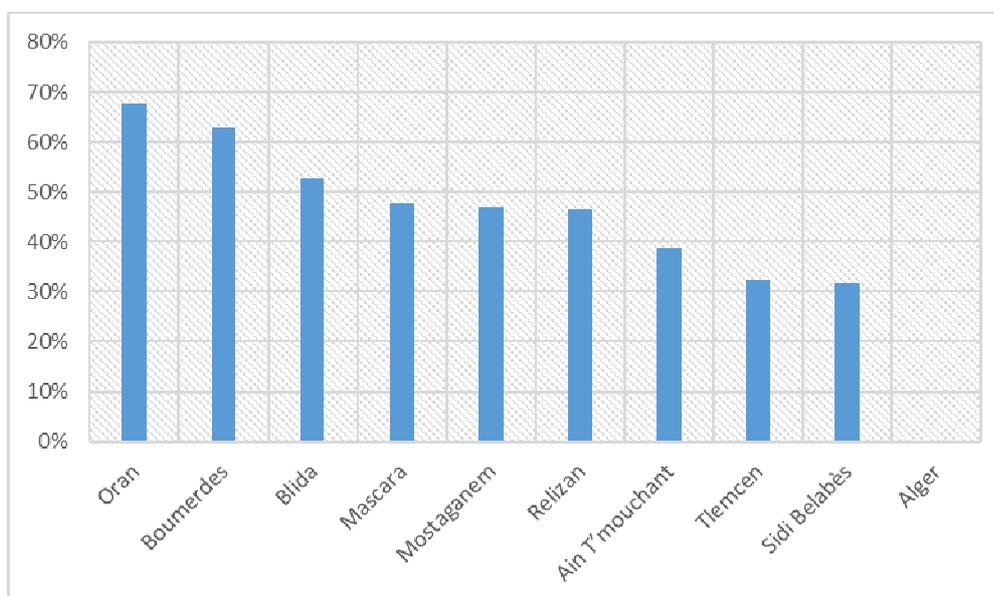


Figure 14 : Les fréquences d'infection des échantillons prélevés par wilaya

III.1.2.3. Fréquences d'infection des échantillons prélevés par variété :

La variabilité des fréquences d'infection par cépage est très remarquable (Fig. 15), ainsi par exemple des cépages telles que Alplonse Lavallée et Aneb El Kadi présentent des fréquences d'infection supérieurs à 70%, alors que le groupe des cépages Sabel ; Dattier de Beyrouth ; Ahmar de Mascara et Red Glob ont des fréquences d'infection compris entre 50 et 75%. Des fréquences d'infection inférieurs à de 25 à 50% ont été obtenu chez les cépages : Aberkane ; Valencie ; Cardinal ; Alicante Bouchet; Muscat de Gustave. Aucun échantillon du cépage Chaouche Blanc n'a réagi positivement vis-à-vis le sérum Anti-GFLV/ArMV, cependant un seul a donné une réaction positive à l'antisérum anti-GFLV. Il faut noter que ces fréquences ne représentent pas un critère de résistance vis-à-vis des virus du court noué.

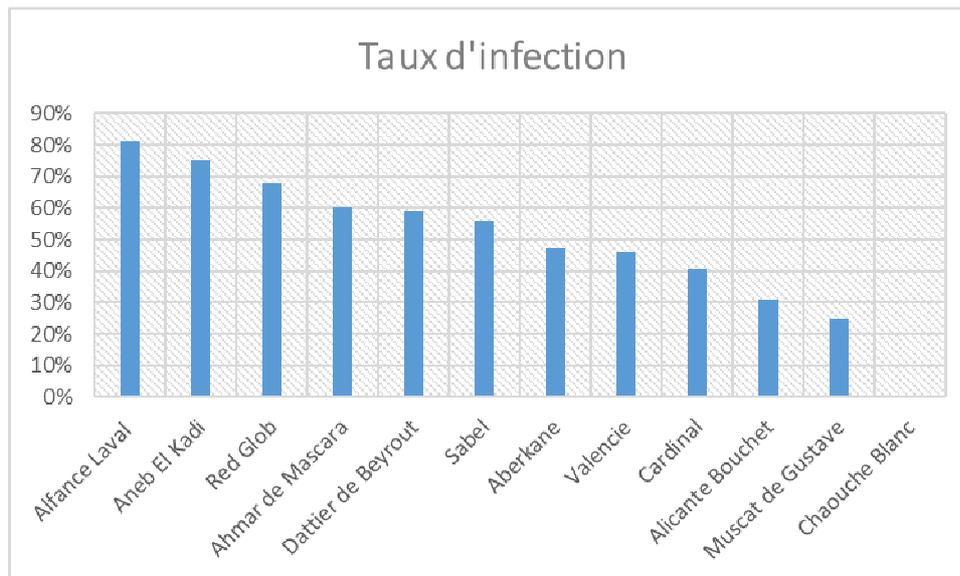


Figure 15 : Les fréquences de réactions positives des échantillons collectés par cépage

III.1.3. Test biochimique (SDS-PAGE) :

Après fixation, coloration et décoloration du gel, un léger smearing sur la colonne qui correspond au mélange des protéines marqueuse a été observé, cependant les bandes étaient faciles à repérer (Fig. 16). Nous avons pu mesurer les distances de migration des protéines marqueuses, ce qui nous a permis de tracer la droite de régression en utilisant la fonction de régression linéaire de Microsoft Excel 2013 © (Fig. 17), la formule de la droite est la suivante :

$$y = -0.2015 x + 11.167$$

Où : y : le logarithme du poids moléculaire de la protéine

x : la distance de migration.

D'où :

$$\text{le poids moléculaire} = e^{(-0.2015 x + 11.167)}$$

La formule a servi pour déterminer les poids moléculaires des différentes protéines correspondant aux bandes observées sur le gel.

Une bande dont la distance de migration est égale à 1,2cm a été mise en évidence, ce qui correspond (selon l'équation de la droite de régression) à un poids moléculaire de 55.559 da, un poids proche de celui de la protéine capsidique du GFLV. La bande est présente dans les puits correspondant aux échantillons prélevés de Tessala (Valencie) ; Larbaa (Red Glob) ; Oued Tlilat (Ahmar de Mascara) ; Yellal (Aberkane) ; Sidi Ali (Valencie) et les Issers (Cardinal), cependant elle est absente dans le témoin sain (Bioreba®), ce qui confirme son origine virale.

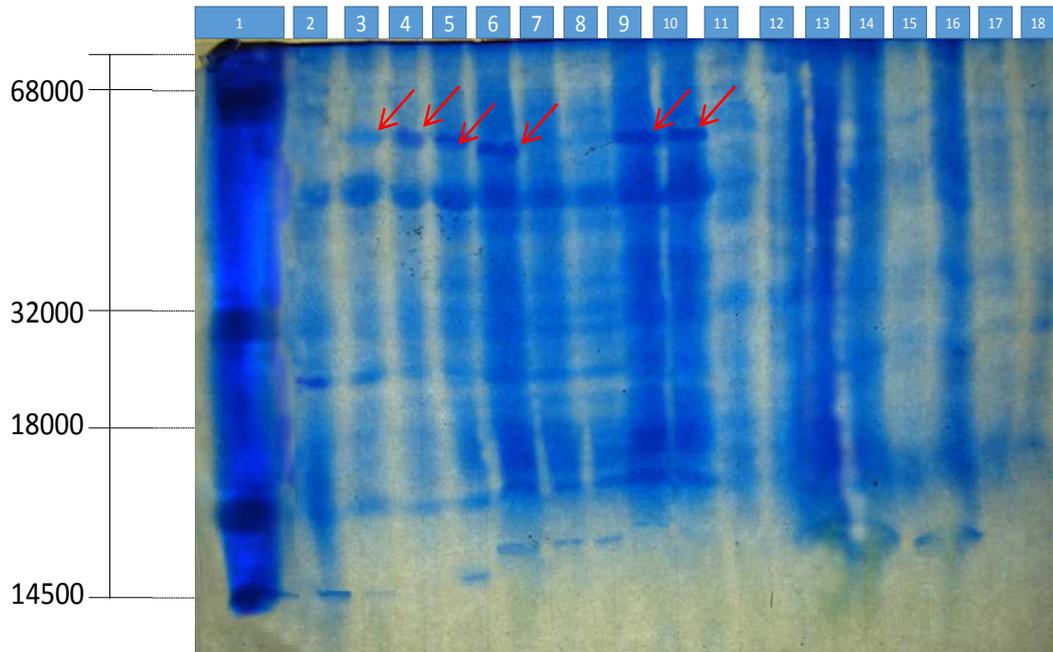


Figure 16 : Gel de la SDS-PAGE de la protéine capside: les protéines marqueuses (puits n° 1) et leurs poids moléculaires respectifs, le témoin sain (puits 2) et les échantillons (puits : 3-18), les bandes avec les flèches rouges correspondent au poids moléculaire 55,559 Kda.

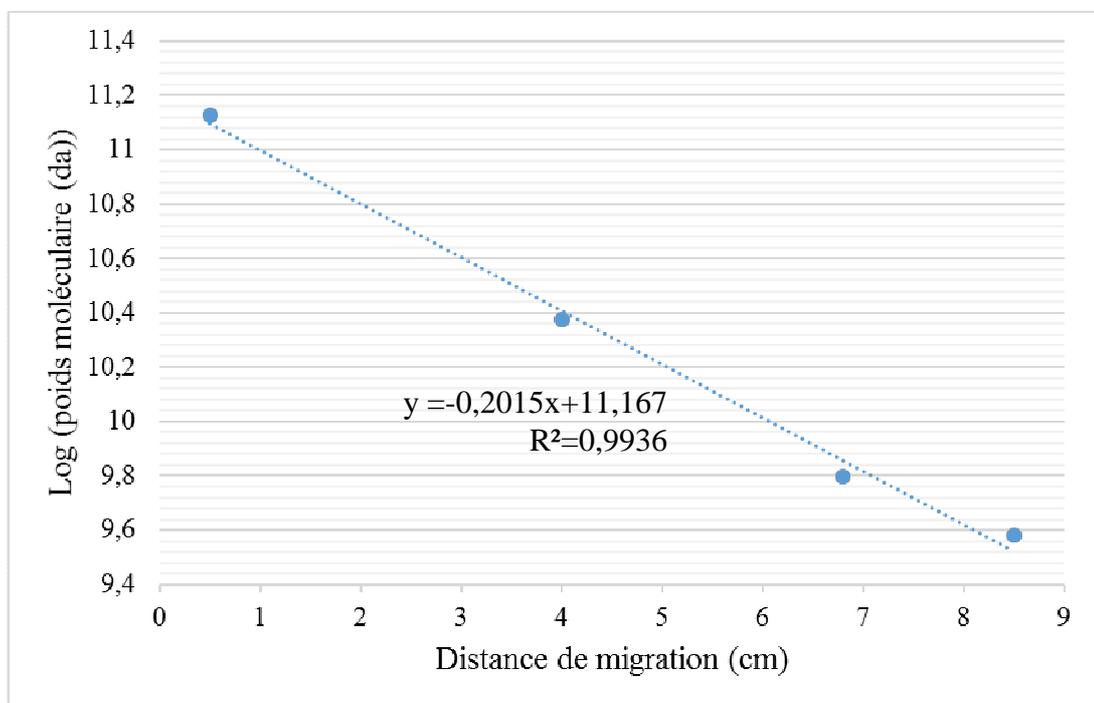


Figure 17 : L'évaluation des Log (Poids moléculaire) en fonction des distances de migrations.

III.2. Discussion

III.2.1. La prospection des vignobles :

Les symptômes observés dans les vignobles prospectés peuvent être catégorisés en : symptômes de malformation ; symptômes de modification de la coloration, et retard de croissance. Selon Martelli (2010), les trois types peuvent être exprimés selon la souche du virus, le cépage cultivé et les conditions environnementales. Les souches plus virulentes causent les malformations des tiges chez les variétés sensibles, alors que d'autres souches moins virulentes n'induisent pas de symptôme.

L'éclaircissement inter-nervaire (vein-banding) observé sur le cépage alicante bouchet est, selon Sokhandan et Hajizadeh (2007), l'un des symptômes typiques de la maladie du court noué.

De même, des symptômes tels que le raccourcissement des entre-nœuds, les doubles-bourgeons, et la chlorose sont caractéristiques du court noué de vigne (Liebenberg et col., 2009).

Das et Raski (1969), et Raski et ses collaborateurs (1983) rapportent aussi que les plages de plants infectés semblables à celles que nous avons pu observer, indiquent une transmission par des agents telluriques tels que les nématodes. Plus tard ses plages se transforment en plage vides (Andret-Link *et al.*, 2004a).

Bien que les symptômes nous aient fournis des informations essentielles sur la maladie, il a été nécessaire que l'inspection visuelle des symptômes soit effectuée en conjonction avec d'autres tests de confirmation pour assurer un diagnostic précis de l'infection par les virus du court noué.

III.2.2. Les tests sérologiques :

L'échantillonnage a été réalisé sur feuille à la fin de printemps parce que selon de nombreux auteurs, la concentration en virus est optimale à cette période de l'année. Cette approche d'échantillonnage est soutenue par plusieurs travaux : Walter et col.(1987) ; Sokhandan Bashir et col. (2007) ; Giribaldi et col. (2011); Sgherri et col. (2013), Lovato et col. (2014). Krebelj et ses collaborateurs (2015) ont pu démontrer que les meilleures

concentrations du virus sont obtenues dans les feuilles à la fin du printemps. En période hivernale, il est recommandé d'utiliser les sarments dormants (Martelli et Boudon-Padiou, 2006).

Les échantillons pris lors de la prospection ont été soumis à des tests sérologiques, vis à vis deux sera, l'un ne contenant que des anticorps monoclonaux Anti-GFLV (Agritest), le second contenant des anticorps anti-GFLV/ArMV. Les résultats obtenus montrent la présence du GFLV dans presque la totalité des vignobles prospectés.

Nous avons pu noter que certains échantillons ne réagissent qu'avec l'antisérum Anti-GFLV/ArMV, ce qui peut signifier qu'ils représentent des cas d'infection simple par l'ArMV, car ils n'ont pas réagi avec l'antisérum anti-GFLV. Martelli et Boudon-Padiou (2006), ont rapporté qu'une infection simple par l'ArMV est possible bien qu'elle reste moins fréquente par rapport l'infection mixte ou l'infection simple par GFLV. Les symptômes causés par l'ArMV sont les même que ceux causé par le GFLV (Anonyme, 2000a), ce qui montre la nécessité d'utiliser des anticorps monoclonaux pour confirmer les résultats obtenus.

Ces résultats confirment des travaux antérieurs portant sur la maladie du court noué en Algérie.

La première citation de la présence de la maladie en Algérie date de 1913, on y décrit l'état d'infestation des vignobles algériens par la maladie du court noué. Un rapport fut publié en 1951 sur l'état de l'Agriculture en Algérie et dans lequel l'auteur indique la présence de la maladie en se référant au symptôme du raccourcissement des entre-nœuds.

Boussalem (1981), a rapporté que la maladie du court noué dans les pépinières algéroises n'existe que dans des cas isolés.

Dans un rapport d'une inspection réalisée en Algérie, par Gallitelli et Martelli (1989), sur la maladie du court noué, ont montré que dans des plants infectés par le GFLV et ne montrant que les symptômes du court noué, un autre virus était présent. Le virus a été isolé plus tard en Italie et nommé GALV (Grapevine Algerian latent virus).

Haddadj et Haddou (1994), lors d'une étude de gamme d'hôte de la maladie du court noué, a pris comme source du GFLV un vignoble dans la région d'Isser, une région dont les échantillons ont réagi positivement au test sérologique dans notre étude.

Digiario et ses collaborateurs (1999) ont noté la place de l'Algérie parmi les grands pays viticole dans la région méditerranéenne, tout en notant qu'une importante partie de ses vignobles est sujette à des infections par des maladies dégénératives telles que le court noué, ce qui risque de la faire reculer dans le classement.

Une étude menée par Lekikot et col. (2012), sur les virus infectant les vignobles en Algérie en utilisant les tests biologique (indexage), sérologique (ELISA) et biomoléculaire (RT-PCR), a révélée qu'un tiers (33,3%) des vignobles est atteint par le GFLV. Les 24% de ces vignobles sont constitués de cépage importés, et 76% sont plantés de cépage multipliés localement. Des échantillons de porte-greffes ont également été testés et aucun n'était porteur d'aucun des virus testés [GFLV ; Grapevine fleck virus (GFkV) ; Grapevine virus A (GVA) ; Grapevine virus B (GVB) ; Grapevine leafroll associated virus 1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll associated virus 2 (GLRaV-2) et Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3)].

