

École Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach, Alger
École Doctorale de Biotechnologies Végétales
Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biotechnologies Végétales
Option: Biotechnologies Végétales

Etude du complexe viral associé à l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie

Par : LEHAD AREZKI

Directrice de Thèse : M^{me} Louanchi M. (Maître de conférences à l'ENSA)
2011-2012

Présidente M^{me} Khelifi M. (Professeur à l'ENSA) Examineurs : M^r Bouznad Z. (Professeur à l'ENSA)
M^{lle} Krimi Z. (Professeur à USD Blida) M^{me} Aitoauda M. (Chargé de cours à l'ENSA)

Table des matières

Remerciement . .	5
Liste des abréviations . .	6
Résumé . .	7
Summary . .	8
ص غ ل م ل ا . .	9
I. Introduction générale . .	10
II. Analyse bibliographique . .	11
II.1. Données générales sur la vigne . .	11
II.1.1 Description botanique de la vigne . .	11
II.1.2. Origine et développement de la viticulture . .	12
II.1.3. La viticulture en Algérie . .	12
II.2. Les maladies de la vigne . .	13
II.2.1. Les maladies fongiques. . .	13
II.2.2. Les maladies bactériennes . .	13
II.2.3. Les maladies à phytoplasmes . .	14
II.2.4. Les Maladies à viroïdes et similaires . .	14
II.2.5. Les maladies à virus de la vigne . .	15
II.3. Maladie de l'enroulement de la vigne . .	16
II.3.1. Symptômes de la maladie d'enroulement foliaire de la vigne . .	17
II.3.2. Transmission . .	18
II.3.3. Les méthodes de diagnostic des virus de la vigne . .	19
II.3.4. Méthodes de lutte contre les virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne . .	20
II.4. Description de la famille des <i>Closteroviridae</i> . .	21
II.4.1. Structure taxonomique de la famille des <i>Closteroviridae</i> . .	21
II.4.2. Propriétés des virus de l'enroulement foliaire de la vigne . .	23
III. Matériel et méthodes . .	27
III.1. Matériel végétal . .	27
III.1.1. Zones d'échantillonnage . .	27
III.1.2. Méthode d'échantillonnage . .	27
III. 4. Les tests immunoenzymatiques . .	28
III. 4. 1. Séra utilisés pour le criblage sérologique . .	28
III.4.2. Préparation des échantillons . .	28
III.4.3. Protocoles utilisés . .	28
III.4.4. Interprétation des résultats . .	29
III.4.5. Détermination du pourcentage d'infection . .	29
III.5. Identification des virus GLRaV-3 et 5 par reverse transcription-PCR . .	30
III.5.1. Extraction des acides nucléiques totaux . .	31
III.5.2. Obtention de l'ADN complémentaire . .	31
III.5.3. Amplification par PCR des ADNc . .	31
III.5.4. Révélation et visualisation des bandes . .	32

IV. Résultats et Discussions . . .	34
IV.1. Observations des symptômes dans les vignobles prospectés . . .	34
IV.1.1. Etat général des vignobles. . .	34
IV.1.2. Collecte des échantillons. . .	34
IV.1.3 Discussion . . .	36
IV.2. Analyses des tests immunoenzymatiques . . .	37
IV.2.1. Réactions sérologiques . . .	37
IV.2.2 Prédominance des virus de l'enroulement de la vigne . . .	40
IV.3. Détection des virus GLRaV 3 et 5 par RT-PCR. . .	44
IV.3.1. Résultats obtenus de la RT-PCR . . .	45
IV.4.2. Discussion . . .	46
IV.4. Comparaison entre le test sérologique et la RT-PCR . . .	46
IV.4.1. Analyse des résultats obtenus avec les deux méthodes . . .	46
IV.4.2. Discussion . . .	48
V. Conclusion Générale. . .	50
Références Bibliographiques . . .	51
Annexe . . .	58
Annexe 1 : Liste des cépages de table autorisés en Algérie (Journal officiel n°7 du 28 janvier 2009) . . .	58
Annexe 2 : Liste des cépages de raisin de séchage autorisés en Algérie (source : journal officiel n° 7 du 28 janvier 2009) . . .	59
Annexe 3 : Liste des cépages de cuve autorisés en Algérie (source : Journal officiel n° 7 du 28 janvier 2009) . . .	60
Annexe 4 : Tampon du test sérologique . . .	60
Annexe 5 : Tampon RT-PCR . . .	61
Annexe 6 : Tableau de lecture des densités optique de chaque échantillon testé par ELISA (première microplaque) . . .	63
Annexe 7 : Tableau de lecture des densités optique de chaque échantillon testé par ELISA (deuxième microplaque) . . .	64

Remerciement

Je tien à remercier Dr Naïma Mahfoudhi pour m'avoir accueilli au sein de sont laboratoire ainsi que toutes sont équipe de recherche (Ines, Manal et Sabrine) qui ont énormément contribué à la réalisation de ce travail.

Je tien à remercier ma directrice de thèse pour avoir accepté de m'encadrer et pour sont aide précieuse et sa patience.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au professeur Khelifi M. pour me faire l'honneur de présider ce jury. Je remercie également le professeur Bouznad Z., le professeur Krimi Z. et Mme Aitouada pour avoir accepté d'examiner et de juger ce mémoire.

Je remercie le directeur de l'Institut Nationale de la recherche agronomique de Tunis pour m'avoir accueillis dans sont institution.

Je remercie Mr Lakroum, directeur de la station d'Ain Témouchent de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne de m'avoir accueilli dans sa station.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à Fateh Sahraoui, ingénieur à la station de Ain Témouchent de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne.

Je remercie Mr Yahiaou, directeur de la station de Mascara de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne de m'avoir accueilli dans sa station.

Je remercie également tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

- AFCVd: l'Apple Fruit Crinkle Viroid.
- BYV : Beet Yellow Virus.
- BYSV : Beet Yellow Stunt Virus.
- BPYV: Beet Pseudo-Yellows Virus.
- CEVd : le Citrus Exocortis Viroid.
- CTV :Citrus Tristeza Virus.
- CPm : Coat Protein.
- ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.
- GYSVd : Grapevine Yellow Speckle Viroid.
- GVA : Grappevine Virus A.
- GVB : Grappevine Virus B.
- GFkV : Grapevine Fleck Virus.
- HSVd : Hop Stunt Viroid.
- HSP70h : Heat Shock Protein homologue.
- LIYV : Lettuce Infectious Yellows Virus.
- OEPP : European and Mediterranean Plant Protection Organization.
- ORF : Open Reading Frame.
- RT-PCR: Retro Transcription – Polymerase Chain Reaction.
- SPCSV : Sweet potato Chlorotic Stunt Virus.

Résumé

L'enroulement foliaire de la vigne est une maladie complexe présente dans tous les vignobles à travers le monde. A ce jour, dix virus de la famille des Closteroviridae sont connus comme associés à cette maladie. Nous avons réalisé une étude pour déterminer les virus associées à l'enroulement foliaire de la vigne présents en Algérie ainsi que leur prédominance. L'étude a portée sur 100 échantillons de vigne collectés dans le centre et l'ouest de l'Algérie sur différents cépages de vigne testés par un test immunoenzymatique (DAS-ELISA) et RT-PCR. Les résultats du test immunoenzymatique obtenus montrent la présence du GLRaV-1, -2, -3, -5 et -6 avec une confirmation claire de la présence des GLRaV-3 et -5 par RT-PCR. Notre étude permet également de confirmer la prédominance du GLRaV-3 et dans une moindre mesure du GLRaV-2.

Mots clé: Virus, Vigne, GLRaV, ELISA, RT-PCR

Summary

The grapevine leafroll virus is a complex disease present in all of the vineyards around the world. Up to now, ten of viruses among the family of Closteroviridae are known as associated with this disease. We conducted a study to determine the virus associated with the grapevine leafroll disease present in Algeria and their predominance. The study focused on 100 samples collected in vineyard from central and western of Algeria on different grape varieties tested by an immunosorbent assay (DAS-ELISA) and RT-PCR. Immunoassay test results obtained show the presence of GLRaV-1, 2, 3, 5 and 6 with a clear confirmation of the presence of GLRaV-3 and -5 by RT-PCR. Our study also confirms the dominance of GLRaV-3 and to a lesser extent of GLRaV-2.

Keywords: Virus, Grapevine, GLRaV, ELISA, RT-PCR

ص خ ل م ا

اللائقاف الورقي للكرم مرض معقد موجود عبر جميع أنحاء العالم. إلى يومنا هذا، عشرة فيروسات من عائلة Closteroviridae نسبت لهذا المرض. فمنا بإنجاز دراسة حول الفيروسات المنسب لللائقاف الورقي للكرم الموجودة في الجزائر ونسبت انتشارها. أجريت الدراسة على 100 عينة من العنب أخذت من المنطقة الوسطى و الشرقية للجزائر على أصناف مختلفة أجريت عليها تحاليل بالتقنية ELISA و RT-PCR. النتائج المحصل عليها بالتقنية ELISA تدل على وجود 6 و 5، -3، -2، GLRaV-1 مع إبتك واضح لوجود 5-3 GLRaV بالتقنية RT-PCR. تحاليلنا سمحت لنا أيضا إبتك انتشار GLRaV-3 وبشكل نسبة لـ GLRaV-2.

الكلمات الرئيسية: الفيروسات، شجرة العنب، GLRaV، ELISA، RT - PCR

I. Introduction générale

La vigne occupe une place stratégique dans l'agriculture de nombreux pays. En Algérie, les conditions pédoclimatiques sont favorables à son développement et depuis une décennie, plusieurs régions, à vocation viticole, font l'objet d'un programme de soutien. Actuellement, la vigne occupe une superficie de 69.110 hectares avec une production de 492.525 tonnes et un rendement de 71 quintaux/ hectare. Il est à noter qu'elle constitue une culture stratégique d'exportation puisqu'elle occupe la 8^e place des exportations hors hydrocarbures et a généré en 2009, plus de 2 millions de dollars (FAOSTAT, 2010).

Ce nouvel essor a engendré des importations de plants et de cépages nouveaux contribuant à l'apparition de problèmes phytosanitaires. Concernant les maladies, les travaux réalisés montrent l'existence d'un grand nombre d'agents pathogènes signalés dans le monde et qui sont en partie responsables des pertes de rendements. Les maladies les plus importantes sont d'origine fongique comme des dépérissements de type Esca et Eutypiose (Berraf, 2009 ; Berraf, 2010), des pourritures grises causées par *Botrytis cinerea* (Louanchi *et al.*, 2010) ainsi que des infections virales avec notamment les maladies du court noué et de l'enroulement foliaire (Lehad, 2008).

Le complexe viral de l'enroulement foliaire de la vigne est dû à des virus appartenant à la famille des *Closteroviridae* et sont dénommés Grapevine Leaf Roll associated Virus (GLRaV). C'est la maladie de la vigne la plus répandue à travers le monde. Elle cause de lourdes pertes en raison de la baisse de rendements et de la qualité des fruits. Dix virus associés à cette maladie ont été signalés (Constable *et al.*, 2011). Certains de ces virus sont reconnus officiellement comme espèces appartenant au genre des *Ampelovirus* (GLRaV-1, -3, -4, -5, -6 et le -9) ou des *Closterovirus* (GLRaV-2) (Martelli, 2005). Les autres types viraux (GLRaV-7, -Pr et -De) restent dans l'attente d'une attribution taxonomique officielle (Sabanadzovic *et al.* 2010).

Les types GLRaV-1 et -3 sont les virus qui présentent l'incidence la plus élevée en Europe et dans le bassin méditerranéen (Sforza *et al.*, 2003) et ont été retrouvés en Algérie (Lehad, 2008; Aitouada *et al.*, 2010).

L'objectif de cette présente étude est d'approfondir nos connaissances sur la maladie de l'enroulement foliaire. En particulier, il s'agira de déterminer la présence des différents virus qui sont associés à cette maladie dans des régions viticoles du Centre et de l'Ouest de l'Algérie et leur importance sur différents cépages.

L'identification des différents types viraux sera réalisée en utilisant les méthodes suivantes :

- Les tests immunoenzymatiques de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) en utilisant des sérums polyclonaux dirigés contre les types viraux GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6.
- Les méthodes moléculaires par RT-PCR (Retro Transcription – Polymerase Chain Reaction) en utilisant des amorces permettant d'identifier les différents virus de la famille des *Closteroviridae*.

II. Analyse bibliographique

II.1. Données générales sur la vigne

II.1.1 Description botanique de la vigne

Les vignes sont des lianes de la famille des *Vitaceae*. Ce sont des plantes du genre *Vitis* largement cultivées pour leur fruit en grappes. Ce sont des arbrisseaux grimpants qui s'attachent aux supports par des vrilles. Les tiges ligneuses, appelées sarments, sont taillées en culture. Les feuilles à nervure palmée comportent cinq lobes principaux plus ou moins découpés, et sont en forme de cœur à la base. Elles connaissent une importante polymorphie selon les cépages et espèces (Figure 1).



Figure 1. Morphologie de la vigne

<http://www.techno-science.net>

Les fleurs pentamères, sont très petites, verdâtres et regroupées en grappes composées. Les fruits mûrs sont des baies de forme et de couleur variables. Ils sont blancs, jaunâtres, violets ou noirs, et presque toujours noirs à l'état sauvage.

II.1.2. Origine et développement de la viticulture

La vigne est cultivée pour ses baies qui peuvent être consommées fraîches, sèches ou bien on y extrait le jus qui sera fermenté. L'homme a commencé à fabriquer du vin dès 8000 av. J.C., et les premières évidences ont été montrées par la découverte de restes de vin dans des vases en argile datant de 5500 av. J.C., en Iran (Unwin, 1996). L'origine de cette culture, désormais plantée à travers le monde, serait probablement dans le sud Caucase, maintenant occupé par le nord-ouest de la Turquie, le nord de l'Irak, l'Azerbaïdjan et la Géorgie (Creasy et al., 2009).

La superficie viticole dans le monde est de 7.792.000 hectares. Les pays viticoles les plus importants dans le monde sont l'Italie, la Chine, les Etats Unis d'Amérique, l'Espagne et la France avec respectivement une production de 7.793.300, 7.235.656, 6.639.920, 5.951.580 et 5.678.500 tonnes. L'Algérie occupe la 23^e place avec une production de 492.525 tonnes (FAOSTAT, 2010).

II.1.3. La viticulture en Algérie

Bien que la culture de la vigne soit connue depuis l'antiquité, la viticulture en Algérie a connu un grand essor durant la période coloniale où les superficies des vignobles sont passées de 23.000 à 123.000 hectares entre 1880 et 1896. Dès lors, les progrès furent prodigieux car à cette époque, les vignobles en France étaient ravagés par le phylloxera et il existait une forte demande en vin. Ainsi, la viticulture a connu une croissance très rapide et en 1938, la vigne de cuve occupait 400.000 hectares (Isnard, 1947). Cependant, après l'indépendance, la viticulture en Algérie a nettement diminué du fait de facteurs politico-économiques et pédoclimatiques. A partir de 2000, un programme de soutien a permis de redynamiser cette culture et en 2009, les superficies étaient estimées à 69.110 hectares. Les exportations de vin pour l'année 2007, ont représenté le 8^e produit hors hydrocarbures exporté par l'Algérie, avec un revenu de 2.145.000 \$ (FAOSTAT, 2010).

II.1.3.1. Superficie, production et rendement de la vigne en Algérie

Le tableau 1 indique que les superficies viticoles ont considérablement augmenté. Cependant, les rendements restent très fluctuants. Cette constatation indique que l'augmentation des superficies ne peut être efficace sans un suivi de l'évolution des rendements par un contrôle phytosanitaire et technique de la culture. Aussi, la majorité des cépages utilisés en Algérie sont très sensibles aux maladies fongiques qui sont considérées comme le facteur saisonnier le plus important.

Tableau 1. Superficies, production et rendement de la vigne en Algérie

Année	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
Superficies	51450	54200	60465	62532	69633	75187	76754	73739	69110
Production (t)	196159	234397	277968	283900	334021	398018	244999	401992	492525
Rendement (Hg/ Ha)	38126	43246	45971	45400	47968	52937	31920	54515	71266

(Source: <http://faostat.fao.org/>)

II.1.3.2. Les cépages de vigne cultivés en Algérie

Le patrimoine variétal est classé en trois catégories: les variétés autochtones, les variétés classiques et les variétés nouvelles. En fonction de l'époque de maturité, on distingue les cépages précoces (maturité: 2^e semaine de juillet), les cépages de saisons (maturité: fin juillet à mi-septembre) et les cépages tardifs (maturité après la mi-septembre). En fonction de la couleur du raisin, on distingue les raisins blancs, les raisins roses et les raisins noirs

Les différents cépages de table et de cuve autorisés en Algérie ont été définis par un arrêté ministériel en 2009 qui fixe la liste provisoire des cépages de vigne autorisées à la production et à la commercialisation (Annexes 1, 2 et 3). Ainsi, les homologations portent sur 40 variétés de vigne de table, 31 variétés de vigne de cuve et 5 variétés de séchage, ainsi que de 10 variétés de porte-greffes.

II.2. Les maladies de la vigne

II.2.1. Les maladies fongiques.

Les maladies fongiques de la vigne causent chaque année des pertes en rendement qui sont souvent difficiles à estimer à cause de leur variabilité d'une année à une autre. Ainsi en pathologie viticole on rencontre un nombre important de champignons qui attaquent la vigne à différents niveaux du cep (Dubos, 1999) (Tableau 2).

Tableau 2. Les maladies fongiques de la vigne

Maladie	Agent causal
Oïdium	<i>Erysiphe necator</i>
Mildiou	<i>Plasmopara viticola</i> (Berk. Et Curl.)Berl. et de Toni.
Pourriture grise	<i>Botrytis cinerea</i> (<i>Teleomorphe Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Wetzl)
Excoriose	<i>Cryptosporella viticola</i> Shear
Black rot	<i>Guignardia bidwellii</i> Viala et Ravaz
Rougeot parasitaire ou Brenner	<i>Pseudopezicula tracheiphila</i> (Müll.- Thurg.) Korf et Zhuang
Anthraxnose	<i>Elsinoe ampelina</i> (de Bary) Shear
Coïtre ou rot blanc	<i>Charrinia diplodiella</i> Viala et Ravaz
Eutypiose	<i>Eutypa lata</i> (Pers: Fr.) Tul.
Syndrome de l'esca	Complexe de champignon: <i>Phellinus ignarius</i> , <i>Stereum hirsutum</i>
Pourridiés	<i>Armillaria mellea</i> (Valh) Kummer (armilaire)
	<i>Rosellinia necatrix</i> (Hart.) Berl. (<i>pourridié laineux</i>)
	<i>Roesleria hypogea</i> Thum.et Pass(<i>pourridié morille</i>)
Pied noir	<i>Nectria destructans</i>

(Source: Dubos, 1999)

À l'échelle mondiale, les maladies les plus préoccupantes sont causées par *Botrytis cinerea*, *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* (Creasy et al., 2009).

II.2.2. Les maladies bactériennes

Bien qu'elles ne soient pas très nombreuses, les bactéries causent des dégâts importants sur la vigne. 6 genres ont été signalés: *Agrobacterium*, *Xylophilus*, *Xylella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Enterobacter* (Boudon-Padieu et al., 2000) (Tableau 3).

Tableau 3. Les maladies bactériennes de la vigne

Maladie	Agent causal
Nécrose bactérienne	<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panagopoulos) Willems et al.
Crown-Gall	<i>Agrobacterium vitis</i> Ophel. et Kerr.
Crown-Gall	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Smith et Townsend) conn.
Maladie de Pierce	<i>Xylella fastidiosa</i> Wells et al.

