

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPULIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش  
ECOLE NATIONAL SUPERIEURE AGRONOMIQUE EL-HARRACH-  
ALGER

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en sciences agronomiques

Département : Botanique.

Spécialité : Phytopathologie.

Option : Biotechnologies appliquées à La résistance des  
plantes.

THEME

Présenté par M<sup>r</sup> KHEDDAM HOCINE

Contribution à l'étude de la tristeza des agrumes (CTV) :  
Caractérisation biologique et mise au point de méthodes de lutte.

M <sup>r</sup> BOUZNAD Z.	Professeur	Président	ENSA Alger
M <sup>me</sup> LOUANCHI M.	Maître de conférences	Directeur	ENSA Alger
M <sup>r</sup> GUEZLANE A.	Maître de conférences	Examinateur	ENSA Alger
M <sup>me</sup> KRIMI Z.	Professeur	Examinateur	USD Blida
M <sup>r</sup> KHEDDAM M.	Maître de conférences	Invité	CNCC Alger

## Remerciement

Au terme de ce travail, nous remercions tout d'abord, le Bon Dieu pour le courage et toute la patience qu'il ma donné afin de surmonter toutes les difficultés rencontrées.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements, ma profonde gratitude à ma promotrice M<sup>me</sup> Louanchi M. pour l'aide précieuse qu'elle ma a apportée et les conseils infiniment utiles pour la réalisation de ce mémoire.

Mes sincères remerciements vont à M<sup>r</sup> Bouznad Z. qui ma fait l'honneur d'accepter de jury ce travail.

Mes remerciements également à M<sup>r</sup> Guezlane A. M<sup>me</sup> Krimi Z. et M<sup>r</sup> Kheddami M. pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Tous mes remerciements aussi à M<sup>r</sup> Kheddami , M<sup>me</sup> kheddami , M<sup>r</sup> Semaha , M<sup>elle</sup> Basta, M<sup>r</sup> Mendile, M<sup>r</sup> Haddad, M<sup>me</sup> Haddad, M<sup>elle</sup> Laàla et tous les travailleurs de L'INPV, ITAFV, CNCC afin de faciliter la réalisation de mon expérimentation.

Enfin j'adresse tous mes remerciements a tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Résumé

La tristeza est la maladie virale la plus importante des agrumes dans le monde entier.

Notre contribution a porté sur la localisation des sites près de la zone de quarantaine, sur la base d'un diagnostic symptomatologique, le symptôme le plus dominant dans nos vergers est le dépérissement. Sur les 4 sites prospectés, 3 sont contaminés par cette affection à des taux d'infection qui varient de 24 à 76%. L'identification réalisée a permis de montrer la présence du CTV dans différents vergers avec un taux d'infection de 39%, mais les résultats de l'indexage ont montré que l'isolat Algérien du CTV est peu pathogène.

Parmi les techniques utilisées dans l'assainissement, la thermothérapie et le micro-greffage de l'apex ont une grande efficacité pour éliminer les maladies virales telles que le CTV comme l'ont montré nos résultats qui classent le traitement 3 (la combinaison des deux méthodes) en premier par un pourcentage d'efficacité suivi par le traitement 2 (thermothérapie) et en dernier le traitement 1 (microgreffage).

**Mots clés:** tristeza, microgreffage, thermothérapie, agrumes, virus, indexage, méthodes d'assainissement

## الملخص

يعتبر التريستيزا مرض الحمضيات الأكثر انتشارا وخطورة في العالم، دراستنا تركزت حول معاينة مناطق المتيجة، بالقرب من منطقة العزل على أساس تحليل الأعراض لاحظنا أن العرض الطاعي هو جفاف أغصان الحمضيات. انطلاقا من مسح أربعة مواقع ، تحصلنا على ثلاث مواقع مصابة بهذا الفيروس بنسب تتراوح ما بين 24 إلى 76 بالمائة.

سمح لنا التشخيص عن طريق تقنية الأمصال بملاحظة وجود الفيروس بنسبة 39% لكن نتائج المرحلة الثانية أثبتت أن هذا الفيروس المعزول الجزائري اقل خطورة من بين التقنيات المستعملة في التصديق لدينا العلاج الحراري والتطعيم المخبري، حيث وجدنا أن لهاتين التقنيتين فعالية كبيرة في القضاء على الأمراض الفيروسية، مثلما تبين لنا من خلال النتائج التي حصلنا عليها، أين صنفت العلاج 03 ( الجمع بين التقنيتين) في المرتبة الأولى متبوعا بالعلاج 02 ( العلاج الحراري) في المرتبة الثانية، وأخيرا العلاج 01 ( التطعيم المخبري) في المرتبة الأخيرة.

**الكلمات المفتاحية:** تريستيزا ، التطعيم المخبري، العلاج الحراري، الحمضيات، الفيروسات، التطعيم، طرق التطهير.

## Summary

Tristeza virus disease is the largest citrus fruit in the world.

Our contribution has focused on the location of sites near the quarantine zone, on the basis of a symptomatic diagnosis; we note that the most dominant symptom in our orchards is decline. Of the 4 sites surveyed, 3 were infected by the disease at rates of infection ranging from 24 to 76%.

The identification carried out has shown the presence of CTV in different orchards with an infection rate of 39%, but the results of the second part showed that the Algerian isolate of CTV are little pathogen

Among the techniques used in certification, heat and micro-grafting of the apex were highly effective in eliminating viral diseases such as CTV as shown by our results that classify the treatment 3 (combination of both methods ) first by a percentage efficiency followed by treatment 2 (thermotherapy) and last treatment 1 (grafting).

**Keywords:** tristeza, grafting, thermotherapy, citrus virus, indexing, methods remediation

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> - La production agrumicole mondiale	5
<b>Tableau 2</b> - La distribution du verger agrumicole algérien en superficie cultivée et leur production par variété	6
<b>Tableau3</b> -Aptitudes des porte-greffes des agrumes aux différentes maladies	11
<b>Tableau4</b> - les porte-greffes et variétés des agrumes cultivés en Algérie	11
<b>Tableau 5</b> - Classification des virus des agrumes	12
<b>Tableau 6</b> - Famille et genre de virus présents chez les agrumes et d'autres familles de plantes	13
<b>Tableau 7</b> - Symptômes des différentes souches du CTV	21
<b>Tableau8</b> - Plantes indicatrices des souches de CTV	23
<b>Tableau9</b> - Tableau récapitulatif des zones prospectées	27
<b>Tableau10</b> - Tableau récapitulatif des produits utilisés pendant l'indexage	33
<b>Tableau 11</b> - Tableau récapitulatif des produits utilisés pendant le greffage	36
<b>Tableau 12</b> - Valeurs en DO du CTV obtenues par la DAS-ELISA pour les échantillons du test biologique (l'indexage).	48
<b>Tableau 13</b> - Analyse statistique du traitement 1 (micro-greffage d'apex)	50
<b>Tableau 14</b> - Analyse statistique du traitement 2 (thermothérapie)	51
<b>Tableau 15</b> - Analyse statistique du traitement 3 (la combinaison de la thérapie avec le micro-greffage de l'apex)	52

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> - La distribution du verger agrumicole en superficie cultivée par espèce	6
<b>Figure 2</b> - La distribution de La production agrumicole du verger Algérien par espèce	6
<b>Figure 3</b> - Distribution du CTV dans le monde	15
<b>Figure 4a</b> - Génome du CTV	17
<b>Figure 4b</b> - Organisation génomique du CTV	18
<b>Figure 5et 6</b> - Striures, dessins polygonaux et ponctuations dus au stem pitting souche agressive du CTV	19
<b>Figure7</b> - Petits fruits qui sont de mauvaise qualité	19
<b>Figure 8</b> - Plant sain à gauche, plants rabougris à droite	19
<b>Figure 9</b> - Feuilles en forme de cuillère	19
<b>Figure 10</b> - Hypertrophie des feuilles	19
<b>Figure 11</b> - Dépérissement de l'arbre (Quick Decline)	19
<b>Figure 12</b> - Principe du test - ELISA	31
<b>Figure 13</b> - Les différentes étapes de greffage	34
<b>Figure 14</b> - Insertion du greffon (écorce avec l'œil) dans le porte greffe	37
<b>Figure 15</b> - Dispositif expérimental (bloc aléatoire complète)	38
<b>Figure 16</b> - Plants ayant subi un forçage dans la serre	40
<b>Figure 17</b> - Porte-greffes âgés de 15 jours	42
<b>Figure 18</b> - Porte-greffes après leur préparation pour réaliser le micro-greffage (a) ; la nouvelle pousse prélevée (greffon) (b)	43
<b>Figure 19</b> - Réalisation de micro greffage	43
<b>Figure 20</b> - Elevage des plants greffés	43
<b>Figure 21</b> - Le sur greffage	43
<b>Figure 22</b> - Dessèchement des branches sur la variété Double fine	44
<b>Figure 23</b> - Fruits de mauvaise qualité	45
<b>Figure 24</b> - Feuilles en forme de coupe	45

<b>Figure 25</b> - Dépérissement totale de l'arbre	45
<b>Figure 26</b> - Taux d'infection du CTV dans les quatre stations	46
<b>Figure 27</b> : Symptômes d'éclaircissement des nervures sur l'indicateur la Lime Mexicaine	48
<b>Figure 28</b> - Aucun symptôme observé sur l'indicateur 2 (Madame venus)	48
<b>Figure 29</b> : Effet du micro-greffage sur le CTV (traitement 1)	52
<b>Figure 30</b> : Effet de la thermothérapie sur le CTV (traitement 2)	53
<b>Figure 31</b> : Effet de la combinaison du micro-greffage avec la thermothérapie sur le CTV (traitement 3)	53

## Liste des Abréviations.

### **1-Virus :**

CILV : Citrus leprosis virus.

CIMV : Citrus mosaic virus.

CITLV : Citrus letter leaf virus.

CLRV : Citrus leaf rugose virus.

CMV : Citrus mosaic virus.

CTV : Citrus tristeza virus.

CTV-CD : Citrus tristeza virus- quick decline.

CTV-SP : Citrus tristeza virus- stem pitting.

CTV-SY : Citrus tristeza virus- seedling yellow.

CVEV : Citrus vein enation virus.

CVIV : Citrus variegation infection virus.

CVV : Citrus variegation virus.

### **- Autres:**

.µl : microlitre.

.ADN db : Acide désoxyribonucléique double brin.

ARN sb : Acide ribonucléique simple brin.

BrCA: Brown Citrus Aphide.

DAS – ELISA: double antibody sandwich – enzyme linked immuno sorbent assay.

DO : densité optique.

IC-PCR : Immuno capture-polymerase chain reaction

ITAFV : l'institut technique des arbres fruitiers et vigne

MT : Methyltransferase

ORF: Open Reading Fragment.

P.B.S : Phosphate buffer Saline

## SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
1 Synthèse bibliographique .....	3
1.1-Généralités sur les agrumes.....	3
1.1.1-Historique .....	3
1.1.2-Aire de culture.....	3
1.1.3-Importance de l'agrumiculture.....	4
1.1.3.1-Dans le monde .....	4
1.1.3.2-Situation de l'agrumiculture en Algérie.....	5
1.1.4-La croissance chez les agrumes .....	5
1.1.5-Les différents porte-greffes cultivés.....	7
1.1.5.1-Le bigaradier(Citrus aurantium).....	8
1.1.5.2-Les citranges.....	8
1.1.5.2.1-Le citrange troyer .....	8
1.1.5.2.2-Le citrange carrizo .....	9
1.1.5.3- Le Poncirus trifoliata .....	9
1.1.5.4-Citrus volkameriana.....	10
1.1.5.5-Mandarine cléopâtre.....	10
1.1.5.6-Citrus macrophylla.....	10
1.2- Le virus de la Tristeza des agrumes.....	12
1.2.1- Généralités sur les virus des agrumes.....	12
1.2.2- Le virus de la Tristeza des agrumes.....	14
1.2.2.1- Généralités.....	14
1.2.2.2- Synonymes.....	14
1.2.2.3- Historique.....	14
1.2.2.4-Répartition géographique .....	15
1.2.2.5- Incidence économique .....	15
1.2.2.6- Etude de la particule virale .....	16
1.2.2.6.1- Propriétés de la particule virale.....	16
1.2.2.6.2- Propriétés biochimique et moléculaire .....	16
1.2.2.7- Symptomatologie .....	18
1.2.2.7.1- Symptômes macroscopiques .....	18
1.2.2.7.2- Symptômes microscopiques.....	20
1.2.2.8- Les différentes souches du CTV.....	20
1.2.2.9- Transmission .....	21
1.2.2.10- Le vecteur du CTV.....	22
1.2.2.11- Gamme d'hôtes.....	22

1.2.3- Diagnostic du CTV .....	22
1.2.3.1- Historique.....	22
1.2.3.2- Identification biologique (indexation).....	23
1.2.3.3- Test ELISA.....	24
1.2.3.4- La microscopie électronique.....	24
1.2.3.5- les techniques colorimétriques.....	24
1.2.3.6- Immuno capture-polymerase chain reaction (IC-PCR)....	24
1.2.4- Méthodes de lutte contre le CTV.....	26
1.2.4.1- La lutte contre le vecteur.....	26
1.2.4.2-La lutte contre l'agent pathogène.....	26
<b>2- Matériels et Méthodes.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1- Identification du CTV.....</b>	<b>27</b>
2.1.1- Zones prospectées.....	27
2.1.2- Méthode d'identification .....	27
2.1.2.1- Le diagnostic visuel.....	27
2.1.2.2- Conservation des échantillons .....	28
2.1.3- Identification par sérologie.....	28
2.1.3.1- Les solutions tampon .....	28
2.1.3.2- Préparation des échantillons .....	28
2.1.3.3- Test sérologique ELISA.....	28
2.1.3.3.1- Principe .....	28
2.1.3.3.2- Sérum utilisé .....	29
2.1.3.3.3- Mode opératoire .....	29
2.1.3.3.4- Lecture des résultats .....	30
<b>2.2- L'identification biologique (l'indexage).....</b>	<b>32</b>
2.2.1-Objectif .....	32
2.2.2- Matériel végétal.....	32
2.2.2.1- Les indicateurs (les porte-greffes.....	32
2.2.2.2- Le source de virus (le greffon) .....	32
2.2.3- Méthode d'étude.....	32
2.2.3.1- Prélèvement des greffons (les baguettes) .....	32
2.2.3.2- Conservation des baguettes.....	32
2.2.3.3- Le greffage .....	33
2.2.3.4- Entretien des plants.....	33
2.2.3.5- La lecture des résultats (par observation visuelle)..	33
2.2.3.6- Vérification de la transmission de virus .....	35
<b>2.3- Essai de méthodes d'assainissement.....</b>	<b>35</b>