Notons par ailleurs que cette maladie est présente dans les pays du pourtour méditerranéen comme la Tunisie (Boulila ,2007), le Maroc (Vidal, 1953) l'Espagne ou selon Palomares-Rius et ses col. (2012), près de 30% des vignobles sont atteints. De plus même si la maladie du court noué (GFLV et l'ArMV) reste moins dispersée et que les dégâts occasionnés sont inférieurs par rapport la maladie de l'enroulement, elles commencent à s'étendre et à prendre de l'ampleur (Bianco ,2015).

Des études prospectives ont rapporté des résultats à propos des populations de nématodes dans les vignobles algériens, étant donné que le virus du GFLV est transmis par *Xiphinema index*, alors que celui de l'ArMV est véhiculé par *X. diversicaudatum*.

Ali et col., en 2014, notent que les publications algériennes en matière de nématologie comme parmi les plus pauvres de la région méditerranéenne, et que même le nombre d'espèces décrites reste très limité.

Sur la carte mondial des maladies et ravageurs des cultures réalisée en collaboration entre CABI et OEPP (2000b), on trouve que *X.index* est noté présent en l'Algérie, et plus récemment, dans sa base de données publiée en 2014, OEPP rapporte la présence de *X.index* en Algérie et en Tunisie.

En réalisant des études analytiques sur les sols transportés, Dalmaso et Cuany (1969) ont découvert des populations de nématodes, l'espèce *X.index*, fut citée.

Hoceini *et al.* (2011 puis 2014), ont rapporté la présence de *Xiphinema index* dans les vignobles de Sidi Belabbès et Tlemcen, deux wilayas prospectées lors de notre étude. Berrabah et ses collaborateurs (2014) ont insisté lors du 4ème Meeting International d'Aridoculture et Cultures Oasisennes sur l'importance du contrôle des sols infestés tout en rapportant des taux dangereux d'infestations de *X.index* qui ont été obtenu dans la région de Rouiba et Boumerdes.

Une étude de prospection des nématodes dans les vignobles algériens réalisée par Bounaceur et col. (2011) a signalé la présence de *X. index* dans des vignobles de Mascara, Oran et Chéelif. La présence de *X. index* dans la région de Mascara a été aussi rapportée par Kaddour (2013).

Lehman (1981) a indiqué la présence de *X.index* dans les plus grands pays viticole de la région méditerranéenne : la France, l'Italie, l'Espagne, Israël, la Grèce ; la Turquie et l'Algérie.

Ainsi donc ces travaux concernant la présence du vecteur du GFLV, le *X.index* confirment de manière indirecte la présence du virus du GFLV dans les régions prospectées notamment les wilayas d'Oran ; Sidi Belabbès ; Tlemcen ; Mascara et Boumerdes.

L'espèce *X.diversicaudatum*, seul vecteur de l'ArMV, n'a été citée présent en Algérie par aucune des publications consultées. Ali et ses collaborateurs (2014), rapportent que *X. diversicaudatum* est une espèce atlantique, et qu'elle ne figure pas parmi les espèces méditerranéennes.

III.2.3. La caractérisation biochimique :

Le test biochimique (SDS-PAGE) a servi comme outil aussi bien de confirmation des tests sérologique que de détermination du poids moléculaire de la protéine capsidique, puisqu'elle constitue plus que 90% de la taille des virions du GFLV et de l'ArMV. (Zarghani *et al.*, 2010)

Le gel obtenu contient 18 colonnes de bande protéiques, la première colonne représente les protéines marqueuses, la deuxième le témoin sain fourni avec le kit d'ELISA, et les autres colonnes sont réservées pour 16 échantillons choisis parmi les échantillons ayant réagi positivement aux tests sérologiques.

Dans la colonne des protéines marqueuses, un léger smearing est observé, Grabski et Burgess (2001), expliquent ce phénomène par une interaction entre les protéines et le gel en présence d'un excès de Bleu de Bromophénol.

Une bande est observée dans un certain nombre de colonne, mais pas dans le témoin sain, ce qui nous a permis de déduire son origine viral, la distance de migration de la bande a permis d'avoir un poids moléculaire de 55.559 Da, très proche de celui de la protéine capsidique du GFLV (56 Kd) et de l'ArMV (54 Kd). Ces résultats viennent confirmer ceux obtenus par des études antérieures, Serghini et ses collaborateurs (1990) ; Demangeat et ses collaborateurs (2001) ; Wetzel et ses collaborateurs (2002) ; Amari et ses collaborateurs (2010) ; Schellenberger et ses collaborateurs (2010) et Terlizzi et ses collaborateurs (2015).

Conclusion

& perspectives

Conclusion et perspectives :

Au terme de ce travail mené sur l'identification des virus impliqués dans la maladie du court noué de la vigne par des critères sérologiques et biochimique, nous pouvons dire que :

Tous les vignobles prospectés, quel que soit la wilaya et quel que soit le cépage, porte le signe d'une infection par les virus impliqués dans le syndrome du court noué. Nos observations ont été corroborées par les résultats des tests sérologiques, et de la migration électrophorétique.

Ainsi, près de 47% des échantillons prélevés ont répondu positivement vis-à-vis du premier antisérum (Anti-GFLV), et 45% avec le deuxième (Anti-GFLV/ArMV)

Par Wilaya, plus de la moitié des échantillons prélevés des wilayas d'Oran et de Boumerdès sont porteur d'au moins un des deux virus du court noué, GFLV ou l'ArMV, et près de la moitié des échantillons des wilaya de Mascara, Mostaganem et Relizane sont porteurs d'un de ces virus.

Les cépages Alphonse lavallée et Aneb El Kadi sont les plus affectés par la maladie du court noué (en se référant au nombre d'échantillons prélevés), Ahmar de Mascara, Sabel et le Dattier de Beyrouth ont des fréquences d'infection supérieures à la moitié, alors que les autres cépages présentent des fréquences inférieure à 50%.

La différence entre les fréquences d'infection entre les deux tests ELISA, est expliquée soit par les faux positifs/négatifs, soit par la présence d'infection simple qui cause la réaction positive avec un sérum et négatif avec l'autre.

La caractérisation biochimique a permis de déterminer le poids moléculaire de la protéine capsidique du virus causal de la maladie du court noué, le poids moléculaire obtenu (55,56 Kda) et proche de celui de la CP du GFLV (56 Kda) et de la CP de l'ArMV (54 Kda).

Nous pouvons donc conclure que les résultats obtenus lors de notre étude sur la maladie du court noué en Algérie sont en concordance avec les travaux antérieurs concernant la présence de la maladie, et que nous avons tout au moins pour le GFLV

déterminé la taille de la protéine capsidique ce qui confirme les résultats du test sérologique.

Enfin il est important de poursuivre ce travail pour confirmer et mieux exploiter les résultats obtenus par :

- Utiliser des sérums monoclonaux anti-ArMV pour confirmer la présence du virus de la mosaïque de l'arabette en Algérie.
- L'analyse des échantillons par des techniques plus précises telles le Western-Blot ou encore la RT-PCR.
- Effectuer des échantillonnages plus précis et sur des vignobles de l'Est et du Sud tout en utilisant des méthodes statistiques vu que la maladie est mal étudiée en Algérie.
- Réaliser des prises de sol pour chercher les espèces vectrices.
- Réaliser des études de résistance variétale en utilisant des cépages autochtones.
- Et enfin de réfléchir avec les concernés à la mise en place de méthodes de lutte pour mieux protéger le vignoble national..

Références

Bibliographiques

Les références bibliographiques

1. Aballay E.; Prodan S.; Mårtensson A. and Persson P., 2012. Assessment of rhizobacteria from grapevine for their suppressive effect on the parasitic nematode *Xiphinema index*. *Crop Protection* vol.42. Pp. :36-41.
2. Adekunle O. K.; Kulshrestha S.; Prasad R.; Hallan V.; Raikhy G.; Verma N.; Rama R.; Kumara S. and Zaidi A.A., 2006. Plant parasitic and vector nematodes associated with Asiatic and Oriental hybrid lilies. *Bioresource Technology* Vol. 97, no. 3. Pp.: 364–371.
3. Agrios G., 2005. *Plant pathology: 5th ed.* Elsevier, California, USA.
4. Amborabé B.E.; Fleurat-Lessard P.; Bonmort J.; Roustan J.P. and Roblin G., 2001. Effects of eutypine, a toxin from *Eutypa lata*, on plant cell plasma membrane: Possible subsequent implication in disease development *Plant Physiology and Biochemistry*, vol.39, n°1. Pp: 51–58.
5. Ali N.; Chapuis E.; Tavoillot J. and Mateille T., 2014. Plant-parasitic nematodes associated with olive tree (*Olea europaea* L.) with a focus on the Mediterranean Basin: A review. *Comptes Rendus Biologies*, vol.337, no7–8. Pp.: 423–442
6. Almeida, R. P. P., Daane, K. M., Bell, V. A., Blaisdell, G. K., Cooper, M. L., Herrbach, E., 2013. Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology*, vol.4, article 94.
7. Amari K.; Boutant E.; Hofmann C.; Schmitt-Keichinger C.; Fernandez-Calvino L.; Didier P.; Lerich A.; Mutterer J.; Thomas C. L.; Heinlein M.; Mély Y.; Maule A. J. and Ritzenthaler C., 2010. A Family of Plasmodesmal Proteins with Receptor-Like Properties for Plant Viral Movement Proteins. *Plos pathogen*, vol. 6, no.9. Pp. : 1-10.
8. Andret-Link P.; Laporte C.; Valat L.; Ritzenthaler C.; Demangeat G.; Vigne, E.; Laval V. Pfeiffer P. ; Stussi-Garaud C. and Fuchs M., 2004a. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant Pathol.* 86, 183–195.
9. Andret-Link P.; Schmitt-Keichinger C.; Demangeat G.; Komar V. and Fuchs M., 2004b. The specific transmission of Grapevine fanleaf virus by its nematode vector

Xiphinema index is solely determined by the viral coat protein. Virology 320. Pp : 12–22.

10. Anonyme , 1913. Court-noue et deperissement des vignes meridionales. — Bullet, agr. Alg. Tun. <https://archive.org/details/PublicationsDuDrL.Trabut>

11. Anonyme, 1951. Rapport du conseil de l'expérimentation et des recherches agronomique en Algérie pour 1950-1951, 121 pp.
<https://gd.eppo.int/taxon/GFLV00/distribution/DZ>

12. Anonyme, 2000a. Data Sheets on Quarantine Pests: Arabis mosaic nepovirus. OEPP and CABI. 5p.

13. Anonyme, 2000b. *Xiphinema index*. Distribution Maps of Plant Diseases, Map No. 819. CABI/EPPO Wallingford, UK: CAB International.
<http://www.cabi.org/isc/abstract/20066500819>

14. Anonyme, 2008. Certification sanitaire de variétés et de porte-greffe de vigne : schémas pour la production de végétaux sains destinés à la plantation. OEPP. 10p.

15. Anonyme, 2012. Food and agriculture organization of the United Nations: Statistics Division.

16. Anonyme, 2014. PQR database. EPPO, Paris, France.
<http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>

17. Askary T.H.; Banday S.A; Iqbal U; Ali Khan A; Mir M.M; and. Shah Waliullah M.I., 2012. Plant Parasitic Nematode Diversity in Pome, Stone and Nut Fruits. In: Agroecology and Strategies for Climate Change, Sustainable agricultural review 8, Lichtfouse E. (Ed.). Springer Science+Business Media B.V. Pp.: 337-368.

18. Audeguin L. ; Boidron R. ; Bloy P. ; Grenan S. ; Leclair P. et Boursiquot J.M., 2000. L'expérimentation des clones de vigne en France Etat des lieux, méthodologie et perspectives. Revue Française d'œnologie, N° 184. Pp. : 8-11.

19. Bagewadi B., 2014. Plant Virus Control by Post-Transcriptional Gene Silencing. In: van Alfen Neal K., Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. Elsevier, USA. Pp.: 472–488.

20. Belhout M.T., 1990. Le secteur viticole et vinicole en Algérie: marche" interne et commerce international. Médit N° 1/90. Pp: 33-36.

21. Bell V. A.; Bonfiglioli R. G. E.; Walker J. T. S. Lo P. L.; Mackay J. F. and McGregor S. E., 2009. Grapevine leafroll-associated virus 3 persistence in *Vitis vinifera* remnant roots. *Journal of Plant Pathology*, vol. 91. Pp. :527–533.

22. Benchiha A.K., 1976. Contribution à l'étude des nématodes (*Xiphinema* COBB, 1913) vecteurs de la dégénérescence infectieuse de la vigne dans la région de Mostaganem. Mémoire d'ingénieur. INA, El Harrach.

23. Beneddra A.T., 1978. Méthodes d'identification et méthodes de lutte du virus du Court-Noué de la vigne. Mémoire d'ingénieur. INA, El Harrach .

24. Benfreha-Zemouli F., 1983. Revue critique des méthodes d'étude des modifications ultrastructurales entraînées par les virus de la vigne. Mémoire d'ingénieur. INA, El Harrach.

25. Bensafir Bouziane Z., 2008. La viticulture dans la région d'Aïn Témouchent : les conditions d'une tentative de résurgence. *Insanyat*, N° 39-40. Pp. 105-121.

26. Berrabah D., Hammache M., Hoceni F, 2014. Etude de la diversité des nématodes phytophage de cultures maraichères et l'effet de rotation sur leur développement dans le nord de l'Algérie. *Revue des Régions Arides - Numéro Spécial – no.35 : Actes du 4ème Meeting International Aridoculture et Cultures Oasisennes : Gestion des ressources et applications biotechnologiques en aridoculture et cultures sahariennes, perspectives pour un développement durable des zones arides*, 17-19/12/2013. Pp. : 1851-1860.

27. Bianco P. A., 2015. Virus Diseases: Summary of the answers from interviewed scientists and professionals. In Carlo De Biasi (Ed.), *Synthèses de la Consultation Mondiale Maladies Viticoles en Impasse – Paris*.

28. Bileva T.; Choleva B.; Hockland S. and Ciancio A., 2009. Management of virus-transmitting nematodes with special emphasis on South-East Europe. In: A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.), *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes*. Springer Science+Business Media B.V. pp.:215-242.

29. Bol J. F., Role of Capsid Proteins 2008. In: Plant Virology Protocols From Viral Sequence to Protein Function. 2nd ed., Foster G.D.; Johansen E.; Hong Y. and Nagy P. D.(Eds.). Humana Press, USA. Pp. : 21-32.

30. Bos L., 1969. Experiences with a collection of plant viruses in leaf material dried and stored over calcium chloride and a discussion of literature on virus preservation. *Meded, Rijksfac. Landbwet. Gent* 34. Pp.:875-887.

31. Boso S.; Alonso-Villaverde V.; Gago P.; Santiago J.L. and Martínez M.C., 2014. Susceptibility to downy mildew (*Plasmopara viticola*) of different *Vitis* varieties. *Crop Protection*, Vol. 63, pp.: 26-35

32. Boulila M., 2007. Phylogeny and genetic recombination of Grapevine fanleaf virus isolates from naturally infected vineyards in Tunisia. *Phytopathol. Mediterr.* Vol. 46. Pp. :285–294.

33. Bounaceur F. ; Safiddine F., Abedelli M. ; Nebih-Hadj Saddok D. ; and Bissaad F.Z., 2011. Contribution to the knowledge of nematodes genera in northern vineyards of Algeria. *Annals of Biological Research*, vol.2, no.3. Pp. : 297-306.

34. Boussalem M., 1981. Contribution à l'étude du court-Noué dans les pépinières de l'Algérois. Mémoire d'ingénieur. INA, El Harrach.

35. Buchholz U.; Schmidt S. and Schruft G.,1994. The use of an immunological technique in order to evaluate the predation on *Eupoecilia ambiguella* (hbn.) (Lepidoptera: Cochylidae) in vineyards. *Biochemical Systematics and Ecology*, Vol.22, N°7, pp.: 671-677.

36. Buckel I.; Molitor D.; Liermann J.C.; Sandjo L.P.; Berkelmann-Löhnertz B.; Opatz T. and Thines E., 2013. Phytotoxic dioxolanone-type secondary metabolites from *Guignardia bidwellii*. *Phytochemistry* 89. Pp.:96–103

37. Burger P.; Bouquet A.; and Striem M.J., 2009. Grape Breeding. In: Jain S.M., Priyadarshan P.M. (eds.), *Breeding Plantation Tree Crops: Tropical Species*, pp.: 161-189.

38.Buzkan N.; Kocsis L. and Walker M.A., 2005. Detection of *Xylella fastidiosa* from resistant and susceptible grapevine by tissue sectioning and membrane entrapment immunofluorescence. *Microbiological Research*, Vol.160, N°3, pp.: 225-231.

39.Cadet P. and Albergel J., 1999. Passive transport of phytoparasitic nematodes by runoff water in the Sudano-Sahelian climatic area. *Journal of hydrology* 214. Pp.: 91–102.

40.Chieka M.; Junji S.; Kazuya T.; Miki A.; Yoshiaki N., 2006. Estimation of the hydrophobicity of 2,4-diphenyl-1,3-oxazoline analogs and QSAR analysis of their ovicidal activity against *Tetranychus urticae*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Vol. 16, N°. 15, pp.: 4080-4084.