(Source: Boudon-Padieu et al., 2000)

Les principales maladies bactériennes de la vigne sont la maladie de Pierce causée par *Xylella fastidiosa* (Varela et al., 2001) retrouvée en Amérique du Nord et du Sud ainsi qu'en Europe (Boubals, 1989 ; Berisha et al., 1998) (Tableau 3).

II.2.3. Les maladies à phytoplasmes

Les phytoplasmes sont des parasites de nombreux végétaux. Les maladies causées chez la vigne peuvent se propager de deux manières : dans les conditions naturelles, par des insectes vecteurs (Tableau 4) ou par le greffage de bois de porte-greffe ou greffon infecté.

Tableau 4. Les maladies à phytoplasmes de la vigne

Maladie	Vecteur
Flavescence dorée	<i>Scaphoideus titanus</i> Ball.
Bois noir	<i>Hyalosthes obsoletus</i> Sign
Vergilbungskrankheit	<i>Hyalosthes obsoletus</i> Sign

(Source: Boudon-Padieu et al., 2000)

Ces maladies se caractérisent par un certain nombre de symptômes :

- Décoloration du limbe chez les cépages blancs et rougissement chez les rouges
- Enroulement des feuilles vers le dessous et disposition du feuillage "en tuiles".
- Défaut d'aoûtement, avec un port pleureur des pampres restant mous.
- Dessèchement des inflorescences responsables de la perte de récolte.

La flavescence dorée est la maladie la plus connue et la plus grave. Elle est considérée comme maladie de quarantaine (Boudon-Padieu et al., 2000). Cette dernière ainsi que la maladie du bois noir causent des pertes importantes sur vigne et plusieurs protocoles de détection ont été mis en œuvre pour leur diagnostic (Weintraub et al. 2010).

II.2.4. Les Maladies à viroïdes et similaires

Les maladies à viroïdes ont été découvertes pour la première fois sur vigne en 1984. Actuellement 6 maladies à viroïdes affectant de façon naturelle la vigne sont répertoriées sur la base d'analyse de séquences nucléotidiques (Tableau 5).

Tableau 5. Les viroïdes de la vigne

Viroïde	Distribution Géographique	Auteurs
<i>Hop stunt (HSVd)</i>	Chine, Turquie, Répartition dans le monde entier probable	Hadidi <i>et al.</i> , 2003; Gazelet et Önelge, 2003, Martelli, 1993
<i>Grapevine yellow speckle 1(GYSVd-1)</i>	Chine, Turquie, Tunisie, Répartition dans le monde entier probable	Martelli, 1993; Elleuch <i>et al.</i> , 2002; Hadidi <i>et al.</i> , 2003, Gazelet et Önelge, 2003
<i>Grapevine yellow speckle 2(GYSVd-2)</i>	Chine, Turquie, Répartition dans le monde entier probable	Martelli, 1993, Hadidi <i>et al.</i> , 2003; Gazelet et Önelge, 2003
<i>Citrus exocortis A (CEVd)</i>	Espagne, Australie	Martelli, 1993, Hadidi <i>et al.</i> , 2003; Gazelet et Önelge, 2003
<i>Australian grapevine viroid (AGVd)</i>	Australie, Tunisie	Martelli, 1993; Elleuch <i>et al.</i> , 2002
<i>Grapevine viroid - cucumber (GVd-c)</i>	Etats Unis (Californie)	Martelli, 1993

En Chine, le *Hop stunt viroid* (HSVd), l'*Apple fruit crinkle viroid* (AFCVd), le *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd) et le *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ont été identifiés (Hadidi *et al.*, 2003). Deux viroïdes ont été retrouvés en Tunisie, l'*Australian Grapevine Viroid* et le *Grapevine Yellow Speckle Viroid* (type 1) (Elleuch *et al.*, 2002). Le *Citrus exocortis viroid-grapevine*, les *Grapevine yellow speckle viroid-1* et *-2* et le *Hop stunt viroid-grapevine* ont été identifiés en Turquie (Gazel et Önelge, 2003).

II.2.5. Les maladies à virus de la vigne

Environ 34 virus de la vigne ont été isolés et caractérisés (Martelli, 1993). Le tableau 6 présente les virus les plus rencontrés.

Tableau 6. Distribution géographique et vecteurs des principaux virus de la vigne

Virus	Distribution géographique	Vecteurs
Virus transmissibles par vecteurs		
Alfalfa mosaic virus	Europe centrale, Europe de l'Est	Aphides
Arabis mosaic, Nepovirus	Suisse, Allemagne, Hongrie, Italie, France, Yougoslavie, Bulgarie, Japon	<i>Xiphinema diversicaudatum</i>
Broadbean wilt, Fabavirus	Bulgarie, Afrique du Sud	Aphides
Grapevine chrome mosaic Nepovirus	Hongrie, Yougoslavie	inconnu
Grapevine fanleaf Nepovirus	Réandu à travers le monde	<i>Xiphinema index</i> , <i>Xiphinema italiae</i>
Grapevine line pattern Ilarvirus	Hongrie	inconnu
Grapevine Closterovirus A	Europe et Méditerranée	<i>Planococcus ficus</i> , <i>Planococcus citri</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i>
Tobacco mosaic Tobamovirus	Allemagne, Bulgarie, Italie, Yougoslavie, ancienne Russie, Etats Unis	inconnu
Tobacco ringspot ,Nepovirus	Etats Unis	<i>Xiphinema americanum</i>
virus transmissible par vecteur mais non transmissible mécaniquement		
Grapevine leafroll-associated Closterovirus I	Europe et Méditerranée, Etats Unis	inconnu
Grapevine leafroll-associated Closterovirus III	Europe et Méditerranée	inconnu
Grapevine leafroll-associated Closterovirus III	Europe et Méditerranée, Etats Unis	<i>Planococcus ficus</i> , <i>Pseudococcus longispinus</i>
Grapevine leafroll-associated Closterovirus IV	Etats Unis, Méditerranée	inconnu
Grapevine leafroll-associated Closterovirus V	Méditerranée	inconnu

(Source: Brunt et al., 1996)

Tous n'ont pas la même importance économique ni la même répartition. Cependant certains causent des pertes importantes tant du point de vue du rendement que de celui de la qualité. Ainsi le virus de l'enroulement et le virus du court-noué sont les plus à craindre et les plus largement répandus dans les vignobles du monde (Bovey et al., 1980). Selon le virus en cause, la vigne peut ne pas présenter de symptômes visibles, mais la perte générale de la vigueur du cep et de la production de fruits de qualité peut être associée aux maladies à virus les plus importants (Creasy et al., 2009).

II.3. Maladie de l'enroulement de la vigne

L'enroulement foliaire de la vigne est considéré comme la maladie virale la plus répandue dans le monde et cause des pertes annuelles considérables (Sabanadzovic et al. 2010). D'après les travaux de Goheen (1970). Elle a été décrite pour la première fois en 1850 en

Allemagne et en France mais sa nature virale n'a été mise en évidence qu'en 1935 par Scheu (Ling, 1995).

Le complexe viral de l'enroulement de la vigne est dû à des virus appartenant à la famille des *Closteroviridae*. Certains de ces virus ont été reconnus officiellement comme espèces et ont été assignés à un genre spécifique. Ainsi, les *Ampelovirus* se subdivisent en 2 sous groupes, le sous groupe I qui comprend les GLRaV-4, -5, -6 et -9 et le sous groupe II qui regroupe les GLRaV-1 et -3 (Varvara *et al.*, 2009). Le GLRaV-2 appartient au groupe des *Closterovirus*. Le GLRaV-7 appartient à la famille des *Closteroviridae* et des études récentes montrent qu'il est étroitement lié au genre des *Crinivirus* (Constable *et al.* 2011).

Deux autres espèces (GLRaV-Pr et -D), sérologiquement distinctes des autres virus, n'ont pas encore été attribuées à un genre de la famille des *Closteroviridae* mais il semblerait qu'elles pourraient appartenir au genre des *Ampelovirus* (Constable *et al.*, 2011). Ils restent cependant dans l'attente d'une attribution taxonomique officielle.

II.3.1. Symptômes de la maladie d'enroulement foliaire de la vigne

Les symptômes de la maladie consistent en un enroulement des limbes des feuilles vers l'intérieur ainsi que des modifications pigmentaires des feuilles (Photo 1). Ces symptômes sont décelables dès le mois de juin pour les ceps les plus touchés, mais la période la plus favorable pour les observations est l'automne.



Figure 2: Symptôme d'enroulement foliaire de la vigne sur cépage rouge (*Cabernet sauvignon*) et sur cépage blanc (*Chardonnay*)

Source: (Jarugula S., 2010)

Il existe une différence de symptôme entre les cépages noir et les cépages blancs. Ainsi, chez les cépages noir (pinot meunier, pinot noir) on distingue un rougissement du limbe des feuilles et les nervures restent vertes (Photo 2). Pour les cépages blancs (riesling, chardonnay), les feuilles jaunissent et les nervures présentent une couleur vert foncé.

Les symptômes associés à la présence du GLRAV-2 sur vigne ne sont pas clairs. En effet, ce virus a été initialement considéré comme agent de l'enroulement de la vigne, puisqu'il fut découvert pour la première fois sur des ceps présentant un symptôme d'enroulement (Gugerli et *al.*, 1984). Il est aussi impliqué dans l'incompatibilité au greffage et dans le dépérissement de la vigne (Meng et *al.*, 2005).

II.3.2. Transmission

Il existe deux modes de transmission du virus : par multiplication de matériel végétal infecté et par un organisme vecteur. Les *Ampelovirus* associés à la maladie de l'enroulement foliaire sont transmis par greffage et par plusieurs espèces de coccidies et de pseudococcidies (Martelli et Boudon-Padieu 2006). Quelques espèces du genre des *Closterovirus* sont transmissibles par inoculation mécanique mais difficilement. Cependant, aucune espèce appartenant aux genres des *Ampelovirus* et des *Crinivirus* n'est transmissible mécaniquement. Chez les espèces à propagation végétale, la dissémination est due en premier lieu au matériel de multiplication végétatif infecté. La transmission par graine est très rare.

Suivant le genre, les vecteurs peuvent être des aphides, des mouches blanches (*Bemisia* et *Trialeurodes*), des pseudococcidés (*Pseudococcus*, *Planococcus*, *Phenacoccus*, *Saccharicoccus* et *Dysmicoccus*) et des coccidés (*Pulvinaria*, *Neopulvinaria* et *Parthenolecanium*). La transmission est semi-persistante (Fauquet et *al.*, 2005). Le tableau 7 indique la répartition géographique et les vecteurs pour chacun des virus associés au complexe de l'enroulement de la vigne.

Tableau 7. Vecteurs et distribution géographique du complexe de l'enroulement

	Virus	Répartition	Vecteurs
1.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 1 (Ampelovirus, GLRaV1)</i>	Mondiale	<i>Heliococcus bohemicus, Neopulvinaria innumerabilis, Phenacoccus aceris, Parthenolecanium corni</i>
2.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 2 (Closterovirus, GLRaV2)</i>	Mondiale	Inconnu
3.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus, GLRaV3)</i>	Mondiale	<i>Planococcus citri, Planococcus ficus, Pseudococcus affinis, Pseudococcus calceolariae, Pseudococcus comstocki, Pseudococcus longispinus, Pseudococcus maritimus, Pseudococcus viburni, Pulvinaria vitis</i>
4.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 4 (Ampelovirus, GLRaV4)</i>	Méditerranée Etats-Unis	Inconnu
5.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 5 (Ampelovirus, GLRaV5)</i>	Méditerranée Etats-Unis	<i>Pseudococcus longispinus</i>
6.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 6 (Ampelovirus, GLRaV6)</i>	Europe	Inconnu
7.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV 7)</i>	Italie, Grèce, Albanie	Inconnu
8.	<i>Grapevine leafroll-associated virus 9 (Ampelovirus, GLRaV 9)</i>	Etats-Unis	Inconnu

(Source: bulletin OEPP, 2008)

Le rôle des pseudococcidés comme vecteur de la maladie a été suggéré par l'apparition de symptômes d'enroulement foliaire sur des ceps de LN33 et des plants de *V. vinifera* sous serre en présence de *Pseudococcus longispinus* (Roscliglione *et al.*, 1983; Tanne *et al.*, 1989). D'autres travaux ont montré que *Planococcus ficus* est capable de transmettre le symptôme d'enroulement foliaire et le GLRaV-3 d'un cep de vigne à un autre (Roscliglione et Gugerli, 1989; Engelbrecht et Kasdorf, 1990).

Le nombre de pseudococcidés et de coccidés qui ont été cités comme vecteurs des Ampelovirus (GLRaV1, 3, 5) a considérablement augmenté. Cependant, aucun vecteur n'a été identifié pour les autres virus provisoirement inclus dans ce genre (GLRaV-4, 6, 7 et 9). On ne connaît aussi aucun vecteur pour le GLRaV-2. (Cabaleiro, 2009). Les virus appartenant au genre des *Ampelovirus* sont semi persistants (Fauquet *et al.*, 2005). Sforza *et al.* (2003), ont démontré que les pseudococcidés, *Heliococcus bohemicus* et *Phenacoccus aceris*, et la coccidie *Parthenolecanium corni* pouvait transmettre le GLRaV-1 sous des conditions expérimentales. Cependant d'autres travaux menés par Zorloni *et al.* (2006) en Italie ont montré que *H. bohemicus* ne transmettait pas le GLRaV-1.

II.3.3. Les méthodes de diagnostic des virus de la vigne

II.3.3.1. Utilisation de plantes indicatrices du genre *Vitis*

L'utilisation de plantes indicatrices du genre *Vitis* reste une étape obligatoire du programme de certification de la vigne. Elle ne peut pas être exclue en raison de l'existence de certaines maladies (enroulement et complexe du bois strié) qui ne peuvent être identifiées que sur des hôtes ligneux différentiels (OEPP, 2008). Il existe également une méthode de micro greffage *in vitro* qui donne un taux de réussite de 75 à 85% (Pathirana et al., 2005). Cependant cette technique ne peut être utilisée pour la détection de certains virus associés à l'enroulement foliaire qui n'extériorisent pas de symptômes visibles.

II.3.3.2. Méthodes sérologiques

L'utilisation des tests immunoenzymatiques sont recommandées pour le *Grapevine fanleaf virus* et les autres népovirus européens dans les zones où ils sont présents, ainsi que pour les *Closteroviridae* (GLRaV 1 à 9), les *Vitivirus* (GVA et GVB) et les *Maculavirus* (GFKV) pour lesquels on dispose d'antisérums. Les antigènes pour les tests ELISA peuvent provenir des bourgeons, des racines, des feuilles ou de copeaux de bois de vigne. Les copeaux de bois présentent des avantages car ils peuvent être utilisés toute l'année, sans perte apparente d'efficacité liée aux variations saisonnières du taux d'antigènes dans les organes végétatifs. Ils sont beaucoup plus fiables pour l'identification des virus de la famille des *Closteroviridae* sur les porte-greffes américains, en particulier *Vitis rupestris* et ses hybrides. Le test ELISA peut être considéré comme un complément aux autres méthodes de diagnostic, sans toutefois pouvoir les remplacer. Il peut servir notamment pour un criblage préliminaire.

II.3.3.3. Méthodes moléculaires

L'utilisation de l'amplification de séquences d'ADN spécifiques par PCR (Polymerase Chain Reaction) pour le diagnostic des maladies virales tend à se répandre en raison de sa plus grande sensibilité par rapport aux méthodes biologiques et aux tests ELISA ainsi que de sa facilité d'utilisation. La PCR est particulièrement utile si les antisérums pour les tests ELISA ne sont pas disponibles ou ne conviennent pas. Il a été montré que l'utilisation de la RT-PCR peut augmenter (d'au moins 10%) le nombre d'échantillons positifs, surtout pour la détection du GFLV et du GFKV (Faggioli et La Starza, 2006). Pour cette raison l'utilisation de la RT-PCR, dans des réactions simples ou multiplexes, est fortement suggérée pour les échantillons présentant un résultat négatif au test ELISA. Cette procédure réduit le nombre de greffes sur plantes indicatrices, avec pour conséquence que quasiment 90% des clones candidats donneront des résultats négatifs par les méthodes biologiques. Des protocoles de RT-PCR multiplexe (mRT-PCR) ont été mis au point pour détecter plusieurs virus en une seule réaction, permettant ainsi un diagnostic de routine rapide, fiable et de bonne efficacité-coût (Faggioli et La Starza, 2006). Cependant, elle ne semble pas adéquate pour la détection des virus de la vigne lorsque qu'on utilise certaines amorces car le produit de la RT-PCR de plusieurs virus peut être similaire et empêche de distinguer entre les virus (Gambino et Gribaudo, 2006).

Routh et al. (1998) ont obtenu à l'aide d'amorces dégénérées, des amplifiats d'une séquence du gène HSP70h sur des échantillons infectés par le GLRaV-4 alors qu'aucune amplification n'a pu être observée sur des échantillons sains. Le séquençage de cette séquence a permis la mise au point d'amorces spécifiques pour la détection du GLRaV-4.

II.3.4. Méthodes de lutte contre les virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne

La lutte contre les maladies virales des végétaux passe par des stratégies de lutte préventive pour éviter la propagation du virus par le biais de vecteurs et le contrôle de la qualité du matériel végétal par la mise en point d'un programme de sélection sanitaire. Ainsi, l'utilisation de matériel végétal sain est le premier moyen de lutte et aussi le plus efficace.

II.3.4.1. Thermothérapie

Tous les agents infectieux de la vigne connus pour être transmissibles par greffage, à l'exception des viroïdes, peuvent être éliminés par thermothérapie, mais avec un niveau d'efficacité variable. Quelle que soit la méthode de thermothérapie utilisée, le traitement du matériel doit être séparé de la fin des tests virologiques par un intervalle suffisant pour éviter les résultats faux négatifs. L'utilisation de la technique de RT-PCR aidera à sélectionner le matériel pour lequel l'amélioration sanitaire a réussi, en évitant les faux négatifs dus à la très faible concentration de virus après le traitement.

II.3.4.2. Culture *in vitro* de méristèmes

Infante et Fiore (2009) ont pu éliminer le GLRaV-2 sur des ceps de la variété Red Globe en combinant la thermothérapie et la culture *in vitro*. La thermothérapie, réalisée à 38°C, a permis de maintenir les boutures en vie mais a aussi provoqué une forte réduction du taux de réplication du virus. Il en a résulté la formation de nouvelles boutures indemnes de virus. Des explants, excisés de l'extrémité de la nouvelle bouture sont cultivés *in vitro*. D'autres méthodes portent sur la combinaison de la culture *in vitro* et des méthodes d'électrothérapie en utilisant un champ électrique continu.

II.4. Description de la famille des *Closteroviridae*

La maladie de l'enroulement foliaire de la vigne ainsi que les virus lui étant associés sont présents dans tous les vignobles du monde, sur les espèces de vigne méditerranéennes et américaines. Cependant chez les espèces américaines, les ceps infectés ne présentent pas de symptômes d'enroulement. L'importation de ce matériel vers l'Europe, comme source de porte greffe pour la prévention du phylloxera, a causé une diffusion de ces virus. Durant le 20^e siècle, ils ont été introduits d'Europe vers d'autres régions où la viticulture était émergente (Cabaleiro, 2009).

II.4.1. Structure taxonomique de la famille des *Closteroviridae*

Les virus de l'enroulement foliaire appartiennent à la famille des *Closteroviridae*. Lors de la mise en place de cette famille en 1998, elle fut divisée en deux genres : les *Crinivirus* et les *Closterovirus* dont la différence réside dans le fait que l'ARN viral est bipartite pour les *Crinivirus* et monopartite pour les *Closterovirus* (Martelli et al., 2002). Par la suite, il a été proposé de classer les *Closteroviridae* en fonction du type d'insecte vecteur plutôt que du nombre d'ARN génomique (Karasev, 2000). Les arguments avancés sont d'ordre, biologiques à savoir le type de vecteur et, moléculaires à savoir les gènes des protéines structurales. Cela a permis la révision de la structure taxonomique de la famille des *Closteroviridae*. En particulier, les espèces transmissibles par cochenille ont été séparées

du genre des *Closterovirus* et ont été mis dans un nouveau genre appelé *Ampelovirus* (*Ampelos*, en grecque: vigne).