2.3.1- Objectif .....	35
2.3.2- Le greffage .....	35
2.3.2.1- Matériel végétal.....	35
2.3.2.1.1- Les porte-greffes.....	35
2.3.2.1.2- Le source de virus (le greffon).....	35
2.3.3- Méthode d'étude.....	35
2.3.3.1- Mode opératoire.....	35
2.3.3.2- Entretien des plants.....	36
2.3.3.3- Vérification de la transmission de virus.....	36
2.3.4- Dispositif expérimental.....	37
2.3.5- L'analyse statistique.....	39
2.4- La thermothérapie .....	39
2.4.1- Appareil utilisé .....	39
2.4.2- Méthode .....	39
2.5- Le micro-greffage de l'apex.....	40
2.5.1- Préparation des milieux de culture.....	40
2.5.1.1- Milieu de semis .....	40
2.5.1.2- Milieu de micro-greffage.....	40
2.5.1.3- Stérilisation des milieux.....	40
2.5.2- Description de la technique du micro-greffage de l'apex « <i>in vitro</i> ».....	40
2.5.2.1- Elevage du porte-greffe.....	40
2.5.2.2- Préparation des greffons .....	41
2.5.2.3- Le micro-greffage de l'apex .....	41
2.5.2.4- Elevage des plants greffés .....	42
2.6- La vérification d'efficacité du traitement.....	42
3- Résultats et discussion.....	44
3.1- Identification du CTV.....	44
3.1.1- Résultats Obtenus.....	44
3.1.1.1- Observation des symptômes .....	44
3.1.1.2- Résultats du test ELISA .....	46
3.1.1.3- Taux d'infection.....	46
3.1.2- Discussion.....	47
3.2- Identification du CTV par indexage.....	47
3.2.1- Résultats obtenus.....	47
3.2.2 Discussion des résultats de l'indexage.....	49
3.3- Essai de méthodes d'assainissement.....	49
3.3.1.- Résultats du test ELISA.....	49

3.3.2- Effet de différents traitements sur l'élimination du CTV.....	52
3.3.3- Discussion .....	54
Conclusion générale.....	57
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	58
ANNEXES.....	64

## INTRODUCTION

Les agrumes occupent la première place des productions fruitières dans le monde avec 96 millions de tonnes produites en 2000 (Anonyme, 2001). Leur culture s'étend des zones tempérées chaudes aux zones tropicales entre 30<sup>0</sup>-40° de latitude Nord et de latitude Sud.

En Algérie, la superficie globale est de 45 859 hectares, avec une production annuelle moyenne évaluée à 68.034.532 quintaux durant ces dernières années. L'agrumiculture subit une dégradation quantitative et qualitative, alors qu'elle a connu un grand essor dans un passé proche (Anonyme, 2006).

La culture des agrumes est sujette aux attaques de nombreux agents pathogènes tels que les bactéries, les champignons, les virus et les viroïdes. La liste des maladies est impressionnante et ne cesse d'augmenter chaque année. L'agriculteur et en particulier le pépiniériste doivent être conscients de ces maladies et de leur propagation à travers l'échange du matériel végétal. L'absence de contrôle de l'échange du matériel végétal peut avoir de sérieuses répercussions sur la productivité et la qualité des fruits, pouvant entraîner le dépérissement et la mort des arbres (Aubert *et* Vullin, 1997).

Les viroses des plantes sont considérées comme les maladies les plus destructives, tenant leur gravité de la nature du virus qui une fois dans la plante, se généralise, se réplique et tue toute la culture (El Saqua, 2001).

En effet, l'action dépressive de ces maladies et surtout la tristeza a détruit plus de 20 millions d'arbres en Amérique latine et plus de 2 millions d'arbres en Espagne en quelques années (Bar-Joseph *et al.*, 1983).

La tristeza est la maladie virale la plus importante des agrumes. Le virus qui la cause est un organisme de quarantaine de la Liste A2. Cette maladie provoque la mort des arbres infectés de la plupart des cultivars d'agrumes (sauf ceux du citronnier) greffés sur bigaradier, porte-greffe extrêmement sensible qui a été très utilisé dans le passé à cause de ses excellentes qualités agronomiques. Des dizaines de millions d'arbres ont été détruits, notamment en Amérique du Nord et du Sud et dans certains pays méditerranéens (OEPP, 1999).

En Algérie, le CTV a été signalé pour la 1<sup>ère</sup> fois en 1982 par un expert français Bové. La maladie a été observée dans la collection agrumicole de la station de Boufarik, où des arbres présentaient des symptômes de CTV.

Bien que cette maladie ne soit pas généralisée, elle reste une préoccupation forte du fait de l'utilisation du bigaradier comme porte-greffe, la création de jeune verger suivi d'une multiplication anarchique, l'importation du matériel végétal non contrôlé et

l'insuffisance du personnel formé dans les laboratoires pour l'identification rapide des maladies les plus graves et des mesures pour les combattre.

Des mesures de quarantaine strictes sont nécessaires pour empêcher l'introduction du CTV dans les pays où il est absent. Ou bien l'introduction des souches agressives dans des zones où existent des souches relativement peu pathogènes (Navarro *et al.*, 1984).

La lutte contre CTV se fait par l'utilisation de porte-greffe tolérant. Cependant, il existe de nombreuses souches agressives qui provoquent des striures du bois, des rabougrissements, des diminutions de rendement et de qualité des fruits chez certains cultivars, même s'ils sont greffés sur des porte-greffes tolérants. Dans cette situation, la lutte contre la maladie ne peut se faire que par protection croisée avec des souches peu pathogènes du virus. Cette méthode présente beaucoup de difficultés et, en pratique, elle n'est utilisée à grande échelle efficacement qu'au Brésil (Costa et Muller, 1980).

Des programmes de certification doivent être établis dans tous les pays producteurs d'agrumes pour garantir la non-dissémination du CTV avec des greffons utilisés pour la propagation commerciale. Ce programme de certification comporte principalement deux moyens d'assainissement, la thermothérapie et le micro-greffage d'apex (Navarro *et al.*, 1988)

Vu l'importance et la gravité de cette maladie et afin de confirmer sa présence ou son absence sur quatre parcelles, notre travail est s'axé autour des objectifs suivant :

1. Identification du virus dans les parcelles d'agrumes dans la région de Mitidja (prés de la zone de quarantaine) par des prospections et collectes d'échantillons et la sélection des échantillons infectés par les tests immuno-enzymatiques.
2. Identification biologique de cet isolat par indexage.
3. La mise au point des méthodes d'assainissement par la thermothérapie, micro-greffage de l'apex et la combinaison des deux méthodes.

## **1- Synthèse bibliographique**

### **1.1-Généralités sur les agrumes**

Le mot «Agrume» est d'origine italienne désignant les fruits comestibles et par extension les arbres qui les portent, appartenant au genre *Citrus* (Loussert, 1985).

Les agrumes appartiennent à la famille des Rutaceae, qui se compose de trois genres : *Poncirus*, *Fortunella* et *Citrus* (Hodgson et Webber, 1967).

Les *Poncirus* sont utilisés comme porte-greffes ; les fruits obtenus par le genre *Fortunella* sont connus commercialement sous le nom de kumquat, par contre le genre *Citrus* constitue à lui seul 145 espèces, c'est le genre le plus important et le plus cultivé pour la production des fruits et comporte les orangers, mandariniers, clémentiniers, citronniers et les pomelos (Hodgson et Webber, 1967).

#### **1.1.1-Historique**

Les agrumes sont originaires des pays du sud-est asiatique où leur culture se confond avec l'histoire des civilisations anciennes de la Chine qui les cultivèrent d'abord pour leur parfums puis pour leurs fruits (Loussert, 1987).

Selon El-Faiz (1995), Abd-el-Rahmane, 1<sup>er</sup>calife Omeyyade, qui construisit la mosquée de Cordoue en Espagne, envoya des émissaires en Syrie pour lui rapporter des semences des plantes rares parmi lesquelles figuraient le cédratier, le bigaradier et le citronnier qu'il désirait introduire en Andalousie. Le rôle de la pépinière agrumicole (nommée alors Tarmidanat) est pour la première fois clairement identifiée par Ibn-Hajjaj en 1074 : «Il s'agit des lieux où se font des plantations de départ en vue de transférer ensuite les sujets à leur emplacement définitif».

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, l'agrumiculture évolua peu, en raison des difficultés économiques liées aux deux guerres mondiales. Au milieu des années 1940, l'agrumiculture mondiale prit un véritable essor grâce à l'utilisation du bigaradier comme porte-greffe. Ce choix permit d'une part de contrôler les pertes causées par *Phytophthora*, d'autre part les difficultés causées par la Tristeza (Zemane, 1931 ; Bitancourt, 1943).

#### **1.1.2-Aire de culture**

La culture des agrumes a pris naissance aussi bien en Inde qu'en Chine. Pendant le premier millénaire avant J-C, le premier centre agrumicole est le centre sino-indien.

C'est à partir de ce centre que la diffusion semble s'être opérée vers l'Est (Japon), le Sud (Malaisie) et l'Ouest (vallée de l'Indou) ainsi que vers le Nord-est.

La zone méditerranéenne constitue un autre centre qui a permis l'introduction des agrumes vers les deux Amériques et l'Afrique de l'Est, de l'Ouest et de Sud.

La diffusion des agrumes dans le reste du monde s'est opérée par trois voies :

- Les Arabes ont assuré leur diffusion sur la côte Est de l'Afrique jusqu'au Mozambique.
- Christophe Colomb les importera à Haïti, à son second voyage en 1493.
- Les Anglo-Hollandais les introduisent en 1954 en Afrique du sud (Jaque Monde et Blondel, 1986).

L'extension des agrumes dans le nouveau monde s'est faite à partir des Caraïbes, et c'est bien plus tard que l'Australie reçoit ses premiers agrumes du Brésil (Praloran, 1971).

Selon Cassin (1984), l'aire de culture des agrumes peut se diviser en trois principales zones climatiques :

- Zone intertropicale située de l'équateur aux latitudes 22<sup>0</sup>-23<sup>0</sup> nord et sud (alternance de saison humide et sèche).
- Zone semi-tropicale située entre les latitudes 22<sup>0</sup>-23<sup>0</sup> et 28<sup>0</sup>-29<sup>0</sup> nord et sud
- Zone située entre les latitudes 30<sup>0</sup>-40<sup>0</sup> nord et sud.

### **1.1.3- Importance de l'agrumiculture**

#### **1.1.3.1-Dans le monde**

Avec une production annuelle de 80 millions de tonnes, les agrumes, les raisins et les bananes représentent les trois principales cultures fruitières de la fin du XX<sup>e</sup> siècle au début du XXI<sup>e</sup> siècle. La place prépondérante qu'elles occupent s'explique par le fait qu'en plus de leur consommation en produit frais, ces fruits sont aussi couramment utilisés dans la transformation industrielle et domestique (Aubert et Vullin, 1997).

La production mondiale des agrumes a augmenté nettement durant la campagne agricole 1999/2000 du fait de la reprise dans de nombreux pays producteurs de l'hémisphère Nord. Aux Etats-Unis, la production des agrumes a légèrement augmenté entre 1998 et 2000 (Tableau 1) (Anonyme, 2001).

Celle-ci s'est également développée au Mexique, en Chine et dans la plupart des pays méditerranéens, à l'exception de la Turquie et du Maroc où elle est restée stable. Dans l'hémisphère Sud, la récolte de l'an 2000 a nettement diminué au Brésil, vu la rareté

des précipitations durant cette campagne. La même diminution a été observée en Afrique du Sud en raison des inondations, alors qu'en Australie et en Argentine, on note une augmentation (Anonyme, 2001).

**Tableau 1** : La production agrumicole mondiale (en milliers de tonnes)

	1995/1998	1998/1999	1999/2000	2000/2001
	Moyenne			
Brésil	18 797	17 662	19 700	17 000
Etats-Unis	15 279	12 334	15 748	15 682
Chine	8338	8590	10 787	9083
Espagne	4994	5265	5625	5471
Mexique	5175	4428	4730	4594
Italie	3138	2373	3215	2725
Egypte	2342	2410	4498	1932
Argentine	2342	2227	2240	-
Japon	1741	1597	1746	1487
Turquie	1612	1597	1826	1487
Autres	22 887	22 704	22 773	-
Total mondial	86 919	81 187	90 887	87 952

(Anonyme, 2001)

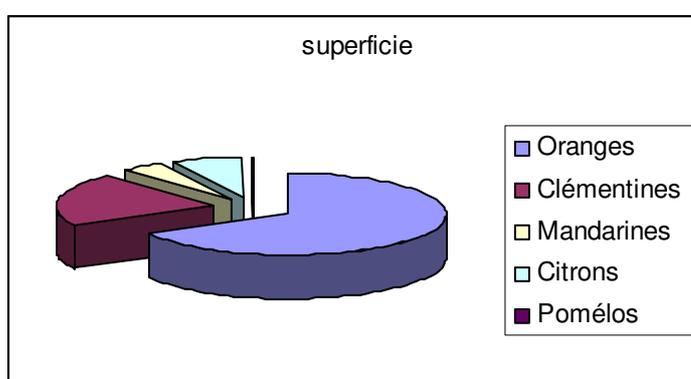
### 1.1.3.2- Situation de l'agrumiculture en Algérie

Les statistiques du ministère de l'Agriculture (Anonyme, 2006) indiquent que le verger agrumicole algérien, en rapport, occupe une superficie globale de 45 859 hectares sur 62 902 hectares plantés. La production agrumicole annuelle moyenne est évaluée à 68034532 quintaux répartie comme suit (Figure 1 et 2) (Tableau 2).