41.Cillo F. and Palukaitis P., 2014. Transgenic Resistance. In: Maramorosch K. and Mettenleiter T. C., *Advances in Virus Research*, vol. 90. Elsevier, UK. Pp.:35–146.

42.Coetzee B.; Freeborough M.J.; Maree H.J.; Celton J.M.; Rees D.J.G.and Burger J.T., 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, Vol. 400, pp.:157–163.

43.Constable F. and Rodoni B., 2011. Grapevine leafroll –associated viruses. *Grapevine leafroll – associated viruses Fact Sheet*, July 2011.

44.Cooper J. I., 1975. Some Non-rosaceous Trees and Shrubs as Hosts to Nematode-borne Viruses. In: *Nematode vectors of plant viruses*. Lamberti F.; Taylor C. E. and Seinhorst J. W. (Eds). Plenum Press, London. Pp.:277-278

45.Cousin M.T. ; Boudon-Padieu E, 2002. Phytoplasmes et phytoplasmoses : vecteurs, méthodes de lutte et thèmes de recherche. *Cahiers Agricultures*. Vol. 11, N° 2, 115-26.

46.Crozzoli R., 2009. Nematodes of Tropical Fruit crops in Venezuela. In: *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes*, Ciancio A. and Mukerji K.G. (Eds.). Springer Science+Business Media B.V. Pp: 63-84.

47. Daijasso A. 1975. Cytogenetics and Reproduction in *Xiphinema* and *Longidorus*. In: Nematode vectors of plant viruses. Lamberti F.; Taylor C. E. and Seinhorst J. W. (Eds.). Plenum Press, London. 139-152.

48. Dalmasso A. et Cuany A., 1969. Importance de la transmission par le sol de la dégénérescence infectieuse de la vigne dans l'Algérois. Plant Protection Bulletin FAO, vol.17. Pp. :58-60.

49. Das S. and Raski D.J., 1969. Vector-Efficiency of *Xiphinema Index* in the Transmission of Grapevine Fanleaf Virus. Nematologica, Volume 14, Issue 1,

50. De Wijs J. J. and Suda-Bachmann F., 1979. The long-term preservation of potato virus Y and watermelon mosaic virus in liquid nitrogen in comparison to other preservation methods. *Neth. J. Pl. Path.*, vol.85. Pp. : 23-29.

51. Debieu D.; Corio-Costet M.F.; Steva H.; Malosse C. and Leroux P, 1995. Sterol composition of the vine powdery mildew fungus, *Uncinula necator*: comparison of triadimenol-sensitive and resistant strains. *Phytochemistry*, Vol. 39, No. 2. Pp.: 293-300.

52. Délye C. and Corio-Costet M.-F., 1998. Origin of primary infections of grape by *Uncinula necator* : RAPD analysis discriminates two biotypes. *Mycol. Res.* vol.102, no 3. Pp.:283-288.

53. Demangeat G. ; Esmenjaud D. et Voisin R., 2005a. Court-noué de la vigne survie de *Xiphinema index* et rétention. *Le vigneron champenois*, no11 . Pp. : 44-52.

54. Demangeat, G., Voisini, R., Minot, J.C., Bosselut, N., Fuchs, M. and Esmenjaud, D., 2005b. Survival of *Xiphinema index* in vineyard soil and retentions of grapevine fanleaf virus over extended time in the absence of host plants. *Phytopathology*, vol.95. Pp. : 1151–1156.

55. Demangeat G. ; Komar V. ; Cornuet P. ; Esmenjaud D. and Fuchs M., 2001. Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single *Xiphinema index* nematode vector. *Journal of Virological Methods*, vol.122, no.1. Pp. : 79-86.

56. Demangeat G., 2007. Nepovirus: transmission by longidorid nematodes. *Virologie*. Vol.11, N°4. Pp.: 309-330.

57. Demangeat G.; Komar V.; Cornuet P.; Esmenjaud D.; Fuchs M., 2004. Sensitive and reliable detection of grapevine fanleaf virus in a single *Xiphinema index* nematode vector. *Journal of Virological Methods*, Vol. 122, N°. 1, pp.: 79-86.

58. Dias H.F. and Harrison B.D., 1963. The relationship between grapevine fanleaf, grapevine yellow mosaic and arabis mosaic viruses. *Ann. appl. Virol.* Vol 51. Pp : 97-105.

59. 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, Série B*, no.29. Pp.: 83- 92.

60. Dijkstra J. and de Jager C.P., 1998. *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*. Springer, Berlin. Pp. :200-201.

61. Duncan L.W., 2009. Managing nematodes in Citrus orchards. In: A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.), *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes*. Springer Science+Business Media B.V. pp.: 135-173.

62. Dunez J. and Le Gall O., 2011. Comoviridae : Nepovirus. In : *The Springer Index of Viruses*. Tidona C. and Darai G. (eds.). Springer, New York. Pp. : 361-370.

63. Ebel R.; Schnabel A.; Reustle G.M.; Krczal G. and Wetzal T., 2003. Complete nucleotide sequence of an isolate of the nepovirus raspberry ringspot virus from grapevine. *Virus Research*, Vol.97, no 2, Pp.:141–144.

64. El-Borai F. E. and Duncan L. W., 2005. Nematode Parasites of Subtropical and Tropical Fruit Tree Crops. In: *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. 2nd ed. Luc M. ; Sikora R. A. and Bridge J. (Eds.). CABI Publishing, UK. Pp.:467-492.

65. Engel E. A. ; Escobara P. F. ; Rojas L. A. ; Rivera P. A. ; Fiorec N. ; Pablo D.T. Valenzuela P.D.T., 2010. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods*, N°163, pp:445–451.

66. Esmenjaud D. and Bouquet A., 2009. Selection and application of resistant germplasm for grapevine nematodes management. In: A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.), *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes*. Springer Science+Business Media B.V. pp.: 195-214.

67. Fritscha C.; Mayo M. and Hemmer O., 1993. Properties of the satellite RNA of nepoviruses. *Biochimie* 75. Pp.: 561-567.

68. Fuchs M., 2008. Les plantes transgéniques et la lutte contre les virus phytopathogènes : état de l'art et perspectives. *Virologie*. Volume 12, Numéro 1, 27-37, janvier-février 2008.

69. Galet P., 2001 ; *Précis de viticulture*. 7ème éd, Deham, Montpellier, 561p.

70. Gallitelli D. Martelli G.P. and Di Franco A, 1989. Grapevine Algerian latent virus, a newly recognized Tombusvirus. *Phytoparasitica*, vol. 17. Pp.: 61-62.

71. Gambino G., Angelini E. and Gribaudo I., 2010. Field Assessment and Diagnostic Methods for Detection of Grapevine Viruses. In: S. Delrot et al. (eds.), *Methodologies and Results in Grapevine Research*. Springer Science+Business Media B.V. Pp.: 211-228.

72. Gambino G.; Gribaudo I.; Leopold S.; Scharl A. and Laimer M., 2005. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes I. *Plant Cell Rep Vol.24*. Pp. : 655–662.

73. Gao M.; Wang Q. Wan R.; Fei Z. and Wang X, 2012. Identification of genes differentially expressed in grapevine associated with resistance to *Elsinoe ampelina* through suppressive subtraction hybridization. *Plant Physiology and Biochemistry* 58. Pp.:253-268.

74. Gherbi H., 1990. Application de quelques méthodes de diagnostic entrant dans le cadre de la sélection sanitaire de la vigne. *Mémoire d'ingénieur*. INA, El Harrach.

75. Giribaldi M. ; Purrotti M. ; Pacifico D. ; Santini D. ; Mannini F. ; Caciagli P. ; Rolle L. ; Cavallarin L. ; Giuffrida M.G. and Marzachi C., 2011. A multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical performance and

berry quality of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. Journal of Proteomics, vol.75, no 1. Pp. : 306-315.

76.Grabski A. C. and Burgess R. R., 2001. Preparation of protein samples for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: procedures and tips. InNovation, vol.13. Pp. : 10-12.

77.Granett J.;Walker M.A.; Kocsis L.and Omer A.D., 2001. Biology and management of grape phylloxera. Annual Review of Entomology, pp:387-412.

78.Guesdon J. L.; Ternynck, T. and Avrameas S., 1979. The use of avidin-biotin interaction of immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, vol.27. Pp.:1137-1139.

79.Haddadj S. et Haddou, I., 1994. Application de quelques techniques pour la détection et recherche d'une gamme d'hotes des maladies virales de la vigne. Mémoire d'ingénieur. INA, El Harrach.

80.Haenni A. L. and Dreher T.W., 2008. Tymoviruses. In: Mahy B. W. J. and Van Regenmortel M.H.V. (Eds.), General encyclopedia of fungal and plant virology, 2010, pp.:360-367

81.Hajizadeh M.; Navarro B.; N. Sokhandan Bashir.; Torchetti E.M. and Di Serio F., 2012. Development and validation of a multiplex RT-PCR method for the simultaneous detection of five grapevine viroids. Journal of Virological Methods, Vol.179, pp.: 62– 69.

82.Hans F.; Pinck M. and Pinck L., 1993. Location of the replication determinants of the satellite RNA associated with grapevine fanleaf nepovirus (strain F13). Biochimie 75. Pp.:597-603.

83.Harries P.A. and Nelson R.S., 2010. Movement of Viruses in Plants. In: Mahy B. W. J. and Van Regenmortel M.H.V. (Eds.), General encyclopedia of fungal and plant virology, 2010. Pp.: 235-243.

84.Helder J.; Vervoort M.; Van Megen H.; Rybarczyk-Mydlowska K.; Quist C; Smant G. and Bakker J., 2015. In: Principles of Plant-Microbe Interactions: Microbes for Sustainable Agriculture. Lugtenberg B. (Ed). Springer, Netherland. Pp.: 91-102.

85.Hewitt W.B., 1950. Fanleaf - Another vine disease found in California. The Bulletin, Department of Agriculture, State of California 39, 62-63

86.Hewitt W.B.; Raski, D.J. and Goheen A.C., 1958. Nematode vector of soilborne fan-leaf virus of grapevines. Phytopathology 48, 586–595.

87.Hoceini F. ; Bounaceur F. ; Berrabah D. ; Hoceini A. ; Doumandji-Mitiche B. ; Nebih D., 2014. Diversité et structure trophique des nématodes dans quelques zones viticoles en Algérie. AFPP, Dixième conférence internationale sur les ravageurs en agriculture. Montpellier, 22 et 23 octobre 2014.

88.Hu G.J.; Hong N.; Wang L.P.; Hu H.J. and Wang G.P., 2012. Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. Crop Protection, vol.37. Pp.: 20–25.

89.Hübschen J.; Kling K.; Ipach U.; Zinkernagel V.; Bosselut N.; Esmenjoud D.; Brown D.J.F. and Neilson R., 2004. Validation of the specificity and sensitivity of species-specific primers that provide a reliable molecular diagnostic for *Xiphinema diversicaudatum*, *X. index* and *X. vuittenezi*. European Journal of Plant Pathology vol.110. Pp.: 779–788.

90.Huglin P et Schneider T, 1998. Biologie et écologie de la vigne. Ed. Laryot. Lausanne. 370p.

91.Hugo H.J. and Malan A.P., 2010. Occurrence and Control of Plant-parasitic Nematodes in Irrigation Water – A Review. S. Afr. J. Enol. Vitic., Vol. 31, No. 2. Pp.: 169-180.

92.Hull R., 2014. Plant virology. 5th ed. Elsvier, Chennai, India.

93.Hyun-Na K.; Jeong-Jin A.; Sang-EunP.; Ju-IlK. and Gil-Hah K., 2014. Regional susceptibilities to 12 insecticides of melon and cotton aphid, *Aphis gossypii*

(Hemiptera: Aphididae) and a point mutation associated with imidacloprid resistance. *Crop Protection*, Vol.55, pp.: 91-97

94. Imache A. ; Hartani T. ; Bouarfa S. et Kuper M., 2011. La Mitidja vingt ans après : Réalités agricoles aux portes d'Alger. Ed. Quae, Versailles. 290 p.

95. Jackson R. S., 2014. *Wine Science: principles and Applications*, 4th ed. Elsevier, USA.

96. Jarugula S.; Gowda S.; Dawson W.O. and Naidu R.A., 2011. 3'-coterminal subgenomic RNAs and putative cis-acting elements of Grapevine leafroll-associated virus 3 reveals 'unique' features of gene expression strategy in the genus *Ampelovirus*. *Virology Journal* 2010, 7:180.

97. Jellali M.H., 1996. Contribution à l'amélioration des techniques de dépistage et d'assainissement "in vitro" des viroses de la vigne en Tunisie. Mémoire de magister. INA, Al Harrach.

98. Journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire du 25 janvier 2005. Arrêté du 17 Safar 1425 correspondant au 7 avril 2004 modifiant et complétant l'arrêté du 21 Dhou El Hidja 1415 correspondant au 21 mai 1995 fixant les normes phytotechniques et phytosanitaires à l'importation des semences et plants des espèces maraîchères, arboricoles, viticoles et des grandes cultures.

99. Kaddour M., 2013. *Xiphinema index*. Journées Scientifiques : Les sciences de la nature et de la vie au service du développement durable, 24-25 Avril 2013, Université de Mascara.

100. Kranz J., 2003. *Comparative Epidemiology of Plant Diseases*. Springer, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 206 p.

101. Krebelj A.J.; Čepin U.; Ravnikar M. and Novak M.P., 2015. Spatio-temporal distribution of Grapevine fanleaf virus (GFLV) in grapevine. *Eur J Plant Pathol.*, vol.142, no.1. Pp.:159-171.

- 102.** Labdelli F., 1989. Contribution à l'inventaire des nématodes phytophages sur vigne et figuier en pépinière à Khemis El Khechna et en plein champ. Mémoire d'ingénieur. INA, El Harrach
- 103.** Laemmli U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680 – 685.
- 104.** Laemmli U.K. and Fabre M., 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 80, 599-575.
- 105.** Lahogue F. et Boulard G., 1996. Recherche de gènes de résistance naturelle à deux viroses de la vigne : le court-noué et l'enroulement. *Vitis*, vol. 35 no.1. Pp. : 43-48.
- 106.** Lamprecht R. L.; Hans J. M.; Dirk S. and Johan T.B., 2012. Complete nucleotide sequence of a South African isolate of Grapevine fanleaf virus. *Virus Genes*, Vol. 45, no 2. Pp.: 406-410
- 107.** Lamprecht R.L.; Spaltman M.; Dirk S.; Wetzel T. and Burger J.T., 2013. Complete Nucleotide Sequence of a South African Isolate of Grapevine Fanleaf Virus and Its Associated Satellite RNA. *Viruses*, vol.5, no7. Pp.: 815-1823.
- 108.** Lee D.L., 2002. Life Cycles. In: *The biology of nematodes*. Lee D.L (Ed.). Taylor and Francis, London. Pp.: 141-161.
- 109.** Lehman P. S.; 1981. Three species of dagger nematodes pathogenic to citrus. *Nematology Circular*, no.81. Pp. : 1-2.
- 110.** Lekikot K. ; Elbeaino T. ; Ghezli C. and Digiario M., 2012. Preliminary Survey of Grapevine Viruses in Algeria. *Proceedings of the 17th Congress of ICVG*, Davis, California, USA October 7–14, 2012. Pp. :194-195.
- 111.** Liebenberg A.; Freeborough M.J.; Visser C.J.; Bellstedt D. U. and Burger J.T., 2009. Genetic variability within the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus isolates from South Africa and the evaluation of RT-PCR, DAS-ELISA and ImmunoStrips as virus diagnostic assays. *Virus Research*, vol.142. Pp. : 28–35

112. Lovato A.; Faoro F.; Gambino G.; Maffi D.; Bracale M.; Polverari A. and Santi L.,2014. Construction of a synthetic infectious cDNA clone of Grapevine Algerian latent virus (GALV-Nf) and its biological activity in *Nicotiana benthamiana* and grapevine plants. *Virology Journal*, vol.11, no.186. Pp.: 1-15.

113. Maghuly F. ; Leopold S. ; Machado A.C.; Fernandez E.B.; Ali Khan M.; Gambino G.; · Gribaudo I. ; Schartl A. and Laimer A., 2006. Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes II. *Plant Cell Rep.* Vol.25. Pp. : 546–553.

114. Magunacelaya J. C., 2009. Concepts in Management of Tree Crops Nematodes in Fruit Production Systems. In: *Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes*, Ciancio A. and Mukerji K.G. (Eds.). Springer Science+Business Media B.V. Pp: 85-100.

115. Maixner M., 1994. Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* 1994 ; 33 : 103-14.

116. Malherbe S.; Marais D., 2015. Nematode community profiling as a soil biology monitoring tool in support of sustainable tomato production: A case study from South Africa. *Applied Soil Ecology*, vol.93. Pp.:19–27

117. Maliogka V. I. ; Martelli G. P.; Fuchs M. and Katis N. I., 2015. Control of Viruses Infecting Grapevine. In: Maramorosch K. and Mettenleiter T.C. (Eds), *Advances in Virus Research*, Vol. 91. Pp:175–227.