Sur la base des comparaisons de séquences du gène HSP70h (heat shock protein homologue) impliqué dans le mouvement cellule à cellule du virus, cette famille contient actuellement 3 genres: *Closterovirus*, *Crinivirus* et *Ampelovirus* (figure 2) (Fauquet et al., 2005).

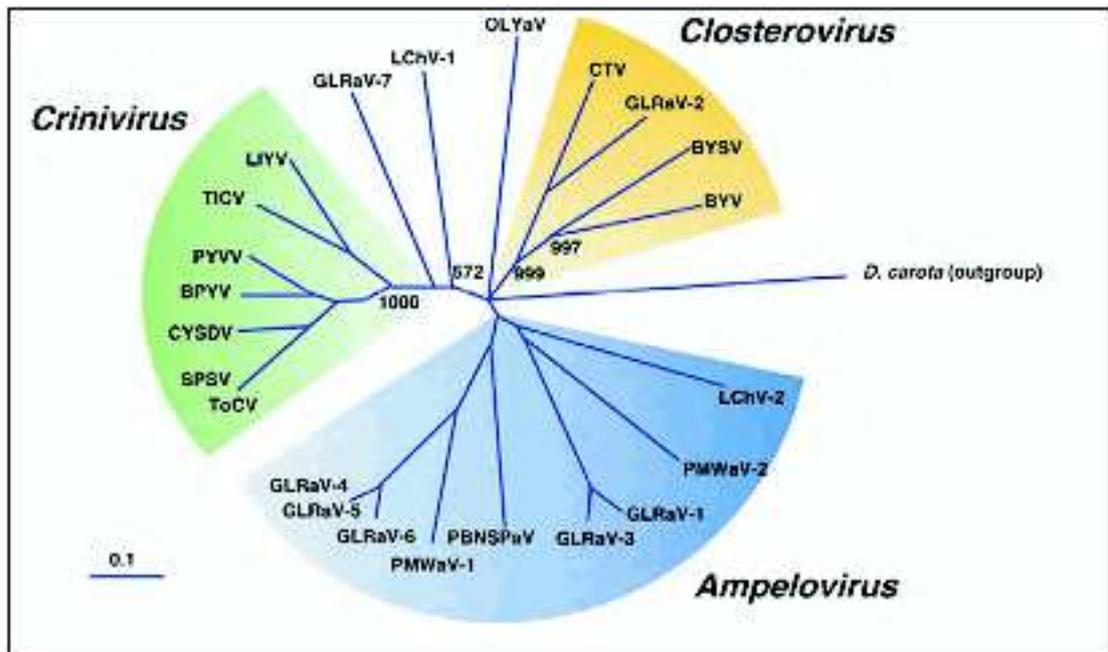


Figure 3. Arbre phylogénétique de la famille Closteroviridae

Source: Fauquet et al. 2005

Il existerait actuellement 10 virus (Martelli et Boudon-Padieu, 2006; Constable et al., 2011). Le GLRaV-2 du genre des *Closterovirus*, les GLRaV-1, 3, 4, 5, 6, 9 du genre des *Ampelovirus* et le GLRaV-7 n'a été assigné à aucun genre (Martelli et al, 2002; Constable et al., 2011). Deux nouveaux *Ampelovirus* sérologiquement différents des autres virus de l'enroulement foliaire de la vigne ont été détectés sur des cépages grecs, le GLRaV-Pr isolé par Prevezaniko et le GLRaV-De isolé par Debina (Varvara et al., 2009) (figure 3)

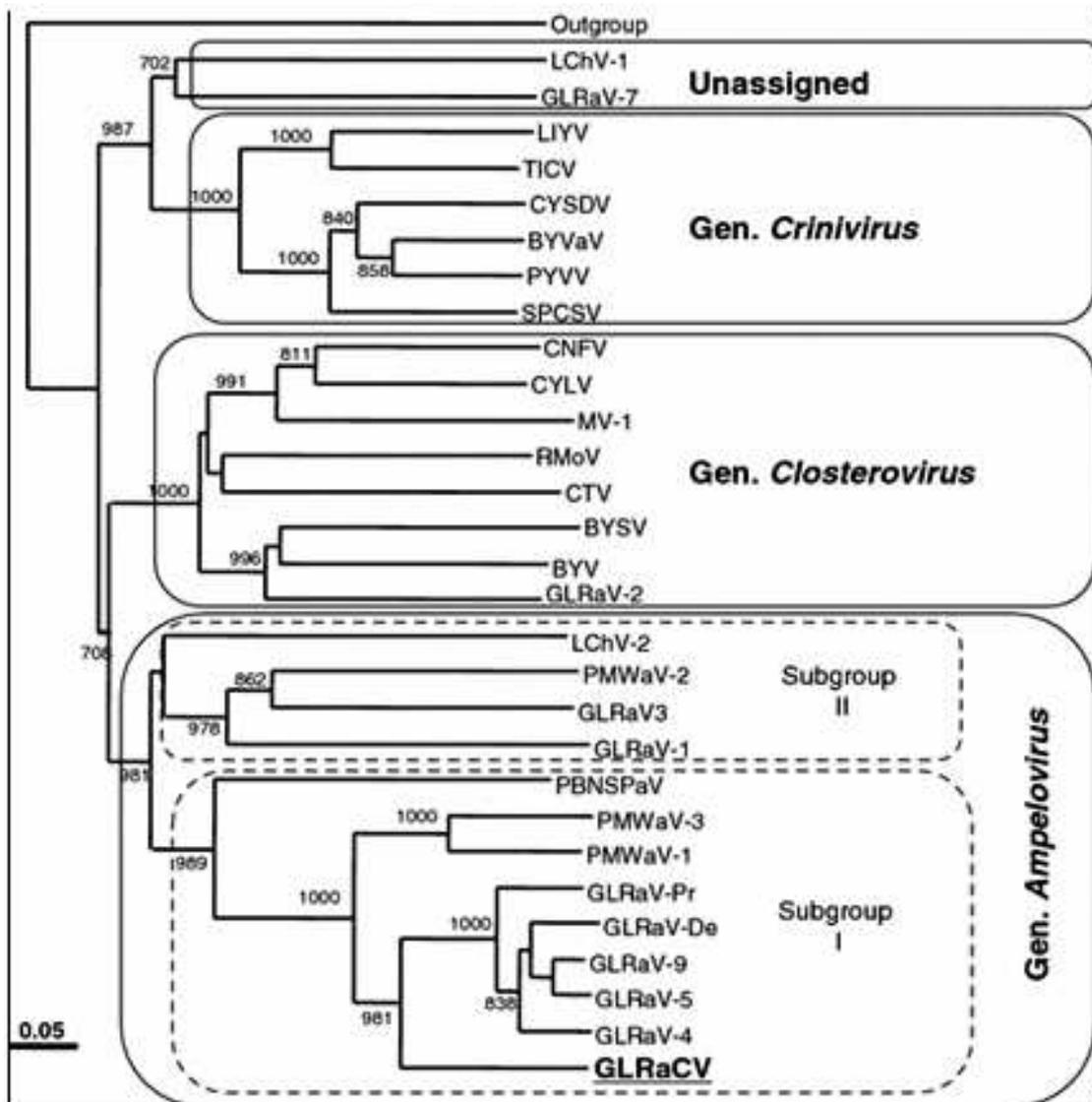


Figure 4: Arbre phylogénique de la famille des Closteroviridae construit par comparaison de séquence du gène HSP70h

(source: Sabanadzovic et al. 2010)

II.4.2. Propriétés des virus de l'enroulement foliaire de la vigne

II.4.2.1. Propriétés physicochimiques

Ces virus présentent un très long filament flexueux de symétrie hélicoïdale long de 1200-2000 nm, comme le montre la figure 4 pour des virus appartenant au genre des *Closterovirus*. Les particules de tous les membres des *Ampelovirus* et des *Crinivirus* ont la même morphologie. Les sous-unités capsidiales de 22 kDa entourent l'ARN, sauf à une extrémité où des sous-unités de 24 kDa forment une zone distincte (Astier et al., 2001).

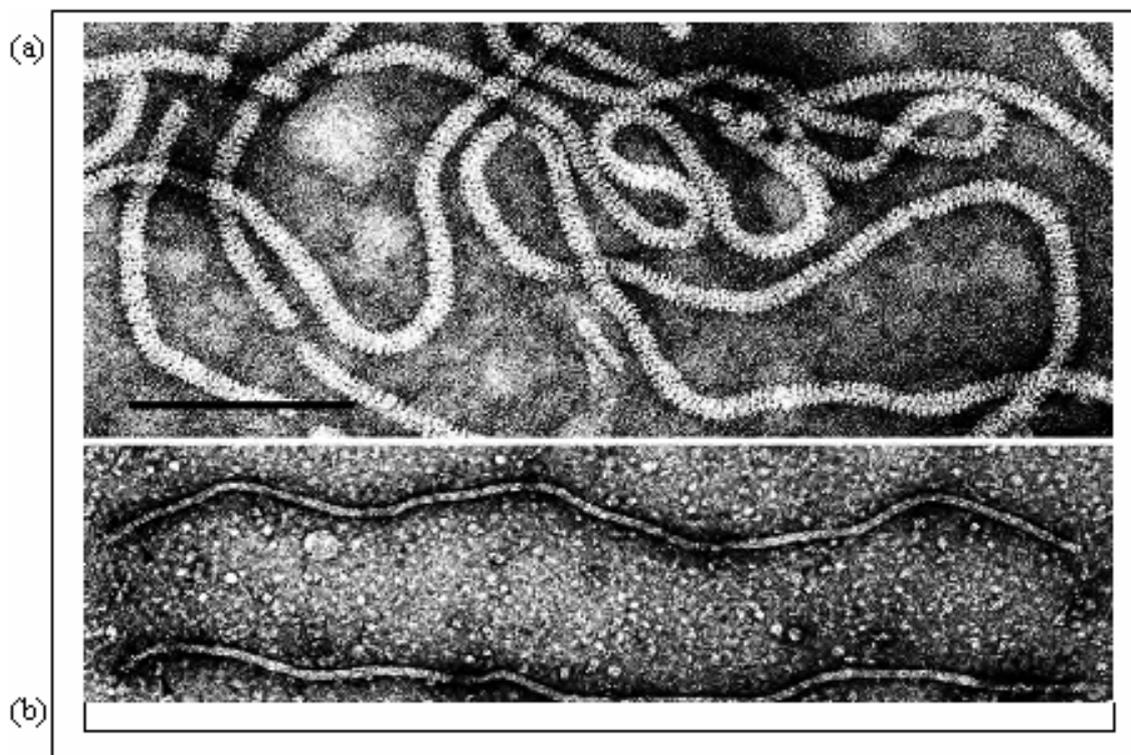


Figure 5: Observation au microscope électronique des particules virales de la famille des Closteroviridae, genre Closterovirus

(Source: Fauquet et al., 2005)

(a) Citrus Tristeza Virus (CTV); Beet Yellow Virus (BYV)

Chez les *Ampelovirus* (GLRAV1, 3, 4, 5, 6 et 9), la taille du virion varie entre 1400 et 2200 nm et contient une seule molécule d'ARN monocaténaire positive linéaire de 16,9 à 19,5 Kb. Les sous-unités capsidiales sont les plus élevées avec 35-39 KDa (Martelli et al., 2002).

Pour les *Crinivirus* (genre de virus proche du GLRaV-7), les virions ont une taille inférieure à 1000 nm et sont bipartites (650-850 et 700-900 nm). Le génome est un ARN monocaténaire linéaire positif de 15,3 – 19 Kb, divisé en 2 molécules qui sont nécessaires à l'infection et encapsidées séparément. Le poids moléculaire des sous-unités capsidiales majeures varient entre 28 et 33 KDa et celui des sous-unités mineures est supérieur de 80 KDa (Martelli et al., 2002).

II.4.2.2. Organisation génomique de la famille des *Closteroviridae*

II.4.2.2.1. Organisation génomique des *Closterovirus*

L'espèce type du genre des *Closterovirus* est le *Beet Yellow virus*. La protéine capsidiale majeure (CP) (22-25 kDa) enveloppe la plus grande partie du virion et la protéine capsidiale mineure (CPm) (24-27 kDa) enveloppe l'une des extrémités de la particule. Il y a trois types d'organisation de la structure génomique dans ce genre représenté par le *Beet yellow virus* (BYV) (Figure 5), le *Citrus tristeza virus* (CTV) et le *Beet yellow stunt virus* (BYSV). L'organisation génomique de BYSV est une organisation intermédiaire entre le CTV et le BYV, suggérant une évolution en trois stades des *Closterovirus*.

A l'inverse des *Ampelovirus* et des *Crinivirus*, la protéine capsidiale mineure est en amont de la protéine capsidiale majeure (Martelli *et al.*, 2002). Le génome du BYV contient 9 ORF, chacun codant pour un type de protéine qui rentre dans le mouvement de cellule en cellule, comme la protéine HSP70, impliquée également dans l'assemblage du virion (Fauquet *et al.*, 2005). La protéine p20 n'est pas requise dans le mouvement de cellule à cellule mais est indispensable pour le transport dans le système vasculaire (Peremyslov *et al.*, 2004).

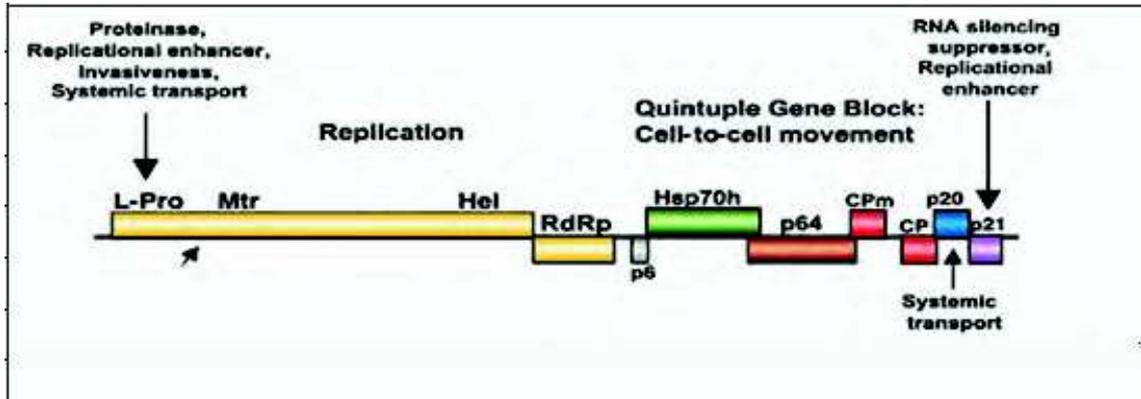


Figure 6 : Organisation génomique du Beet Yellow Virus (BYV)

(Fauquet *et al.*, 2005)

L.Pro, leader proteinase ; Mtr, méthyltransférase ; Hel, hélicase ; RdRp, RNA polymérase ; HSP70h, heat shock protein homologue ; CP, Coat protein ; CPm, minor capsid protein

II.4.2.2.2 Organisation génomique des *Ampelovirus*

L'espèce type des *Ampelovirus* est le GLRaV-3. Il existe deux types de structure génomique dans ce genre qui est représenté par le GLRaV-3 (Figure 6) et le LChV-2. Le génome du GLRaV-3 contient 12 ORFs (Fauquet *et al.*, 2005).

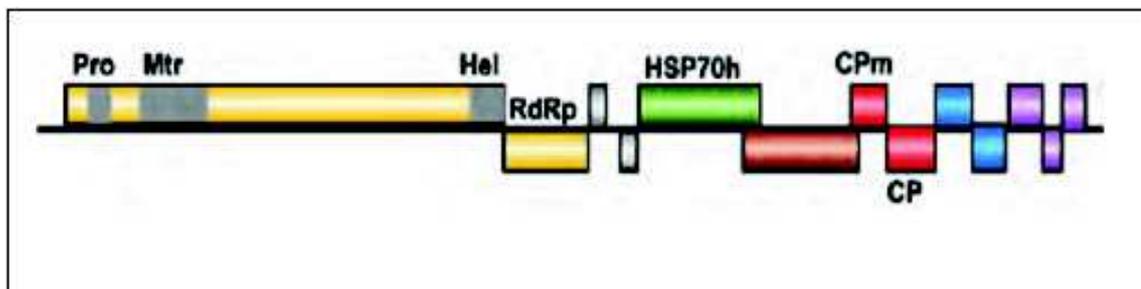


Figure 7 : Organisation génomique du GLRaV-3, espèce type des *Ampelovirus*

(Fauquet *et al.*, 2005)

Pro, papain-like protease; Mtr; Hel; RdRp; HSP70h; CP; CPm.

II.4.2.2.3. Organisation génomique des *Crinivirus*

Le nombre et la position relative des ORF varient en fonction du génome et ou de l'espèce virale (Hull Roger, 2002). Le génome du LIYV (espèce type des *Crinivirus*) présente 3 ORF au niveau de l'ARN 1 et 7 ORF au niveau de l'ARN 2 (Klaassen *et al.*, 1995). Le génome du

LIYVest divisé en deux structures qui sont indispensables pour l'établissement de l'infection (Figure 7). Il existe trois types de structure génomique dans ce genre qui sont représentés par le LIYV, le SPCSVet le BPYV (Martelli et al., 2002).

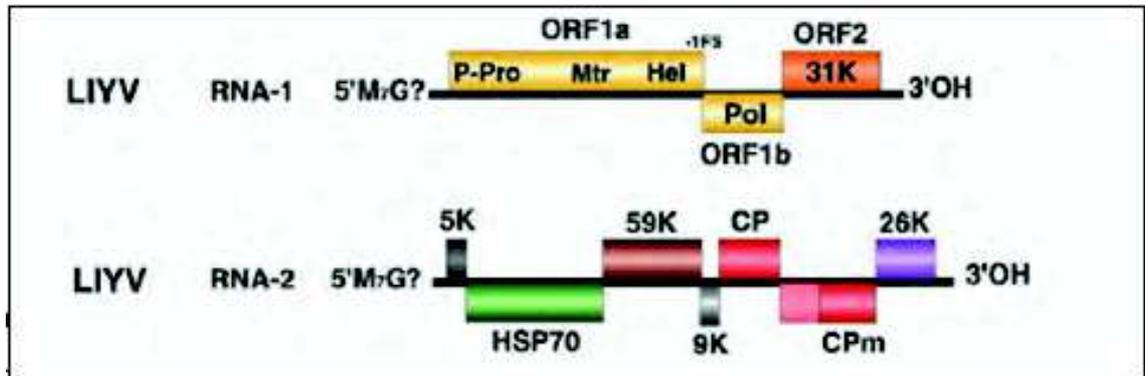


Figure8. Organisation génomique du LIYV

Pro, papain-like protease; Mtr ; Hel ; POL, RNA polymerase ; HSP70h ; CP ; CPm (Fauquet et al., 2005)

II.4.2.3. Propriétés biologiques

La gamme d'hôtes naturelle et expérimentale des espèces virales des *Closteroviridae* est réduite. Les symptômes de la maladie vont du type jaunissement (à savoir, enroulement, jaunissement ou rougissement des feuilles, fruit de petite taille et muris tardivement. L'infection est systémique, mais elle est souvent limitée au phloème, qui peut se nécroser à des degrés divers (Fauquet et al., 2005). Ling et al. (2008) rapportent que le GLRaV-2 est capable d'infecter le tabac (*Nicotiana benthamiana*).