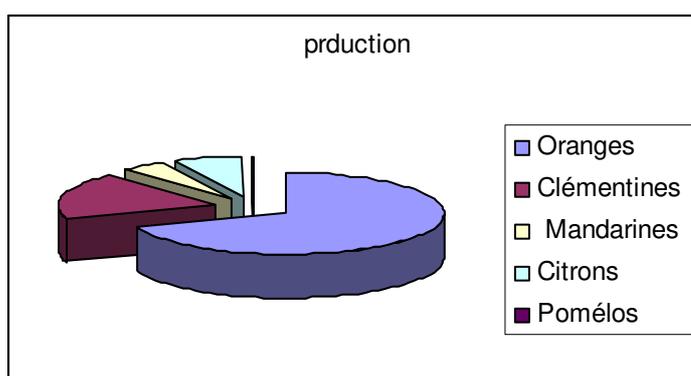
**Tableau 2** : La distribution du verger agrumicole algérien en superficie cultivée et leur production par variété

Espèces	Superficie	Production (tonne)
Oranger	30.864	4.744.530
Clémentinier	9.532	1.238.935
Mandarinier	2.086	321.957
Citronnier	3.283	472.710
Pomélos	94	25.300

(Statistiques du ministère de l'Agriculture série 2006)



**Figure 1** : La distribution du verger agrumicole en superficie cultivée par espèce



**Figure 2** : La distribution de la production agrumicole du verger algérien par espèce

La production agrumicole a connu une multitude de variations au cours des vingt dernières années. Actuellement, l'agrumiculture algérienne est confrontée à de nombreuses contraintes notamment :

- ✓ Le déficit hydrique, aggravé par l'état défectueux des réseaux d'irrigation.
- ✓ L'insuffisance des soins culturaux (taille, fertilisation, irrigation, désherbage)

- ✓ La sensibilité a de nombreuses maladies, telle que la mineuse, Phytophthora, la tache grasseuse, *Alternaria*, la mélanose, la tristeza.

La grande majorité du verger agrumicole algérien est greffé sur le bigaradier grâce à sa grande souplesse d'adaptation et à sa multiplication facile. Ainsi la distribution des porte-greffes utilisés en Algérie est la suivant :

- Bigaradier : 80%
- Citrange troyer : 10%
- Volkameriana : 9%
- Poncirus trifoliata : 0,8%
- Mandarine Cléopâtre : 0,1%
- Indéterminé : 0,1%

#### **1.1.4-La croissance chez les agrumes**

Les températures moyennes favorables à la culture des agrumes sont de l'ordre de 10 à 12<sup>0</sup> C pour l'hiver, 22-24<sup>0</sup> C pour l'été. Au printemps, les températures inférieures à 12<sup>0</sup> C peuvent handicaper leur formation (Loussert, 1985).

Selon Blondel (1959), l'humidité excessive de l'air ambiant et le vent sont deux facteurs non négligeables qui peuvent parfois endommager non seulement la production mais également l'arbre.

Les plantes d'agrumes sont composées d'une partie racinaire et une aérienne. Le développement, tant en profondeur que latéralement, démontre que le porte-greffe joue aussi un rôle dans le développement et la localisation des racines. En règle générale, le système racinaire est localisé dans le 1<sup>er</sup> mètre de profondeur (Loussert, 1985).

#### **1.1.5-Les différents porte-greffes cultivés**

Les agrumes présentent une très grande diversité, mais le matériel végétal destiné à être utilisé comme porte-greffe d'agrumes doit être le plus adéquat sur le plan production et résistance aux maladies (Aubert, 1990). Il ne faut pas oublier que le porte-greffe est le plus souvent multiplié par semis (Anonyme, 1992). Le porte-greffe idéal n'existe pas, il conviendra de choisir le meilleur compromis possible. La description des porte-greffes conventionnels est présentée en tableau3. En Algérie les porte-greffes et variétés cultivées sont organisés dans le tableau4.

### 1.1.5.1-Le bigaradier

Il s'agit du porte-greffe le plus anciennement utilisé et qui reste encore dominant dans bien des pays du Bassin méditerranéen. Il tend à perdre sa place prépondérante en raison des associations sensibles qu'il constitue vis-à-vis du virus de la tristeza (Rey, 1997).

C'est le sujet le plus connu grâce à sa grande souplesse d'adaptation et à sa multiplication facile. Il n'a été introduit dans le Bassin méditerranéen que vers la moitié du XII<sup>e</sup> siècle. Parmi ses caractéristiques, on note son adaptation à de nombreux types de sol, allant des sols lourds argileux de la plaine de la Mitidja en Algérie aux sols légers sablo-limoneux de la vallée du Sousse au Maroc (Cassin, 1983).

Le bigaradier ne donne pas une trop grande vigueur aux arbres, ceci permet de les maintenir assez bas, afin de faciliter les soins. Il confère au greffon une bonne productivité et aux fruits une bonne qualité. Il est moyennement tolérant à la sécheresse (Rebour, 1957, Davis *et* Albrigo. 1994).

Le bigaradier est sensible au mal secco, une maladie du système vasculaire due à *Phoma tracheiphila*. Il donne des associations sensibles au virus de la tristeza, notamment avec le mandarinier, l'oranger et ses hybrides ou le pomelo, mais pas avec le citronnier ou le bergamotier. Il est tolérant à la *cachexie-xyloporose* et à l'*exocortis*, résistant à la gommose et à *Phytophthora*, mais sensible aux nématodes notamment ceux du type *Tylenchulus semipenetrans* (Rey, 1997).

### 1.1.5.2- Les citranges

#### 1.1.5.2.1- Le *citrange troyer*

Le *citrange troyer* est un hybride de l'oranger *Washington Navel* avec le *Poncirus trifoliata*. De ce fait, il a les caractéristiques de ses deux parents (Ben cheikh, 1978).

Le *citrange troyer* présente des qualités très voisines de son géniteur, le *Poncirus trifoliata*. Du point de vue aptitude, ce porte-greffe présente une résistance assez élevée aux maladies virales, une vigueur moyenne, une productivité élevée et une mise à fruits améliorée.

Quant aux aptitudes édaphiques, sa résistance en terre est moyenne. Elle est faible à moyenne en terre sèche. Sa résistance aux chlorures, est faible. Sa multiplication, elle est facile et se fait soit par semis soit par greffage (Blondel, 1967).

D'autre part, le *citrangé troyer* forme des associations tolérantes à la tristezza, à la *cachexie xyloporose* et résistantes à la gommose. Mais il est sensible à l'*exocortis* (Praloran, 1971).

#### **1.1.5.2.2- Le *Citrangé carrizo***

C'est un porte-greffe hybride de *Citrus simensis* et de *Poncirus trifoliata*. Après ce croisement, le docteur Swingle était impressionné de l'aspect des fruits du *citrangé carrizo* et de l'uniformité des jeunes plants qui les ont produits. Des spécimens de ces arbres ont été alors envoyés au Texas afin de mieux les expérimenter (Savage *et al.*, 1965).

Ce porte-greffe se comporte globalement comme le *citrangé troyer*, mais il présente un enracinement plus dense et plus profond et il est plus résistant aux chlorures (Rey, 1997).

Le *citrangé carrizo* donne des associations tolérantes à la tristezza et sa résistance aux nématodes est meilleure qu'avec le *citrangé troyer*. Il semble moins sensible à certains viroïdes (Rey, 1997).

En général, le *citrangé carrizo* peut être légèrement préférable au troyer comme porte-greffe pour les oranges. Il est admis universellement que les citrangers (troyer, carrizo) sont tolérants à la tristezza (Praloran, 1971).

#### **1.1.5.3- Le *Poncirus trifoliata***

Cette espèce originaire de Chine est employée comme porte-greffe depuis 1848 (Blonde in Bouderbala, 1978).

C'est une espèce à feuilles caduques trifoliées, la pulpe des fruits n'est pas comestible (Praloran, 1971).

Les diverses variétés de ce genre monospécifique possèdent une grande résistance au froid (jusqu'à  $-15^{\circ}$  C) qui est partiellement conférée au scion. Ce porte-greffe est donc recommandé pour les zones à hiver marqué. Le *Poncirus* supporte bien les terres humides et l'asphyxie, mais il craint les sols secs. En revanche, il montre une grande sensibilité au calcaire et aux chlorures, c'est un porte-greffe mal adapté aux régions chaudes et arides (Rey, 1997).

Le Poncirus forme avec la plupart des cultivars des associations tolérantes à la tristeza, en même temps il a une bonne résistance à la gommose et aux nématodes, mais il est sensible à l'*exocortis* et à la rouille (Loussert, 1987).

#### **1.1.5.4- *Citrus volkameriana***

A l'origine, ce porte-greffe avait retenu l'attention pour sa résistance au mal secco. C'est un bon porte-greffe, notamment pour les citronniers, les limettiers et divers autres agrumes. Le *Citrus volkameriana* est assez résistant aux chlorures, s'adapte bien en sols secs, mais nécessite des sols aérés. Il supporte moyennement les sols lourds et résiste mal à l'asphyxie (Rey, 1997).

Ce porte-greffe résiste correctement à la gommose, à *Phytophthora* et il donne des associations tolérantes à la tristeza, à l'*exocortis*, à la *cachexie*, (Rey, 1997).

#### **1.1.5.5- *Mandarine cléopâtre***

Ce porte-greffe est utilisé pour sa tolérance à la tristeza, à la *cachexie xyloporose* et à l'*exocortis*, et à moindre degré à la rouille, mais il est sensible à la gommose. Il ne supporte que les sols légers et bien drainés. La productivité et la qualité des fruits sont moyennes. Les plantules sont sensibles à la fonte de semis et le greffage est souvent délicat (Rey, 1997).

#### **1.1.5.6- *Citrus macrophylla***

Il est originaire de l'île de Cebu aux Philippines. C'est un hybride issu d'un croisement entre citronnier et pamplemoussier. Ce porte-greffe peut être recommandé de préférence pour les citronniers et les limettiers à gros fruits dans les régions indemnes de tristeza. *Citrus macrophylla* est sensible au froid et aux sols humides. En revanche, il supporte des teneurs élevées en chlorures et s'accommode de sols très calcaires mais souvent il montre des carences en magnésium. Il donne également des associations de bon comportement en régions arides de type sahélien (régions le plus souvent indemnes de tristeza) (Rey, 1997).

Ce porte-greffe est tolérant à la gommose et réagit bien aux autres attaques racinaires, de *Diaprepas abbreviatus* en particulier, en raison de son aptitude à régénérer rapidement les racines lésées. Il est tolérant à l'*exocortis*, mais sensible à la tristeza ainsi qu'à la *cachexie-xyloporose*. La sensibilité à la tristeza est plus marquée lorsque le virus

contamine le sujet avant le greffage, ce qui est le cas lorsque la maladie est transmise par des pucerons à de jeunes semis (Rey, 1997).

**Tableau 3** : Aptitudes des porte-greffes des agrumes aux différentes maladies.

Porte-greffe	Gommose Phytophthora	Tristeza	Cachexie Xyloporose	Exocortis
Bigaradier	Résistant	Très sensible	Tolérant	Tolérant
Mandarine Cléopatre	Sensible	Tolérant	Tolérant	Tolérant
Poncirus trifoliata	Résistant	Tolérant	Tolérant	Très sensible
Citrange troyer	Résistant	Tolérant	Tolérant	Sensible
Citrange carrizo	Résistant	Tolérant	Tolérant	Sensible
Orange de semis	Sensible	Tolérant	Tolérant	Tolérant
Limette douce de poles	Sensible	Sensible	Sensible	Sensible
Lime rangpur	Sensible	Tolérant	Sensible	Sensible
Rough lemon	Très sensible	Tolérant	Tolérant	Tolérant
Citrus volkamériana	Résistant	Tolérant	Tolérant	Tolérant

Source : Anonyme, 1995.

**Tableau 4** : les porte-greffes et variétés des agrumes cultivés en Algérie.

	Description	Variétés
Porte-greffe	matériel végétal adéquat sur le plan production et résistance aux maladies	<i>Bigaradier, Citrange Troyer, Volkameriana, Poncirus Trifoliata et Mandarine Cléopatre</i>
Les Orangers	C'est l'espèce du genre Citrus la plus importante par leur nombre de variétés et son production	Oranges blondes navel ( <i>Baianinha, Washington, Thomson, Navelena, Navelate, Newhal navel</i> ) ; oranges blondes ( <i>Valeneilate, Valencia</i> ) ; oranges sanguines ( <i>Double fine, Malaise, Moro, Tarocco</i> )
Les mandariniers	C'est la 2 <sup>ème</sup> espèce du genre Citrus après les oranges par leur importance	Mandarinier satsuma, Mandarinier communs, Clémentinier, Mandarinier ortanique
Les Citronniers	Arbre vigoureux à grand développement, fruit de formes ovales	<i>Euréka, Lisbonne, Verna et Femminello ovale</i>
Les Pomelos	Arbres de grande taille, à feuillage dense, cachant souvent les fruits	<i>Marsh, Seedle, Dunca et Shambar</i>

Source : Aubert, 1990 ; Loussert, 1989.