118. Mandahar C. L., 2006. *Multiplication of RNA Plant Viruses*. Springer, Netherlands. 353p.

119. Mani M.; Shivaraju C. and Kulkarni N.S., 2014. *The Grape Entomology*. Springer India. 222p.

120. Marshall D.B. and Lester P.J., 2001. The Transfer of *Typhlodromus pyri* on Grape Leaves for Biological Control of *Panonychus ulmi* (Acari: Phytoseiidae, Tetranychidae) in Vineyards in Ontario, Canada. *Biological Control*, Vol. 20, N°. 3, pp.: 228-235.

- 121.** Martelli G. P., 2010. Virus Diseases of Grapevine. John Wiley & Sons.
- 122.** Martelli G.P. and Boudon-Padiou E., 2006. Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-like diseases of grapevine: bibliographic report 1998-2004. Options méditerranéennes, série B, no.55. 280p.
- 123.** Martelli G.P. and Gallitelli D., 2008. Emerging and Reemerging Virus Diseases of Plants. In: Mahy B. W. J. and Van Regenmortel M.H.V. (Eds.), General encyclopedia of fungal and plant virology, 2010, pp.: 412- 418
- 124.** Martelli G.P. and Taylor C.E., 1990. Distribution of viruses and their nematode vectors. In Advances in disease vector research, Harris K. (ed.). Springer, New York, USA. Pp : 164-186.
- 125.** Martelli G.P. and Uyemoto J.K., 2008. Plant Virus Diseases: Fruit Trees and Grapevine. In: Mahy B.W.J. and Van Regenmortel M.H.V. (Eds.), General encyclopedia of fungal and plant virology, 2010, pp.: 201-207.
- 126.** Mauro M.C.; Toutain S.; Walter B.; Pinck L.; Otten L.; Coutos-Thevenot P., Deloire A. and Barbier P., 1995. High efficiency regeneration of grapevine plants transformed with the GFLV coat protein gene. Plant Science, vol.112, no.1. Pp.: 97–106.
- 127.** Mekuria T. ; Gutha L.R. ; Martin R.R. and Naid R.A., 2009. Grapevine fanleaf disease in Washington State vineyards. Washington Association of Wine Grape Growers Annual Meeting.
- 128.** Mervat A.A., Samaa M. Shawky, Ghada S. Shaker, 2012. Comparative efficacy of some bioagents, plant oil and plant aqueous extracts in controlling *Meloidogyne incognita* on growth and yield of grapevines. Annals of Agricultural Sciences, Vol. 57, N°. 1, pp.:7-18.
- 129.** Morsli D., 1995. Evaluation sanitaire du vignoble et identification par voie biologique et sérologique d'un isolat du court-noué à partir d'une variété autochtone. Mémoire de magister. INA, El Harrach

130. Murant A. F.; Jones A.T.; Martelli G. P. and Stace-Smith R., 1996. Nepoviruses: general Properties, diseases, and virus identification. In: The plant viruses, volume 5: polyhedral virions and bipartite RNA genomes. Harrison B. D. and Murant A.F. (Eds). Springer Science+Business Media, LLC, USA. Pp.: 99-138.

131. Myoung R.C; Jong-Ho L.; Sung-Wook J.; Taek J. K.; Hyeong H.K.; Chang Y.Y. and Seung-Joon A., 2013. Occurrence and distribution of the grape rust mite *Calepitrimerus vitis* (Nalepa, 1905) in Korea. Journal of Asia-Pacific Entomology, Vol. 16, N°. 4, pp.: 415-419.

132. Narayanasamy P., 2011. Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis: Vol. 2, Bacterial and Phytoplasmal Pathogens,. Springer Science+Business Media B.V.

133. Nölke G.; Cobanov P.; Uhde-Holzem K.; Reustle G.; Fischer R. and Schillberg S., 2009. *Grapevine fanleaf virus* (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and Arabis mosaic virus (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*. Molecular plant pathology, vol.10 no 1. Pp.: 41-49.

134. Otten L.; Burr T. and Szegedi E., 2008. Agrobacterium: a disease causing bacterium. In : Tzifira T. and Citovsky V. (eds.), Agrobacterium from biology to biotechnology. Springer, pp.: 1-46.

135. Palomares-Rius J.E.; Gutiérrez-Gutiérrez C.; Cantalapiedra-Navarrete C., and Castillo P., 2012. Prevalence and diversity of Grapevine fanleaf virus in southern Spain. Plant Pathology, vol.61, no.6. Pp. : 1032–1042.

136. Panattoni A. and Triolo E., 2010. Susceptibility of grapevine viruses to thermotherapy on in vitro collection of Kober 5BB. Scientia Horticulturae, vol.125. Pp.: 63–67

137. Panattoni A. ; Luvisi A. and Triolo E., 2013. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. Spanish Journal of Agricultural Research, vol.11, no.1. Pp. : 173-188.

- 138.** Perazzolli M.; Dagostin S.; Ferrari A.; Elad Y. and Pertot I., 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control* 47. Pp.: 228–234
- 139.** Pertota I. ; Gobbina D.; De Lucaa F. and Prodorutti D., 2008. Methods of assessing the incidence of *Armillaria* root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial–temporal pattern in northern Italy. *Crop Protection* 27. Pp.:1061–1070
- 140.** Pierron R. J.G. ; Pages M. ; Couderc C. ; Compant S. ; Jacques A. and Violleau F., 2015. In vitro and in planta fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. *Scientia Horticulturae*, vol.189. Pp.:184–191.
- 141.** Pitcher R. S., 1975. Factors influencing the Movement of Nematodes in Soil. In: *Nematode vectors of plant viruses*. Lamberti F.; Taylor C. E. and Seinhorst J. W. (Eds). Plenum Press, London. Pp: 389-408.
- 142.** Powell K.S; Cooper P. D. and Forneck A., 2013. Chapter Four - The Biology, Physiology and Host–Plant Interactions of Grape Phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*. *Advances in Insect Physiology*, Vol.45, pp.: 159-218.
- 143.** Prince S.G. and Nesbitt M., 2005. *The cultural history of plants*. Ed. Routledge, London, Great Britain.
- 144.** Raski D.J. ; Goheen A.C. ; Lider L.A. and Meredith C.P., 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease* 67, 335–337.
- 145.** Ravichandra N.G., 2014. *Horticultural Nematology*. Springer India. 434p.
- 146.** Ritzenthaler C.; Viry M.; Pinck M.; Margis R.; Fuchs M. and L. Pinck, 1991. Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology* 72. Pp.: 2357–2365.
- 147.** Robinson L., 1986. *Atlas des Vins du monde*. Ed. Larousse, 1212p.

- 148.** Rowhani A.; Uyemoto J.K. and Golino D.A., 1997. A Comparison Between Serological and Biological Assays in Detecting Grapevine Leafroll Associated Viruses. *Plant Disease*, Vol. 81, N° 7.
- 149.** Ryoji N.; Koji I; Hideo N.; Katsura K.; Hiromichi N.; Jun I. and Masaaki N., 2008. Detection of viruses associated with rugose wood in Japanese grapevines and analysis of genomic variability of Rupestris stem pitting-associated virus. *J. Gen. Plant Pathol.*, Vol.74, pp.:156–163.
- 150.** Sanfaçon H., 2008. Nepovirus. *In* : Encyclopedia of Virology 3rd ed, Mahy B.W.J. and van Regenmortel M.H.V. Elsevier Ltd. Pp.: 405–413.
- 151.** Sanfaçon H., 2010. Nepovirus. *In*: Mahy B. W. J. and Van Regenmortel M.H.V. (Eds.), General encyclopedia of fungal and plant virology, 2010. Pp.: 235-243.
- 152.** Sasanelli N., 2009. Olive nematodes and their control. *In*: A. Ciancio & K. G. Mukerji (eds.), Integrated Management of Fruit Crops and Forest Nematodes. Springer Science+Business Media B.V. pp.: 275-315.
- 153.** Sastry K.S., 2013a. Seed-borne Plant Virus Diseases. Springer, India. 342p.
- 154.** Sastry K.S., 2013b. Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics: Volume 1: Introduction of Plant Viruses and Sub-Viral Agents, Classification, Assessment of Loss, Transmission and Diagnosis. Springer, India. 381p.
- 155.** Sastry K.S., 2013c. Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics: Volume 2: Epidemiology and Management. Springer, India. 511p.
- 156.** Savino, V.; Cherif, C. et Martelli, G. P., 1985 *Phytopathologia Mediterranea*, vol.24, no29-34. <https://gd.eppo.int/taxon/GFLV00/distribution/TN>
- 157.** Schellenberger P.; Andret-Link P.; Schmitt-Keichinger C.; Bergdoll M.; Marmonier A.; Vigne E.; Lemaire O. ; Fuchs M.; Demangeat G. and Ritzenthaler C., 2010. A Stretch of 11 Amino Acids in the β B- β C Loop of the Coat Protein of Grapevine Fanleaf Virus Is Essential for Transmission by the Nematode *Xiphinema index*. *Journal of Virology*, vol. 84, n°16. Pp.: 7924–7933.

158. Scheper R.W.A.; Crane D.C.; Whisson D.L. and Scott E.S., 2000. The Diaporthe teleomorph of *Phomopsis* Taxon 1 on grapevine. Mycol. Res. vol.104, no 2. Pp.: 226-231.

159. Scott S.W; Zimmerman M.T.; Jones T A. and Le Gall O.,2000. Differences between the coat protein amino acid sequences of English and Scottish serotypes of raspberry ringspot virus exposed on the surface of virus particles. Vol.68, no 2. Pp.:119–126.

160. Serfontein S.; Serfontein T.J.; Botha W.I. and Staphorst J.L., 1997. The isolation and characterization of *Xylophilus ampelinus*. Vitis, Vol.36, N° 4, pp.:209-210.

161. Serghini M. A. ; Fuchs M. ; Pinck M. ; Reinbolt J. ; Walter B. and Pinck L., 1990. RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. Journal of General Virology, vol.71. Pp. : 1433-1441.

162. Serghini M. A.; Pinek M. and Pinek L., 1991. In vitro expression of a chimeric coat protein gene from Grapevine Fanleaf virus (strain F 13). Arch. Virol. 117. Pp.:297-304.

163. Sforza R, Clair D, Daire X, Larrue J, Boudon-Padieu E., 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of "Bois noir" of grapevines in France. J. Phytopathol. 1998; 146 : 549-56.

164. Sgherri C.; Ranieri A. and M. Quartacci F., 2013. Antioxidative responses in *Vitis vinifera* infected by grapevine fanleaf virus. Journal of Plant Physiology, vol.170. Pp.:121– 128

165. Sokhandan Bashir N. and Hajizadeh M., 2007. Survey for Grapevine fanleaf virus in vineyards of north-west Iran and genetic diversity of isolates. Australasian Plant Pathology, 2007, 36, 46–52.

166. Sokhandan Bashir N.; Zarghani S. N. and Hejazi M S., 2007. Diversity of Grapevine fanleaf virus isolates from Iran. Virus Research, vol.128. Pp.: 144–148

167. Sopp E. ; Rühl E. H. and Holst H., 1998. Resistance of rootstocks to the virus transmitting nematode *Xiphinema index*. *Wein-Wissenschaft*, vol. 53, no.1, pp. 3-6

168. Spielmann A. ; Krastanova S. ; Douet-Orhant V. and Gugerli P., 2000. Analysis of transgenic grapevine (*Vitis rupestris*) and *Nicotiana benthamiana* plants expressing an Arabis mosaic virus coat protein gene. *Plant Science*, vol.156, no.2. Pp: 235–244.

169. Spilmont A.S.; Ruiz A. and Grenan S., 2012. Efficiency of micrografting of shoot apices as a sanitation method against seven grapevine viruses (ArMV, GFLV, GLRaV-1, -2, -3, GFkV, GVA). Proceeding of the 17th congress of ICVG, 7-14 october, University of California. Pp.: 270-271.

170. Taliansky M.; Torrance L. and Kalinina N.O., 2008. Role of Plant Virus Movement Proteins. In: *Plant Virology Protocols From Viral Sequence to Protein Function*. 2nd ed., Foster G.D.; Johansen E.; Hong Y. and Nagy P. D.(Eds.). Humana Press, USA.Pp. : 33-54.

171. Taylor C. E. and Robertson W. M., 1975. Acquisition, Retention and Transmission of Viruses by Nematodes. In: *Nematode vectors of plant viruses*. Lamberti F.; Taylor C. E. and Seinhorst J. W. (Eds). Plenum Press, London. Pp.: 253-276.

172. Terlizzi F.; Pisi A.; Beber R.; Fiore N.; Zamorano A.; Credi R. and Ratti C., 2015. Genetic variability of the movement and coat protein genes of Grapevine fanleaf virus isolates from Italy. *J Gen Plant Pathol.*, vol.81, no.1. Pp. : 1-5.

173. Ternynck T., Avrameas S., 1991. Techniques immunoenzymatiques. In *Techniques en immunologie 2ème édition*, INSERM. S.F.I., Paris.

174. Thomas C.L.; Bayer E.M.; Ritzenthaler C.; Fernandez-Calvino L. and Maule A.J., 2008. Specific targeting of a plasmodesmal protein affecting cell-to-cell communication. *PLoS Biol*, Vol.6, N°07.

175. Tolba I.H.; Zaki M.F., 2011. Characterization of *Agrobacterium vitis* isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. *Annals of Agricultural Sciences*, Vol.56, N°2, pp.: 113-119.

- 176.** Toledo P.J., 2007. Les parasites de la vigne : Stratégies de protection raisonnée. Dunod, Paris, France. 421 p.
- 177.** Torres-Viñals M.; Sabate-Casaseca S.; Aktouche N.; Grenan S.; Lopez G.; Porta-Alguera M. and Torregrosa L., 2004. Large-scale production of somatic embryos as a source of hypocotyl explants for *Vitis vinifera* micrografting *Vitis* 43, 163-168.
- 178.** Toussaint-Samat M., 2009. A history of food: new expanded edition. 2e ed. Wiley-Blackwell.
- 179.** Ueki S and Citovsky V., 2006. Arrest in Viral Transport as the Basis for Plant Resistance to Infection. In: Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses, Loebenstein G. and Carr J (eds.) P. Springer, Netherlands. Pp.: 289-314.
- 180.** Valat C., 1972. La sélection clonale de la vigne: facteur d'amélioration de la productivité vignoble du français. *Option méditerranée*, vol.12, no.4. 89-91.
- 181.** Valat L ; Toutain S. ; Courtois N. ; Gaire F. ; Decout E. ; Pinck L. ; Mauro M.C. and Burrus M., 2000. GFLV replication in electroporated grapevine protoplasts. *Plant Science*, Vol.155, N°. 2, pp.: 203-212.
- 182.** Valat L. ; Fuchs M. and Burrus M., 2006. Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of Grapevine fanleaf virus: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. *Plant Science*, vol. 170. Pp. :739–747.
- 183.** Valat L. ; Mode F. ; Mauro M.C. and Burrus M., 2003. Preliminary attempts to biolistic inoculation of grapevine fanleaf virus. *Journal of Virological Methods*, vol.108. Pp.:29-40.
- 184.** Van Zyl, S.; Vivier M. A. and Walker M. A., 2012. *Xiphinema index* and its relationship to grapevines: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, Vol.33. Pp. : 21–32.
- 185.** Vidal J.P.C., 1953. *Progres Agricole et Viticole*, vol.139 , no11-12. Pp. : 154-159. <https://gd.eppo.int/taxon/GFLV00/distribution/MA>

186. Vigne E. ; Marmonier A. ; Komar V. ; Lemaire O. and Fuchs M., 2009. Genetic structure and variability of virus populations in cross-protected grapevines superinfected by Grapevine fanleaf virus. *Virus Research*, vol.144. Pp. :154–162.

187. Vigne E.; Demangeat G.; Komar V. and Fuchs M., 2005. Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of Grapevine fanleaf virus. *Arch. Virol.*, Vol. 150, pp.: 2241–2255.

188. Viry M.; Serghini M. A.; Hans F.; Ritzenthaler C.; Pinck M. and Pinck L., 1993. Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *Journal of General Virology* 74. Pp : 169-174.

189. Walter B., 2000. *Maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne.* Editions Féret. Bordeaux. p. 15-74.

190. Walter B.; Huss B. and Etienne L., 1987. Improvements in the serological detection of ARMV and GFV. Abstracts of papers presented at the 9th meeting of the international council for the study of viruses and virus diseases of the grapevine, September 6-11, 1987, Qiryat Anavim, Israel.

191. Wanga Q.; Mawassi M.; Li P.; Gafny R. and Sela I., 2003. Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Science*, vol.165, no.2. pp.: 321–327

192. Wetzel T, Jardak R, Meunier L, Ghorbel A, Reustle G.M, Krczal G, 2002. Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, vol.101, no.1–2. Pp. : 63-69.