II.4.2.4. Effet cytopathologique et leur impact sur les paramètres physiologiques

Les virions sont souvent trouvés dans le phloème, occasionnellement dans le mésophile et l'épiderme. Les modifications ultrastructurales sont dues à une prolifération membranaire, vésicularisation des chloroplastes, dégénérescence et vésicularisation des mitochondries et une formation d'inclusion. Celle-ci est composée par les agrégats des virions ou des vésicules membranaires, ou bien la combinaison des deux (Fauquet et al., 2005). Ainsi, Hritsov et Abracheva (2001) rapportent une réduction de la concentration en chlorophylle et en carotène sur des ceps de vigne (variété Cabernet Sauvignon) infectés par le GLRaV-3 et une réduction du système racinaire de 18%. Credi et Badini (1996) rapportent que la croissance de trois porte greffes (420 A, Kober 5BB et Teleki 5A) est réduit de 43 à 90% lorsqu'ils sont infectés par des virus associés incluant le GLRAV-3.

Lee et Martin (2008) rapportent que les plants de vigne infectés par le GLRaV présentent une diminution de la taille et du poids des grappes ainsi qu'une diminution de la taille des baies. Cependant, Cabaleiro et al. (1999) rapporte que les baies les plus larges sont relevées sur ceps de 'Albarino' infectés par le GLRAV-2. Lee et al. (2009) ont montré que les GLRaV-2 et -3 n'ont pas d'effet significatif sur la composition en acide organique et sucre simple des baies du 'Pinot noir'.

III. Matériel et méthodes

Indépendamment des prospections, les méthodes utilisées ont été réalisées dans le cadre d'un stage au Laboratoire de Protection des végétaux de l'INRAT (Tunisie) sous la supervision de Dr. Mahfoudhi.

III.1. Matériel végétal

III.1.1. Zones d'échantillonnage

Les échantillons prélevés au cours de cette étude proviennent de matériel végétal présentant des symptômes d'enroulement. Deux régions à vocation viticole ont été ciblées : la région du centre (Wilaya de Boumerdes) et la région Ouest (Wilayas de Ain Témouchent et Mascara). Les vignobles visités ainsi que les différents cépages de vigne de table et de cuves retenus sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8. Provenance des différents échantillons

Nom du cépage	Localisation	Nbre d'échantillons	Superficie (hectares)
Alicante Bouchet 1	El-Malah (Ain Timmouchent)	10	5,0
Alicante Bouchet 2	El-Malah (Ain Timmouchent)	10	2,0
Alicante Bouchet 3	Oued Barkeche (Ain Timmouchent)	11	10,0
Valencie 1	Maouassa (Mascara)	09	2,0
Valencie 2	Maouassa (Mascara)	10	2,0
Alphonse Lavallé	Hamiz (Alger)	10	0,5
Dattier de Beyrouth 1	Hamiz (Alger)	10	1,0
Chaouch Blanc	Hamiz (Alger)	10	1,0
Dattier de Beyrouth 2	Si Moustapha (Boumerdes)	10	2,0
Cardinal	Isser (Boumerdes)	10	2,0

III.1.2. Méthode d'échantillonnage

Une première prospection a été réalisée en septembre 2010, afin de repérer et marquer les vignobles dans lesquels l'échantillonnage sera réalisé. La récolte des échantillons, notamment les sarments, a été réalisée en décembre 2010. Des photographies ont été réalisées sur certains ceps présentant des symptômes et ont été marqués pour l'échantillonnage.

L'échantillonnage a été réalisé en suivant une ligne transversale le long du vignoble et les ceps échantillonnés ont été marqués pour d'autres échantillonnages éventuels.

Nous avons réalisé un échantillonnage aléatoire en prélevant les échantillons à partir de sarments à deux nœuds de chacun des vignobles. Au total, 100 échantillons ont été collectés et conservés dans du papier absorbant imbibé d'eau et mis à 4°C (tableau 8).

III. 4. Les tests immunoenzymatiques

III. 4. 1. Séra utilisés pour le criblage sérologique

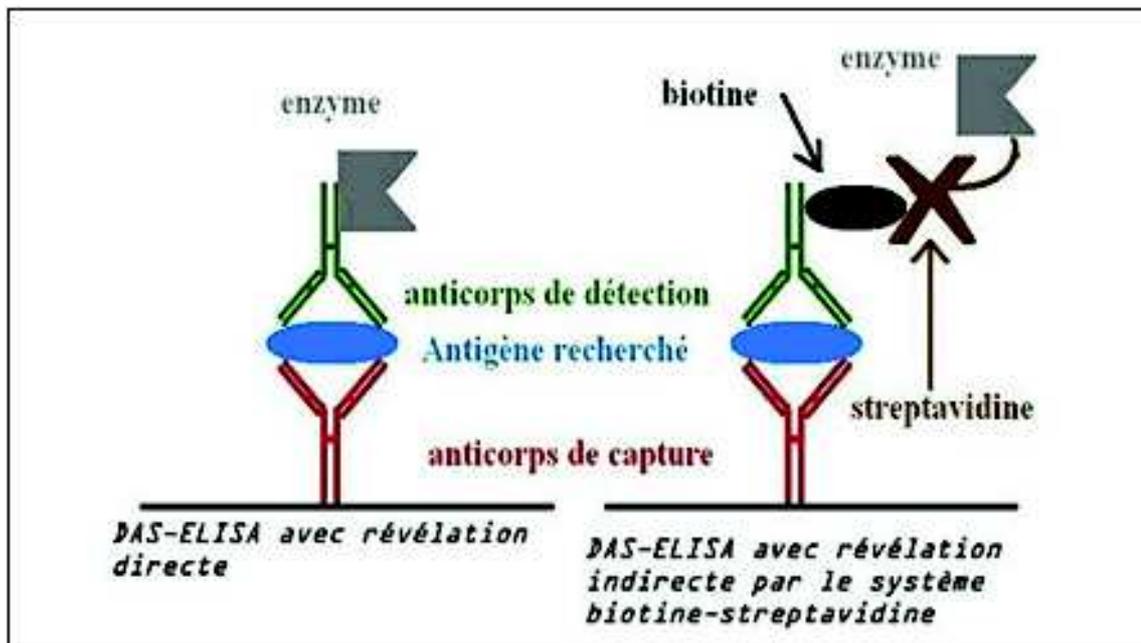
Les séra utilisés pour la détection sérologique sont des séra polyclonaux dirigés contre les GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6 provenant d'un kit (Sanofi, Biorad). Les IgG sont utilisés à 1/1000 pour le GLRaV-1, 1/500 pour le GLRaV-2, 1/500 pour le GLRaV-3, 1/1000 pour le GLRaV-5 et 1/500 pour le GLRaV-6.

III.4.2. Préparation des échantillons

Les 100 échantillons prélevés sur les différents cépages ont été analysés par les méthodes sérologiques de type ELISA. Le test immunoenzymatique a été effectué sur le cortex des sarments que nous avons obtenus par décortiquage et broyage dans un tampon d'extraction (Annexe. 4).

III.4.3. Protocoles utilisés

Deux variantes de la méthode DAS-ELISA ont été utilisées et diffèrent par le mode de révélation, direct ou indirect par le système streptavidine-biotine (Figure 8). Les protocoles sont réalisés suivant celui décrit par Martelli (1993) et les recommandations faites par le fournisseur (Sanofi - Biorad). La méthode DAS-ELISA directe a été réalisée pour la détection des types GLRaV-1, 2, 3 et 6 (Planche 1). Pour la détection du type GLRaV-5, la méthode DAS-ELISA indirecte est préconisée car ses IgG présentent une forte sensibilité à la phosphatase alcaline (Planche 2). Afin de diminuer le signal, le conjugué est constitué d'IgG couplées à la biotine qui est elle-même couplée à la phosphatase alcaline. Les tampons utilisés sont décrits en Annexe 1



.Figure 9. Méthodes DAS-ELISA avec révélation directe et indirecte

III.4.4. Interprétation des résultats

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

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

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

$$\text{Seuil de positivité} = (\text{moyenne des témoins négatif}) \times 2$$

III.4.5. Détermination du pourcentage d'infection

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

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

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

Planche 1. Méthode DAS-ELISA directe (Martelli, 1993)

Ce protocole est utilisé pour détecter les types GLRaV-1, 2, 3 et 6.

- Activation de la plaque par dépôt du sérum spécifique dilué dans le tampon de fixation.
- Incubation à 37°C durant 2 heures
- Trois rinçages au PBST de 5 minutes chacun
- Dépôt des extraits dilués dans le tampon d'extraction
- Incubation à 4°C durant une nuit
- Trois rinçages au PBST de 5 minutes chacun
- Dépôt du conjugué dilué dans le tampon du conjugué
- Incubation à 37°C durant 2 heures
- Trois rinçages au PBST de 5 minutes chacun.
- Dépôt du substrat dilué dans le tampon de substrat (1mg.ml^{-1}) (Para -Nitro-Phényl-Phosphate, PNPP)
- Incubation à 37°C pendant 15 minutes
- Lecture au spectrophotomètre à 405 nm.

Planche 2. Méthode DAS-ELISA indirecte par le système biotine-streptavidine (Agritest, Bari, Italy)

Ce protocole est utilisé pour la détection du type GLRaV-5

- Activation de la plaque par dépôt du sérum (IGg) spécifique dilué dans le tampon de fixation.
- Incubation à 37°C durant 2 heures
- Trois rinçages au PBST de 5 minutes chacun
- Dépôt des extraits dilués dans le tampon d'extraction
- Incubation à 4°C durant une nuit
- Trois rinçages au PBST de 5 minutes chacun
- Dépôt du conjugué dilué dans le tampon du conjugué
- Incubation à 37°C pendant 2 heures
- Trois rinçages au PBST de 5 minutes chacun.
- Dépôt de la Streptavidine
- Incubation à 37°C pendant 30minutes
- Dépôt du substrat dilué dans le tampon de substrat (1mg.ml^{-1}) (Para-Nitro-Phényl-Phosphate, PNPP)
- Incubation à 37°C pendant 15 minutes
- Lecture au spectrophotomètre à 405 nm.

III.5. Identification des virus GLRaV-3 et 5 par reverse transcription-PCR

Tous les tampons et solutions utilisés dans cette partie sont décrits en annexe 5.

III.5.1. Extraction des acides nucléiques totaux

Parmi les 100 échantillons, nous en avons testé 58 échantillons. L'extraction des acides nucléiques totaux (TNA) est réalisée selon la méthode décrite par Foissac (2001) adaptée aux conditions du laboratoire (Planche 3).

La pureté des TNA est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1,2% dissout dans le tampon TBE. Les puits du gel sont chargés avec 10 μ l de TNA et 3 μ l de colorant. La migration électrophorétique est réalisée à 140 volts. L'observation des TNA est réalisée en immergeant le gel dans une solution contenant 0,5 μ g.ml⁻¹ de bromure d'éthidium et en le plaçant sur un transilluminateur à UV.

II.5.2. Obtention de l'ADN complémentaire

Une linéarisation des ARN a été réalisée en utilisant des amorces aléatoires (provient du kit Invitrogen). Pour chaque échantillon, 10 μ l d'acides nucléiques totaux (TNA) sont ajoutés à 2,5 μ l du Mix I composé de 1 μ l Rp (1 μ g. μ l⁻¹) et 1,5 μ l d'eau distillée stérile. Deux tubes contenant de l'eau à la place des TNA sont également utilisés comme contrôle négatif. Les tubes sont mis à incuber à 90°C pendant 5 minutes.

Après incubation, les ADN complémentaires sont obtenus par reverse transcription en utilisant une reverse transcriptase (M-MLV). Dans chacun des tubes, 7,5 μ l de tampon mix II (4 μ l de tampon Fs 5X, 0,5 μ l de dNTPs 10mM, 2 μ l dTT 0,1mM, 1 μ l M-MLV 200 U. μ l⁻¹). Le volume final de chaque échantillon est de 20 μ l. Les tubes sont mis à incuber à 39°C pendant 1 heure puis à 70°C pendant 10 minutes. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C.

III.5.3. Amplification par PCR des ADNc

III.5. 3. 1. Les amorces ADN utilisées pour la RT-PCR

Les amorces d'ADN qui ont été utilisées pour RT-PCR permettent d'identifier les types GLRaV-3 et GLRaV-5. Elles ont été élaborées respectivement par Ling *et al.* (1998) et Good et Monis (2001) (Tableau 9).

Tableau 9. Amorces utilisées pour la détection de GLRaV-3 et GLRaV-5

Virus	Amorces	Séquences	Amplifiat	Références
GLRaV-3	LR3-LC1F	CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT	546pb	Ling <i>et al.</i> , (1998)
	LR3-LC2 R	GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT		
GLRaV-5	LR5-1F	CCCGTGATACAAGGTAGGACA	690pb	Good et Monis, (2001)
	LR5-1R	CAGACTTCACCTCCTGTTAC		

III. 5. 3. 2. Préparation des échantillons pour la PCR

Pour chaque échantillon, 2,5 μ l d'ADNc sont ajoutés au milieu réactionnel suivant : 5 μ l de tampon 5X, 1 μ l de MgCl₂ 25mM, 1 μ l de dNTPs, 0,5 μ l de l'amorce sens (LC₁F 10mM pour le type GLRaV-3 et F1 10 mM pour le type GLRaV-5), 0,5 μ l de l'amorce antisens (LC₂R 10mM pour le type GLRaV-3 et R1 10 mM pour le type GLRaV-5), 0,25 μ l de Taq polymérase 5 U. μ l⁻¹ et 14,25 μ l d'eau distillé stérile.

III. 5. 3. 3. Condition d'amplification

Pour l'identification du type GLRaV-3, les conditions d'amplification sont celles décrites par Ling et *al.* 1998. Une première dénaturation est réalisée à 94°C pendant 5 minutes. Elle est suivie de 35 cycles d'amplification dans les conditions suivantes: dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 52°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute. Pour terminer, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes.

L'identification du type GLRaV-5 est réalisée selon les conditions d'amplification décrites par Good et Monis (2001). Une première dénaturation est réalisée à 94°C pendant 5 minutes. Elle est suivie de 35 cycles d'amplification dans les conditions suivantes: dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation des amorces à 58°C pendant 45 secondes et une élongation à 72°C pendant 1 minute. Pour terminer, une élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 minutes.

Les témoins négatifs et positifs proviennent de la collection du laboratoire de virologie végétale de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Tunis.

III.5.4. Révélation et visualisation des bandes

Les amplifiats sont observés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2%. Un marqueur de taille 100 pb est également ajouté au gel. Les bandes attendues devraient correspondre à une taille de 546 pb pour le GLRaV-3 et de 690 pb pour le GLRaV-5. L'électrophorèse est réalisée à 140 volts pendant 30 minutes. La visualisation des bandes est réalisée en immergeant le gel dans une solution contenant du bromure d'éthidium à 0,5 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et en le plaçant sur un transilluminateur à UV. Une photographie du gel est réalisée.

Planche 3. Extraction des acides nucléiques totaux (TNA) (Foissac, 2001)

- Ajouter au tampon de broyage 2% de sodium bisulfate (antioxydant) juste avant l'utilisation (pour 12 échantillons, il en faut 0,24 mg).
- Broyer les tissus végétaux (0,2 g du cortex) en utilisant de l'azote liquide dans un mortier à l'aide d'un pilon.
- Mélanger la poudre obtenue dans 1 ml de tampon de broyage dans un microtube et le placer dans la glace.
- Ajouter 100 μl NLS (10%) puis mélanger énergiquement avec un vortex.
- Incuber à 70°C pendant 10 min en agitant les microtubes de temps à autre.
- Mettre dans de la glace pendant 5min
- Centrifuger à 13000 tpm pendant 10 min et récupérer le surnageant.
- Dans de nouveaux microtubes, ajouter : 150 μl éthanol absolu, 300 μl NaI 6M, 35 μl de silica
- Ajouter à ce mélange 300 μl de surnageant puis mélanger au vortex.
- Agiter les microtubes pendant 30 min.
- Centrifuger à 6000 tpm pendant 20 secondes.
- Récupérer le culot (silica + TNA) et jeter le surnageant.
- Ajouter 500 μl de tampon de lavage.
- Mélanger au vortex et centrifuger à 6000 tpm pendant 20 secondes.

- Répéter le lavage deux fois de suite.
- Eliminer le surnageant et sécher le culot.
- Ajouter 120µl d'eau distillé stérile puis mélanger au vortex.
- Incuber à 70°C pendant 3 minutes.
- Centrifuger à 13000 tpm pendant 3 min.
- Récupérer 100 µl du surnageant et le conserver à -20°C avant utilisation

IV. Résultats et Discussions

IV.1. Observations des symptômes dans les vignobles prospectés

IV.1.1. Etat général des vignobles.

Les prospections ont été réalisées dans 5 vignobles de l'Ouest et 5 vignobles de la région centre sur 6 cépages différents. Les observations montrent que les symptômes d'enroulement diffèrent entre les six cépages par certaines spécificités. Ainsi, le cépage Alicante de Bouchet présente un enroulement avec coloration rouge brique foncée (figure 10 et 11) bien répartie sur la feuille à l'inverse du cépage Alphonse Lavallé qui présente des boursouflures avec coloration rouge brique (figure 12). Le dattier de Beyrouth présente un enroulement suivi d'un léger jaunissement des feuilles (figure 13).

Nous avons aussi pu constater que les cépages Alicante Bouchet, le Dattier de Beyrouth et le cépage Alphonse Lavallé sont énormément sensibles au symptôme d'enroulement par rapport aux cépages Cardinal, Valensi et El-beydha (Chaouch Blanc). Ainsi presque la totalité des vignobles d'Alicante Bouchet de la commune Oued Berkeche et d'El-Malah de la wilaya de Ain Témouchent présentent les symptômes typique de l'enroulement foliaire de la vigne. Nous avons pu constater des parcs à bois de Cabernet présentant des symptômes d'enroulements foliaire de la vigne généralisés sur tout le vignoble. La totalité des ceps atteints présentent un épaissement des feuilles par rapport au sujet sain.

IV.1.2. Collecte des échantillons.

Les prospections réalisées ont permis de collecter 100 échantillons sur des cépages de cuves et de tables des régions centre (Boumerdes et Alger) et ouest (Mascara et Ain-Témouchent). Ainsi, nous avons collecté 31 échantillons sur le cépage Alicante de Bouchet, 20 échantillons sur le Cépage Valensi, 20 échantillons sur le cépage Dattier de Beyrouth, 9 échantillons sur le cépage Alphonse Lavallé, 10 échantillons sur le cépage Cardinal et 10 échantillons sur le cépage El-Beydha.



Figure 10 : Aspect général d'un cep d'Alicante Bouchet atteint d'enroulement foliaire de la vigne



Figure 11 : Détail de l'enroulement foliaire et coloration rouge brique de la vigne sur le cépage Alicante de Bouchet



Figure 12: Enroulement foliaire et coloration rouge brique sur le cépage Alphonse Lavallé.



Figure 13 : Enroulement foliaire avec jaunissement du cépage Dattier de Beyrouth.

IV.1.3 Discussion

Les résultats symptomatologiques montrent des disparités dans l'enroulement observé. Mais il reste à déterminer si cet enroulement est dû à la présence de virus de l'enroulement foliaire de la vigne.

Les observations indiquent une grande propagation de l'enroulement foliaire de la vigne qui peut être d'origine virale ou bien phytoplasmique. Ainsi, il est nécessaire de mener des études sur l'origine de cet enroulement qui cause des baisses de rendement continue et affecte la maturité du raisin.