## 1.2- Le virus de la Tristeza des agrumes

### 1.2.1- Généralités sur les virus des agrumes

En 1966, le comité international de la taxonomie des virus (ICNV) a établi une classification des virus en fonction des propriétés biologiques et physico-chimiques des particules virales. Les virus des agrumes sont divisés en trois catégories :

- La première catégorie est composée de virus appartenant à des genres regroupés en cinq familles. Ces familles possèdent un acide nucléique de type ARN simple brin, mis à part la famille des Caulimoviridae qui est constituée d'un génome de type ADN double brin. La particule virale de ces virus est présente sous différentes formes : sphérique, bâtonnet, filament et isométrique (Tableau 5).
- La deuxième catégorie se compose de virus appartenant à des genres non regroupés en famille. Leur génome est de type ARN simple brin, leur particule virale est sous forme de bâtonnet et en filament.
- La troisième catégorie se compose de virus non assignés ni à une famille ni à un genre. Les particules virales sont de type filamenteux comme le Citrus ringspot (CRSV) et sphérique comme le *Satsuma dwarf virus* (SDV) avec un ARN simple brin.

**Tableau 5** : Classification des virus des agrumes

Génome	Particule	Ordre	Famille	Genre
ADN db, 1 Circulaire	Isométrique, Bâtonnet	-	Caulimoviridae	Badnavirus
ARN sb, 2+ Segment	Filamenteuse	Nidovirales	Closteroviridae	Closterovirus
ARN sb et Enveloppe	Isométrique, Monopartite, Sphérique, Tripartite.	Nidovirales Mononegavirales		Lutteovirus Ophiovirus
ARN sb	Isométrique, Tripartite, Filamenteuse, Bâtonnet	Nidovirales - -		Ilarvirus Capillovirus Rhabdovirus

Source : Van Regenmortel *et al.* 2000 ; 2001.

Les trois catégories des virus des agrumes ne sont pas spécifiques seulement aux agrumes mais à d'autres cultures (Tableau 6).

**Tableau 6:** Famille et genre de virus présents chez les agrumes et d'autres familles de plantes

<b>Famille</b>	<b>Genres spécifiques Agrumes</b>	<b>Genres non spécifiques Agrumes</b>
Bromoviridae	Ilarvirus : (CVIV). (CVV). (CLRv)	Ilarvirus (TSV). (PNRSV). (PDV). (PMOV). (APLPV). Alfamovirus : (AMV) Bromovirus : (BMV) Cucumovirus : (CMV). (BYMV) Oleavirus : (OLV2)
Bunyaviridae	Ophiovirus : (CPV)	Tospovirus : (TSWV). Tenuivirus : (RSV).
Caulimoviridae	Badnavirus : (CIMV).	Badnavirus : (ComYMV). Caulimovirus : (CaMV) PVCV-like viruses (Pv-CV) SBCMV-like viruses(SBCMV) CSVMV-like viruses (CSVMV) RTBV-like viruses (RTBV)
Closteroviridae	Closterovirus : (CTV).	Closterovirus : (BYV). (CCSV). (CLSV). Crinivirus : (LIYV).
Luteoviridae	Luteovirus (CVEV)	Luteovirus : (BYD-PAV). Polerovirus : (PLRV). (CYDV- RPV). Enamovirus : (PEMV-I).
-	Capilovirus : (CITLV). Rhabdovirus : (CILV).	Capillovirus : (ASGV).

Source : Giovani et Martelli, 1997 ; Van Regenmortel *et al.* 2001.

## **1.2.2- Le virus de la Tristeza des agrumes**

### **1.2.2.1- Généralités**

Le virus de la tristeza appartient à l'ordre des Nivirales, famille des Closteroviridae et genre Closterovirus (Van Regenmortel *et al.*, 2001). D'après Bar-Joseph *et al.* (1989), la tristeza est la seule maladie de cette famille qui infecte les agrumes.

### **1.2.2.2- Synonymes**

Noms communs : CTV (acronyme). Citrus seedling yellows virus (Fraser, 1952), Citrus quick decline virus (Fawcett et Wallace, 1946), Grapefruit stem pitting virus (Oberholzer *et al.*, 1949), Lime die-back virus (Hughes et Lister, 1949), Tristeza, seedling yellows, quick decline (anglais), Tristeza (espagnol, français), Podre dumbre de las raciallas (Argentine), Graft incompatibility (Java et Afrique du Sud), Dépérissement du limettier (Ghana) et Bud union decline (Australie), (Mc Clean, 1957).

### **1.2.2.3- Historique**

D'après MC Clean (1957), la tristeza est originaire de Chine, où elle était probablement endémique, alors que d'après Bar-Joseph *et al.* (1989), le CTV est probablement originaire de sud-est asiatique où les citrus sont originaires.

L'épidémie de la tristeza a infesté les arbres greffés sur bigaradier en Amérique du Sud (Pérou, Brésil, Uruguay et Argentine) entre 1930 et 1940 (Bové et Vogel, 1964) et en Amérique du Nord (Californie, Floride) en 1950 (Roistacher *et al.*, 1974).

En Thaïlande, ce virus a été signalé en 1973 par Knorr et ses collaborateurs. Le CTV a été signalé en Afrique du Sud en 1896 suite à un greffage de l'orange douce sur bigaradier (Frezal, 1953).

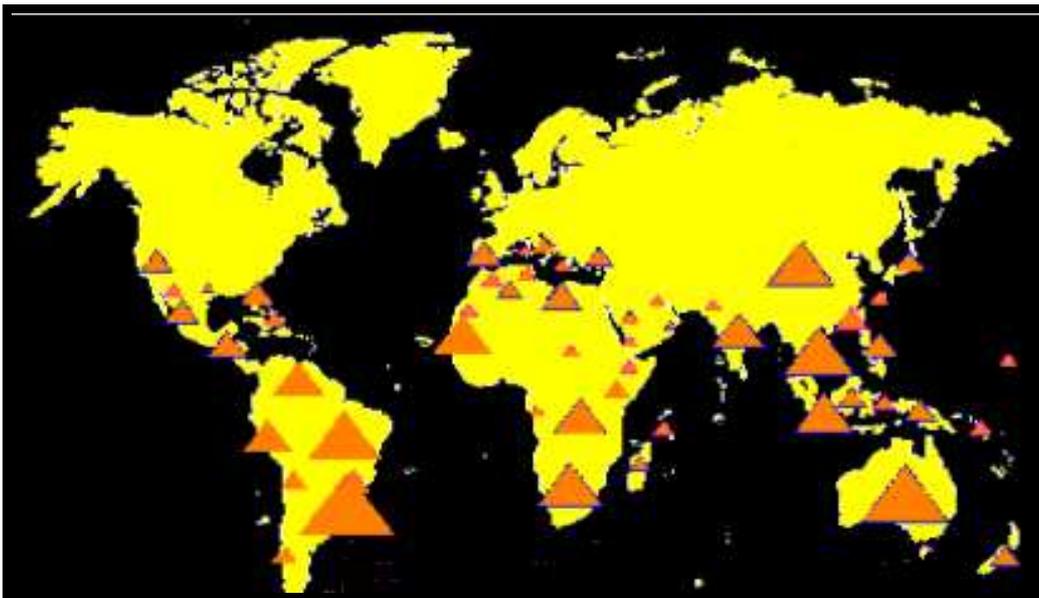
En 1954, la maladie a été découverte dans les régions agrumicoles de l'Afrique du Nord et dans le Bassin méditerranéen. Elle fut trouvée sur des variétés particulières comme le Citron Meyer (Anonyme, 1976).

Depuis l'apparition de la tristeza en Espagne, Ferzal l'identifiât pour la première fois en Algérie par Bové et Blondel sur mandarinier Satsuma greffé sur bigaradier en 1982, et en 2000 par Bayoud sur oranger et mandarinier.

#### 1.2.2.4- Répartition géographique

D'après Costa et Muller (1980), la tristeza est la maladie virale qui a une répartition la plus vaste. La superficie sur laquelle elle s'est propagée est étendue et est présente dans le monde entier (Figure 3) (Lee, 2000).

Le CTV est largement répandu dans les zones tropicales productrices d'agrumes. Les pays où la maladie est présentée sont cités par Bové et Vogel, (1981).



Source : Roistancher, 1991

**Figure 3** : Distribution du CTV dans le monde

#### 1.2.2.5- Incidence économique

La tristeza est la maladie des citrus la plus importante économiquement dans le monde (Lee, 2000). Elle est connue comme la maladie la plus dangereuse des citrus dans le monde entier et est considérée comme l'affection la plus destructive de toutes les plantes cultivées (Vogel, 1980).

La tristeza est avant tout une maladie d'association qui entraîne la mort de pratiquement toutes les variétés d'agrumes greffées sur bigaradiers, exception faite du citronnier (Davino *et al.*, 1983).

Des millions d'arbres greffés sur orange amère (bigaradiers) ont été détruits en Amérique du Sud et dans plusieurs pays du bassin des Caraïbes (Lee, 2000). Des

dizaines de millions d'arbres ont été détruits notamment en Afrique du Nord et Sud ainsi que dans certain pays du Bassin méditerranéen (Davino *et al.*, 1983).

En Californie où le virus se propage plus lentement, on a évalué à 300 000 le nombre d'arbres qui ont été détruits. En Afrique occidentale, elle constitue l'un des facteurs qui limite la culture du petit limettier amer (Mc Clean, 1957).

En Argentine et en Espagne, la maladie continue à s'étendre. Wallace (1978) a estimé les pertes à 3 millions d'arbres d'oranges douce.

#### **1.2.2.6- Etude de la particule virale**

##### **1.2.2.6.1- Propriétés de la particule virale**

Le CTV apparaît en microscope électronique sous forme de particules filamenteuses, non enveloppées de 1100 à 2000 nm de longueur sur 12 nm de largeur (Bar Joseph *et al.*, 1989 ; Rocha Pena *et al.*, 1995). Ces particules sont couramment flexibles (Lee, 1989).

##### **1.2.2.6.2- Propriétés biochimique et moléculaire**

Le CTV présente un coefficient de sédimentation de 140S et d'une densité de 1257 g/ml (Bar Joseph *et al.*, 1989).

La particule virale contient un ARN simple brin d'environ  $6,5 \cdot 10^6$  Da (Bar Joseph *et al.*, 1989), à sens positif, est formée de 193 nucléotides (Karasev *et al.*, 1995), avec deux protéines capsidiales : CP (Capsid proteins) couvrant 95% de la longueur de la particule avec un poids moléculaire de 27 000 à 28 000 DA et la protéine de la couche de divergence «d CP» (diverged coat proteins) présente à une seule extrémité de la particule formant une structure en serpent (Gargo Zachert *et al.*, 1999). A la «d CP» on postule toujours la fonction de la transmission par les aphides (Agranovsky *et al.* 1995).

Quatre modes de conservation en séquence (domaines I, II, III, IV) existent entre les deux protéines (Figure 4a) (Gargo Zachert *et al.*, 1999).



**Figure 4a** : Génome du CTV (Gargo-Zachert *et al.*, 1999)

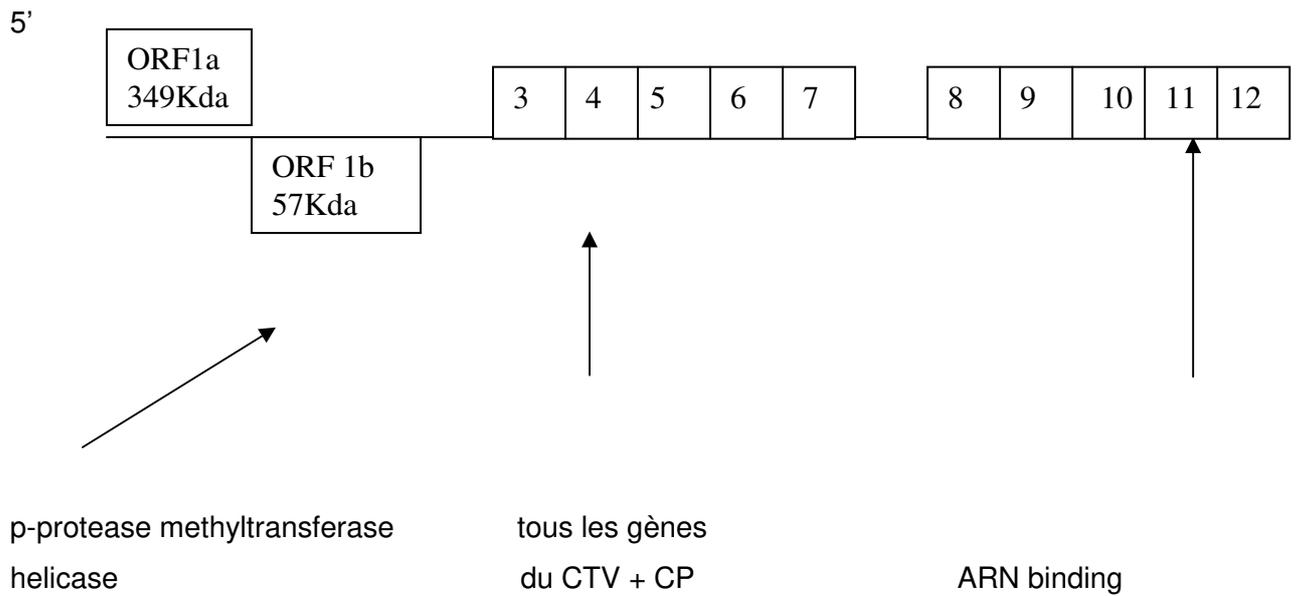
### Organisation génomique du CTV

Le séquençage du virus a été réalisé par Karasev *et al.* (1995) en étudiant l'isolat T36 de Floride. Ainsi, trois blocs de gènes sont identifiés chez le CTV (Figure 4b).