193. Wetzel T. ; Bassler A. Amren M.A.W. and Krczal G., 2006. A RT/PCR-partial restriction enzymatic mapping (PREM) method for the molecular characterisation of the large satellite RNAs of Arabis mosaic virus isolates. *Journal of Virological Methods* 132. Pp: 97–103.

194. Wetzel T.; Meunier L.; Jaeger U.; Reustle G.M. and Krczal G, 2001. Complete nucleotide sequences of the RNAs 2 of German isolates of Grapevine fanleaf and Arabis mosaic nepoviruses. *Virus Research* 75. Pp: 139–145.

- 195.** Wetzel T.; Chisholm J.; Bassler A. and Sanfaçon H., 2008. Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from Arabis mosaic virus (subgroup A nepovirus). *Virology* 375 .Pp.:159–169
- 196.** Wilson C R and Wilson C, 2014. Applied Plant Virology. CABI, Australia. 177p .
- 197.** Winterhagen P.; Dubois C.; Sinn M.; Wetzel T; Reustle G.M., 2009. Gene silencing and virus resistance based on defective interfering constructs in transgenic *Nicotiana benthamiana* is not linked to accumulation of siRNA. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol.47, no.8. Pp.:739–742.
- 198.** Wysoki M. ; De Haan P. and Izhar Y., 1988. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* preparations containing dead and live spores against two avocado pests: the giant looper, *Boarmia selenaria* (Lep.: Geometridae) and the honeydew moth, *Cryptoblabes gnidiella* (Lep.: Phycitidae). *Crop Protection*, Vol.7, N°.2, pp.: 131-136.
- 199.** Wyss U., 1975. Feeding of *Trichodorus*, *Longidorus* and *Xiphinema*. In: Nematode vectors of plant viruses. Lamberti F.; Taylor C. E. and Seinhorst J. W. (Eds). Plenum Press, London. Pp.: 203-222.
- 200.** Wyss U., 2002. Feeding Behaviour of Plant-Parasitic Nematodes. In: The biology of nematodes. Lee D.L (Ed.). Taylor and Francis, London. Pp.: 462-513.
- 201.** Zarghani S.N. ; L. Dupuis-Maguiraga, A. ; Bassler and T. Wetzel, 2014. Mapping of the exchangeable and dispensable domains of the RNA 2-encoded 2AHP protein of arabis mosaic nepovirus. *Virology*, vol.458–459. Pp. :06-113.
- 202.** Zheng C.; Choquer M.; Zhang B.; Ge H., Hu S.; Ma H. and Chen S., 2011. LongSAGE gene-expression profiling of *Botrytis cinerea* germination suppressed by resveratrol, the major grapevine phytoalexin. *Fungal biology* 115. Pp.:815-832.
- 203.** Ziegler-Graff V. and Brault V., 2008. Role of Vector-Transmission Proteins. In: *Plant Virology Protocols From Viral Sequence to Protein Function*. 2nd ed., Foster G.D.; Johansen E.; Hong Y. and Nagy P. D.(Eds.). Humana Press, USA. Pp.: 81-98.

Annexe

Annexe I :

Réglementation de la sélection sanitaire de la vigne en Algérie

**MINISTERE DE L'AGRICULTURE
ET DU DEVELOPPEMENT RURAL**

Arrêté du 17 Safar 1425 correspondant au 7 avril 2004 modifiant et complétant l'arrêté du 21 Dhou El Hidja 1415 correspondant au 21 mai 1995 fixant les normes phytotechniques et phytosanitaires à l'importation des semences et plants des espèces maraichères, arboricoles, viticoles et des grandes cultures.

Le ministre de l'agriculture et du développement rural,

Vu le décret présidentiel n° 03-215 du 7 Rabie El Aouel 1424 correspondant au 9 mai 2003, modifié, portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-12 du 1er janvier 1990, modifié et complété, fixant les attributions du ministre de l'agriculture ;

Vu le décret exécutif n° 92-133 du 28 mars 1992 portant création du centre national de contrôle et de certification des semences et plants ;

Vu le décret exécutif n° 93-139 du 14 juin 1993, modifié et complété, portant réaménagement des statuts de l'institut national de la protection des végétaux ;

Vu le décret exécutif n° 93-284 du 23 novembre 1993 fixant la réglementation relative aux semences et plants ;

Vu le décret exécutif n° 93-286 du 23 novembre 1993 réglementant le contrôle phytosanitaire aux frontières ;

Vu l'arrêté du 21 Dhou El Hidja 1415 correspondant au 21 mai 1995 fixant les normes phytotechniques et phytosanitaires à l'importation des semences et plants des espèces maraichères, arboricoles, viticoles et des grandes cultures ;

Arrête :

Article 1er. — Le présent arrêté a pour objet de modifier et de compléter les dispositions de l'arrêté du 21 Dhou El Hidja 1415 correspondant au 21 mai 1995, susvisé, et notamment ses annexes.

Art. 2. — Les normes phytotechniques et phytosanitaires à l'importation des semences et plants des espèces maraichères, arboricoles, viticoles et des grandes cultures, annexées à l'original de l'arrêté du 21 mai 1995, susvisé, sont remplacées par celles annexées au présent arrêté et seront publiées au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 17 Safar 1425 correspondant au 7 avril 2004.

Saïd BARKAT.

ANNEXE 1

**NORMES PHYTOTECNIQUES ET PHYTOSANITAIRES RELATIVES
A L'IMPORTATION DES SEMENCES DES GRANDES CULTURES**

1. NORMES PHYTOTECNIQUES :

1.1- Céréales

Espèce	Catégorie	Pureté variétale minimale % grains	Faculté germinative minimale % grains	Pureté spécifique minimale % poids	Humidité max. % poids	Teneur maximale dans un échantillon de 500 grammes			
						Total	dont autres espèces de céréales	dont espèces de plantes autres que céréales	Sclérotés ou fragments de sclérotés de claviceps pupurea
Blés	Semences Pré-base et base	999	85	99	15	4	1	3 dont 1 Raphanus raphanistrum ou Agrostemma gitagho	1
	Orge et Avoine	Semences certifiées	997	85	98	15	10	7	7 dont 3 Raphanus raphanistrum ou Agrostemma gitagho
Triticale	Semences Pré-base et base	997	80	99	15	4	1	3 dont 1 Raphanus raphanistrum ou Agrostemma gitagho	1
	Semences certifiées	995	80	98	15	10	7	7 dont 3 Raphanus raphanistrum ou Agrostemma gitagho	3

1-2 Bois de vigne.

PARAMETRES	BOUTURES PEPINIERS	BOUTURES GREFFABLES	BOUTURES GREFFONS
Etat général	Avoir un bon état de fraîcheur, suffisamment aotées sur la totalité de leur longueur, non desséchées, pas de traces de dommages de grêle et de gel, pas de blessures, non écrasées, ni cassées.		
Dimensions	Longueur: 55 à 60 cm Diamètre : * Au petit bout : 4,5 mm, * Au grand bout : 12 mm au maximum. Talon : 5 mm.	Mètre greffable : 105 -120 cm Bouture greffable : 40 - 45 cm, Diamètre : * Au petit bout : 6,5 à 12 mm, * Au grand bout : 14 mm au maximum. Talon : 5 mm au minimum.	Longueur minimale : 50 cm avec un minimum de 5 yeux utilisables, Diamètre : * Au petit bout: 6,5 à 12 mm * Au grand bout : 14 mm au maximum.
Conditionnement	Paquets de 100 ou 200 boutures liés par 2 à 3 attaches, identifiés par une étiquette.		
Origine et authenticité variétale	Les bois doivent être certifiés et être accompagnés de documents officiels certifiant leur authenticité variétale, leur origine et leur état sanitaire conformément à la réglementation en vigueur.		

2. NORMES PHYTOSANITAIRES :

Les plants et porte-greffes viticoles doivent être reconnus indemnes des organismes nuisibles réglementés et de ceux ci-dessous énumérés.

VIRUS	BACTERIES
Grapevine fan leaf virus (GFLV) (court noué). Grapevine leaf roll virus (GLRV let 3) (enroulement). Rupestris Stem Pitting (RSTaV) (maladie du bois strié) Corky Bark (GV B) Grapevine Virus A (GVA) Grapevine Fleck Virus (GFKV)	Erwinia vitivora (maladie d'oléron)
Nématodes	Cryptogames
Méloïdogyne spp Longidorus spp	Eutypa armeniacae (Eutypiose)

Pour les organismes nuisibles non énumérés et pouvant être combattus par traitement phytosanitaire, une tolérance cumulée de 3% est admise.

Annexe II :

La composition du Kit Bioreba ® ainsi que le protocole fourni.

Product Information: DAS-ELISA
Grapevine fanleaf virus (GFLV)

GFLV is a grapevine pathogen and is spread over medium and long distances in infected propagative material and soil, and between plants in the field by dorylamoid nematodes. Fanleaf disease is characterized by malformations of leaves and canes, and by various types of chlorotic discolourations of the foliage. Bunches are reduced in number and size, ripen irregularly and show shot berries and poor berry setting. Yellow mosaic is typically characterized by various patterns of brilliant chrome-yellow discolourations of leaves and shoots. Yellowing is most prominent in spring, fading away as the season progresses (heat masking). Crop losses range from moderate (5-10%) to very high (up to 90% or more) according to the virulence of the virus strain and varietal susceptibility. Fruit quality is also affected by a decrease in sugar content and titratable acidity. American rootstocks suffer a decrease of pruning wood up to 50% and show lower rooting ability of cuttings and graft take.

Specificity and sampling instruction

The DAS-ELISA reagent (1) consists of different antibodies. The antibodies were made against isolates of GFLV from Central Europe (Colmar, France) and Canada (Vineland Research Station, Ontario). The coating antibodies are polyclonal, the AP-conjugated antibodies are monoclonal (P. Ellis, *personal communication*).

For testing grapevine, a special extraction buffer «Grapevine» (0.2 M TRIS, pH 8.2) (2, modified) is used; for other plants, the extraction buffer «General» is applied.

Young leaves or sprouting buds and juicy bark are good tissue sources for detecting GFLV in grapevine (2).

The product was developed in cooperation with Phyto Diagnostics Company Limited, North Saanich, BC, Canada.

References

- (1) Clark, M.F., and Adams, A.N. 1977. J. gen. Virol. 34: 475-483.
- (2) Gugerli, P. 1986. In H.U. Bergmeyer: Methods of Enz. Analysis. Vol. XI, pp. 474-481.
- (3) Hewitt, W.B. et al. 1970. Descriptions of plant viruses. No. 28. CMI/AAB. 4 pp.

Ordering Information

Pathogen	Abbr.	Art. No.	Reagent form	Size	Assays
Grapevine fanleaf virus coating IgG: polyclonal conjugate: monoclonal	GFLV	120412	IgG	0.2 ml	1000
		120422	Conjugate	0.2 ml	1000
		120415	IgG	0.1 ml	500
		120425	Conjugate	0.1 ml	500
		120453	Positive control	2.5 ml	12
		180043	Negative control	2.5 ml	12
		120462	Reagent set 960		960
		120465	Reagent set 480		480
		120472	Complete kit 960		960
		120475	Complete kit 480		480

Reagent sets contain: IgG and conjugate, positive and negative controls, and microtiter plates (F-96) for 480 or 960 tests, respectively, for a working volume of 200 µl/test/well.

Complete kits contain: All reagents, controls, microtiter plates (F-96), buffers, and substrate necessary to perform 480 or 960 tests, respectively, for a working volume of 200 µl/test/well.

All buffers as well as equipment for sample preparation and disposables are also available.

For ordering, prices, and further information on any other product from BIOREBA, please contact your local distributor (see www.bioreba.com) or our office in Switzerland.





Datasheet

ELISA reagents and controls for the detection of

Grapevine fanleaf virus (GFLV)

Coating IgG (Dilute 1000 x in coating buffer)	Art. No. 120415 120412
Lot No. 211120	
Conjugate IgG conjugated w/AP (Dilute 1000x in conjugate buffer)	Art. No. 120425 120422
Lot No. 221120	

Positive Control (*Reconstitute in 2.5 ml dist. water)	Art. No. 120453
Lot No. 254170	
Negative Control (*Reconstitute in 2.5 ml dist. water)	Art. No. 180043
Lot No. 251630	

*Exp. Date AUG 2016 Store at +4°C

Quality Control **OD 405/492 nm		60 min
Infected:	Ch. quinoa	> 3.000
Healthy:	grapevine	< 0.100
Extraction buffer	EP-grapevine	< 0.100
Positive control,	Lot No. 254170	> 2.200
Negative control,	Lot No. 251630	< 0.100

Reference: E 293-14 / E 303-14

Approved by: 

* The functionality of the coating and conjugate reagents and of the unopened controls is guaranteed until the expiration date. The controls, however, should be used immediately after reconstitution; unused portions can be frozen for later use (refer to Product information «Positive and negative controls»).

** The extinction values were obtained by following the procedure of double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) as described on enclosed Technical information «ELISA Procedure». Certified NUNC F-96 Maxisorp microtiter plates were used. Extinction values may vary according to species, variety, tissue, and physiological age of plant; strain of pathogen; microtiter plate; plate washer; and ELISA reader. Since these reagents were tested in DAS-ELISA, other procedures or combinations of reagents might not yield optimal results.

Specificity and sampling: See reagent-specific product information.

Warranty and Liability

BIOREBA AG guarantees that the delivered product has been thoroughly tested in order to ensure that its properties specified herein and/or in the corresponding product information are fulfilled. No further warranties are given. BIOREBA AG is unable to accept liability for any damage which results from a non-appropriate use of this product.

printed 01.09.2014



BIOREBA AG *Your Partner in Agro-Diagnostics*
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach BL1
Switzerland
phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com



Information produit

Kit complet

Composition des kits

Composant	480 tests	960 tests
IgG	0.1 ml	0.2 ml
Conjugué	0.1 ml	0.2 ml
Témoin positif	2.5 ml	2.5 ml
Témoin négatif	2.5 ml	2.5 ml
Tampon d'extraction (10x/5x)*	250 ml/500 ml	500 ml/2x500 ml
Tampon de coating	1 tablette (0.1 l)	2 tablettes (0.2 l)
Tampon conjugué (10x)	10 ml	20 ml
Tampon substrat (5x)	20 ml	2 x 20 ml
Tampon de lavage	1 sachet (5 l)	2 sachets (10 l)
Substrat (pNPP)	5 tablettes (0.1 l)	10 tablettes (0.2 l)
Albumine d'œuf**	25 g	50 g
Urée***	150 g	300 g
Microplaques	5 x F96 plaques	10 x F96 plaques

Mode opératoire et fiches de données

Les fiches de contrôle qualité des réactifs et des témoins
Les modes de préparation des tampons
Le mode opératoire du test ELISA
L'utilisation des témoins positifs et négatifs

Conservation et stabilité

Les composants des kits sont stables jusqu'à leur date de péremption s'ils sont conservés à +4°C. Une courte période à température ambiante, pendant le transport notamment, n'affecte pas la péremption et la qualité des produits. Une fois dilué, selon le protocole, le tampon de lavage doit être utilisé rapidement (idéalement dans la journée) alors que les autres tampons se conservent bien plusieurs semaines à +4°C (max. 2 mois). Exception faite du tampon d'extraction spécifique pour les bulbes et les tubercules auquel on rajoute de l'albumine d'œuf et qui doit être préparé extemporanément. Il est conseillé d'attendre que les tampons aient atteint la température ambiante avant utilisation dans les microplaques. **A noter:** Les tablettes de substrat se conservent plusieurs mois à +4°C, mais peuvent être mises à -20°C pour une très longue conservation.

Utilisation

Tous les composants du kit sont prévus pour être utilisés en laboratoire in vitro pour la détection de pathogènes de plantes par la technique ELISA. Ils ne sont pas destinés à l'usage pour l'homme ou l'animal.

Risque pour la santé

Les tampons contiennent 0.02 – 0.2 % d'azide de sodium (NaN_3) qui est toxique s'il est avalé et irritant au contact de la peau, des yeux ou des muqueuses. Cependant, ces produits ne sont pas considérés dangereux s'ils sont utilisés selon le protocole et dans le cadre des Bonnes Pratiques de Laboratoire. Les déchets doivent être évacués selon la réglementation en vigueur.

- * Pour les virus de la vigne, une quantité double de tampon est fournie puisque la concentration est x5.
- ** Fourni uniquement avec le tampon d'extraction spécifique des «Bulbes & Tubercules» et «Caulimo».
- *** Fourni uniquement avec le tampon d'extraction «Caulimo».

1/1
Version: 15.04.2011

www.bioreba.com

BIOREBA AG *Your Partner in Agro-Diagnostics*
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach BL1
Switzerland
phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17
admin@bioreba.ch
www.bioreba.com



Information technique

Préparation des tampons

Tampon de coating: 1 ou 2 tablettes dans les kits. Disponible aussi individuellement (Réf. 110110).