L'observation des symptômes a permis de révéler des enroulements foliaires avec jaunissement pour le cépage Dattier de Beyrouth, le cépage Valensi, le cépage Cardinal et le cépage El-Baydha et une coloration rouge brique pour le cépage Alphonse Lavallé et Alicante Bouchet. Ces observations sont en adéquation avec celles réalisées dans d'autres études.

Martinson et *al.* (2008), rapporte que les cépages rouges développent une coloration rouge caractéristique avec les nervures qui restent verte débutant à la base de la tige. Cependant, les cépages blancs, tel que le Chardonnay montrent souvent un enroulement des feuilles et un jaunissement à la fin de la saison de récolte.

Bovey (1980) et Martelli (1993), rapportent aussi que les symptômes externes majeurs sont un enroulement des feuilles vers la face inférieure suivi d'un jaunissement ou d'un rougissement suivant qu'on est en présence d'un cépage blanc ou bien rouge. Cependant, les espèces de vigne américaine n'extériorisent pas de symptômes d'enroulement ou bien de coloration à l'exception de *Vitis riparia* Gloire (Vuittenez, 1985)

Martelli (1993), rapporte que les cépages Cabernet et Pinot Noir, qui sont des cépages utilisés en Algérie comme vigne de cuve, sont des indicateurs ligneux des virus de l'enroulement foliaire de la vigne et cela de par leur forte sensibilité et leur rapide réaction à ces virus.

A l'heure actuelle, peu de travaux sont consacrés aux variations symptomatologiques. Il est difficile de conclure si elles dépendent du type d'agent ou bien des différences dans les réactions variétales. Cependant, des indications montrent que la présence de différents *Closterovirus* est liée aux différences dans l'expression des symptômes. Par exemple, le GLRaV-1 semble être lié à un enroulement marqué de la marge des feuilles et une légère décoloration rougeâtre des marges enroulées, tandis que le GLRaV-3 est plus systématiquement associé à un enroulement d'intensité moyenne et une rougeur intense avec une teinte violacée profonde (Zimmermann, in Martelli 1993). Il semble aussi que le GLRaV-2 soit lié à l'incompatibilité au greffage (Lee et Martin, 2009 ; Bertazzon et Angelini, 2004)

Il est intéressant de mener des études sur la réaction symptomatologique différentielle des différents cépages de la vigne et déterminer les composés interagissant avec les virus.

IV.2. Analyses des tests immunoenzymatiques

IV.2.1. Réactions sérologiques

IV.2.1.1. Réactions des échantillons vis-à-vis de l'antisérum GLRaV-1

L'analyse des échantillons vis-à-vis de l'antisérum polyclonal GLRaV-1 a permis de montrer des réactions positives (Annexes 6 et 7). Sur la base du seuil de détection qui est de 0,102 pour la première microplaque (annexe 6) et de 0,346 pour la deuxième microplaque (annexe 7), six échantillons ont montré une réaction positive : deux échantillons sur le cépage Alicante Bouchet, deux échantillons sur le cépage Valensi, un échantillon sur le cépage El-Beydha et un échantillon sur le cépage Dattier de Beyrouth.

IV.2.1.2. Réactions des échantillons vis-à-vis de l'antisérum GLRaV-2

L'analyse des échantillons vis-à-vis de l'antisérum polyclonal GLRaV-2 a permis de montrer des réactions positives (Annexes 6 et 7). Sur la base du seuil de détection qui est de 0,259 pour la première microplaque (annexe 6) et de 0,250 pour la deuxième microplaque (annexe 7), 16 échantillons ont montré une réaction positive : 8 échantillons sur le cépage Alicante Bouchet, 4 échantillons sur le cépage Valensi, un échantillon sur le cépage Chaouch Blanc, deux échantillons sur le cépage Dattier de Beyrouth et un échantillon sur le cépage Cardinal.

IV.2.1.3. Réactions des échantillons vis-à-vis de l'antisérum GLRaV-3

L'analyse des échantillons vis-à-vis de l'antisérum polyclonal GLRaV-3 a permis de montrer des réactions positives (Annexes 6 et 7). Sur la base du seuil de détection qui est de 0,150 pour la première microplaque (annexe 6) et de 0,199 pour la deuxième microplaque (annexe 7), 67 échantillons ont montré une réaction positive : 16 échantillons sur le cépage Alicante Bouchet, 9 échantillons sur le cépage Valensi, 10 échantillons sur le cépage El-Beydha, 16 échantillons sur le cépage Dattier de Beyrouth, 7 échantillons sur le cépage Cardinal et 9 échantillons sur le cépage Alphonse Lavallé.

IV.2.1.4. Réactions des échantillons vis-à-vis de l'antisérum GLRaV-5

L'analyse des échantillons vis-à-vis de l'antisérum polyclonal GLRaV-5 a permis de montrer des réactions positives (Annexes 6 et 7). Sur la base du seuil de détection qui est de 0,188 pour la première microplaque (Annexe 6) et de 0,124 pour la deuxième microplaque (Annexe 7), 6 échantillons ont montré une réaction positive : 1 échantillon sur le cépage Alicante Bouchet, 2 échantillons sur le cépage Valensi, un échantillon sur le cépage El-Beydha et deux échantillons sur le cépage Dattier de Beyrouth.

IV.2.1.5. Réactions des échantillons vis-à-vis de l'antisérum GLRaV-6

L'analyse des échantillons vis-à-vis de l'antisérum polyclonal GLRaV-6 a permis de montrer des réactions positives (Annexes 6 et 7). Sur la base du seuil de détection qui est de 0,259 pour la première microplaque (Annexe 6) et de 0,250 pour la deuxième microplaque (Annexe 7), 2 échantillons ont montré une réaction positive : 1 échantillon sur le cépage Valensi et un échantillon sur le cépage El-Beydha (Chaouch blanc).

IV.2.1.6 Discussion

Les 100 échantillons collectés lors des prospections ont été analysés par les tests immunoenzymatiques de type ELISA vis-à-vis du GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6. Les résultats obtenus montrent que tous les virus de l'enroulement foliaire de la vigne testés sont présents dans les vignobles prospectés et confirment que l'observation des symptômes réalisée lors des prospections dans les différents vignobles est due à la présence de virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne.

Des travaux antérieurs ont montré la présence du GLRaV-1 et du GLRaV-3 dans les vignobles de la wilaya de Boumerdes (Si Mustapha) sur le cépage Dattier de Beyrouth en utilisant un test immunoenzymatique multiplexe (Lehad, 2008 ; Aitouada, 2010). Dans notre étude, nos résultats montrent que le GLRaV-3 est présent dans tous les vignobles prospectés. Ceci a été rapporté par Martelli (1985) lors de prospections effectués en Algérie. Concernant la présence du GLRaV-2, nos résultats obtenus en début de l'année 2011 ont été confirmés au court de cette même année dans les vignobles de Boumerdes (Mousselmal, 2011). Pour la première fois en Algérie, nos résultats montrent la présence du GLRaV-5 et -6

Lors de cette étude, nous avons utilisé des séra polyclonaux contre le GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6. Cependant, aucun test pour déterminer la présence du GLRaV-4, 7 et 9 n'a été réalisé. Ainsi d'autres analyses sont nécessaires pour statuer sur leur présence en Algérie.

Des anticorps monoclonaux (Mabs) ont été élaborés contre la protéine capsidiale du GLRaV-1. Ces anticorps diffèrent dans le niveau de spécificité avec les différents isolats du GLRaV-1 (Seddas et al. 2000). Monis (2000) a développé des anticorps monoclonaux contre le GLRaV-5.

Les virus de l'enroulement foliaire de la vigne sont largement répandus à travers le pourtour méditerranéen. En Tunisie, Mahfoudhi (2007) rapporte pour la première fois la présence du GLRaV-5 et 9 par test immunoenzymatique et par RT-PCR.

Le virus de la vigne A (GVA), le virus de la vigne B (GVB) et le GLRaV-3 sont les virus les plus dangereux et les plus répandus dans les pays arabes en plus du GLRaV-1 et 2. On note aussi la présence du GLRaV-7 en Egypte, en Jordanie et en Palestine bien qu'à faible prédominance. Récemment, le GLRaV-6 a été détecté pour la première fois en Syrie (Mahya Eddine Makouk et al. 2008).

en 2010, des travaux révèlent pour la première fois la présence du GLRaV-5 en Espagne (Padilla et al. 2010), du GLRaV-4 et -5 en Chine (Pei et al. 2010), du GLRaV-3 aux Etats Unies d'Amérique dans l'état du Washington (Soule et al. 2010) et du GLRaV-5 au Chili (Engel et al. 2010).

Cette étude sérologique a permis de mettre en évidence la présence des GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6. Cependant, il est nécessaire de procéder à leur identification par des techniques moléculaires.

Ainsi, l'inconvénient du test ELISA réside dans la difficulté de choisir un seuil de positivité capable de différencier avec efficacité entre les échantillons positifs et les échantillons négatifs.

Astier et al (2001) rapportent que la sensibilité et la spécificité de la détection d'un virus par ELISA dépendent du choix du seuil de positivité. Lorsque la concentration du virus qu'on veut détecter est élevée, le seuil de positivité ne pose aucune difficulté (par exemple 3 fois la moyenne des densités optiques des échantillons sains de référence, la spécificité du test est excellente, la sensibilité est faible). Mais lorsqu'on veut utiliser le test ELISA pour détecter de faibles concentrations en virus, il faut augmenter la sensibilité de détection au détriment de la spécificité. Le seuil de positivité devient alors un compromis entre la sensibilité de détection et la spécificité.

Au cours de cette étude, nous avons considéré le seuil de positivité comme étant deux fois la moyenne du témoin sain de référence ce qui nous emmène à la possibilité de présence de faux négatifs qui n'ont pas pu être détectés à cause de leur faible concentration.

Ainsi, il s'avère nécessaire de réaliser une détection par d'autres techniques plus sensibles pour éliminer le risque d'avoir des faux négatifs et le risque de dissémination des virus de l'enroulement foliaire de la vigne.

IV.2.2 Prédominance des virus de l'enroulement de la vigne

IV.2.2.1. Pourcentage de plants infectés.

Afin de déterminer la prédominance des virus de l'enroulement foliaires de la vigne, nous avons calculé le pourcentage de plant infectés pour chaque virus (Tableau 10)

Les résultats des tests sérologiques montrent que tous les vignobles prospectés sont infectés par les virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne. Certains ceps sont infectés par plus de deux virus, cela fait que certains ceps présentent des infections simples (cep infecté par un seul virus) alors que d'autre présentent des infections multiples (cep infecté par plusieurs virus) (Annexes 6 et 7). Ainsi, le pourcentage d'infection total est de 78% (Tableau 10), il comprend 64% d'infection simple et 14% d'infection mixte. Cela confirme que l'enroulement foliaire observé lors des prospections est dû à la présence de ces virus. Ainsi, certains échantillons sont infectés par plusieurs virus en même temps.

vignoble	nbr d'échantillon	Echantillons (+)	LR1	LR2	LR3	LR5	LR6	total
Valensi 1	10	6	0%	0%	50%	20%	10%	60%
Valensi 2	10	8	20%	40%	40%	10%	0%	80%
Alicante 1	10	6	10%	0%	40%	10%	0%	60%
aLicante2	10	9	0%	30%	70%	10%	0%	90%
Alicante3	11	7	9%	36,36%	45,45%	0%	0%	63,63%
Alphonse Lavallé	9	9	0%	0%	100%	0%	0%	100%
Cardinal	10	7	0%	10%	70%	0%	0%	70%
Dattier de Beyrouth1	10	9	10%	20%	90%	10%	0%	90%
Dattier de Beyrouth 2	10	7	0%	0%	70%	0%	0%	70%
El-Beydha	10	10	10%	10%	100%	0	10%	100%
Total	100	78	6%	16%	67%	6%	2%	78%

Tableau 10 : Pourcentage d'infection des vignobles par les virus associé à l'enroulement de la vigne

Le Tableau 10 montre que certains cépages sont plus infectés que d'autre par les virus de l'enroulement foliaire de la vigne. Les deux vignobles du cépage Valensi présentent des pourcentages d'infections de 60% et 80 %. Les trois vignobles du cépage Alicante Bouchet présentent des pourcentages d'infections de 60%, 90 % et 63%. Les cépages Alphonse Lavallé, Cardinal et El Beydha présentent respectivement des pourcentages d'infections de 100%, 70% et 100%. Les deux vignobles du cépage Dattier de Beyrouth présentent des pourcentages d'infections de 90% et 70%. Cependant, la différence du pourcentage d'infection ne peut pas nous renseigner sur la résistance ou la sensibilité des ces cépages pour les virus en question.

La figure 14 montre que les cépages Alphonse Lavallé et El-Beydha présentent les pourcentages d'infections les plus élevés avec 100% d'infection. Les cépages prospectés présentent des pourcentages d'infection supérieurs à 60% ce qui nous indique le mauvais état sanitaire des vignobles prospectés. Nous constatons aussi que certains échantillons sont infectés par plusieurs virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne (annexes 6 et 7)

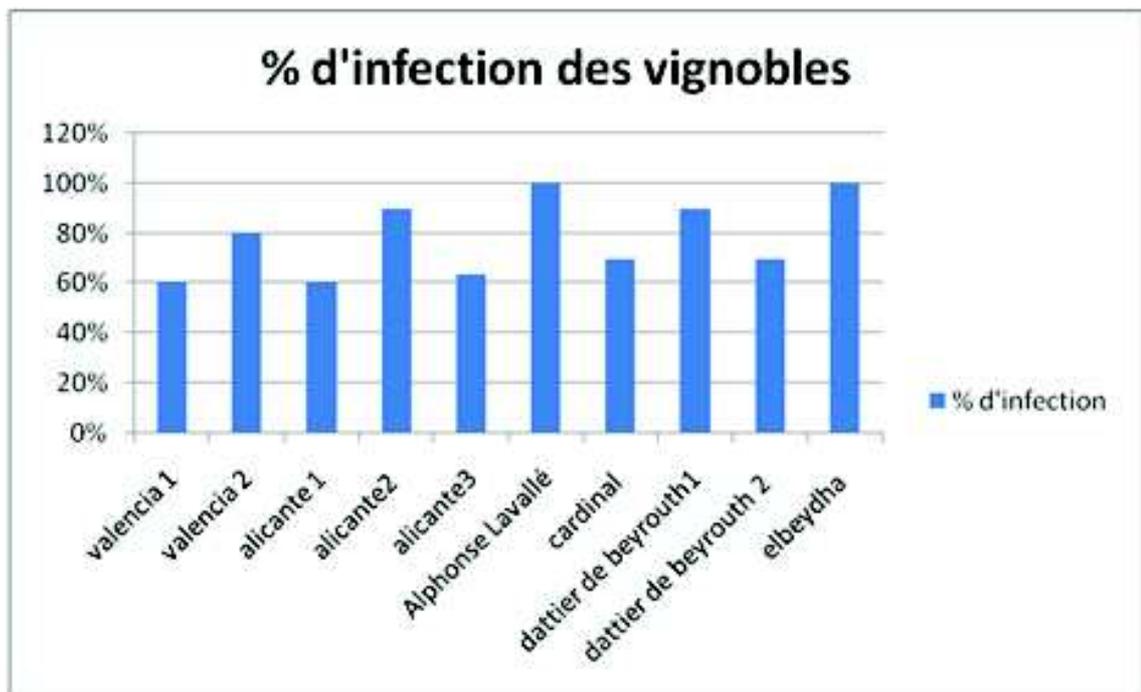


Figure 14 : pourcentage d'infection total des Cépages prospectés.

IV.2.2.2. Prédominance des virus de l'enroulement de la vigne

Les résultats obtenus montrent que le GLRaV-3 est le virus le plus prédominant dans les vignobles algériens suivi par le GLRaV-2. Le GLRaV-1, 5 et 6 présentent les pourcentages les plus faibles. Les pourcentages diffèrent et indiquent que certain virus sont largement prédominants que d'autres. Ainsi, les pourcentages d'infection par le GLRaV1, 2, 3, 5 et 6 sont respectivement de 6%, 16%, 67%, 6% et 2% (Tableau 10).

La figure 15 montre une grande différence dans la prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne, nous constatons que le GLRaV-3 est largement prédominant par rapport aux autres virus.

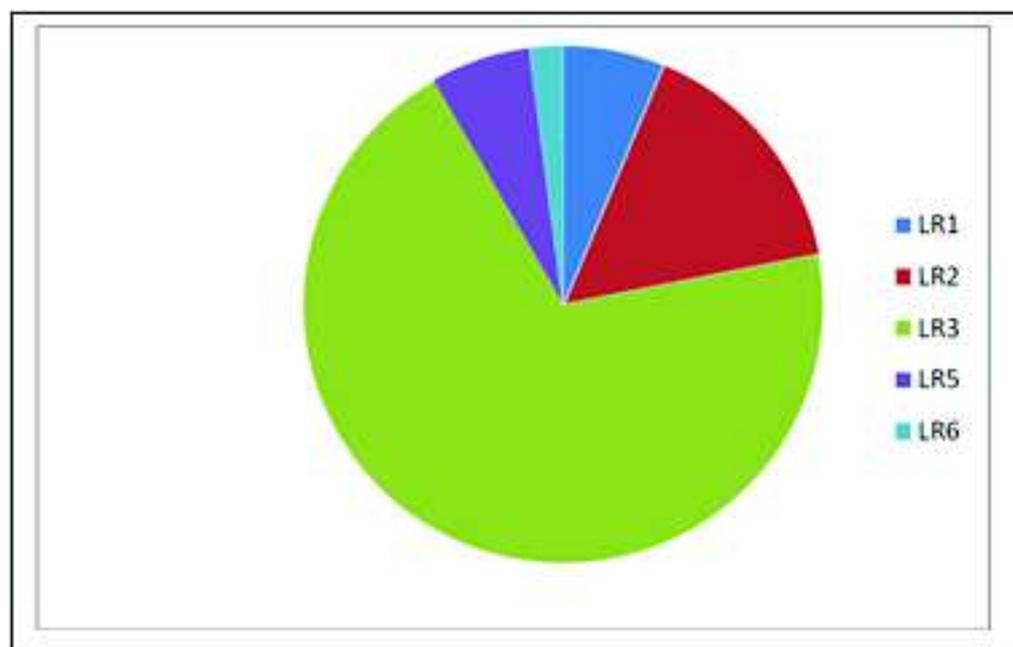


Figure 15 : Prédominance du GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6 dans les vignobles Algériens.

La prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne varie d'un pays à un autre. Ainsi, le GLRaV-1 semble être le virus le plus prédominant en Turquie avec 8,36% par rapport au GLRaV-2, 3 et 7 (Akbas et *al.* 2007). En Tunisie le GLRaV-3 est le plus prédominant avec 76,3% par rapport aux GLRaV-1, 2, 5, 6 et 7 (Mahfoudhi, 2008). En Argentine le GLRaV-2 est le virus le plus prédominant avec 18,8% par rapport aux autres virus de l'enroulement foliaire de la vigne (Volpe et *al.*2010)

IV.2.2.3. Comparaison entre la région ouest et centre du pays

Durant les prospections, l'échantillonnage a été réalisé dans cinq vignobles de la région centre et cinq vignobles de la région ouest du pays. Le test sérologique nous a permis de faire une comparaison de la prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne entre les deux régions prospectés.

La figure 16 nous montre la prédominance des virus de l'enroulement foliaire de la vigne entre la région Centre du Pays et la région Ouest. Le pourcentage d'infection total dans la région centre est de 85,71% par contre celui de la région Ouest est de 70,59% (Tableau 11).