Son génome est organisé en 12 cadres ouverts de lecture (Open Reading Frame) (ORF) codant pour la production de 17 protéines ; le bloc 5' est appelé ORF1a (ORF de début) situé au nucléotide 108 et comportant plusieurs polyprotéines du 5' au 3' dont 2 papain like protéase (P-Pro), Methyltransferase (MT) l'helicase (HEL). L'ORF1b d'arrêt est formé de 57 KDa de ARN putatif-ARN polymérase- dépendant (RdRp), qui est probablement exprimé grâce à une lecture inverse au niveau de plusieurs ribosomes et cela à cause du codon CGG (Arginine).

Le deuxième bloc contient 5 ORFs ; 3-7 conservant le CTV parmi les Closterovirus, et renfermant les gènes du CTV homologue de HSP70 protéines, et la duplication des gènes de la protéine capsidiale.

Le bloc 3 contient les ORF (8-11) terminaux codant pour une ARN- protéine agglomérante (attachante) ORF 11 et 3 protéines à fonction indéterminée (Karasev *et al.*, 1995).



**Figure 4b:** Organisation génomique du CTV

### 1.2.2.7- Symptomatologie

#### 1.2.2.7.1- Symptômes macroscopiques

L'attaque par le CTV commence toujours par la zone apicale de la soudure du porte- greffe au greffon, où le virus bouche les vaisseaux du phloème (Lee, 2000).

Les symptômes induits sur arbres greffés sur bigaradier sont la défoliation et le rabougrissement des sujets infectés, la dégénérescence et la nécrose des tissus au niveau de la soudure greffon / porte-greffe. Cela se traduit par une hypertrophie des cellules parenchymateuses (changement de couleur des nervures des feuilles du vert au blanc), un arrêt du passage de la sève élaborée vers les racines, des cellules du bois lignifiées, une apparition de striures, de dessins polygonaux et de ponctuations. Les arbres infectés produisent de petits fruits qui sont de mauvaise qualité (Figure 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11) (Al Mouie, 2002).



**Figure 5 et 6** : Striures, dessins polygonaux et ponctuations dus au stem pitting, souche agressive du CTV



**Figure 7** : "Petits fruits de mauvaise qualité



**Figure 8** : Plant sain à gauche, plant rabougri à droite



**Figure 9** : Feuilles en forme de cuillère



**Figure 10** : Hypertrophie des feuilles



Source : Roistancher, 1991

**Figure 11** : Dépérissement de l'arbre (Quick Decline)

### 1.2.2.7.2- Symptômes microscopiques

Le CTV est un virus du phloème, où il s'accumule en très larges agrégats dans le cytoplasme, lieu de sa réplication. On peut l'observer aussi dans le réticulum endoplasmique ou au niveau des mitochondries (D'onghia et Lacirignola, 1998).

Les modifications histologiques induites par le CTV sont observées dans le phloème (D'onghia et Lacirignola, 1998), alors que des inclusions se localisent dans le cytoplasme des cellules infectées et sont sous forme d'inclusions cristallines (Buchen Osmond *et al.*, 1986 ; Lee 1989).

### 1.2.2.8- Les différentes souches du CTV

Il existe trois groupes de souches de la tristeza induisant respectivement divers symptômes aux champs (Tableau 7) ( Permar *et al.*, 1990):

- Le groupe des souches (CTV-SY) qui correspond au jaunissement du semis (Seedling Yellow) qui est une souche sévère induisant une chlorose pouvant amener à un fort dépérissement et même à la mort de l'oranger doux, du pamplemoussier et du mandarinier greffé sur bigaradier.
- Le groupe des souches (CTV-CD) qui induisent un dépérissement rapide (quick decline) des arbres greffés sur bigaradier.
- Le groupe des souches (CTV-SP) qui induisent les symptômes du « stem pitting » sur les cultivars de plusieurs variétés. C'est la souche la plus redoutable.

**Remarque :** Il existe un autre groupe qui est le groupe des souches modérées qui n'induisent pas de symptômes observables à l'œil nu et même sur les plantes indicatrices les plus sensibles et utilisées comme moyen de lutte croisée (prémunition).

**Tableau 7 : Symptômes des différentes souches du CTV**

<b>Souches</b>	<b>Symptômes</b>	<b>Références</b>
<b>CTV-CD</b>	Dégénérescence Réduction de la croissance Fruit petits et de mauvaise qualité Défoliation légère ou complète Production d'un « honey combing » ou alvéoles polygonales	(Bar Joseph <i>et al.</i> , 1989 ; Rocha Pena <i>et al.</i> , 1995)  (Garnsey <i>et al.</i> , 1987)
<b>CTV-SY</b>	Feuilles petites Jaunissement du limbe Dessèchement des feuilles Enroulement du limbe Défoliation Dessèchement des bourgeons apicaux Chlorose sévère Rabougrissement	(Aubert <i>et al.</i> , 1982)      (Agrios, 1997 ; Roistacher, 1991)
<b>CTV-SP</b>	Symptômes macroscopiques sur tronc et branche : Striures ou cannelures dans le bois Diminution de la productivité et de la qualité du fruit Formation de tissu à parois mince au lieu de phloème et xylème normaux Destruction des îlots du cambium Hypertrophie du greffon au niveau de la greffe Diminution de la vigueur de l'arbre Symptômes microscopiques de dégénérescence du phloème Nécrose et résorption des vaisseaux libéraux-ligneux et des cellules compagnes Accumulation d'amidon dans la région au dessus de la soudure	 (Permar <i>et al.</i> , 1988)  (Lee <i>et al.</i> , 1999)  (Frezal, 1954)  (Aubert <i>et al.</i> , 1982)  (Lee <i>et al.</i> , 1999)   (Frezal, 1954)

### 1.2.2.9- Transmission

La propagation à longue distance du CTV se fait de façon indirecte principalement par le matériel de propagation infecté dans la multiplication en pépinière (Lee, 2000). Le virus de la tristeza peut être aussi transmis par la *Cuscuta subinclusa*. (Yokomi *et al.* 1994). La propagation locale s'effectue par les aphides vecteurs (Lee *et al.* 1994).

La transmission du CTV s'effectue selon le mode semi-persistant (Lee, 2000). Ce mode de transmission est dû à l'habilité des protéines 27K de s'accrocher au phloème des cellules réceptrices. Le mode semi-persistant est typique au mode non persistant, car le virus est non circulant dans le vecteur (Cohen et Bové, 1980).

Le vecteur garde l'habilité de transmission du virus trois à quatre jour après son acquisition. Le virus est acquis par le vecteur dès la première prise de repas (Dimitman, 1983). Dans ce mode, le virus est toujours associé aux cellules du phloème.

#### **1.2.2.10- Le vecteur du CTV**

Le CTV se trouve réparti dans toutes les aires de production agrumicole du monde. Cette dispersion est assurée grâce aux échanges de germplasm (Bar Josph *et al.*, 1989) d'une part, et par le grand mouvement important de pucerons vecteurs de ce virus selon le mode semi-persistant, d'autre part. Jusqu'à ce jour, les pucerons reconnus potentiellement vecteurs du CTV sont *Toxoptera citricida* [Brown Citrus Aphid (BrCA)], *T. aurantii*, *Aphis gossypii* et *A. spiraecola* (Lee *et al.*, 1994).

Le puceron marron des citrus (BrCA) ou le puceron tropical est le vecteur le plus efficace de la transmission de la maladie, et surtout il transmet les souches virulentes et sévères du CTV (Nolasco *et al.*, 1995 ; Lee, 2000).

Des études effectuées ont montré que le BrCA était capable de transmettre le CTV 25 fois mieux qu'*Aphis gossypii*. *Aphis spiraecola* et *T. aurantii* sont reconnus comme vecteurs du CTV mais moins efficaces qu'*Aphis gossypii* (Yokomi et Damstreegt, 1991).

#### **1.2.2.11- Gamme d'hôtes**

Le CTV infecte toutes les espèces «cultivars et hybrides» des agrumes. Il infecte aussi certains genres apparentés aux agrumes tels qu'*Aeglopsis*, *Afraegle*, *Fortunella* et *Pamburus* et quelques hybrides inter-génériques. Certaines espèces de *Passiflora* ont été infectées expérimentalement (mais pas de façon naturelle) et sont les seules plantes hôtes expérimentales n'appartenant pas aux Rutaceae (Roistacher, 1991). Dans la région OEPP, les plantes hôtes menacées sont les agrumes et les végétaux apparentés aux agrumes de la zone méditerranéenne.

### **1.2.3- Diagnostic du CTV**

#### **1.2.3.1- Historique**

Le premier essai pour la détection de la tristeza était l'essai d'iode pour l'accumulation d'amidon sur des coupes de bois et de bourgeon au-dessous de l'union de bourgeon. Ce combiné avec la piqûre de corrosion inverse ou « honey combing » dans le rhizome d'orange amère juste au-dessous de l'union de bourgeon était quelque peu diagnostiqué, mais non sûr (Bitancourt, 1944). Ceci plus tard a été suivi de l'utilisation de

la Lime mexicaine comme indicateur (identification biologique) et finalement de l'utilisation d'ELISA avec ses diverses procédures comprenant la tache directe de tissu immuno assay. En outre, la visualisation des particules de virus dans le microscope électronique était également utile pour la confirmation pendant les premières années (Roistacher et Moreno, 1991).

### 1.2.3.2- Identification biologique (indexation)

Pour l'identification du CTV, on utilise un indicateur biologique spécifique : Lime mexicain (c'est l'indicateur le plus sensible du CTV).

Plante indicatrice : Lime mexicaine (*Citrus aurantifolia*)

Température : 18-26°C

Symptômes : Les symptômes apparaissent au bout de 3 à 4 semaines sous la forme d'éclaircissement des nervures, suivie du développement de striures sur le bois des jeunes branches. La sévérité des striures indique la sévérité de la souche du virus présente dans l'inoculum (OEPP, 1999)

D'autre part, on peut faire un typage pour l'identification de la souche du CTV :

Une gamme d'hôtes de plantes indicatrices est établie pour les trois souches de CTV (CTV-CD, CTV-SP, CTV-SY) (Tableau 8) (Garnsey *et al.*, 1987).

**Tableau 8:** Plantes indicatrices des souches de CTV

Souches	Indicateurs
CTV-CD	Oranger doux greffé sur bigaradier (orange amère)
CTV-SY	Mexicaine lime, oranger amer seedlings
CTV-SP sur orange doux	Madam vinous, oranger doux seedlings
CTV-SP sur grappe fruit	Duncun grape fruit seedlings.

Source :Garnsey *et al.*, 1987

**Remarque :** La reconnaissance du type de souche par la méthode biologique (l'indexage) est très délicate. En plus, il faut l'utilisation de l'IC-PCR (méthode moléculaire) ou des serums monoclonaux pour la confirmation.

### **1.2.3.3- Test ELISA**

La purification du virus de la tristeza du citron a permis le développement de la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay). L'anti-corps est lié par une enzyme qui permet la détection rapide du virus de la maladie recherchée (Barre-Joseph *et al.*, 1979).

L'amélioration de cette méthode par la mise au point de production d'anticorps monoclonaux a permis d'identifier les différentes souches du virus (Permar et Garnsey 1991).

### **1.2.3.4- La microscopie électronique**

Cette technique permet la détection directe de ces agents causaux. Cette technique est rapide mais elle a l'inconvénient de ne pouvoir être employée que par des laboratoires bien équipés (Nicoli, 1985).

### **1.2.3.5- les techniques colorimétriques**

Le test colorimétrique au «bleu d'Azur» est un test rapide qui est utilisé pour la détection de la tristeza. Le bleu azur colore les ARN. Après coloration, les coupes fines pratiquées dans les nervures des feuilles prennent une couleur bleue intense aux endroits où il y a concentration du virus. Une vérification de la contamination par le test ELISA est recommandée (Nicoli, 1985).

### **1.2.3.6- Immuno capture-polymerase chain reaction (IC-PCR)**

La polymérase «chain réaction» est une réaction enzymatique permettant de multiplier des fragments d'ADN à partir de courts morceaux ou amorces d'ADN complémentaire de celui recherché.

Des essais ont été effectués pour le diagnostic de la tristeza des agrumes. L'amplification du gène de la capsidie en utilisant des amorces spécifiques a pu être réalisée avec succès dernièrement au laboratoire en partant des ARNs. Cependant, cette technique reste encore au stade expérimental au Maroc (Jelloul ,1995).

## 1.2.4- Méthodes de lutte contre le CTV

### 1.2.4.1- La lutte contre le vecteur

Ils existent plusieurs méthodes de lutte contre le vecteur : lutte chimique, lutte biologique et la lutte biotechnologique,

Actuellement, les moyens de lutte utilisés contre le vecteur du CTV dans le monde sont :

- **La lutte biologique** : c'est l'utilisation d'ennemis naturels de vecteur du CTV. Généralement, les coccinelles (Coléoptères) sont prédatrices de pucerons ; les bactéries telles que le *Bacillus thuringiensis* (Balachowsky, 1951 ; Doumandji B et Doumandji S, 1996).
- **La lutte biotechnologique** : c'est le contrôle de la transmission des maladies où l'expression de certains gènes de bactéries symbiotiques peut rendre un puceron incapable de transmettre un deuxième micro-organisme pathogène. Donc, c'est la prévention des maladies causées par les pucerons en utilisant des bactéries symbiotiques transgéniques telles que *Buchenra*.

### 1.2.4.2- La lutte contre l'agent pathogène

Pour toutes les maladies virales, il est pratiquement impossible de détruire l'agent causal à l'intérieur de l'arbre en plein champ sans tuer l'arbre lui-même (Nicoli, 1985).