Dissoudre une tablette dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir un tampon bicarbonate (50mM carbonate, pH 9.6) contenant 0.02 % de NaN_3 .

Tampon de lavage: Les kits contiennent des sachets de 50 g en poudre (Réf. 110152).

Dissoudre un sachet dans 5000 ml pour obtenir un tampon phosphate (10 mM carbonate, pH 7.4) contenant 140 mM NaCl, 3 mM KCl et 0.05 % de Tween 20 (PBST). Ne contiens pas de NaN_3 . A utiliser dans les deux jours après reconstitution (ajouter un conservateur – azide de sodium- pour éviter les contaminations microbiennes au delà de 2 jours). Le contenu d'un sachet peut aussi être dissous dans 500 ml pour obtenir une solution concentrée 10 fois et stable à température ambiante 15-25°C. Cette solution doit être diluée x10 juste avant utilisation.

Tampon d'extraction «general»: 250 ml ou 500 ml concentré 10 fois (x10) fournis dans les kits complets. Disponible aussi individuellement (Réf. 110120).

100 ml de solution concentrée x10 sont ajoutés à 900 ml d'eau distillée pour former 1000 ml de tampon Tris (200 mM, pH 7.4) contenant 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 % PVP 24kD, 0.05 % Tween 20 et 0.02 % NaN_3 . Colorée en vert avec E102 et E131.

Tampon d'extraction spécial «bulbes et tubercules»: 25 g ou 50 g d'albumine d'œuf en poudre fournie dans les kits complets. Disponible aussi individuellement (Réf. 110122).

Pour préparer 1 litre de tampon, dissoudre 10 g d'albumine d'œuf en poudre dans 20 ml de tampon. Compléter ensuite jusqu'à 1000 ml avec du tampon d'extraction «général». A utiliser juste après la préparation!

Tampon d'extraction spécial «Caulimo»: Voir Information produit «Cauliflower mosaic virus».

Tampon d'extraction spécial «vigne»: 500 ml ou 1000 ml concentré 5 fois (x5) fournis dans les kits complets. Disponible aussi individuellement (Réf. 110123).

200 ml de solution x5 sont ajoutés à 800 ml d'eau distillée pour former 1000 ml de tampon Tris (200 mM, pH 8.2 à 25°C) contenant 137 mM NaCl, 2 % PVP 24 kD, 1 % PEG 6kD, 0.05 % Tween 20 et 0.02 % NaN_3 . Colorée en orangé avec E102 et E127. **A noter:** La formation d'un léger précipité peut apparaître au cours de la conservation. Il n'affecte pas la qualité et les performances du tampon, et disparaît en général quand celui-ci se réchauffe.

Tampon de conjugué: 10 ml ou 20 ml concentré 10 fois (x10) fournis dans les kits complets. Disponible aussi individuellement (Réf. 110140/110142).

10 ml de solution concentrée x10 sont ajoutés à 90 ml d'eau distillée pour former 100 ml de tampon Tris (20 mM, pH 7.4) contenant 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 % PVP 24kD, 0.05 % Tween 20, 0.2 % BSA et 0.02 % de NaN_3 . Colorée en violet rosé avec E127 et E131.

Tampon de substrat: 20 ml ou 2 x 20 ml concentré 5 fois (x5) fournis dans les kits complets. Disponible aussi individuellement (Réf. 110130/110132).

20 ml de solution concentrée x5 sont ajoutés à 80 ml d'eau distillée pour former 100 ml de tampon diethanolamine (1M, pH 9.8) contenant 0.02 % de NaN_3 . Ajouter 1 tablette de pNPP (20 mg) dans 20 ml de tampon de substrat 15 minutes avant utilisation.

Tablettes de substrat (pNPP): 5 ou 10 tablettes conditionnées individuellement contenant chacune 20 mg de pNPP (para Nitro-Phenyl-Phosphate) fournis dans les kits complets mais aussi disponible séparément (110080/110180). Pour une meilleure conservation stocker à -20° C.

Ouvrir l'emballage individuel sans toucher la pastille et la faire dissoudre dans 20 ml de tampon substrat reconstitué pour obtenir une solution concentrée à 1 mg/ml. A utiliser juste après la préparation.

Risques pour la santé

L'azide de sodium NaN_3 est un conservateur utilisé dans certains de nos tampons. C'est un produit qui peut être toxique s'il est ingéré ou mis au contact de la peau, des yeux et des muqueuses. Cependant, ce produit ne présente pas de danger pour la santé ou l'environnement s'il est utilisé conformément aux règles de bonnes pratiques de laboratoire. Les déchets doivent être évacués selon la réglementation en vigueur.

1/1

Version: 2 - 15.04.2011

www.bioreba.com

BIOREBA AG
Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach BL1
Switzerland

phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17

Your Partner in Agro-Diagnostics

admin@bioreba.ch
www.bioreba.com



Information du produit

Utilisation des témoins positifs et négatifs

Description générale

Les témoins positifs et négatifs sont utilisés pour valider l'analyse ELISA. Les témoins positifs sont fabriqués à partir d'extraits de plantes infectées pour utilisation en ELISA et ne peuvent pas être utilisés pour d'autres applications, comme l'inoculation de plantes ou les tests rapides AgriStrip. Les témoins négatifs sont des extraits de plantes saines. Le poids net des contrôles est de 50 - 100 mg.

A noter: les témoins positifs peuvent contenir plus d'un agent pathogène; donc certains témoins positifs provoquent une réaction positive avec plusieurs réactifs.

Conservation

Les témoins lyophilisés se conservent à +4°C. L'activité antigénique du témoin positif peut légèrement diminuer au cours du temps, mais son utilisation en tant que témoin de réaction est garantie au moins jusqu'à la date indiquée.

Utilisation

Avant utilisation, ajouter 2,5 ml d'eau distillée dans le flacon et mélanger jusqu'à disparition du lyophilisat; Cet extrait reconstitué est à utiliser immédiatement. La solution en excès peut être aliquotée au volume de votre choix et congelée (-20 °C) pour être utilisée ultérieurement. Elle se conserve ainsi plusieurs mois, cependant au cours du temps une réponse plus faible peut être observée. A décongeler juste avant l'usage et éviter les cycles répétés de congélation / décongélation.

Détermination du seuil de détection

Les témoins positifs et négatifs sont utilisés pour valider le bon déroulement de l'analyse. Ainsi, les témoins positifs, comme les échantillons infectés, doivent se colorer en jaune alors que les témoins négatifs, comme les échantillons sains, restent incolores. Pour déterminer précisément le seuil à partir duquel un échantillon doit être considéré comme infecté, il faut utiliser des témoins d'analyse préparés dans les mêmes conditions que l'(les) échantillon(s) à analyser. C'est à dire, si possible, même partie de plante, même stade physiologique, même espèce et même méthode d'extraction. Se reporter à notre fiche „analyse de données ELISA“ en cas de besoin.

Sécurité biologique

L'infectiosité résiduelle, qui peut être présente dans les témoins positifs, se perd rapidement après la reconstitution. Même si la structure antigénique est préservée afin de provoquer une réaction dans les tests ELISA, cela ne représente pas un danger réel si l'on utilise selon les précautions habituelles de laboratoire.

1/1

Version: 2 - 15.04.2011

www.bioreba.com

BIOREBA AG

Christoph Merian-Ring 7
CH-4153 Reinach BL1
Switzerland

phone +41 61 712 11 25
fax +41 61 712 11 17

Your Partner in Agro-Diagnostics

admin@bioreba.ch
www.bioreba.com

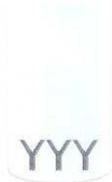


Information technique

Mode opératoire du test ELISA

Sauf exception, nos réactifs ELISA sont optimisés pour être utilisés dans un test en double sandwich (DAS-ELISA) sur des microplaques de titration Nunc certifiées avec un volume utile de 200 µl par puit. Lorsque une autre procédure est utilisée, celle-ci est clairement spécifiée à la fiche de données du réactif.

Le principe des tests ELISA de BIOREBA correspond au protocole généralement utilisé dans les laboratoires de certification réalisant de nombreuses analyses en routine. C'est une procédure «robuste» qui a largement fait ses preuves et qui optimise la fiabilité des résultats. Ainsi les clients utilisent un protocole identique et fiable pour toutes les combinaisons plantes/pathogènes.



1. Coating: Sensibilisation des microplaques avec un anticorps spécifique

Diluer au 1/1000 les anticorps de coating (IgG) dans le tampon de coating ; i.e. 20 µl IgG dans 20 ml de tampon. Ajouter 200 µl de la solution obtenue dans chaque puit de la microplaque.

Couvrir les plaques et placer les dans une étuve humide.

Incuber 4 h à 30°C ou une nuit à +4°C.

1a. Lavage : Vider les plaques et laver les au moins 3 fois avec le tampon de lavage. Eliminer tout le liquide en tapant les plaques sur du papier absorbant. Le laveur de microplaque BIOREBA «EASY WASH 2000» permet un lavage optimum.



2. Echantillon: Incubation de l'extrait de plante (antigène)

Diluer l'extrait végétal au 1/20 dans le tampon d'extraction (la nature du tampon d'extraction ainsi que le taux de dilution peut varier selon les échantillons; se reporter à la fiche «information produit» du réactif).

Ajouter 200 µl par puit.

Couvrir les plaques et placer les dans une étuve humide.

Incuber une nuit à +4°C.

2a. Laver comme en 1a.



3. Conjugué: Incubation avec les anticorps conjugués à l'enzyme (conjugate)

Diluer au 1/1000 les anticorps conjugués dans le tampon de conjugué.

Ajouter 200 µl de la solution obtenue par puit.

Couvrir les plaques et placer les dans une étuve humide.

Incuber 5h à 30°C.

3a. Laver comme en 1a.



4. Substrat: Une réaction colorée indique la présence d'un échantillon infecté

Diluer les pastilles de substrat pNPP à 1 mg/ml dans le tampon de substrat.

Ajouter 200 µl de la solution obtenue par puit.

Incuber à température ambiante (18-25°C) à l'obscurité.

Observez la réaction et notez le développement de la coloration entre 30 et 120 min, soit visuellement soit avec un photomètre à 405 nm. Les photomètres à double lecture 405/492 nm permettent de réduire les effets de bruits de fond.

1/1
Version: 3 - 08.12.2011

www.bioreba.com

BIOREBA AG Your Partner in Agro-Diagnostics
 Christoph Merian-Ring 7
 CH-4153 Reinach BL1 phone +41 61 712 11 25 admin@bioreba.ch
 Switzerland fax +41 61 712 11 17 www.bioreba.com



Annexe III :

Les lectures des DO du test ELISA obtenues

1

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD	lecture	Moyenne	LSD
1	BLCar1	0,259	0,2	0,244	0,179	0,138	0,169
		0,141		0,244	0,097		0,169
	BLCar2	0,193	0,185	0,244	0,134	0,129	0,169
		0,177		0,244	0,123		0,169
	BLCar3	0,243	0,289	0,244	0,168	0,200	0,169
		0,335		0,244	0,232		0,169
	BLCar4	0,229	0,261	0,244	0,145	0,092	0,169
		0,293		0,244	0,039		0,169
	BLCar5	0,519	0,594	0,244	0,359	0,411	0,169
		0,669		0,244	0,463		0,169
	BLCar6	0,093	0,11	0,244	0,064	0,076	0,169
		0,127		0,244	0,088		0,169
	BLCar7	0,075	0,055	0,244	0,052	0,038	0,169
		0,035		0,244	0,024		0,169
	BLCar8	0,294	0,253	0,244	0,204	0,141	0,169
		0,212		0,244	0,078		0,169
	BLSab1	0,341	0,287	0,244	0,236	0,199	0,169
		0,233		0,244	0,161		0,169
	BLSab2	0,425	0,501	0,244	0,294	0,347	0,169
		0,577		0,244	0,400		0,169
	BLSab3	0,291	0,24	0,244	0,202	0,167	0,169
		0,189		0,244	0,131		0,169
	BLSab4	0,242	0,274	0,244	0,168	0,225	0,169
		0,306		0,244	0,281		0,169
	BLSab5	0,396	0,427	0,244	0,274	0,296	0,169
		0,458		0,244	0,317		0,169
	BLSab6	0,096	0,091	0,244	0,066	0,132	0,169
		0,086		0,244	0,198		0,169
	BLSab7	0,218	0,25	0,244	0,082	0,139	0,169
		0,282		0,244	0,195		0,169
	BLSab8	0,291	0,337	0,244	0,202	0,234	0,169
		0,383		0,244	0,265		0,169
	BLSab9	0,235	0,19	0,244	0,163	0,132	0,169
		0,145		0,244	0,100		0,169
	BLRg1	0,707	0,753	0,244	0,490	0,522	0,169
		0,799		0,244	0,553		0,169
	BLRg2	0,066	0,094	0,244	0,046	0,066	0,169
		0,122		0,244	0,085		0,169
	BLRg3	0,124	0,0945	0,244	0,086	0,066	0,169
		0,065		0,244	0,045		0,169
	BLRg4	0,115	0,153	0,244	0,080	0,141	0,169
		0,191		0,244	0,202		0,169
	BLRg5	0,326	0,305	0,244	0,226	0,212	0,169
		0,284		0,244	0,197		0,169
	BLRg6	0,294	0,371	0,244	0,204	0,257	0,169
		0,448		0,244	0,310		0,169
	BLRg7	0,203	0,302	0,244	0,141	0,210	0,169
		0,401		0,244	0,278		0,169
BLRg8	0,224	0,32	0,244	0,155	0,222	0,169	
	0,416		0,244	0,288		0,169	
BLRg9	0,344	0,256	0,244	0,238	0,177	0,169	
	0,168		0,244	0,116		0,169	
BLAI1	0,318	0,295	0,244	0,220	0,204	0,169	
	0,272		0,244	0,188		0,169	
BLAI2	0,213	0,295	0,244	0,148	0,205	0,169	
	0,377		0,244	0,261		0,169	

2

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	BLAI3	0,515	0,474	0,295	0,199	0,183	0,114
		0,433		0,295	0,167		0,114
	BLAI4	0,171	0,125	0,295	0,105	0,068	0,114
		0,079		0,295	0,031		0,114
	BLAI5	0,976	0,981	0,295	0,377	0,379	0,114
		0,986		0,295	0,381		0,114
	BLAI6	0,253	0,29	0,295	0,098	0,112	0,114
		0,327		0,295	0,126		0,114
	BLAI7	0,356	0,423	0,295	0,138	0,164	0,114
		0,490		0,295	0,189		0,114
	BBCar1	0,261	0,216	0,295	0,101	0,084	0,114
		0,171		0,295	0,066		0,114
	BBCar2	0,252	0,191	0,295	0,097	0,074	0,114
		0,130		0,295	0,050		0,114
	BBCar3	0,445	0,41	0,295	0,172	0,159	0,114
		0,375		0,295	0,145		0,114
	BBCar4	0,357	0,311	0,295	0,138	0,120	0,114
		0,265		0,295	0,102		0,114
	BBCar5	0,188	0,241	0,295	0,073	0,094	0,114
		0,294		0,295	0,114		0,114
	BBCar6	0,291	0,301	0,295	0,112	0,116	0,114
		0,311		0,295	0,120		0,114
	BBCar7	0,111	0,141	0,295	0,043	0,074	0,114
		0,171		0,295	0,105		0,114
	TSAb1	0,216	0,248	0,295	0,083	0,096	0,114
		0,280		0,295	0,108		0,114
	TSAb2	0,292	0,27	0,295	0,113	0,143	0,114
		0,248		0,295	0,173		0,114
	TSAb3	0,183	0,145	0,295	0,071	0,056	0,114
		0,107		0,295	0,041		0,114
	TSAb4	0,537	0,591	0,295	0,208	0,229	0,114
		0,645		0,295	0,249		0,114
	TSAb5	0,029	0,053	0,295	0,011	0,021	0,114
		0,077		0,295	0,030		0,114
	TSAb6	0,044	0,058	0,295	0,017	0,023	0,114
		0,072		0,295	0,028		0,114
	TSAb7	0,239	0,3	0,295	0,092	0,116	0,114
		0,361		0,295	0,140		0,114
	TSAb8	0,305	0,239	0,295	0,118	0,093	0,114
		0,173		0,295	0,067		0,114
	TSAb9	0,400	0,421	0,295	0,155	0,163	0,114
		0,442		0,295	0,171		0,114
	TCAb11	0,326	0,337	0,295	0,126	0,130	0,114
		0,348		0,295	0,134		0,114
	TCAb12	0,291	0,279	0,295	0,112	0,108	0,114
		0,267		0,295	0,103		0,114
	TCAb13	0,319	0,349	0,295	0,123	0,154	0,114
		0,379		0,295	0,185		0,114
	TCAb14	0,195	0,18	0,295	0,075	0,070	0,114
		0,165		0,295	0,064		0,114
	TCAb15	0,193	0,22	0,295	0,036	0,066	0,114
		0,247		0,295	0,095		0,114
	TCAb16	0,083	0,104	0,295	0,231	0,220	0,114
		0,125		0,295	0,209		0,114
	TCAb17	0,187	0,262	0,295	0,072	0,101	0,114
		0,337		0,295	0,130		0,114