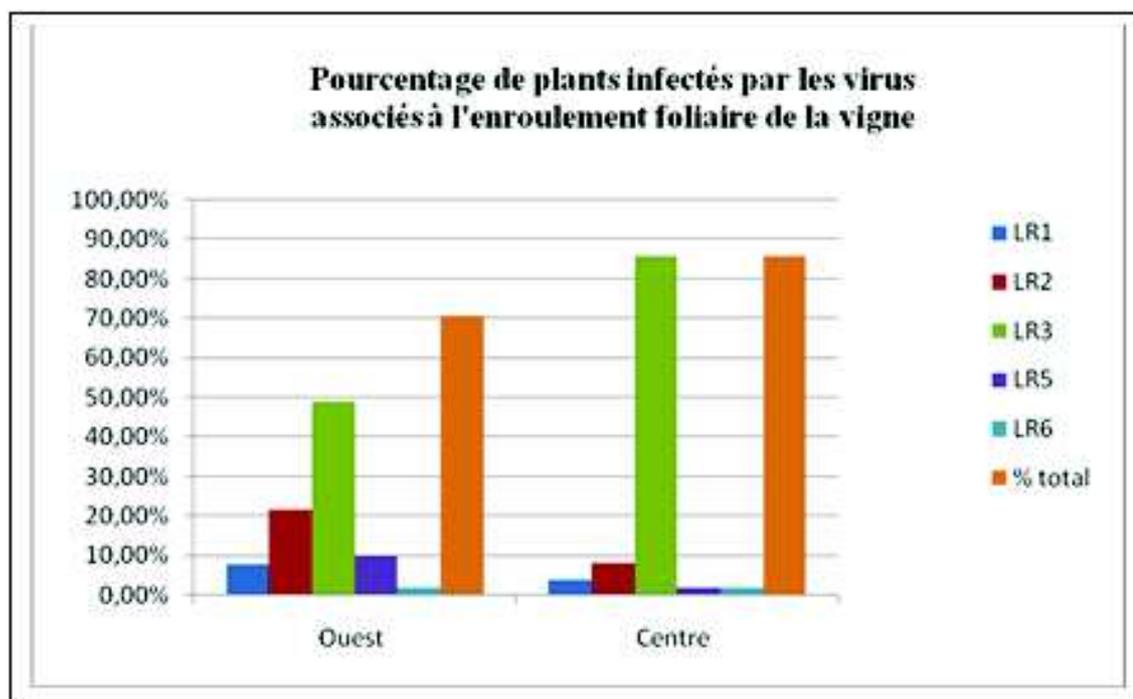


Figure 16 : Prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne dans les régions Ouest et Centre

Le GLRaV-3 est presque deux fois plus prédominant dans les vignobles du centre avec 85,71% que de l'ouest avec 49,02%. Cependant, le GLRaV-2 est presque trois fois plus prédominant dans la région Ouest avec 21,57% que dans la région Centre avec seulement 8,16%. Le GLRaV-1 et 5 sont plus prédominant dans la région Ouest que dans la région centre avec respectivement 7,84% et 9,80% pour le GLRaV-1, 4,08% et 2,04% pour le GLRaV-5. Le pourcentage d'infection est identique entre les deux régions pour le GLRaV-6 (Tableau 11).

Tableau 11 : Prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne entre la région Centre et Ouest de l'Algérie

région	nbr d'échantillon	LR1	LR2	LR3	LR5	LR6	taux d'infection
Ouest	51	7,84%	21,57%	49,02%	9,80%	1,96%	70,59%
Centre	49	4,08%	8,16%	85,71%	2,04%	2,04%	85,71%

IV.2.2.4. Discussion

L'étude de la prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne montre que les résultats obtenus pour le GLRaV-1 et -3 sont en adéquation avec ceux obtenus par Digiaro et al. (1997) qui rapportent des pourcentages d'infection de 10% pour le GLRaV-1 et de 80% pour le GLRaV-3 sur un total de 10 échantillons en Algérie. Ce même auteur a rapporté au Maroc un pourcentage d'infection par le GLRaV-3 de 96%.

Bertolini et al. (2010) rapporte que les virus les plus répandus en Espagne sont le GFLV (95,8%) suivi par GLRaV-3 (94,7%) et le GLRaV-1 (65,3%) suite à des analyses sérologiques.

Sforza et al. (2003) rapporte aussi que les GLRaV-1 et 3 sont les *Ampélovirus* les plus répandus dans le nord de la France suite à des analyses sérologiques.

La grande prédominance du GLRaV-3 par rapport aux autres virus en Algérie suppose la présence d'insectes vecteurs de ce virus qui est plus répandu que ceux du GLRaV-1. Ainsi, le GLRaV-1 et 3 sont connus pour être transmis par les *Pseudococcidées* appartenant au genre des *Planococcus* et des *Pseudococcus* (Roscliglione and Castellano, 1985; Tanne et al., 1989; Garau et al., 1995; Cabaleiro and Segura, 1997; La Notte et al., 1997; Petersen and Charles, 1997; Golino et al., 1998), et par des coccidies appartenant aux genres des *Pulvinaria*, *Neopulvinaria* et des *Parthenolecanium* (Belli et al., 1994; Fortusini et al., 1997). Le GLRaV-2 ne présente aucun vecteur connu (Martelli et al., 2002).

Cabaleiro et al., (2006), rapportent que les GLRaV-1 et 3 sont les formes prédominantes dans le bassin méditerranéen. Or au cours de cette étude nous avons constaté que ce sont les GLRaV-2 et 3 qui sont les virus les plus répandus (respectivement 16% et 67%) et le GLRaV-1 présente le même pourcentage d'infection avec le GLRaV-5 qui est de 6%. De même, Mahfoudhi (2008) rapporte que le GLRaV-3 et 5 sont les virus les plus prédominants en Tunisie avec respectivement 76,3% et 38,5% sur un total de 712 échantillons.

Ainsi, chaque pays du monde présente des spécificités dans le virus prédominant. Cela peut être dû à l'utilisation de matériels végétal infectés, à l'abondance des insectes vecteurs de ces virus et à la sensibilité des cépages utilisés. Beaucoup de cépages de cuves utilisés en Algérie comme le Cabernet et le Pinot noir sont considérés comme des indicateurs ligneux pour les virus de l'enroulement foliaire de la vigne à cause de leur sensibilité à ces virus et peuvent être utilisés pour les tests biologiques de détection (Martelli, 1993).

IV.3. Détection des virus GLRaV 3 et 5 par RT-PCR.

Nous avons choisis 58 échantillons de façon aléatoire sur les 100 échantillons testés par ELISA. Ces échantillons ont été analysés par Reverse transcription PCR (RT-PCR). Le tableau 12 montre le nombre d'échantillons testés par cépage.

Tableau 12. Nombre d'échantillons de vigne testés par RT-PCR

Nom du cépage	Localisation	Echantillons testés
Alicante Bouchet	Ain Timmouchent	20
Valensi	Mascara	12
Alphonse Lavallé	Alger	4
Chaouch Blanc	Alger	6
Dattier de Beyrouth	Boumerdes	10
Cardinal	Boumerdes	6

Pour rappel, les acides nucléiques totaux (TNA) ont été extraits et leur pureté estimée par électrophorèse en gel d'agarose. Les ADN complémentaires (ADNc) ont été obtenus suite à une linéarisation des ARN suivie d'une RT-PCR.

La recherche des virus GLRaV-3 et 5 a été réalisée par PCR classique en utilisant des amorces qui permettent d'amplifier des séquences spécifiques de chacun des deux virus.

IV.3.1. Résultats obtenus de la RT-PCR

IV.3.1.1. Identification du GLRaV-3

L'amplification d'un fragment de 546 pb a été observée pour 36 échantillons parmi les 58 testés. Ce fragment correspond à celui qui a été amplifié pour le témoin positif (Figure 17). En fonction des cépages, le nombre d'échantillons infectés par le GLRaV-3 sont : 9 échantillons pour le cépage Alicante Bouchet, 7 échantillons pour le Valensi, 10 échantillons pour le Dattier de Beyrouth, 1 pour l'Alphonse Lavallé, 5 pour le Chaouch Blanc, et 4 pour le Cardinal.

T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif ; M : marqueur de tailles en pb ; 1 : Cardinal ; 2, 3, 4, 5, 6 et 7 : Dattier de Beyrouth ; 8 : Chaouch Blanc ; 9, 10, 11 et 12 : Valensi ; 13, 14, 15, 16 : Dattier de Beyrouth.

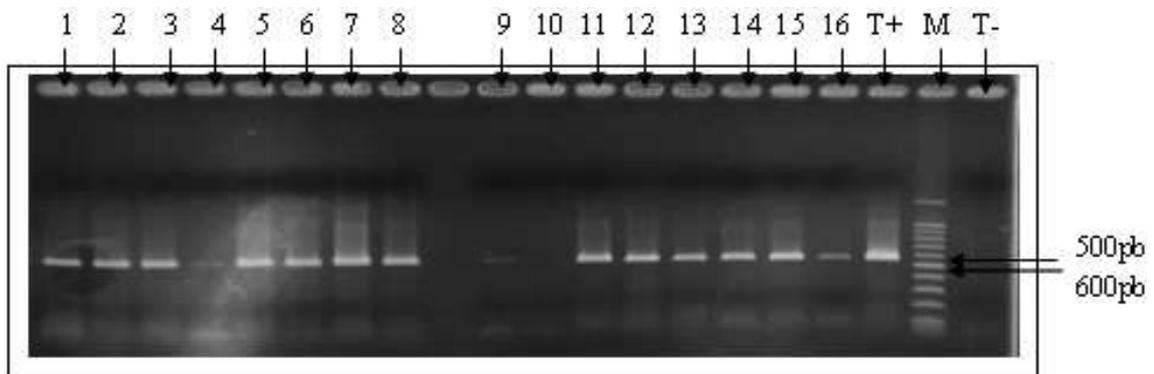


Figure 17. Profil électrophorétique en gel d'agarose de l'amplification par RT-PCR du fragment spécifique du GLRaV-3 des échantillons de vigne

IV.3.1.2. Identification du GLRaV-5

L'amplification d'un fragment de 690 pb a été observée pour 3 échantillons parmi les 58 testés. Ce fragment correspond à celui qui a été amplifié pour le témoin positif (Figure 18). L'identification du GLRaV-5 est observée pour un échantillon du cépage Dattier de Beyrouth et deux échantillons pour le cépage Valensi.

T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif ; M : marqueur de tailles en pb ; 1-12 : Alicante de Bouchet ; 13-17 : Valensi

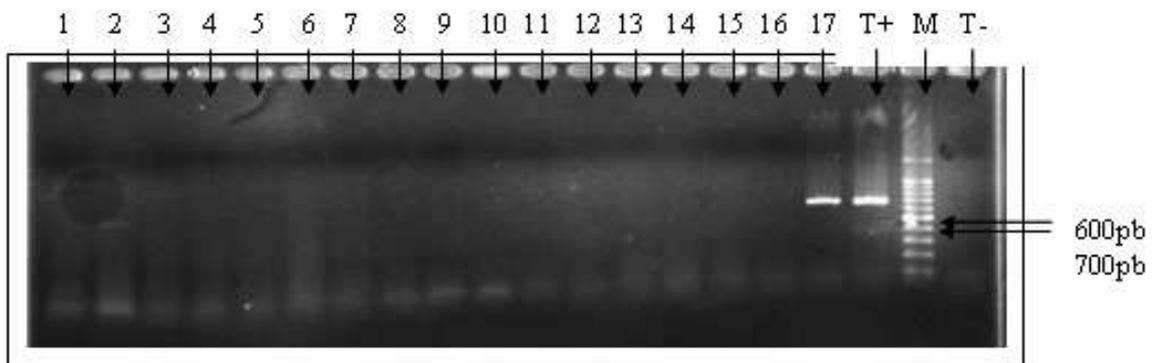


Figure 18. Profil électrophorétique en gel d'agarose de l'amplification par RT-PCR du fragment spécifique du GLRaV-5 des échantillons de vigne

IV.4.2. Discussion

L'identification des virus GLRaV-3 et GLRaV-5, a été réalisée par une amplification RT-PCR d'un fragment spécifique de chacun des deux virus et a permis de confirmer leur présence pour la première fois en Algérie.

Pour le GLRaV-3, 36 échantillons sont infectés, les échantillons proviennent des cépages Alicante Bouchet, Valensi, Dattier de Beyrouth, Chaouch blanc, Alphonse Lavallé et Cardinal. Ces résultats montrent que ce virus infecte tous les cépages et est présent dans les deux régions prospectées et donc semble être largement répandu comme cela a été observé en Tunisie et autour du pourtour méditerranéen. Ces résultats confirment ceux obtenues en Tunisie, où la présence du GLRaV-3 a été confirmée par ELISA et RT-PCR (Mahfoudhi et *al.* 2008 ; Acheche et *al.* 1999).

Pour le GLRaV-5, trois échantillons ont montré des bandes spécifiques à celle du GLRaV-5. Les échantillons proviennent du cépage Valensi et Dattier de Beyrouth. Ce virus a déjà été identifié en Tunisie et autour du pourtour méditerranéen. Ainsi, Mahfoudhi (2007) rapporte pour la première fois en Tunisie l'existence du GLRaV-5.

D'autres travaux sont nécessaires pour confirmer la présence du GLRaV-1, -2 et -6 par RT-PCR et séquençage ainsi que les autres virus de l'enroulement foliaire de la vigne qui n'ont pas fait l'objet de cette étude (GLRaV-4, -7 et -9)

IV.4. Comparaison entre le test sérologique et la RT-PCR

IV.4.1. Analyse des résultats obtenus avec les deux méthodes

La comparaison des deux méthodes utilisées, tests immunoenzymatiques et RT-PCR vis-à-vis des deux virus GLRaV-3 et 5, montre que certains échantillons sont positifs par le test ELISA alors qu'ils ne le sont pas par RT-PCR et réciproquement. Le tableau 13 montre pour chacun des tests utilisés le nombre des échantillons détectés pour chacun des cépages.

Tableau 13. Comparaison des résultats obtenus en ELISA et RT-PCR de la détection des virus GLRaV-3 et 5

Cépage	Nombre d'échantillons	GLRaV-3		GLRaV-5	
		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
Alicante Bouchet	20	5	9	2	0
Valensi	12	3	7	2	2
Alphonse Lavallé	4	4	1	0	0
Cardinal	6	4	4	0	0
Dattier de Beyrouth	10	6	10	0	1
Chaouch blanc	6	6	5	0	0
Total	58	28	36	4	3

Ainsi, Parmi les 20 échantillons du cépage Alicante Bouchet testés vis-à-vis du GLRaV-3, cinq échantillons sont détectés en ELISA alors que neuf le sont par RT-PCR. Les 5 échantillons positifs en ELISA sont détectés par RT-PCR. Quatre échantillons ne

sont détectés qu'en RT-PCR. Concernant le GLRaV-5, Deux échantillons sont détectés en ELISA et aucun en RT-PCR.

Pour les 12 échantillons du cépage Valensi testés vis-à-vis du GLRaV-3, trois échantillons sont détectés en ELISA et 7 le sont par RT-PCR. Les 3 échantillons détectés en ELISA sont confirmés en RT-PCR. Quatre échantillons ne sont détectés qu'en RT-PCR. Concernant le GLRaV-5, Deux échantillons sont détectés en ELISA et en RT-PCR.

Pour les 4 échantillons du cépage Alphonse Lavallé testés vis-à-vis du GLRaV-3, les 4 échantillons sont détectés en ELISA et seulement 1 par RT-PCR qui correspond à l'un des échantillons testés en ELISA. Concernant le GLRaV-5, aucun des échantillons n'est positif par les deux méthodes.

Pour les 6 échantillons du cépage Cardinal testés vis-à-vis du GLRaV-3, les quatre échantillons détectés en ELISA le sont par RT-PCR. Concernant le GLRaV-5, aucun échantillon n'a été détecté avec les deux méthodes.

Pour les 10 échantillons du cépage Dattier de Beyrouth testés vis-à-vis du GLRaV-3, les six échantillons détectés en ELISA le sont par RT-PCR. Quatre échantillons ne sont détectés qu'en RT-PCR. Concernant le GLRaV-5, un échantillon est détecté en RT-PCR mais n'a pas été détecté par ELISA.

Pour les 6 échantillons du cépage El-Beydha testés vis-à-vis du GLRaV-3, six échantillons sont détectés en ELISA. Cinq échantillons sont détectés avec les deux méthodes et un échantillon n'est détecté qu'en ELISA. Concernant le GLRaV-5, aucun échantillon n'a été trouvé infecté.

Les pourcentages de plants infectés ont été estimés pour chacune des deux méthodes. Concernant le GLRaV-3, sur les 58 échantillons testés, 28 ont répondu positivement au test ELISA et 36 échantillons pour la RT-PCR. Le pourcentage total d'infection est passé de 48,2% pour le test sérologique à 62% pour la RT-PCR (Figure 19).

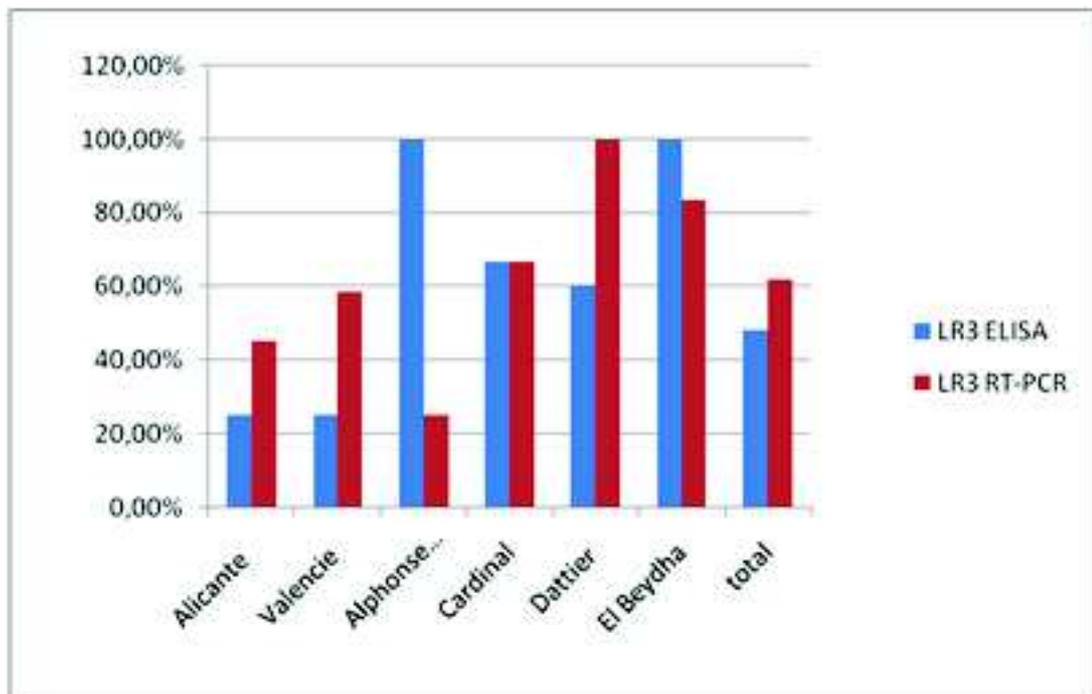


Figure 19. Comparaison des pourcentages d'infection obtenus avec le test ELISA et la RT-PCR vis-à-vis des is des virus GLRaV-3

Pour le GLRaV-5, la différence entre les deux méthodes, réside seulement dans un seul échantillon. Le pourcentage d'infection est plus important pour le test sérologique avec 6,9% par rapport au pourcentage d'infection par RT-PCR qui est de 5,2% (Figure 20).