La lutte contre les virus est beaucoup plus préventive que curative, c'est dans ce contexte qu'il faut combiner tous les moyens de lutte contre ce virus. Parmi ces moyens, on peut citer :

- ❖ **La lutte culturale** : Désinfection des outils de travail afin d'éviter la propagation de la maladie.
- ❖ **Mise en quarantaine** : C'est la mise des foyers déclarés par le CTV en quarantaine.
- ❖ **La prémunition** : Les végétaux ne possèdent pas de réaction immunitaire. Cependant, il existe un mode de protection croisée en prenant une plante saine sur laquelle on inocule une souche atténuée. Celle-ci protège la plante infectée contre une infection ultérieure par une souche plus agressive du même virus. Cette méthode présente beaucoup de difficultés et en pratique, elle n'est utilisée à grande échelle efficacement qu'au Brésil (Costa et Miller, 1980; Sylvie *et al.*, 1992).
- ❖ **La sélection sanitaire** : C'est le schéma de certification établi par l'OEPP. Son objectif est d'obtenir un matériel de base sain qui est destiné à la multiplication.

- ❖ **La thermothérapie :** Les essais d'utilisation de la chaleur pour détruire certains virus contaminant les agrumes datent de plus de 65 ans, Grant, en Floride, est le premier à avoir obtenu des plants indemnes de tristesa. Le principe de cette technique est basé sur l'exposition du plant à des températures très élevées jusqu'à 40°C 8 semaines, afin de bloquer la réplication du virus (Lee *et al.*, 1994)
  
- ❖ **Le micro-greffage de l'apex :** Le méristème caulinaire est une partie du plant qui est en général peu contaminée par les agents pathogènes. Chez les agrumes, les méristèmes placés sur un milieu nutritif refusent de s'enraciner, ce qui rend pratiquement irréalisable leur culture «in vitro». C'est pour cela que la régénération des variétés malades doit faire appel à une autre technique, celle du micro-greffage de méristèmes «in vitro» (Nicoli, 1985).

## 2- Matériels et Méthodes

### 2.1- Identification du CTV

#### 2.1.1- Zones prospectées

Les prospections sur terrain couvrent la région de la Mitidja près de la zone de quarantaine (du Boufarik jusqu'à Béni Tamou). Les prospections sont effectuées sur les agrumes durant la campagne agricole 2007 où plusieurs prélèvements sont réalisés.

Les zones visitées sont des parcelles d'agrumes appartenant à des exploitations privées qui sont au nombre de quatre (Tableau 9).

**Tableau 9:** Tableau récapitulatif des zones prospectées

Localisation	Description
Parcelle de Boufarik 1	Le verger mitoyen avec la station régionale de la protection des végétaux de Boufarik (SRPV), constitué de 5 hectares d'oranges variété Thomson. Ce sont de jeunes arbres greffés sur Citrange carrizo, irrigués uniquement par les eaux de pluie. Les traitements phytosanitaires sont effectués selon un calendrier.
Parcelle de Boufarik 2 (Bouagabe)	Le verger constitué de 5 hectares d'oranges variété Thomson et 10 hectares de Double fine est situé en face de la base militaire de Boufarik. Il est constitué de vieux arbres greffés sur bigaradiers, alimentés par un apport naturel (eaux de pluies) en plus de l'irrigation. Les traitements phytosanitaires ont été effectués uniquement pour la variété Thomson (5 hectares).
Parcelle de la Chiffa	Le verger est localisé à la sortie de la Chiffa, est constitué de 5 hectares d'oranges variété Thomson et de 5 hectares de Washington navel. La majorité des arbres est âgée, greffée sur bigaradiers et alimentée par les eaux de pluies, en plus de l'irrigation. Les traitements phytosanitaires sont effectués selon un calendrier.
Parcelle de Chebli	Un verger, constitué de 4 hectares de Valencia late, 5 hectare d'oranges variété Thomson, 3 hectares Washington navel et 10 hectares d'agrumes. Ces arbres sont greffés essentiellement sur bigaradiers et alimentés par l'apport naturel (eaux de pluie), en plus de l'irrigation. Les traitements phytosanitaires sont effectués selon un calendrier.

#### 2.1.2- Méthode d'identification

##### 2.1.2.1- Le diagnostic visuel

Le prélèvement des échantillons a été fait pendant la phase de la montée de la sève (mars, avril et début juin 2007) car le CTV est un virus du phloème (*Closterovirus*).

La mise en évidence des infections virales est effectuée visuellement. Il s'agit d'observer des plantes malades présentant des symptômes décelables à l'œil nu,

attribuables à une origine virale par comparaison aux données bibliographiques. Les échantillons ont été prélevés sur la base des symptômes correspondant à l'infection du CTV (Lee, 2000 ; Al Mouie, 2002).

Le nombre total d'échantillons prélevés est de 100 à raison de 25 échantillons par site (parcelle), où chaque échantillon représente un seul plant (pour chaque prélèvement, le plant et l'échantillon prélevé sont numérotés).

### **2.1.2.2- Conservation des échantillons**

Sur terrain, les feuilles prélevées sont mises dans des sacs en papier numérotés et conservées à 4°C pendant une nuit après les avoir mis en Boss pour éviter toute altération et dessèchement.

Nous avons procédé à la conservation de tous les échantillons prélevés. La technique utilisée est celle de Mc Kinney *et al.* (1969), simplifiée par Boss. Les feuilles de chaque échantillon sont découpées finement puis 1 gramme est pesé et mis dans des coupelles de papier type fin petit four. Celles-ci sont déposées sur une couche de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>) dans une boîte de Pétri et conservées à 4°C jusqu'au jour de l'utilisation.

### **2.1.3- Identification par sérologie**

#### **2.1.3.1- Les solutions tampon**

Plusieurs solutions tampon ont été préparées pour réaliser le test ELISA (voir Annexe).

#### **2.1.3.2- Préparation des échantillons**

Les petits fragments des feuilles conservées sont broyés avec un appareil de broyage manuel. On dépose 1 g de feuilles dans 10 ml de la solution de broyage. A la fin de l'opération, le jus obtenu est mis dans des tubes numérotés. Chaque tube représente un échantillon. Ce jus sera analysé par le test ELISA.

#### **2.1.3.3- Test sérologique ELISA**

##### **2.1.3.3.1- Principe**

Le teste Elisa est une réaction immuno-enzymatique qui permet de mettre en évidence la présence d'un virus (antigène) à l'aide d'un anticorps marqué par une enzyme, la phosphatase alcaline, par une réaction colorée en présence du substrat de

l'enzyme, le paranitro-phenyl phosphate. L'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 405 nm.

Il existe plusieurs protocoles Elisa, parmi eux dans notre expérimentation nous avons utilisé :

**DAS-ELISA** (double antibody sandwich – enzyme linked immuno sorbent assay), ou réaction de type sandwich. Le virus présent dans les extraits de plantes à tester réagit avec gamma globulins G (IgG) fixé sur la plaque de microtitration. Il est ensuite mis en contact avec une préparation d'IgG spécifique couplé à l'enzyme phosphatase alcaline. La double réaction sérologique est mise en évidence par la réaction du substrat de l'enzyme, le PNPP, ce qui induit une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de l'antigène fixé (Clark et Adams, 1977).

#### **2.1.3.3.2- Sérum utilisé**

Pour l'identification du virus recherché, nous avons utilisé un sérum composé des anticorps polyclonaux Anti-CTV qui reconnaît toutes les souches provenant de la Station de pathologie végétale, INRA, Versailles, France et d'un conjugué universel provenant du laboratoire de SANOFI de France.

#### **2.1.3.3.3- Mode opératoire**

Cette méthode est constituée de 4 étapes successives (Figure 12) :

##### **Etape 1 : Fixation des anticorps**

Les anticorps sont dilués au 1/100<sup>e</sup> dans le tampon de fixation. La dilution se fait juste avant l'utilisation. Les anticorps est déposé dans les puits de la plaque à raison de 100 µl/puits, afin d'éviter l'effet de bordure, les puits se trouvant aux bords des plaques sont remplis d'eau distillée. Ensuite, les plaques sont mises en incubation à 37°C pendant 2 heures (les plaques doivent être couvertes avec un film plastique adhésif).

##### **Etape2 : Dépôt des échantillons**

Après 3 lavages des plaques par le tampon de lavage, l'extrait des plantes est déposé à raison de 100 µl/puits accompagné par des échantillons à raison de 2 répétition par échantillon. Ensuite, les plaques sont mises au froid à 4° C pendant une nuit.

##### **Etape 3 : Dépôt des anticorps conjugués**

Après 3 lavages des plaques, les anticorps conjugués est dilue au 1/100<sup>e</sup> dans le tampon conjugué et dépose dans les puits de la plaque à raison de 100 µl/puits. Ensuite, ils sont mis en incubation à 37°C pendant 2 heures. Les plaques doivent être couvertes avec un film plastique adhésif.

#### **Etape 4 : Dépôt du substrat**

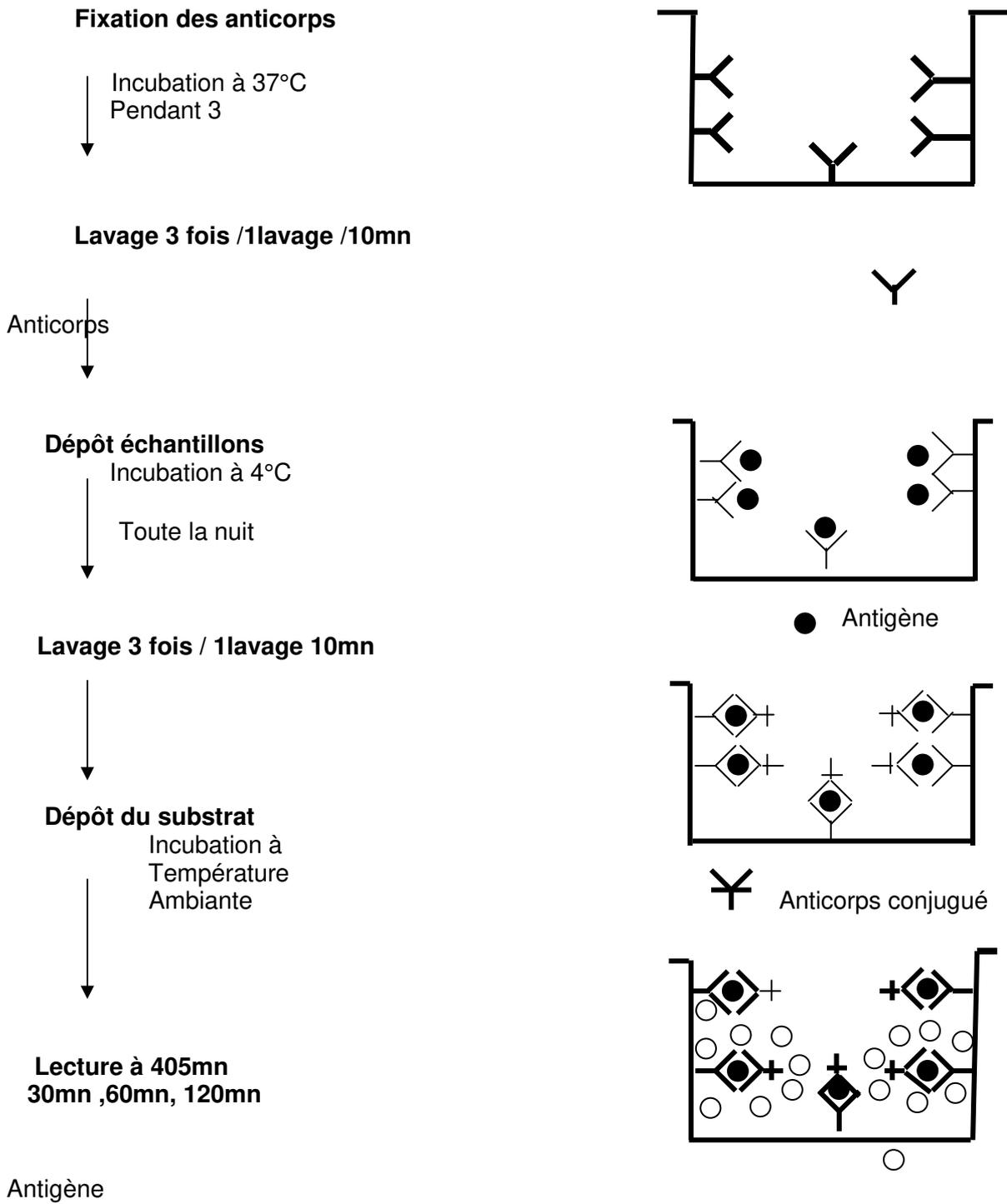
Après 3 lavages des plaques, le substrat de l'enzyme paranitro-phenyl phosphate est dilué dans sa solution à raison de 100 µl /puits et les plaques sont mises en incubation à température ambiante.

#### **2.1.3.3.4- Lecture des résultats**

Après 30 minutes d'incubation, plusieurs lectures sont faites pour suivre l'évolution de la réaction enzymatique approximativement toutes les demi-heures.

Ce suivi se fait par observation visuelle des puits qui virent au jaune tandis que les mesures qualitatives se font sur spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 405 nm.

A partir de la densité optique des témoins négatifs, nous avons la possibilité de déterminer les échantillons viroses : l'échantillon est déclaré positif quand sa densité optique est supérieure à celle de la moyenne des témoins négatifs plus la somme des trois écart type  $(DO \text{ d'échantillon positif} \geq (\text{témoin négatif 1} + \text{témoin négatif 2} + \text{témoin négatif 3}) / 3) + (\text{écart type 1} + \text{écart type 2} + \text{écart type 3})$ .