3

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	TCAb18	0,169	0,237	0,274	0,173	0,243	0,280
		0,305		0,274	0,312		0,280
	TCAb21	0,162	0,142	0,274	0,166	0,248	0,280
		0,122		0,274	0,329		0,280
	TCAb22	0,265	0,263	0,274	0,271	0,269	0,280
		0,261		0,274	0,267		0,280
	TCAb23	0,123	0,109	0,274	0,126	0,112	0,280
		0,095		0,274	0,097		0,280
	TCAb24	0,320	0,264	0,274	0,327	0,270	0,280
		0,208		0,274	0,213		0,280
	TCAb25	0,240	0,21	0,274	0,245	0,215	0,280
		0,180		0,274	0,184		0,280
	TCAb26	0,252	0,296	0,274	0,258	0,303	0,280
		0,340		0,274	0,347		0,280
	TCAb27	0,185	0,241	0,274	0,189	0,247	0,280
		0,297		0,274	0,304		0,280
	TCAb28	0,281	0,299	0,274	0,287	0,291	0,280
		0,317		0,274	0,295		0,280
	TCAb29	0,056	0,12	0,274	0,057	0,123	0,280
		0,184		0,274	0,188		0,280
	TMAb31	0,255	0,235	0,274	0,261	0,241	0,280
		0,215		0,274	0,220		0,280
	TMAb32	0,170	0,203	0,274	0,174	0,208	0,280
		0,236		0,274	0,241		0,280
	TMAb33	0,307	0,245	0,274	0,314	0,251	0,280
		0,183		0,274	0,187		0,280
	TMAb34	0,083	0,098	0,274	0,085	0,100	0,280
		0,113		0,274	0,115		0,280
	TMAb35	0,168	0,213	0,274	0,172	0,218	0,280
		0,258		0,274	0,264		0,280
	TMAb36	0,199	0,256	0,274	0,253	0,287	0,280
		0,313		0,274	0,320		0,280
	TMAb37	0,212	0,166	0,274	0,217	0,170	0,280
		0,120		0,274	0,123		0,280
	TMAb38	0,373	0,457	0,274	0,381	0,467	0,280
		0,541		0,274	0,553		0,280
	ARCb1	0,149	0,131	0,274	0,152	0,134	0,280
		0,113		0,274	0,115		0,280
	ARCb2	0,276	0,317	0,274	0,180	0,273	0,280
		0,358		0,274	0,366		0,280
	ARCb3	0,263	0,206	0,274	0,269	0,211	0,280
		0,149		0,274	0,152		0,280
	ARCb4	0,207	0,242	0,274	0,212	0,248	0,280
		0,277		0,274	0,283		0,280
	ARCb5	0,199	0,171	0,274	0,203	0,124	0,280
		0,143		0,274	0,044		0,280
	ARCb6	0,266	0,246	0,274	0,272	0,252	0,280
		0,226		0,274	0,231		0,280
	ARCb7	0,181	0,186	0,274	0,185	0,190	0,280
		0,191		0,274	0,195		0,280
	SbAEV1	0,228	0,19	0,274	0,233	0,194	0,280
		0,152		0,274	0,155		0,280
	SbAEV2	0,264	0,201	0,274	0,270	0,206	0,280
		0,138		0,274	0,141		0,280
	SbAEV3	0,182	0,201	0,274	0,186	0,206	0,280
		0,220		0,274	0,225		0,280

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
4	SbAEV4	0,136	0,228	0,292	0,205	0,344	0,440
		0,320		0,292	0,482		0,440
	SbAEV5	0,142	0,113	0,292	0,214	0,171	0,440
		0,084		0,292	0,127		0,440
	SbAEV6	0,349	0,402	0,292	0,526	0,606	0,440
		0,455		0,292	0,686		0,440
	SbAEV7	0,198	0,245	0,292	0,512	0,476	0,440
		0,292		0,292	0,440		0,440
	SbAEV8	0,224	0,193	0,292	0,338	0,291	0,440
		0,162		0,292	0,244		0,440
	SbAEAb11	0,199	0,161	0,292	0,300	0,168	0,440
		0,123		0,292	0,035		0,440
	SbAEAb12	0,175	0,149	0,292	0,264	0,150	0,440
		0,123		0,292	0,035		0,440
	SbAEAb13	0,235	0,17	0,292	0,354	0,256	0,440
		0,105		0,292	0,158		0,440
	SbAEAb14	0,468	0,42	0,292	0,705	0,558	0,440
		0,372		0,292	0,410		0,440
	SbAEAb15	0,250	0,248	0,292	0,377	0,374	0,440
		0,246		0,292	0,371		0,440
	SbAEAb16	0,255	0,21	0,292	0,384	0,317	0,440
		0,165		0,292	0,249		0,440
	SbAEAb17	0,225	0,174	0,292	0,339	0,262	0,440
		0,123		0,292	0,185		0,440
	SbAEAb18	0,158	0,151	0,292	0,238	0,228	0,440
		0,144		0,292	0,217		0,440
	SbAEAb19	0,198	0,148	0,292	0,298	0,223	0,440
		0,098		0,292	0,148		0,440
	SbTAb21	0,275	0,2	0,292	0,414	0,452	0,440
		0,125		0,292	0,490		0,440
	SbTAb22	0,179	0,147	0,292	0,270	0,222	0,440
		0,115		0,292	0,173		0,440
	SbTAb23	0,238	0,196	0,292	0,359	0,296	0,440
		0,154		0,292	0,232		0,440
	SbTAb24	0,234	0,197	0,292	0,353	0,297	0,440
		0,160		0,292	0,241		0,440
	SbTAb25	0,187	0,192	0,292	0,282	0,290	0,440
		0,197		0,292	0,297		0,440
	SbTAb26	0,243	0,22	0,292	0,366	0,332	0,440
		0,197		0,292	0,297		0,440
SbTAb27	0,128	0,105	0,292	0,193	0,159	0,440	
	0,082		0,292	0,124		0,440	
SbV11	0,308	0,345	0,292	0,496	0,481	0,440	
	0,382		0,292	0,465		0,440	
SbV12	0,354	0,416	0,292	0,533	0,627	0,440	
	0,478		0,292	0,720		0,440	
SbV13	0,055	0,061	0,292	0,083	0,092	0,440	
	0,067		0,292	0,101		0,440	
SbV14	0,027	0,1	0,292	0,241	0,251	0,440	
	0,173		0,292	0,261		0,440	
SbV15	0,064	0,05	0,292	0,096	0,075	0,440	
	0,036		0,292	0,054		0,440	
SbV16	0,255	0,275	0,292	0,484	0,465	0,440	
	0,295		0,292	0,445		0,440	
SbV17	0,610	0,647	0,292	0,919	0,925	0,440	
	0,684		0,292	0,931		0,440	

5

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	SbV18	0,498	0,555	0,377	0,407	0,454	0,308
		0,612		0,377	0,500		0,308
	SbV19	0,463	0,531	0,377	0,378	0,434	0,308
		0,599		0,377	0,489		0,308
	SbZV11	0,591	0,609	0,377	0,483	0,498	0,308
		0,627		0,377	0,512		0,308
	SbZV12	0,342	0,344	0,377	0,279	0,281	0,308
		0,346		0,377	0,283		0,308
	SbZV13	0,425	0,484	0,377	0,347	0,396	0,308
		0,543		0,377	0,444		0,308
	SbZV14	0,227	0,272	0,377	0,185	0,222	0,308
		0,317		0,377	0,259		0,308
	SbZV15	0,413	0,418	0,377	0,501	0,424	0,308
		0,423		0,377	0,346		0,308
	SbZV16	0,047	0,04	0,377	0,038	0,033	0,308
		0,033		0,377	0,027		0,308
	SbZV17	0,039	0,03	0,377	0,032	0,025	0,308
		0,021		0,377	0,017		0,308
	SbZV18	0,096	0,082	0,377	0,078	0,067	0,308
		0,068		0,377	0,056		0,308
	MSAV21	0,463	0,469	0,377	0,378	0,383	0,308
		0,475		0,377	0,388		0,308
	MSAV22	0,264	0,237	0,377	0,297	0,235	0,308
		0,210		0,377	0,172		0,308
	MSAV23	0,098	0,08	0,377	0,080	0,066	0,308
		0,062		0,377	0,051		0,308
	MSAV24	0,470	0,483	0,377	0,384	0,395	0,308
		0,496		0,377	0,405		0,308
	MSAV25	0,133	0,174	0,377	0,109	0,143	0,308
		0,215		0,377	0,176		0,308
	MSAV26	0,545	0,579	0,377	0,445	0,473	0,308
		0,613		0,377	0,501		0,308
	MSAV27	0,137	0,138	0,377	0,112	0,113	0,308
		0,139		0,377	0,114		0,308
	MSAV28	0,719	0,66	0,377	0,587	0,539	0,308
		0,601		0,377	0,491		0,308
	MSAV29	0,058	0,127	0,377	0,047	0,104	0,308
		0,196		0,377	0,160		0,308
	MATV21	0,135	0,181	0,377	0,110	0,148	0,308
		0,227		0,377	0,185		0,308
	MATV22	0,450	0,484	0,377	0,368	0,396	0,308
		0,518		0,377	0,423		0,308
	MATV23	0,159	0,0905	0,377	0,130	0,074	0,308
		0,022		0,377	0,018		0,308
	MATV24	0,692	0,633	0,377	0,565	0,517	0,308
		0,574		0,377	0,469		0,308
	MATV25	0,168	0,131	0,377	0,137	0,107	0,308
		0,094		0,377	0,077		0,308
	MATV26	0,648	0,613	0,377	0,529	0,501	0,308
		0,578		0,377	0,472		0,308
	MATV27	0,412	0,4035	0,377	0,044	0,086	0,308
		0,395		0,377	0,127		0,308
	MATV28	0,391	0,466	0,377	0,319	0,381	0,308
		0,541		0,377	0,442		0,308
	MTV11	0,188	0,162	0,377	0,154	0,092	0,308
		0,136		0,377	0,029		0,308

6

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
6	MTV12	0,203	0,177	0,403	0,095	0,060	0,188
		0,151		0,403	0,024		0,188
	MTV13	0,231	0,245	0,403	0,108	0,068	0,188
		0,259		0,403	0,028		0,188
	MTV14	0,180	0,166	0,403	0,084	0,078	0,188
		0,152		0,403	0,071		0,188
	MTV15	0,410	0,364	0,403	0,191	0,170	0,188
		0,318		0,403	0,148		0,188
	MTV16	0,442	0,426	0,403	0,206	0,199	0,188
		0,410		0,403	0,191		0,188
	MTV17	0,638	0,6	0,403	0,298	0,280	0,188
		0,562		0,403	0,262		0,188
	MMV11	0,159	0,129	0,403	0,074	0,060	0,188
		0,099		0,403	0,046		0,188
	MMV12	0,120	0,069	0,403	0,056	0,032	0,188
		0,018		0,403	0,008		0,188
	MMV13	0,106	0,077	0,403	0,049	0,036	0,188
		0,048		0,403	0,022		0,188
	MMV14	0,123	0,192	0,403	0,057	0,090	0,188
		0,261		0,403	0,122		0,188
	MMV15	0,601	0,645	0,403	0,280	0,301	0,188
		0,689		0,403	0,321		0,188
	MMV16	0,588	0,551	0,403	0,274	0,257	0,188
		0,514		0,403	0,240		0,188
	MMV17	0,017	0,048	0,403	0,008	0,023	0,188
		0,079		0,403	0,037		0,188
	MMV18	0,031	0,044	0,403	0,014	0,021	0,188
		0,057		0,403	0,027		0,188
	MBV11	0,344	0,378	0,403	0,188	0,190	0,188
		0,412		0,403	0,192		0,188
	MBV12	0,664	0,646	0,403	0,310	0,302	0,188
		0,628		0,403	0,293		0,188
	MBV13	0,605	0,643	0,403	0,282	0,300	0,188
		0,681		0,403	0,318		0,188
	MBV14	0,565	0,614	0,403	0,264	0,287	0,188
		0,663		0,403	0,309		0,188
	MBV15	0,506	0,549	0,403	0,236	0,256	0,188
		0,592		0,403	0,276		0,188
	MBV16	0,315	0,333	0,403	0,147	0,156	0,188
		0,351		0,403	0,164		0,188
MBV17	0,451	0,467	0,403	0,210	0,218	0,188	
	0,483		0,403	0,225		0,188	
MBV18	0,431	0,504	0,403	0,201	0,235	0,188	
	0,577		0,403	0,269		0,188	
OOTAM1	0,446	0,465	0,403	0,205	0,192	0,188	
	0,484		0,403	0,179		0,188	
OOTAM2	0,049	0,029	0,403	0,023	0,014	0,188	
	0,009		0,403	0,004		0,188	
OOTAM3	0,038	0,02	0,403	0,018	0,010	0,188	
	0,002		0,403	0,001		0,188	
OOTAM4	0,484	0,544	0,403	0,226	0,254	0,188	
	0,604		0,403	0,282		0,188	
OOTAM5	0,737	0,688	0,403	0,344	0,321	0,188	
	0,639		0,403	0,298		0,188	
OOTAM6	0,290	0,334	0,403	0,093	0,135	0,188	
	0,378		0,403	0,176		0,188	

7

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	OOTAM7	0,534		0,120	0,954	0,954	0,205
		0,558	0,546	0,120	0,953		0,205
	OOTRG1	0,282		0,120	0,482	0,610	0,205
		0,432	0,357	0,120	0,738		0,205
	OOTRG2	0,080		0,120	0,137	0,130	0,205
		0,072	0,076	0,120	0,123		0,205
	OOTRG3	0,251		0,120	0,429	0,426	0,205
		0,247	0,249	0,120	0,422		0,205
	OOTRG4	0,509		0,120	0,870	0,917	0,205
		0,623	0,566	0,120	0,964		0,205
	OOTRG5	0,323		0,120	0,552	0,672	0,205
		0,463	0,393	0,120	0,791		0,205
	OOTRG6	0,352		0,120	0,601	0,468	0,205
		0,396	0,374	0,120	0,335		0,205
	OOTRG7	0,048		0,120	0,082	0,091	0,205
		0,058	0,053	0,120	0,099		0,205
	OOTRG8	0,426		0,120	0,728	0,694	0,205
		0,386	0,406	0,120	0,659		0,205
	OATR1	0,542		0,120	0,926	0,865	0,205
		0,470	0,506	0,120	0,803		0,205
	OATR2	0,655		0,120	0,919	0,900	0,205
		0,515	0,585	0,120	0,880		0,205
	OATR3	0,298		0,120	0,509	0,542	0,205
		0,336	0,317	0,120	0,574		0,205
	OATR4	0,071		0,120	0,121	0,149	0,205
		0,103	0,087	0,120	0,176		0,205
	OATR5	0,380		0,120	0,649	0,596	0,205
		0,318	0,349	0,120	0,543		0,205
	OATR6	0,045		0,120	0,077	0,135	0,205
		0,113	0,079	0,120	0,193		0,205
	OATR7	0,149		0,120	0,255	0,178	0,205
		0,059	0,104	0,120	0,101		0,205
	OATR8	0,408		0,120	0,697	0,682	0,205
		0,390	0,399	0,120	0,666		0,205
	OATAK1	0,115		0,120	0,196	0,149	0,205
		0,059	0,087	0,120	0,101		0,205
	OATAK2	0,188		0,120	0,321	0,376	0,205
		0,252	0,22	0,120	0,431		0,205
	OATAK3	0,449		0,120	0,767	0,839	0,205
		0,591	0,52	0,120	0,910		0,205
	OATAK4	0,339		0,120	0,579	0,714	0,205
		0,397	0,368	0,120	0,849		0,205
	OATAK5	0,359		0,120	0,313	0,310	0,205
		0,379	0,369	0,120	0,306		0,205
	OATAK6	0,388		0,120	0,663	0,802	0,205
		0,350	0,369	0,120	0,940		0,205
	OATAK7	0,490		0,120	0,837	0,914	0,205
		0,638	0,564	0,120	0,990		0,205
	OATAK8	0,014		0,120	0,024	0,014	0,205
		0,002	0,008	0,120	0,003		0,205
	BIAL1	0,324		0,120	0,554	0,539	0,205
		0,306	0,315	0,120	0,523		0,205
	BIAL2	0,649		0,120	0,909	0,944	0,205
		0,573	0,611	0,120	0,979		0,205
	BIAL3	0,232		0,120	0,396	0,407	0,205
		0,244	0,238	0,120	0,417		0,205