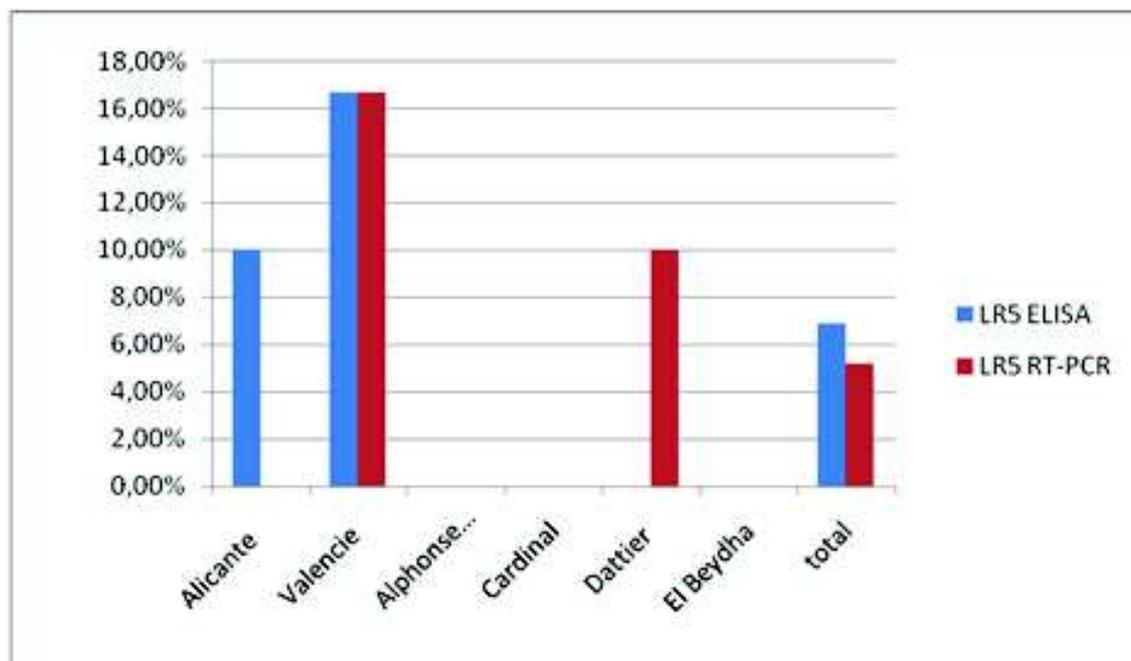


Figure 20. Comparaison des pourcentages d'infection obtenus avec le test ELISA et la RT-PCR vis-à-vis des is des virus GLRaV-5

IV.4.2. Discussion

La comparaison du test sérologique et de la RT-PCR pour la détection des GLRaV-3 et GLRaV-5 montre que certains échantillons positifs lors du test immunoenzymatique sont avérés être négatifs lors de la RT-PCR. Ling et *al.* (1998), Good et Monis (2001) qui ont mis au point les amorces utilisés lors de notre étude, n'ont utilisé qu'une seule souche de chacun des virus, sur la base d'une comparaison des séquences de leurs souches avec plusieurs *Closteroviridae* pour identifier des régions conservées et spécifique du GLRaV-3 et du GLRaV-5 ayant servi pour construire les amorces. Or, dans la mise au point d'amorces, il est intéressant d'étudier la spécificité de ces amorces sur les différentes souches de GLRaV-3 et 5 décrites. Des travaux ont permis d'obtenir des amorces des deux virus suite au choix de séquences conservées spécifiques à plusieurs souches des virus GLRaV-3 et GLRaV-5 (Osman et *al.* 2006).

La réaction négative de certains échantillons à la RT-PCR bien qu'ils soient positifs lors du test immunoenzymatique laisse supposer une variabilité génétique au sein des échantillons ce qui a rendu les amorces utilisées inefficace pour certains échantillons. Ainsi, il est nécessaire de mener des études sur la variabilité génétique des virus de l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie. En, Afrique du Sud, Jouste (2011) a mis en évidence la présence de trois souches du GLRaV-3 par l'étude du polymorphisme de l'ORF5 par la méthode Single Strand Conformation polymorphism (SSCP) qui ont été séquencés et caractérisés. Gouveia (2011) a réalisé une étude phylogénique sur la protéine capsidiale du

GLRaV-3 de 174 isolats provenant d'une collection de vigne portugaise et indique que le gène de la protéine capsidiale se subdivise en 5 groupes phylogéniques distincts.

Aussi, certains échantillons ont réagi positivement à la RT-PCR mais se sont avérés négatifs lors du test immunoenzymatique. Cela peut être dû à la faible concentration des virions dans les échantillons testés. Ainsi le test immunoenzymatique présente des limites liées à la concentration de l'antigène. Il existe une concentration à laquelle le test sérologique répond négativement même en présence de l'antigène. La sensibilité du DAS-ELISA se situe entre 1 et 10ng/ml (Astier et *al.* 2001) à l'inverse de la PCR qui reconnaît même de très faibles concentrations de séquences d'ADN.

La comparaison entre le test immunoenzymatique et le test moléculaire montre les limites de chaque test. Ainsi, pour les tests immunoenzymatiques, l'un des facteurs limitant est la concentration du virion qui peut être dans certains cas très faible en plus de la phosphatase alcaline qui interagit avec l'anticorps réduisant la sensibilité du test. Le choix du seuil de détection pose aussi un énorme problème dans l'interprétation des résultats. Pour les tests moléculaires l'inconvénient majeur réside dans la spécificité des amorces.

Ramel et *al.* (2004) rapportent dans leur comparaison entre le test ELISA et la RT-PCR pour la détection du virus du Bois strié du pommier que certains échantillons positifs lors de l'ELISA ont répondu négativement à trois paires d'amorces utilisées en RT-PCR. Ainsi l'inconvénient majeur de la RT-PCR est sa grande spécificité car l'utilisation d'amorces spécifique à toutes les formes et souches d'un même virus est une condition majeure pour la réussite du test.

Heleguera et *al.* (2001) ont rapporté que des échantillons prélevés durant l'été sur des plantes infectées ont montré un résultat positif pour le *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) avec la RT-PCR, mais ont produit un résultat négatif avec le test ELISA. Le même auteur rapporte que la sensibilité du test ELISA varie également selon l'origine des échantillons. Ainsi, la sensibilité diffère lorsque l'échantillonnage est fait sur des feuilles ou bien sur le cortex.

En vu de ces résultats, il semble que la combinaison des deux techniques soit à préconiser. Le développement de ces outils serait d'un apport précieux pour le contrôle de la maladie dans les parcs à bois ainsi que pour la certification des plants.

V. Conclusion Générale.

L'étude réalisée au cours de ce travail porte sur la maladie de l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie.

Les prospections réalisées dans la région centre et ouest du pays nous ont permis d'obtenir des résultats symptomatologiques qui nous indiquent une disparité dans les symptômes d'enroulement foliaire. Nous avons pu constater que presque la majorité des vignobles de la région ouest et centre du pays sont atteints par un enroulement foliaire qui est sévère dans certains cas. L'enroulement foliaire de la vigne observé est suivi par une coloration rouge brique ou bien un jaunissement suivant qu'on est en présence d'un cépage rouge ou bien blanc. Cependant, l'étude réalisée a porté seulement sur 100 échantillons et sur des vignobles de production de raisins et de vins et n'a pas porté sur les parcs à bois. Une étude plus large est nécessaire pour connaître l'état sanitaire des vignobles algériens et déterminer les modes de propagation des viroses de la vigne. Ainsi, il sera utile de mener des prospections sur les parcs à bois dans la région centre et ouest pour les virus les plus dangereux tel que le virus du court noué, le virus de la mosaïque arabe de la vigne, le virus de la vigne A, B et les virus de l'enroulement foliaire de la vigne.

L'étude des insectes vecteurs est nécessaire pour une bonne compréhension de la maladie de l'enroulement de la vigne. Aucune étude n'a été réalisée sur l'entomofaune de la vigne en Algérie et il s'avère utile de faire une étude sur l'existence des insectes vecteurs des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne vu qu'ils ont été signalés dans beaucoup de pays méditerranéens.

Un test sérologique a été réalisé sur les échantillons collectés et a révélé la présence des GLRaV-1, -2, -3, -5 et -6. Ainsi, nous avons détecté pour la première fois en Algérie le GLRaV-5 et -6 par ELISA. Une étude sur la prédominance de ces virus a été réalisée et a montré que le GLRaV-3 et GLRaV-2 sont les virus les plus prédominants en Algérie. Cependant, l'étude réalisée n'a pas porté sur le GLRaV-4, -7, -9, -De et -Pr, il s'avère utile de mener des études sur ces virus parce qu'ils ont été détectés dans plusieurs pays du pourtour méditerranéen.

Une RT-PCR a été réalisée pour confirmer la présence du GLRaV-3 et -5. Les résultats obtenus montrent la présence du GLRaV-3 et -5 pour la première fois en Algérie par RT-PCR. Cependant, il est nécessaire de faire un séquençage et d'étudier la variabilité génétique au sein de ces deux virus afin de déterminer les souches présentes en Algérie.

Une comparaison entre le test ELISA et la RT-PCR a été réalisée et a montré des résultats différents pour les deux techniques concernant certains échantillons, cela indique les limites des deux techniques et que leur combinaison est nécessaire pour l'amélioration des programmes de certifications.

L'étude menée lors de ce travail nous a permis d'approfondir nos connaissances sur ces virus et d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherches sur la symptomatologie des virus de l'enroulement foliaire de la vigne, l'étude des vecteurs, la caractérisation moléculaire et l'étude de la variabilité génétique au sein de ces espèces virales.

Références Bibliographiques

- Acheche H., Fattouch S., M'hirsi S., Marzouki N., Marrackchi M., 1999.** Use of optimized PCR methods for the detection of GLRaV3: a Closterovirus associated with grapevine leafroll in Tunisian grapevine plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **17**: 31-42.
- Aitouada M., Lehad A., Abdellaoui K., Louanchi M., 2010.** Mise au point d'un sérum polyclonal anti-GLRV-1-3. Accepté pour communication au Séminaire international de biologie végétale et écologie, 22-25 novembre 2010, Constantine, Algérie.
- Astier S., Albouy J., Maury Y., 2001,** Principes de virologie végétale Génome, pouvoir pathogène, écologie, INRA de France
- Belli G., Fortusini A., Casati P., Belli L., Bianco P.A., Prati S., 1994.** Transmission of a grapevine leafroll associated closterovirus by the scale insect *Pulvinaria vitis* L. *Rivista di Patologia Vegetale* **4**: 105-108.
- Berisha B., Chen Y. D., Zhang G. Y., Xu B., Y. et Chen T. A., 1998.** Isolation of Pierce's disease bacteria from grapevine in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, **104**: 427-433.
- Berraf A., 2010.** Phaeocremonium species associated with decline of grapevine in Algeria. 13th Congress of Mediterranean Phytopathological Union, 20-25 June 2010, Roma, Italy.
- Berraf A., 2009.** Fungi associated with decline of grapevine in Algeria (*Eutypa Dieback* and *Esca*). 10th Arab Congress of plant protection, 26-30 October 2009, Beirut, Lebanon
- Bertazzon N., Angelini E., 2004.** Advances in the detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants. *Journal of Plant Pathology*, **86**: 283-290.
- Bertolini Edson & García Julio & Yuste Alberto & Olmos Antonio, 2010,** High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathol* volume, **128**:283–287
- Boubals D., 1989.** La maladie de pierce arrive dans les vignobles d'Europe. *Bull.O.I.V.*, **62** :309-314
- Boudon-Padieu E., Ridé M., Walter B., 2000,** Maladies à virus bactéries et phytoplasmes de la vigne, FERET- Bordeaux.
- Bovey R., Gärtel W., Hewitt W. B., Martelli G. P., Vuittenez A., 1980,** Maladies à virus et affection similaire de la vigne, *Maison Rustique*, 16-15
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J. and Watson, L. (1996). *Viruses of Plants*, CAB International, Wallingford, UK, P.1484.
- Cabaleiro, 2009.** . Current advanced in the epidemiology of Grapevine leafroll disease *Extended Abstracts 16th Meeting of ICVG, Dijon, France*, p.:264.

- Cabaleiro, C., and A. Segura. 2006.** Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 441-446.
- Cabaleiro, C., Segura, A., & Garcia-Berrios, J. J., 1999.** Effects of grapevine leafroll associated virus 3 on the physiology and must of *Vitis vinifera* L. cv. Albariño following contamination in the field. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 40–44.
- Cabaleiro C., Segura A., 1997.** Field transmission of Grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybug *Planococcus citri*. *Plant Dis*, 81: 283-287.
- Creasy Glen L. et Creasy Leroy L., 2009. Grapes. CAB International, New York.
- Constable F. et Rodoni B. 2011,** Grapevine Leafroll associated Virus, fact sheet
- Credi R, Babini AR 1997.** Effects of virus and virus-like infections on growth, yield and fruit quality of Albana and Trebbiano Romagnolo grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 7-12.
- Digiario M., Martelli G. P., et Savino V., 1997.** Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East: a synopsis. *Options Méditerranéennes, Série B/n 29- Proceeding of the Mediterranean Network on Grapevine Closterovirus.*
- Dubos B., 1999,** les maladies cryptogamiques de la vigne, Féret – Bordeaux.
- Elleuch, A., Fakhfakh H., Pelchat M., Landry P., Marrakchi M., Perreault J.P., 2002,** Sequencing of *Australian Grapevine Viroid* and *Yellow Speckle Viroid* isolated from a Tunisian Grapevine without Passage in an Indicator Plant. *European Journal of Plant Pathology*, 108, n°8.
- Engelbrecht D. J., Kasdorf G. G. F., 1990.** Transmission of grapevine leafroll disease and associated closterovirus by the nine mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica*, 22: 341-346
- Engel E. A., Escobar P. F., Rivera P. A., Valenzuela P. D. T., 2010,** First Report on the Occurrence of *Grapevine leafroll-associated virus 5* in Chilean Grapevines plant disease, 94, n° 8: 1067
- Faggioli F & La Starza S., 2006.** One-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of eight grapevine viruses and its application in a sanitary selection program. *Extended abstracts of the 15th ICVG Meeting, 2006-04-03/07, Stellenbosch, South Africa.*
- Foissac X., Svanella-Dumas L., Gentit P., Dulucq M.J., Candresse T., 2001.** Polyvalent detection of Tricho-, Capillo and Foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine-containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550: 37-44.
- Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. 2005.** Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier-Academic Press, Amsterdam, p. 1259.
- Fortusini A., Scattini G., Prati S., Cinquanta S., Belli G., 1997.** Transmission of grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and grapevine virus A (GVA) by scale insects. *Proceedings of 12th Meeting of ICVG, Lisbon, 1997: 121-122.*

- Gambino G., Bondaz J., Gribaudo I., 2006.** Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 114: 397-404.
- Garau R., Prota V.A., Boscia D., Fiori M., Prota U., 1995.** Pseudococcus affinis Mask., new vector of grapevine trichoviruses A and B. *Vitis*, 34: 67-68.
- Gazel M., Önelge N., 2003,** First report of grapevine viroids in the east Mediterranean region of Turkey. *Plant Pathology*, 52 n°3: 405-405.
- Golino D.A., Sim S.T., Grzegorzczak W., Rowhani A., 1998.** Transmission studies of grapevine closteroviruses by four species of mealybugs. *Phytopathology*, 88: 32.
- Good X., Monis J., 2001.** Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of Grapevine leafroll-associated virus – 5. *Phytopathology*, 91: 274-281.
- Gouveia Paulo, Santos Margarida Teixeira, Eiras-Dias Jose Eduardo, Nolasco Gustavo, 2011,** Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties, *Archives of Virology*, 56, (3): 413-420
- Gugerli P., Brugger J.-J., Bovey R., 1984.** L'enroulement de la vigne : mise en évidence de particules virales et développement d'une méthode immunoenzymatique pour le diagnostic rapide. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 16 : 299-304.
- Hadidi A., Flores R., Randles JW., Semancik JS., eds., 2003, *Viroids*. Collingwood, Australia: CSIRO Publications.
- Heleguera, P.R., Taborda, R., Docampo, D.M. and Ducasse, D.A. (2001).** Immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus* necrotic ring spot virus in the peach. *J. Virol. Meth.*, 95: 93-100.
- Hristov I, Abrasheva P 2001.** Effect of grapevine fanleaf virus and grapevine leafroll-associated virus 3 on vine plants under conditions of in vitro cultivation. *Rasteniievudni Nauki (Plant Science)*, Bulgaria, 38 (5-6): 269-274.
- Hull R., 2002.** *Matthew's Plant Virology*, 4th Edition. Academic Press, London
- Infante R, Fiore N. 2009.** Combined effect of thermotherapy and in vitro shoot culture on the Grapevine leafroll associated virus 2 Red Globe strain affecting 'Red Globe' vines. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 7: 274-277.
- Isnard H., 1947.** Vigne et colonization en Algérie. *Annales Economies, Sociétés, Civilisations*, Paris, Pp: 288-300.
- Jooste Anna Elizabeth Catharina, 2011,** Identification and molecular characterization of three genetic variants of Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) from South African vineyards and their spread in local vineyards, these de doctorat, *University of Stellenbosch, Afrique du Sud*.
- Karasev, A.V. 2000.** Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Ann. Rev. Phytopathol*, 38: 293-324

- Klaassen VA, Boeshore ML, Koonin EV, Tian T & Falk BW., 1995.** Genome Structure and Phylogenetic Analysis of Lettuce Infectious Yellows Virus, a Whitefly-Transmitted, Bipartite Closterovirus. *Virology*, 208: 99-110
- La Notte P., Buzkan N., Choueiri E., Minafra A., Martelli G.P., 1997.** Acquisition and transmission of grapevine virus A by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *Journal of Plant Pathology*, 78: 79-85.
- Lee, J. , & Martin, R. R. 2008.** Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics. *Food Chemistry*, 112 : 889–896
- Lee, J., Keller, K. E., Rennaker, C., & Martin, R. R., 2009.** Influence of grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of Oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Free amino acids, sugars, and organic acids. *Food Chemistry*, 117: 99–105.
- Lehad A., 2008.** Détection de virus de l'enroulement foliaire de la vigne dans la région de Boumerdes et mise au point d'un sérum anti-GLRaV. Mémoire d'ingénieur, Institut National Agronomique d'El-Harrache.
- Ling KS, Zhu HY, Drong RF, Slightom JL, McFerson JR, Gonsalves D., 1998.** Nucleotide sequence of the 3'-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus-3 genome reveals a typical monopartite closterovirus. *J Gen Virol*, 79:1299-1307
- Ling Kai-Shu, 1995.** Coat protein gene identification, genome organization, and PCR detection of grapevine leafroll associated Closterovirus-3 and study towards transgenic grapevines. Thesis of Doctor of Philosophy. Cornell University, page: 3-4.
- Louanchi M., Meamiche H. et Salhi L., 2010.** Etude de la spécialisation parasitaire et du polymorphisme génétique par les marqueurs RAPD de *Botrytis* sp. Accepté pour communication au séminaire international de biologie végétale et écologie, 22-25 novembre 2010, Constantine, Algérie.
- Mahfoudhi Naima, Digiario Michele, Dhouibi Mohamed Habib, 2008.** Incidence and Distribution of Grapevine Leafroll-associated viruses in Tunisian Vineyards. *Journal of Phytopathology*, 156, (9) : 556–558
- Mahfoudhi N., Habili N., Masri S. A., Dhouibi M. H., 2007,** First Report on the Occurrence of *Grapevine leafroll-associated viruses 5 and 9* in Tunisian Grapevines, *Plant Dis* , 91, (10).
- Mahya Eddine Makouk K., Fadjalat Djabar Ibrahim, Kamari Safa Ghassane, 2008.** Maladies virales des cultures importante dans la région arabe. Maison de la Renaissance Arabe, Beyrouth. P. 631.
- Martelli, G.P. & Boudon-Padieu E. 2006.** Directory of infectious diseases of grapevines. International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies. Options Méditerranéennes Ser. B, Studies and Research, 55: 59-75.
- Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D. Candresse T., Coutts R.H.A., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Hu J.S., Jelkman W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.J., Wisler G.C., Yoshikawa N., 2005. The family *Closteroviridae*.