**Figure12** : Principe du test - ELISA (Clark *et Adams*, 1977).

## **2.2- L'identification biologique (l'indexage)**

### **2.2.1-Objectif**

Cette étude préliminaire porte particulièrement sur l'observation visuelle des échantillons positifs du CTV vis-à-vis de deux indicateurs utilisés par l'OEPP (*Lime mexicaine* et *Madame vinous*), où la *Lime mexicaine* est l'indicateur le plus sensible au CTV par contre le seconde est un indicateur spécifique du *stubborn*, mais est considéré comme indicateur secondaire du CTV. Cette technique d'identification permet de confirmer la présence du CTV dans les échantillons révélés positif en ELISA et de voir la sévérité des symptômes liés à un type de souche donné (OEPP, 1993).

### **2.2.2- Matériel végétal**

#### **2.2.2.1- Les indicateurs (les porte-greffes)**

Deux types d'indicateurs sont utilisés, il s'agit de la *Lime mexicaine* et *Madame vinous*. Ils sont âgés d'un an et ont été obtenus par l'ITAFV. Le substrat de semis est composé de trois parties égales de fumier de bovin, de sable et de terre.

#### **2.2.2.2- Source de virus (le greffon)**

Les échantillons positifs (CTV) de la première partie sont considérés comme des greffons pour la réalisation de l'indexage. Les rameaux greffons sont des rameaux de l'année.

### **2.2.3- Méthode d'étude**

#### **2.2.3.1- Prélèvement des greffons (les baguettes)**

Nous avons prélevé les baguettes à partir des arbres infectés par le CTV et ayant répondu positivement au test ELISA. Le nombre des greffons prélevé est de 17 baguettes et la date de prélèvement est le 30 septembre 2007 (pendant la période de la montée de la sève).

#### **2.2.3.2- Conservation des baguettes**

Les baguettes prélevées sont couvertes par un papier hygiénique humide (papier sweettoo) et mises ensuite dans des sacs en plastique numérotés et conservés à 4°C pendant une nuit afin d'éviter toute altération.

### 2.2.3.3- Le greffage

Le greffage est réalisé dans la serre d'indexage située au niveau de L'ITAFV. Les étapes de cette technique sont les suivantes :

- Création d'une entaille en forme de T dans le porte-greffe (l'indicateur) à l'aide d'un greffoir
- Prélèvement de l'écorce de la baguette (greffon)
- Insertion de cette écorce prélevée dans l'entaille
- Ligature du greffon inséré dans l'entaille par le parafilm.

Le matériel utilisé doit être désinfecté à l'aide d'un coton et de l'eau de Javel (Figure 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 et 20).

### 2.2.3.4- Entretien des plants

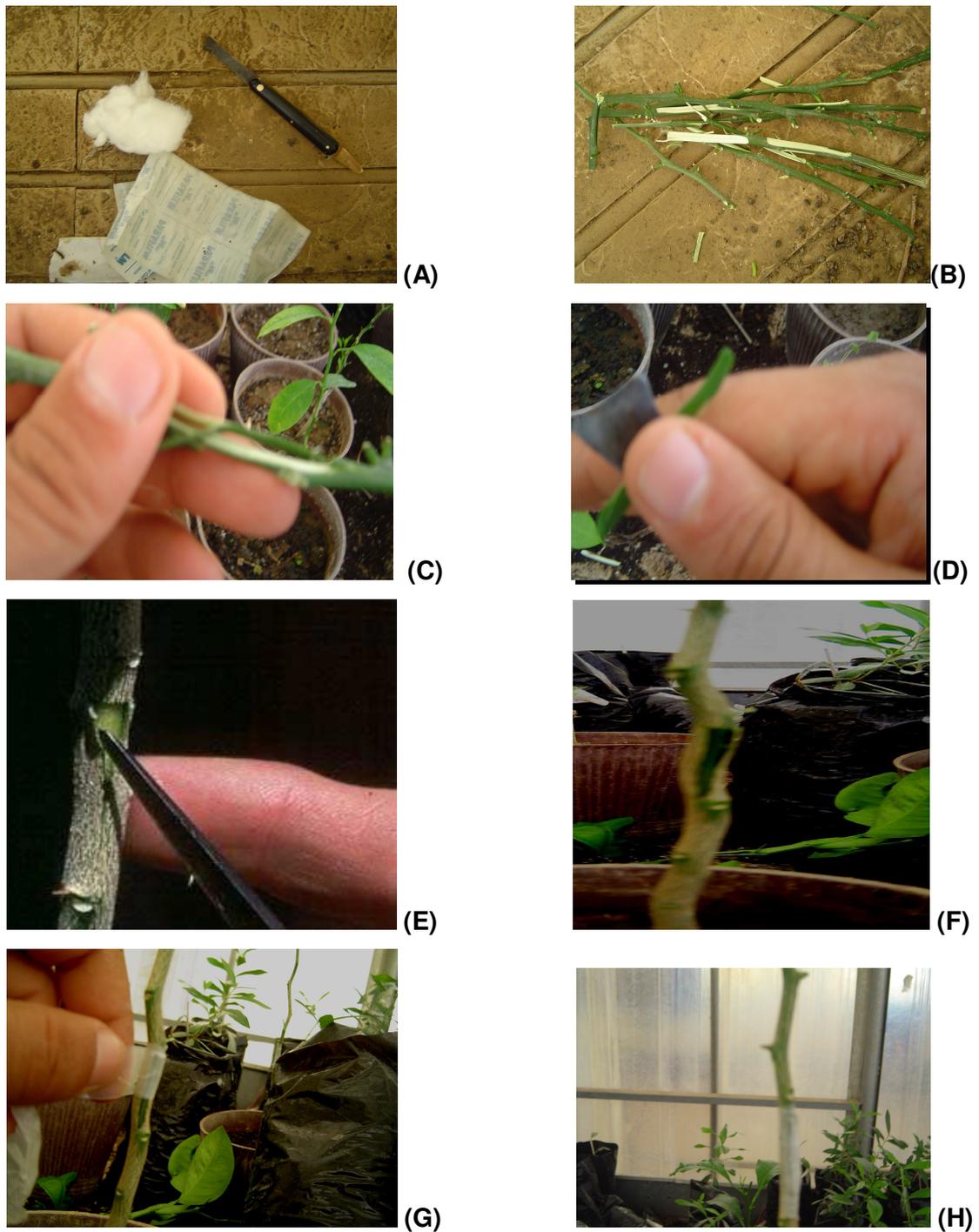
Des arrosages réguliers et des désherbages manuels sont effectués régulièrement pendant notre essai. Des fertilisations foliaires et plusieurs traitements phytosanitaires sont effectués (Tableau 10)

**Tableau 10** : Tableau récapitulatif des produits utilisés pendant l'indexage

Date	Traitement	Dose	Mode d'utilisation
13/10/2007	Engrais complet NPK	7g/l	Pulvérisation
22/10/2007	Engrais foliaire azoté	5g/l	Pulvérisation
31/10/2007	Insecticide (Lannate 25 WP)	15g/l	Pulvérisation
17/11/2007	Anti-mineuse (Consult)	60ml/hl	Pulvérisation
21/12/2007	Insecticide (Lannate)	5g/l	Pulvérisation
12/01/2008	Anti-mineuse (Consult)	60ml/hl	Pulvérisation

### 2.2.3.5- La lecture des résultats (par observation visuelle)

La lecture des résultats est réalisée au bout de 3 à 4 semaines lorsque les symptômes apparaissent. On peut indiquer que la sévérité de la souche du virus présente dans l'inoculum s'est exprimée par la sévérité des symptômes présents selon les normes OEPP (1993). Les symptômes apparaissent au bout de 3-4 semaines sous la forme d'éclaircissement des nervures, suivi du développement de striures sur le bois des jeunes branches. La sévérité des striures indique la sévérité de la souche du virus présente dans l'inoculum



**Figure 13** : Les différentes étapes de greffage.

**A** : Matériel utilisé dans le greffage

**C** : Prélèvement de l'écorce d'une baguette

**E** : Création d'une entaille dans le porte-greffe

**F** : Insertion du greffon(écorce) dans le porte-greffe

**G** : Ligature du greffon par le parafilm

**B** : Baguettes (les greffons)

**D** : Ecorce prélevée

**H** : Plant greffé

### **2.2.3.6- Vérification de la transmission de virus**

La vérification de la transmission et de la présence du virus dans les indicateurs utilisés a été faite par la méthode ELISA décrite dans le chapitre précédent.

## **2.3- Essai de méthodes d'assainissement**

### **2.3.1- Objectif**

Cette étude préliminaire est basée essentiellement sur une étude comparative entre deux moyens de traitement qui sont l'assainissement par la thermothérapie, le micro-greffage de l'apex et la combinaison des deux moyens de certification. C'est donc d'étudier et de vérifier la meilleure technique parmi ces trois niveaux de traitement permettant d'éliminer le CTV.

### **2.3.2- Le greffage**

#### **2.3.2.1- Matériel végétal**

##### **2.3.2.1.1- Les porte-greffes**

Deux types des porte-greffes sont utilisés. Il s'agit du *bigaradier* et du *citrus volcameriana*. Ils sont âgés d'un an et obtenus au sein de l'ITAFV. Le substrat de semis est composé de trois parties égales de fumier de bovin, de sable et de terre locale.

##### **2.3.2.1.2- Le source de virus (le greffon)**

Les échantillons positifs (CTV) de la première partie sont considérés comme des greffons pour la réalisation du greffage. Les rameaux greffons sont des rameaux de l'année. Ces baguettes sont ramenées de deux sites Parcelle de Boufarik 2 (Bouagabe) et Parcelle de la Chiffa, composés de deux variétés d'orange la Double fine et Thomson. Nous avons prélevé les baguettes à partir des arbres atteints du CTV (qui ont répondu positivement dans la première partie). Le nombre des greffons prélevé est de 6 échantillons. La date de prélèvement est le 30 septembre 2007 (pendant la période de la montée de la sève).

Les baguettes prélevées sont mises dans un papier hygiénique humide (papier sweettoo) et conservées à 4<sup>0</sup>C pendant une nuit dans des sacs en plastique numérotés.

### **2.3.3- Méthode d'étude**

#### **2.3.3.1- Mode opératoire**

Le type de greffage réalisé est la greffe en placage d'un œil en copeau (mini-greffe) « chip-budding ». Le greffage est réalisé dans la serre d'indexage. Les étapes de cette technique sont les suivantes :

- Création d'une entaille en forme de T dans le porte-greffe (l'indicateur) à l'aide d'un greffoir
- Prélèvement de l'écorce de la baguette (greffon)
- Insertion de cette écorce prélevée dans l'entaille
- Ligature du greffon inséré dans l'entaille par le parafilm sans couvrir l'œil

Le matériel utilisé doit être désinfecté à l'aide d'un coton et de l'eau de Javel.

Les étapes de ce greffage sont les mêmes que le premier greffage (l'inoculation de l'écorce). La seule différence entre ces deux types de greffage réside dans le type de l'écorce prélevé. Le premier greffage consiste à prélever un écorce sans œil, par contre le second, l'écorce est prélevé avec l'œil (Figure 14).

### 2.3.3.2- Entretien des plants

Des arrosages réguliers et des désherbages manuels sont effectués régulièrement pendant notre essai.

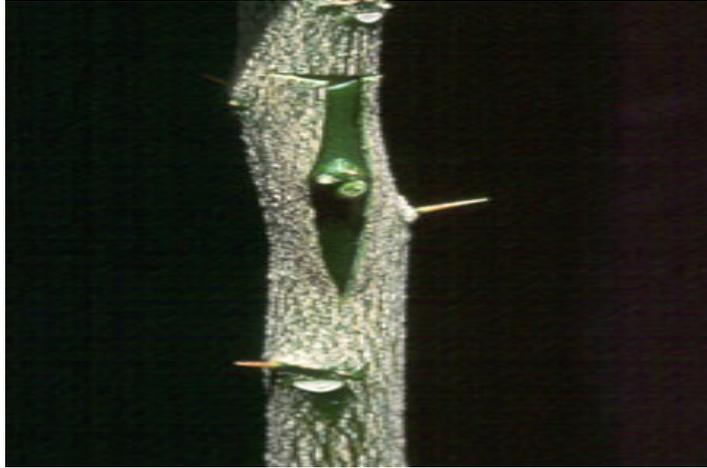
Des fertilisations foliaires et plusieurs traitements phytosanitaires ont été effectuées (Tableau 11).

**Tableau 11** : Tableau récapitulatif des produits utilisés dans le greffage

Date	Traitement	Dose	Mode d'utilisation
13/10/2007	Engrais complet NPK	7g/l	Pulvérisation
22/10/2007	Engrais foliaire azote	5g/l	Pulvérisation
31/10/2007	Insecticide (Lannate 25 WP)	15g/l	Pulvérisation
17/11/2007	Anti-mineuse (Consult)	60ml/hl	Pulvérisation
21/12/2007	Insecticide (Lannate)	5g/l	Pulvérisation
12/01/2008	Anti-mineuse (Consult)	60ml/hl	Pulvérisation

### 2.3.3.3- Vérification de la transmission de virus

Cette étape est réalisée pour gagner du temps, car le démarrage de l'œil greffé peut prendre beaucoup de temps jusqu'à 14 mois (œil de dormance). La technique de diagnostic est l'ELISA telle que décrite dans le premier chapitre.



**Figure 14:** Insertion du greffon (écorce avec l'œil) dans le porte-greffe

### 2.3.4- Dispositif expérimental

Nous avons utilisé dans notre expérimentation un dispositif expérimental BAC (bloc aléatoire complet), avec deux facteurs de variance qui sont :

✚ Facteur 1 : variétés.

V1O1 : Double fine greffée sur bigaradier.

V1O2 : Thomson greffée sur bigaradier.

V2O1 : Double fine greffée sur Citrus volcameriana.

V2O2 : Thomson greffée sur Citrus volcameriana.

✚ Facteur 2 : traitement utilisé.

Traitement 1 : Micro-greffage de l'apex.

Traitement 2 : Thermo-thérapie.

Traitement 3 : Thermo-thérapie + micro-greffage de l'apex.