8

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	BIAL4	0,500		0,325	0,405		0,263
		0,514	0,507	0,325	0,254	0,330	0,263
	BIAL5	0,499		0,325	0,404		0,263
		0,365	0,432	0,325	0,295	0,350	0,263
	BIAL6	0,497		0,325	0,402		0,263
		0,461	0,479	0,325	0,535	0,469	0,263
	BIAL7	0,436		0,325	0,353		0,263
		0,500	0,468	0,325	0,405	0,379	0,263
	BIAL8	0,015		0,325	0,012		0,263
		0,043	0,029	0,325	0,035	0,024	0,263
	BIAL9	0,410		0,325	0,332		0,263
		0,376	0,393	0,325	0,304	0,318	0,263
	BIC1	0,392		0,325	0,317		0,263
		0,354	0,373	0,325	0,448	0,383	0,263
	BIC2	0,597		0,325	0,483		0,263
		0,703	0,65	0,325	0,569	0,526	0,263
	BIC3	0,333		0,325	0,350		0,263
		0,381	0,357	0,325	0,227	0,289	0,263
	BIC4	0,069		0,325	0,056		0,263
		0,157	0,113	0,325	0,127	0,092	0,263
	BIC5	0,328		0,325	0,265		0,263
		0,434	0,381	0,325	0,351	0,308	0,263
	BIC6	0,562		0,325	0,455		0,263
		0,510	0,536	0,325	0,413	0,434	0,263
	BIC7	0,265		0,325	0,214		0,263
		0,275	0,27	0,325	0,223	0,219	0,263
	BIC8	0,179		0,325	0,145		0,263
		0,191	0,185	0,325	0,155	0,150	0,263
	BTC1	0,152		0,325	0,123		0,263
		0,258	0,205	0,325	0,209	0,166	0,263
	BTC2	0,093		0,325	0,075		0,263
		0,199	0,146	0,325	0,161	0,118	0,263
	BTC3	0,490		0,325	0,397		0,263
		0,472	0,481	0,325	0,382	0,390	0,263
	BTC4	0,342		0,325	0,277		0,263
		0,194	0,268	0,325	0,157	0,217	0,263
	BTC5	0,547		0,325	0,443		0,263
		0,579	0,563	0,325	0,469	0,456	0,263
	BTC6	0,215		0,325	0,174		0,263
		0,273	0,244	0,325	0,302	0,238	0,263
	BTC7	0,355		0,325	0,287		0,263
		0,489	0,422	0,325	0,396	0,342	0,263
	BTC8	0,077		0,325	0,062		0,263
		0,049	0,063	0,325	0,040	0,051	0,263
	BTC9	0,014		0,325	0,011		0,263
		0,090	0,052	0,325	0,073	0,042	0,263
	BTDB1	0,636		0,325	0,515		0,263
		0,492	0,564	0,325	0,398	0,457	0,263
	BTDB2	0,549		0,325	0,444		0,263
		0,415	0,482	0,325	0,336	0,390	0,263
	BTDB3	0,420		0,325	0,340		0,263
		0,368	0,394	0,325	0,298	0,319	0,263
	BTDB4	0,267		0,325	0,216		0,263
		0,365	0,316	0,325	0,295	0,256	0,263
	BTDB5	0,282		0,325	0,309		0,263
		0,208	0,245	0,325	0,168	0,239	0,263

9

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	BTDB6	0,581	0,56	0,322	0,227	0,219	0,143
		0,539		0,322	0,211		0,143
	BTDB7	0,598	0,607	0,322	0,234	0,238	0,143
		0,616		0,322	0,241		0,143
	BTDB8	0,219	0,282	0,322	0,086	0,052	0,143
		0,345		0,322	0,018		0,143
	BTDB9	0,662	0,67	0,322	0,259	0,223	0,143
		0,678		0,322	0,187		0,143
	ATHBAB11	0,451	0,424	0,322	0,176	0,166	0,143
		0,397		0,322	0,155		0,143
	ATHBAB12	0,061	0,045	0,322	0,024	0,018	0,143
		0,029		0,322	0,011		0,143
	ATHBAB13	0,156	0,108	0,322	0,061	0,042	0,143
		0,060		0,322	0,023		0,143
	ATHBAB14	0,076	0,15	0,322	0,030	0,059	0,143
		0,224		0,322	0,088		0,143
	ATHBAB15	0,426	0,359	0,322	0,166	0,140	0,143
		0,292		0,322	0,114		0,143
	ATHBAB16	0,085	0,046	0,322	0,033	0,018	0,143
		0,007		0,322	0,003		0,143
	ATHBAB17	0,532	0,524	0,322	0,208	0,205	0,143
		0,516		0,322	0,202		0,143
	ATHBAB18	0,452	0,483	0,322	0,177	0,189	0,143
		0,514		0,322	0,201		0,143
	ATHBAB19	0,119	0,117	0,322	0,046	0,046	0,143
		0,115		0,322	0,045		0,143
	ATHBAB110	0,207	0,135	0,322	0,081	0,053	0,143
		0,063		0,322	0,025		0,143
	ATHBAB31	0,070	0,085	0,322	0,027	0,033	0,143
		0,100		0,322	0,039		0,143
	ATHBAB32	0,197	0,199	0,322	0,077	0,039	0,143
		0,201		0,322	0,000		0,143
	ATHBAB33	0,364	0,392	0,322	0,142	0,153	0,143
		0,420		0,322	0,164		0,143
	ATHBAB34	0,255	0,245	0,322	0,021	0,057	0,143
		0,235		0,322	0,092		0,143
	ATHBAB35	0,017	0,03	0,322	0,007	0,012	0,143
		0,043		0,322	0,017		0,143
	ATHBAB36	0,385	0,321	0,322	0,150	0,125	0,143
		0,257		0,322	0,100		0,143
	ATHBAB37	0,490	0,487	0,322	0,191	0,229	0,143
		0,484		0,322	0,267		0,143
	ATHBAB38	0,469	0,448	0,322	0,183	0,175	0,143
		0,427		0,322	0,167		0,143
	ATHBAB39	0,278	0,216	0,322	0,109	0,085	0,143
		0,154		0,322	0,060		0,143
	ATHBAB310	0,651	0,622	0,322	0,293	0,263	0,143
		0,593		0,322	0,232		0,143
	ATHBAB311	0,539	0,582	0,322	0,211	0,228	0,143
		0,625		0,322	0,244		0,143
	ATATAB31	0,574	0,586	0,322	0,224	0,229	0,143
		0,598		0,322	0,234		0,143
	ATATAB32	0,487	0,519	0,322	0,151	0,183	0,143
		0,551		0,322	0,215		0,143
	ATATAB33	0,052	0,077	0,322	0,020	0,030	0,143
		0,102		0,322	0,040		0,143

10

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	ATATAB34	0,237	0,235	0,380	0,020	0,072	0,207
		0,233		0,280	0,123		0,207
	ATATAB35	0,301	0,306	0,380	0,159	0,162	0,207
		0,311		0,380	0,165		0,207
	ATATAB36	0,452	0,453	0,380	0,239	0,240	0,207
		0,454		0,380	0,240		0,207
	ATATAB37	0,109	0,095	0,380	0,058	0,051	0,207
		0,081		0,380	0,043		0,207
	ATATAB38	0,326	0,266	0,380	0,173	0,141	0,207
		0,206		0,380	0,109		0,207
	ATATAB39	0,689	0,675	0,380	0,365	0,358	0,207
		0,661		0,380	0,350		0,207
	ATATAB310	0,034	0,039	0,380	0,018	0,021	0,207
		0,044		0,380	0,023		0,207
	RRA1	0,335	0,347	0,380	0,177	0,184	0,207
		0,359		0,380	0,190		0,207
	RRA2	0,536	0,595	0,380	0,284	0,315	0,207
		0,654		0,380	0,346		0,207
	RRA3	0,433	0,508	0,380	0,229	0,269	0,207
		0,583		0,380	0,309		0,207
	RRA4	0,332	0,366	0,380	0,176	0,194	0,207
		0,400		0,380	0,212		0,207
	RRA5	0,364	0,313	0,380	0,193	0,166	0,207
		0,262		0,380	0,139		0,207
	RRA6	0,235	0,298	0,380	0,261	0,243	0,207
		0,361		0,380	0,224		0,207
	RRA7	0,092	0,062	0,380	0,049	0,033	0,207
		0,032		0,380	0,017		0,207
	RRA8	0,480	0,44	0,380	0,254	0,233	0,207
		0,400		0,380	0,212		0,207
	RRDB1	0,413	0,349	0,380	0,219	0,185	0,207
		0,285		0,380	0,151		0,207
	RRDB2	0,113	0,118	0,380	0,060	0,063	0,207
		0,123		0,380	0,065		0,207
	RRDB3	0,508	0,581	0,380	0,269	0,308	0,207
		0,654		0,380	0,346		0,207
	RRDB4	0,644	0,601	0,380	0,341	0,292	0,207
		0,558		0,380	0,242		0,207
	RRDB5	0,588	0,6	0,380	0,311	0,318	0,207
		0,612		0,380	0,324		0,207
RRDB6	0,490	0,523	0,380	0,259	0,277	0,207	
	0,556		0,380	0,294		0,207	
RRDB7	0,177	0,169	0,380	0,094	0,090	0,207	
	0,161		0,380	0,085		0,207	
RRDB8	0,514	0,482	0,380	0,272	0,255	0,207	
	0,450		0,380	0,238		0,207	
RYDB1	0,625	0,619	0,380	0,331	0,328	0,207	
	0,613		0,380	0,324		0,207	
RYDB2	0,428	0,397	0,380	0,227	0,211	0,207	
	0,366		0,380	0,194		0,207	
RYDB3	0,181	0,128	0,380	0,096	0,068	0,207	
	0,075		0,380	0,040		0,207	
RYDB4	0,140	0,146	0,380	0,074	0,077	0,207	
	0,152		0,380	0,080		0,207	
RYDB5	0,244	0,214	0,380	0,129	0,087	0,207	
	0,184		0,380	0,044		0,207	

11

Plaque	Codification	ELISA I (AGRITEST serum)			ELISA (BIOREBA kit)		
		lecture	Moyenne	LSD 1	lecture	Moyenne	LSD2
	RYDB6	0,157	0,235	0,347	0,084	0,126	0,185
		0,313		0,347	0,167		0,185
	RYDB7	0,339	0,26	0,347	0,181	0,139	0,185
		0,181		0,347	0,096		0,185
	RYDB8	0,140	0,08	0,347	0,075	0,043	0,185
		0,020		0,347	0,011		0,185
	RYA1	0,223	0,236	0,347	0,119	0,126	0,185
		0,249		0,347	0,133		0,185
	RYA2	0,675	0,682	0,347	0,360	0,364	0,185
		0,689		0,347	0,367		0,185
	RYA3	0,254	0,24	0,347	0,135	0,181	0,185
		0,226		0,347	0,227		0,185
	RYA4	0,292	0,281	0,347	0,156	0,150	0,185
		0,270		0,347	0,144		0,185
	RYA5	0,572	0,64	0,347	0,305	0,341	0,185
		0,708		0,347	0,377		0,185
	RYA6	0,124	0,157	0,347	0,013	0,057	0,185
		0,190		0,347	0,101		0,185
	RYA7	0,615	0,566	0,347	0,328	0,302	0,185
		0,517		0,347	0,276		0,185
	RYA8	0,085	0,088	0,347	0,045	0,047	0,185
		0,091		0,347	0,049		0,185
	RYA9	0,022	0,084	0,347	0,012	0,045	0,185
		0,146		0,347	0,078		0,185
	RYAM1	0,661	0,659	0,347	0,352	0,351	0,185
		0,657		0,347	0,350		0,185
	RYAM2	0,455	0,424	0,347	0,296	0,253	0,185
		0,393		0,347	0,210		0,185
	RYAM3	0,550	0,578	0,347	0,293	0,308	0,185
		0,606		0,347	0,323		0,185
	RYAM4	0,019	0,05	0,347	0,010	0,027	0,185
		0,081		0,347	0,043		0,185
	RYAM5	0,117	0,067	0,347	0,062	0,036	0,185
		0,017		0,347	0,009		0,185
	RYAM6	0,287	0,288	0,347	0,260	0,207	0,185
		0,289		0,347	0,154		0,185
RYAM7	0,098	0,064	0,347	0,052	0,034	0,185	
	0,030		0,347	0,016		0,185	
RYAM8	0,362	0,375	0,347	0,300	0,254	0,185	
	0,388		0,347	0,207		0,185	

Résumé

Identification des virus impliqués dans la maladie du court noué de la vigne par des critères sérologiques et biochimiques

Cette étude s'inscrit dans le contexte de déterminer des virus impliqués dans la maladie du court noué de la vigne en Algérie. Un nombre total de 300 échantillons ont été prélevés de trois wilayas du centre et sept wilayas de l'ouest du pays, sur 12 cépages de la vigne. Les échantillons ont été sujets à deux tests sérologiques, un premier en utilisant un sérum monoclonal anti-GFLV, et le deuxième en utilisant un sérum anti-GFLV/ArMV. Les résultats obtenus ont montré que 47% des échantillons prélevés ont répondu positivement au premier sérum, alors que 45% ont réagi avec le deuxième. Plus que la moitié des échantillons prélevés des wilayas d'Oran et de Boumerdès et près de la moitié de ceux des wilayas de Mascara, Mostaganem et Relizane sont porteur d'au moins un des deux virus du court noué, GFLV ou l'ArMV.

Dans un deuxième temps, 16 extraits viraux ont été soumis à une SDS-PAGE pour déterminer le poids moléculaire de la protéine capsidique. Une bande protéique dont le poids moléculaire correspond à 55.559 Dalton a été identifiée. Ce poids moléculaire est proche de ceux des protéines capsidiques du GFLV (56.000 Dalton) et de l'ArMV (54.000 Dalton), un résultat confirmant celui des tests sérologiques et ceux des travaux antérieurs.

Mots clés : Vigne, court noué, GFLV, ArMV, ELISA, SDS-PAGE, protéine capsidique, Algérie.

Summary

Identification of viruses involved in the grapevine fanleaf disease by serological and biochemical criteria

This study is part of the context of searching the viruses that are involved in the grapevine fanleaf disease in Algeria. A total of 300 samples were collected from three provinces of the center and seven provinces of the west, over 12 varieties of the grapevine. The samples were subjected to two serological tests, a first using a monoclonal serum anti-GFLV, and the second using an anti-GFLV/ArMV serum. The results obtained has shown that 47% of samples responded positively to the first serum, whereas 45% reacted with the second. More than half of the samples taken from of Oran and Boumerdès and nearly half of ones taken from Mascara, Mostaganem and Relizane are carrying at least one of the two major viruses involved in the disease (GFLV ; ArMV).

In a second step, 16 viral extracts were subjected to SDS-PAGE to determine the molecular weight of the coat protein. A protein band with molecular weight of 55 559 Dalton was identified. This moléculaire weight is close to that of the GFLV coat protein (56.000 Dalton) and ArMV coat protein (54,000 Dalton), a result confirming that of the serological tests and those of the prior works.

Key words : grapevine, fanleaf, GFLV, ArMV, ELISA, SDS-PAGE, coat protein, Algeria.

ملخص

التعرف على الفيروسات المتسببة في مرض الأوراق المروحية لدالية العنب عن طريق معايير مصلية وبيوكيميائية

هذه الدراسة هي جزء من سياق البحث عن الفيروسات المتسببة في مرض الأوراق المروحية لدالية العنب في الجزائر. تم أخذ ما مجموعه 300 عينة من 10 ولايات جزائرية، ثلاث من الوسط وسبعة من الغرب، على 12 نوعا من العنب. أخضعت العينات لاختبارين مصليين، الأول باستخدام مصل وحيد النسيلة المضادة للـGFLV، والثانية باستخدام مصل مضاد للـ GFLV / ArMV. وأظهرت النتائج أن 47% من العينات ردت بإيجابية مع المصل الأول، في حين كان 45% منها تفاعل مع المصل الثاني. أكثر من نصف العينات التي أخذت من كل من وهران وبومرداس و ما يقارب النصف من تلك التي أخذت من كل من معسكر، مستغانم وغليزان تحمل على الأقل واحد من الفيروسات المتسببة في مرض الأوراق المروحية عند العنب GFLV او ArMV.

في الخطوة الثانية، تم عرض 16 مستخرجا فيروسيا إلى SDS-PAGE لتحديد الوزن الجزيئي لبروتين قفيصة الفيروس. تم التعرف على بروتين ظهرت بوزن جزيئي يساوي 55.559 دالتون. هذا الوزن قريب من وزن قفيصة بروتين GFLV (56.000 دالتون) و ArMV (54.000 دالتون)، وهذه النتيجة تؤكد صحة النتائج المحصل عليها من الاختبارات المصلية في دراستنا وتلك من الأعمال السابقة.

الكلمات المفتاحية: دالية العنب، مرض الأوراق المروحية، GFLV، ArMV، الإختبار المصلي، الإختبار البيوكيميائي، بروتين القفيصة، الجزائر.