In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,. Elsevier-Academic Press, Amsterdam, The Netherlands. Pp :1077-1087

- Martelli G, Agranovsky AA, Bar-Joseph M, Boscia D, Candresse T, Coutts RHA, Dolja V, Falk B, Gonsalves D, Jelkmann W, Karasev A, Minafra A, Namba S, Vetten H, Wisler G and Yoshikawa N., 2002.** The family Closteroviridae revised. *Archives of Virology*, 147: 2039–2044
- Martelli, G. P., 1993** : Graft-transmissible Diseases of Grapevines . Handbook for Detection and Diagnosis. FAOPublication Division, Rome.
- Martelli G. P., 1985**, viroses et quasi viroses de la vigne en Algérie, Rapport au gouvernement Algérien, F.A.O, Rome INPV.
- Martinson, T., M. Fuchs, G. Loeb, and H. Hoch. 2008.** Grapevine leafroll – an increasing problem in the Finger Lakes, the US and the world. Cornell University Cooperative Extension
- Meng B., Li C., Goszczyński Dariusez E., Gonsalves D., 2005** , Genome Sequences and Structures of Two Biologically Distinct Strains of Grapevine leafroll- associated virus 2 and Sequence Analysis, *Virus Genes*, 31: 31-41.
- MONIS, J., 2000**, Development of monoclonal antibodies reactive to a new grapevine leafroll-associated closterovirus. *Plant Dis.* 8: 858-862.
- Mousselmal O., 2011.** Detection et identification du virus de l'enroulement de la vigne (1, 2 et 3) dans la wilaya de Boumerdés et Alger, mémoire d'ingénieur, Institut Nationale Agronomique, EL-Harrach.
- OEPP, 2008.** Schemes for the production of healthy plants for planting – Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks. EPPO Bull. 38: 422-429.
- Osman, F., & Rowhani, A. 2006.** Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130–136.
- Padilla CV, Cretazzo E, López N, García de Rosa B, Padilla V, Velasco L, 2010.** First report of *Grapevine leafroll-associated virus 4* (GLRaV-4) in Spain. *New Disease Reports* volume 21, page 21 [<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2010.021.021>]
- Pathirana R, McKenzie M., 2005** . Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* using in vitro micrografting. *Plant Cell Tissus and Organ Culture*, 81, (1): 11-18
- Pei G.-Q., Dong Y.-F, Zhang Z.-P., and Fan X.-D., 2010**, First Report of *Grapevine leafroll-associated virus 4* and 5 in Grapevines in China, 94, (1), Page 130
- Peremyslov VV, Pan YW & Dolja VV., 2004.** Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, 78:3704-3709.
- Petersen C.L., Charles J.G., 1997.** Transmission of grapevine leafroll-associated closterovirus by *Pseudococcus longispinus* and *P. calceolariae*. *Plant Pathology*, 46: 509-515.

- Ramel M , Gugerli P , Bourquin L , De Meyer J, 2004**, Diagnostic immunoenzymatique des maladies du bois strié du pommier et du jaunissement des nervures. *Revue suisse de viticulture arboriculture horticulture*. 36, (4) : 207-214
- Rosciglione B., Gugerli P., 1989**. Transmission of grapevine leafroll disease and an associated closterovirus to healthy grapevine by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret. *Proceedings 9th meeting of ICVG, Kiryat Anavim, Israel, 1987*, Pp: 67-69
- Rosciglione B., Castellano M.A., 1985**. Further evidence that mealybugs can transmit grapevine virus A (GVA) to herbaceous hosts. *Phytopathologia Mediterranea*, 24: 186-188.
- Rosciglione B., Castellano M. A. Martelli G. P., Savino V., Cannizzaro G., 1983. Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis*, 22, p.p. 331-347
- Routh G., Zang Y.P., Saldarelli P., Rowhani A., 1998**. Use of degenerate primers for partial sequencing and RT-PCR based assays of grapevine leafroll-associated viruses 4 and 5. *Phytopathology*, 88: 1231-1237.
- Sabanadzovic Abou Ghanem, N. , Sabanadzovic, S. , Uyemoto, J. K. , Golino, D. , Rowhani, A. 2010**. A putative new ampelovirus associated with grapevine leafroll disease. *Arch Virol*, 155: 1871-1876.
- Seddas, A., Haidar, M.M., Greif, C., Jacquet, C., Cloquemin, G., Walter, B. 2000**, Establishment of a relationship between grapevine leafroll closterovirus 1 and 3 by use of monoclonal antibodies. *Plant Pathology*, 49: 80-85.
- Sforza R., Boudon-Padieu E. et Grief Charles. 2003**. New mealybug species vectoring Grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 (GLRaV-1 and -3). *European Journal of Plant Pathology*, 109: 975-981.
- Soule M. J., Eastwell K. C., and Naidu R. A., 2006**. First Report of *Grapevine leafroll associated virus-3* in American *Vitis* spp. *Grapevines in Washington State*, Volume 90, (11) : 1461
- Tanne E., Ben-Dov Y., Raccah B., 1989**. Transmission of the corky-bark disease by the mealybug *Planococcus ficus*. *Phytoparasitica*, volume, 17: 55
- Unwin T., 1996**. *Wine and the Vine*. Routledge and Francis group, London and New York, p: 47.
- Varela, L. G., R. J. Smith, and P. A. Phillips. 2001**. *Pierces disease*. University of California, Agriculture and Natural Resources, Oakland, CA.
- Varvara I., Maliogka C. I., Dovas L., Katis N. I., 2009**. Complete genome analysis and immunodetection of a member of a novel virus species belonging to the genus *Ampelovirus*. *Arch Virol*, 154: 209-218
- Volpe Melisa Lanza; Talquenca Sebastián Gómez; Engel Esteban A.; Gracia Olga ' 2010**, Incidence of *Grapevine Leafroll Associated Viruses -1, -2, and -3* in Mendoza vineyards *Trop. plant pathol. Brasília*, 35 (6).
- Vuittenez, A. ; 1985** : Additions to the inventory of virus and virus-like diseases of grapevine of French and foreign origin studied in France, with special reference to those we studied in the Station de Pathologie Viologie végétale of INRA at Colmar. *Phytopathol. Medit*. 24: 114-122.

Weintraud Phyllis G. et Jones Phil, 2010. Genomes, Plant Hosts and Vectors, CAB International. P: 188

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

Zorloni, Prati S., Bianco P.A., Belli G., 2006, Transmission of grapevine virus A and grapevine leafroll –associated virus 3 by *Heliococcus bohemicus* .Journal of Plant Pathology, 88, (3): 325-328.

Site internet:

www.faostat.com

Annexe

Annexe 1 : Liste des cépages de table autorisés en Algérie (Journal officiel n°7 du 28 janvier 2009)

1- Adari	21- Reine des vignes
2- Ahmeur Bou Amer	22- Servant Blanc
3- Alphonse Lavalle	23- Valensi (= Mokrani= panse de provence)
4- Bezoul El Khadem	24- Frana
5- Cardinal	25- Black Pearl
6- Chaouch Blanc	26- Centennial
7- Chaouch Rose	27- Argentina
8- Chasselas	28- King's Ruby
9- Dabouki	29- Adelo
10- Dattier de Beyrouth	30- Nerona
11- Gros noir des Beni Abbas	31- Bronx
12- Guerbez (=gros vert= Saint Jannette)	32- Emerald
13- Italia	33- Christmas rose
14- Madeleine du Sahel	34- Pasiga
15- Muscat d'Alexandrie	35- Alvina
16- Muscat de Hambourg	36- Dona Maria
17- Ohanes (Uva de Almeria)	37- Matilde
18- Panse précoce (= Sicilien)	38- Datal
19- Perle de Ksaba	39- Danam
20- Perlette	40- Red globe

Annexe 2 : Liste des cépages de raisin de séchage autorisés en Algérie (source : journal officiel n° 7 du 28 janvier 2009)

Adari	21- Reine des vignes
Ahneur Bou Amer	22- Servant Blanc
Alphonse Lavallo	23- Valensi (= Mokrani= panse de provence)
Bezoul El Khadem	24- Frana
Cardinal	25- Black Pearl
Chaouch Blanc	26- Centennial
Chaouch Rose	27- Argentina
Chasselas	28- King's Ruby
Dabouki	29- Adelo
Dattier de Beyzouth	30- Nerona
Gros noir des Béni Abbes	31- Bronx
Guerbez (=gros vert= Saint Jannette)	32- Emerald
Italia	33- Christmas rose
Madeleine du Sahel	34- Pasiga
Muscat d'Alexandrie	35- Alvina
Muscat de Hambourg	36- Dona Maria
Ohanes (Uva de Almeria)	37- Matilde
Panse précoce (= Sicilien)	38- Datal
Perle de Ksaba	39- Danam
Perlette	40- Red globe

Sultanine
Muscat d'Alexandrie
Corinthe Noire
King's Ruby
Centennial

Annexe 3 : Liste des cépages de cuve autorisés en Algérie (source : Journal officiel n° 7 du 28 janvier 2009)

Raisin noir ou rose	Raisin Blanc
Alicante Bouchet	1- Chardonnay
Aramon gris	2- Chenin blanc
Aramon oir	3- Clairette
Cabernet Franc	4- Frana
Cabernet Sauvignon	5- Grenache blanc
Carignan	6- Macabeu (=Macabeo)
Cinsault	7- Merseguerra (= listan= palomino)
Grenache Franc	8-Muscat d'Alexandrie
Grenache rose	9- Sauvignon
Grenache Velu	10- Tizourine Bou afrara (S. d'Algérie)
Merlot	11- Ugni blanc (= El Maoui)
Morestel (= Gros Matteredou)	12- Valenci blanc
Mourvedre (=Matteredou fin)	13- Pinot blanc
Pinot noir	
Syrah	
Tipasi (=Toustrain=plant Romain)	
Grenache gris	
Grenache noir	

Annexe 4 : Tampon du test sérologique

1 -Tampon phosphate (PBS)

(Ph7,4, pour 1000ml)

- 8 gr NaCl
- 0,2 gr KH₂PO₄
- 2,9 gr Na₂HPO₄
- 0,2 gr KCl
- 0,2 gr NaN₃

2- tampon d'extraction (Tris)

(Ph= 8,2, pour 1000ml)

- 60,5 gr Tris
- 8 gr NaCl
- 10 gr polyvinylpyrrolidone (PVP)
- 10 gr PEG
- 0,2 gr NaN₃
- 0,5 ml tween 20

3- tampon de sensibilisation

(Ph= 9,6, pour 1000ml)

- 1,5 gr Na₂CO₃
- 2,93 gr NaHCO₃
- 0,2 gr NaN₃

4- tampon de conjugaison

(Ph= 7,4, pour 1000ml)

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

5- Tampon de substrats

(Ph= 9,8, pour 1000ml)

- 97 ml Diethanolamine
- 0,2 gr NaN₃

Ajuster le Ph avec HCl

6- tampon de lavage

(Ph= 7,4 pour 1000ml)

- 1000 ml PBS
- 0,5 gr Tween 20

Annexe 5 : Tampon RT-PCR

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

a-Tampon de broyage (pour 50 ml)

- 23,65 gr thieosanate Guanidine (4M)
- 1,36 gr NaOAc (0,2 M) Ph : 5,2-5,5
- 0,465 gr EDTA 25mM
- 4,9 gr KOAc 1,0 M
- 50 ml d'eau distillé stérile (ajouter lentement et avec attention)

- 1,25 gr PVP-40, 2,5 % (ajouter apres avoir fait la stérilisation)
- 1,2 ml CH₃COOH pour ajuster le Ph (5,6- 5,8)

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

b-Tampon de lavage (pour 10ml)

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

c-Préparation du TBE (pour 1 L)

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

d-Préparation du NaI

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

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

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

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

f-Préparation du silica (silica dioxyde).

- 60 gr de silica dans 500ml d'eau distillé

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

Annexe 6 : Tableau de lecture des densités optique de chaque échantillon testé par ELISA (première microplaque)

	Echantillon	LR1 (1-56)	LR2 (1-56)	LR 3 (1-56)	LR5 (1-56)	LR6 (1-56)
Cépage	Hémo négatif	0,052	0,089	0,07	0,083	0,035
	Hémo négatif	0,05	0,17	0,08	0,105	0,043
	Hémo positif		0,975			0,79
	Hémo positif		1,07			0,779
	seuil de positivité	0,102	0,259	0,15	0,188	0,078
Valensi	VMD1	0,096	0,307	0,134	0,55	0,99
	VMD2	0,077	0,212	0,092	0,084	0,75
	VMD3	0,091	0,273	0,831	0,089	0,125
	VMD4	0,079	0,256	0,096	0,144	0,069
	VMD5	0,082	0,251	0,102	0,084	0,082
	VMD6	0,066	0,216	0,802	0,09	0,065
	VMD7	0,062	0,323	0,268	0,23	0,268
	VMD8	0,055	0,207	0,82	0,079	0,07
	VMD9	0,069	0,214	0,984	0,081	0,066
	VMD10	0,52	0,144	0,079	0,067	0,066
Alicante Bouchet	A1M1	0,076	0,239	0,123	0,103	0,09
	A1M2	0,064	0,291	0,094	0,075	0,074
	A1M3	0,073	0,319	0,493	0,082	0,092
	A1M4	0,062	0,311	0,072	0,068	0,057
	A1M5	0,083	0,212	0,084	0,077	0,073
	A1M6	0,069	0,216	0,536	0,086	0,049
	A1M7	0,167	0,302	0,098	0,095	0,061
	A1M8	0,05	0,306	0,721	0,086	0,038
	A1M9	0,069	0,977	0,384	0,069	0,063
	A1M10	0,046	0,184	0,063	0,104	0,091
Alicante Bouchet	A2M1	0,074	2,793	0,101	0,09	0,108
	A2M2	0,06	0,224	1,264	0,062	0,05
	A2M3	0,07	0,257	0,1	0,09	0,076
	A2M4	0,056	0,247	0,618	0,05	0,044
	A2M5	0,07	0,972	0,529	0,11	0,072
	A2M6	0,066	0,075	0,497	0,066	0,072
	A2M7	0,069	0,236	0,532	0,085	0,048
	A2M8	0,059	1,292	0,953	0,115	0,04
	A2M9	0,072	0,307	0,078	0,101	0,054
	A2M10	0,058	0,117	0,404	0,085	0,07
Valensi	VMG1	0,084	0,704	0,1	0,077	0,066
	VMG2	0,066	0,111	0,685	0,062	0,043
	VMG3	0,078	0,579	0,095	0,068	0,073
	VMG4	0,057	0,234	0,059	0,067	0,047
	VMG5	0,062	0,416	0,072	0,068	0,058
	VMG6	0,059	0,245	0,243	0,074	0,059
Alicante Bouchet	VMG7	0,065	0,345	0,359	0,061	0,04
	VMG8	0,062	0,19	0,06	0,067	0,03
	VMG9	0,2	0,373	0,077	0,087	0,044
	VMG10	0,272	0,71	0,806	0,064	0,038
	A3M1	0,073	0,755	0,426	0,064	0,067
	A3M2	0,073	0,623	0,076	0,09	0,098
	A3M3	0,081	0,237	0,102	0,082	0,77
	A3M4	0,078	0,6	0,207	0,085	0,044
	A3M5	0,081	0,283	0,085	0,084	0,064
	A3M6	0,072	1,053	0,057	0,148	0,063
A3M7	0,081	0,302	0,73	0,091	0,034	
A3M8	0,063	0,061	0,302	0,063	0,042	
A3M9	0,079	0,233	0,267	0,13	0,078	
A3M10	0,506	0,218	0,418	0,094	0,048	
A3M11	0,086	0,315	0,091	0,117	0,071	
Chasselas	CH1	0,071	0,204	1,175	0,076	0,055
	CH2	0,071	0,183	1,108	0,086	0,062
	CH3	0,061	0,173	1,375	0,08	0,039
	CH4	0,073	0,058	0,857	0,084	0,051
	CH5	0,058	0,055	1,169	0,075	0,05

Annexe 7 : Tableau de lecture des densités optique de chaque échantillon testé par ELISA (deuxième microplaque)

	Echantillon	LR1 (57-100)	LR2 (57-100)	LR3 (57-100)	LR5(57-100)	LR6 (57-100)	
cépage	témoin négatif	0,217	0,137	0,102	0,065	0,141	
	témoin négatif	0,129	0,113	0,097	0,059	0,15	
	témoin positif	0,429		1,328	0,769	3,969	
	témoin positif	0,429		1,467	0,738	4,079	
	seuil de positivité	0,346	0,25	0,199	0,124	0,291	
Chasselas	CH6	0,142	0,248	1,678	0,088	0,218	
	CH7	0,132	0,162	1,984	0,094	0,188	
	CH8	0,154	0,173	1,625	0,081	0,165	
	CH9	0,115	0,141	1,103	0,112	0,159	
Cardinal	CaH1	0,139	0,309	1,030	0,115	0,138	
	CaH2	0,08	0,252	1,027	0,117	0,15	
	CaH3	0,102	0,149	1,070	0,11	0,162	
	CaH4	0,065	0,107	0,158	0,085	0,128	
	CaH5	0,126	0,187	0,172	0,096	0,129	
	CaH6	0,068	0,206	0,931	0,088	0,153	
	CaH7	0,258	0,11	1,471	0,08	0,18	
	CaH8	0,143	0,432	1,339	0,063	0,147	
	CaH9	0,148	0,161	1,022	0,079	0,173	
	CaH10	0,139	0,149	0,221	0,083	0,184	
er de Beyrouth	DH1	0,134	0,16	1,116	0,101	0,146	
	DH2	0,103	0,155	1,133	0,102	0,122	
	DH3	0,587	0,389	1,601	0,119	0,136	
	DH4	0,068	0,165	0,943	0,083	0,096	
	DH5	0,1	0,127	1,336	0,09	0,118	
	DH6	0,126	0,165	0,124	0,068	0,109	
	DH7	0,187	0,377	2,12	0,088	0,144	
	DH8	0,148	0,242	1,362	0,158	0,177	
	DH9	0,156	0,272	1,451	0,0101	0,193	
	DH10	0,113	0,328	1,302	0,192	0,153	
	El-Beydha	EH1	0,123	0,301	1,052	0,069	0,158
		EH2	0,377	0,244	1,589	0,122	0,159
EH3		0,073	0,253	1,438	0,069	0,128	
EH4		0,067	0,213	0,844	0,159	0,739	
EH5		0,084	0,166	0,75	0,079	0,167	
EH6		0,114	0,364	1,641	0,069	0,096	
EH7		0,201	0,25	1,205	0,065	0,141	
EH8		0,173	0,307	1,451	0,072	0,139	
EH9		0,213	0,304	0,702	0,072	0,159	
EH10		0,181	0,234	1,301	0,051	0,14	
Dattier de Beyrouth	DSM1	0,142	0,326	0,196	0,057	0,115	
	DSM2	0,102	0,305	0,307	0,083	0,15	
	DSM3	0,149	0,252	1,085	0,105	0,137	
	DSM4	0,106	0,207	0,936	0,072	0,14	
	DSM5	0,14	0,23	0,94	0,083	0,134	
	DSM6	0,129	0,188	1,22	0,063	0,092	
	DSM7	0,157	0,083	2,555	0,065	0,165	
	DSM8	0,161	0,114	0,868	0,072	0,144	
	DSM9	0,123	0,172	0,17	0,065	0,133	
	DSM10	0,124	0,174	1,337	0,059	0,15	