Le dispositif comprend trois échantillons de chaque origine greffés sur les deux types de porte-greffe, avec trois répétitions. Le total est de 108 avec 12 témoins positifs et 6 témoins négatifs. Les paramètres étudiés sont la densité optique du virus avant et après traitement (Figure 15).

T1V1O 1E2R3	T2V1O 1E1R1	T1V2O 2E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1
T1V1O 1E1R1								
T1V1O 1E1R1								
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T-V1R2	T1V1O 1E1R1	T+V2O 1R3
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V2O 1R2	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V1O 2R3	T1V1O 1E1R1
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T- V21R1	T1V1O 1E1R1	T-V1R3	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T-V2R3
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1R1	T1V1O 1E1R1	T+V2O 1R1	T1V1O 1E1R1	T+V22 O2R	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V1O 1R2	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V1O 2R2	T1V1O 1E1R1	T-V2R2	T1V1O 1E1R1	T+V2O 23R
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T- V11R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V2O 21R	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V1O 2R1
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T+V1O 1R3	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1
T1V1O 1E1R1	T2V1O 1E1R1	T2V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T2V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T2V1O 1E1R1	T2V1O 1E1R1
T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T2V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T2V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1	T1V1O 1E1R1

**Figure 15** : Dispositif expérimental (bloc aléatoire complet)

**Légende :**

**T** : Traitement (T1 :Micro-greffage de l'apex, T 2 : Thermo thérapie, T 3 : la Thermo thérapie plus le micro-greffage de l'apex.

**V** : Le porte-greffe (V1 : bigaradier V2 : Citrus volcameriana)

**O** : Variété le greffe (O 1 : Double fine, O 2 : Thomson)

**E** : Echantillons (E1 : échantillon 1, E2 : échantillon 2, E3 : échantillon 3)

**R** : Répétition (R1 : répétition 1, R2 : répétition 2, R3 : répétition 3)

### **2.3.5- L'analyse statistique**

Une analyse de la variance est appliquée à chaque variable étudiée afin de comparer statistiquement les résultats obtenus. Un logiciel de traitement de données (STATICF) est utilisé pour les calculs de l'analyse de variance.

Dans le cas où la différence entre les moyennes calculées est significative, le test de NEWMAN et KEULS à 5% d'erreur est appliqué. Il permet de classer les moyennes en groupes homogènes.

## **2.4- La thermothérapie**

### **2.4.1- Appareil utilisé**

L'appareil utilisé est un conviron (chambre de thermothérapie), avec une photopériode et humidité réglables. Cette appareil est fabriquée en Allemagne sa marque est CSA.

### **2.4.2- Méthode**

Tout d'abord, il est essentiel de préparer les plantes avant le traitement. Elles doivent être cultivées à des températures élevées (30°C le jour et 25°C la nuit) pendant 1 mois avant le traitement dans la serre d'indexage. Les écussons prélevés sur les plantes ainsi préparées sont greffés sur des porte-greffes résistants à la chaleur (le bigaradier et le volcameriana) (Roistacher et Moreno, 1991).

Les plantes greffées sont placées dans une chambre climatique sous une forte humidité et à une température initiale de 30-35°C, avec 16 heures d'éclairage et 8 heure à 30°C à l'obscurité. Au bout d'une semaine, la température est augmentée progressivement à 40°C. Les plantes greffées sont conservées à cette température pendant 8 semaines, elles sont ensuite transférées dans une serre où elles subiront un forçage. Les nouvelles pousses, après une période de croissance, sont testées pour vérifier l'absence de virus dans le cas d'utilisation de la thermothérapie seule (T1), mais lorsqu'on combine avec le micro-greffage, cette nouvelle pousse doit être utilisée en micro-greffage (le cas du troisième type de traitement T1+2) (Figure 16).



**Figure 16** : Plants ayant subi un forçage dans la serre

## **2.5- Le micro-greffage de l'apex**

### **2.5.1- Préparation des milieux de culture**

#### **2.5.1.1- Milieu de semis**

Le milieu de semis est constitué de sels minéraux de Murashigue et Skoog (1962), solidifié avec l'agar pur à raison de 7g/l (voir Annexe). Le pH est ajusté à 5,7 à l'aide d'une solution de NaOH ou de HCl. Le milieu est réparti dans des tubes en verre stérilisés de 25 ml par tube.

#### **2.5.1.2- Milieu de micro-greffage**

C'est un milieu liquide, constitué de sels minéraux de Murashigue et Skoog (1962), additionné de 100 mg/l de myo-inositol, 75 g/l de saccharose et des vitamines Murashigue et Skoog (voir Annexe).

Le milieu est réparti dans des tubes à essai stérilisés à raison de 25 ml par tube.

#### **2.5.1.3- Stérilisation des milieux**

Tous les milieux de culture sont stérilisés juste après leur préparation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes. Ensuite, les milieux sont conservés au frigo à une température de 4°C jusqu'au jour d'utilisation.

## **2.5.2- Description de la technique du micro-greffage de l'apex «*in vitro*»**

### **2.5.2.1- Elevage du porte-greffe**

Les graines extraites du fruit sont lavées à l'eau chaude et traitées par un fongicide. Ensuite, elles sont conservées dans des sacs en plastique à une température de 4°C jusqu'au jour d'utilisation.

Les graines sont alors décortiquées de leurs deux téguments sous hotte à flux laminaire. Les graines sont désinfectées à l'aide de l'hypochlorite de calcium à 0,7% avec deux gouttes de Tween 20 pendant 15 minutes suivies de 3 rinçages à l'eau distillée stérile.

L'ensemencement est effectué à raison de deux graines par tube contenant le milieu de semis.

Les tubes sont placés dans un incubateur à une température constante de 27°C à l'obscurité pendant 15 jours (Roistacher et Moreno, 1991 ; Navarro, 1981) (Figure 17).

### **2.5.2.2- Préparation des greffons**

Les plants à régénérer sont placés dans une serre chauffée entre 27-30°C. Ils sont totalement effeuillés pour permettre l'apparition rapide de jeunes pousses.

Des jeunes pousses d'environ 3 cm sont prélevées sur les plants de la serre à l'aide de ciseaux désinfectés pour éviter leur dessèchement. Les apex sont mis dans des béciers remplis d'eau et analysés au laboratoire.

Sous hotte à flux laminaire, les apex sont désinfectés à l'aide de l'hypochlorite de calcium à 0,3% avec deux gouttes de Tween 20 pendant 15 minutes suivies de 3 rinçages à l'eau distillée stérile (Nicoli, 1985).

### **2.5.2.3- Le micro-greffage de l'apex**

Les porte-greffes âgés de 15 jours sont extraits de leurs milieux de culture et débités à environ 2 cm au dessus des attaches des cotylédons après suppression de ces derniers. La racine est réduite à environ 4 à 5 cm de longueur (Figure 18).

Les porte-greffes sont placés dans des boîtes de Pétri stériles contenant du papier filtre humide pour éviter leur dessèchement sous la loupe binoculaire. Nous avons pratiqué une entaille en forme de «T» inversé au niveau de l'extrémité en incisant l'écorce sans léser le bois. Nous isolons l'apex avec deux à trois ébauches foliaires et dont la taille ne dépasse pas 0,2 mm de diamètre. L'apex est ensuite placé au niveau de l'incision préparée à l'extrémité du porte-greffe.

Le prélèvement se fait à l'aide d'un morceau de lame de rasoir emmanché sur un porte-lame. On insère l'apex sous les lèvres de l'incision en prenant bien soin de le placer sur la base de la coupe (Figure 19).

Afin d'éviter la transmission mécanique du virus, la servante à inciser le porte-greffe n'est pas la même que celle qui sert à prélever le méristème, et elle est aussi désinfectée avant chaque intervention.

Les plants greffés sont placés dans des tubes de culture contenant le milieu de micro-greffage (Nicoli, 1985).

#### 2.5.2.4- Elevage des plants greffés

Les plants greffés sont placés dans une chambre de culture à température constante  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , avec une photopériode de 16 heures de lumière et une intensité lumineuse d'environ 5000 lux (Nicoli, 1985) (Figure 20).

Les cultures sont contrôlées régulièrement sous loupe binoculaire. On élimine aseptiquement lorsque cela est nécessaire les pousses émises par le porte-greffe à l'aide de longs ciseaux stériles.

Quand le méristème greffé est soudé au porte-greffe, il se développe plus ou moins rapidement suivant les variétés.

#### 2.5.2.5- Le sur-greffage

D'après les promoteurs de la technique, les plants obtenus par le micro-greffage «*in vitro*» sont repiqués 5 à 8 semaines après le greffage sous serre dans un mélange terreux et recouverts par des sacs en polyéthylène. Ces sacs sont retirés progressivement (Nicoli, 1985).

D'après les essais pratiqués dans la station expérimentale (ITAFV) et qui donnent de bons résultats, on pratique directement un greffage de côté sous écorce des plantules *in vitro* sur des plants plantés dans des pots. Il était indispensable de recouvrir entièrement le greffon avec un parafilm afin d'éviter son dessèchement (Figure 21).

### 2.6- La vérification d'efficacité du traitement

La vérification d'efficacité des traitements pour éliminer le virus du CTV est réalisée par la méthode ELISA décrite dans le chapitre précédent.



**Figure 17 :** Porte-greffes âgés de 15 jours



(a)

(b)

**Figure 18 :** Porte-greffes après leur préparation pour réaliser le micro-greffage (a) ; la nouvelle pousse prélevée (greffon) (b)



**Figure 19 :** Réalisation de micro-greffage.



**Figure 20 :** Elevage des plants greffés



**Figure 21 :** Le sur-greffage

### 3- Résultats et discussion

#### 3.1- Identification du CTV

##### 3.1.1- Résultats Obtenus

###### 3.1.1.1- Observation des symptômes

Dans cette étape de notre travail, les symptômes du type CTV ont été observés dans les quatre sites prospectés. Il s'agit de :

- Jaunissement apical des rameaux
- Dessèchement des branches et dépérissement total de l'arbre (Figure 22 et 25)
- Des fruits de mauvaise qualité (Figure 23)
- Enroulement des jeunes pousses et des feuilles en forme de coupe (Figure 24)
- Nanisme des plants

Les échantillons prélevés des quatre zones prospectées s'élèvent à 100 échantillons à raison de 25 pour chacune des 4 parcelles visitées. Cependant, nous n'avons pas pu prélever 25 échantillons par variété à cause du dépérissement total des arbres pour deux variétés.



**Figure 22** : Dessèchement des branches sur la variété Double fine (parcelle : Boufarik 2).



**Figure 23 :** Fruits de mauvaise qualité



**Figure 24 :** Feuilles en forme de coupe



**Figure 25 :** Dépérissement total d'un arbre atteint de CTV

### 3.1.1.2- Résultats du test ELISA

Pour confirmer la présence ou l'absence du CTV, l'ensemble des échantillons prélevés sur terrain des quatre sites a été analysé par la technique DAS-ELISA.

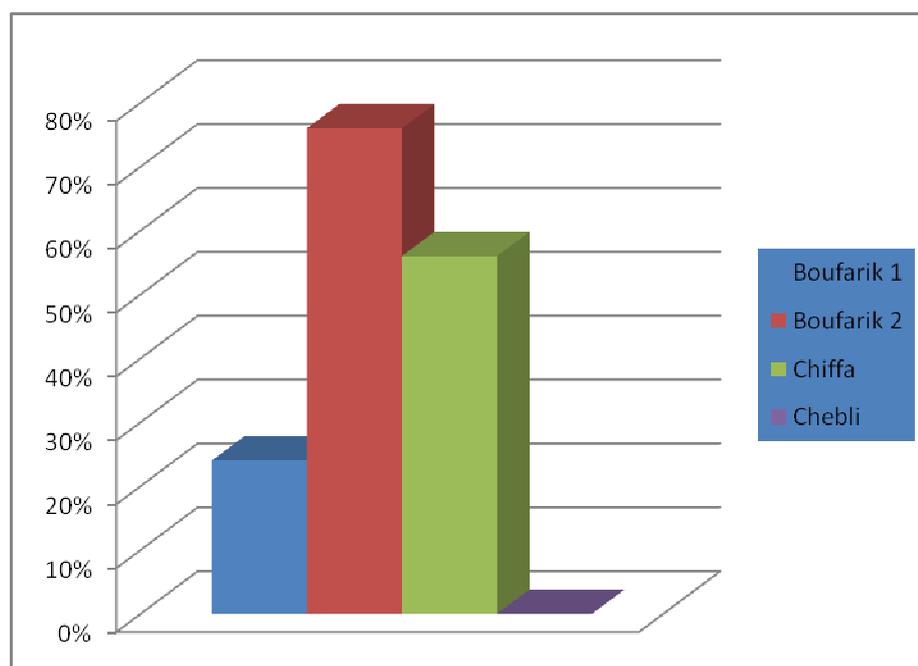
Sur les 100 échantillons prélevés, 39 ont répondu positivement ; le reste a donné des réponses négatives. Un échantillon est considéré comme positif lorsque sa densité optique est supérieure au seuil de détection, c'est-à-dire, 0,243 (voir Annexe).

### 3.1.1.3- Taux d'infection

Le taux d'infection ou incidence est calculé comme suit :

$$T.I = \frac{\text{Nbr de plants positifs}}{\text{Nbr de plants testés}} \times 100$$

Le taux d'infection de chaque parcelle est représenté dans la figure 26



**Figure 26 :** Taux d'infection du CTV dans les quatre stations

Après l'analyse des valeurs des DO des échantillons testés et la DO du témoin négatif, le CTV était présent dans la région de la Mitidja avec un taux d'infection de 39%. Il a été caractérisé dans trois parcelles (Boufarik 1, Boufarik 2 et Chiffa), alors qu'il était totalement absent dans la parcelle de Chebli.

Pour la parcelle de Boufarik 2, sur 25 échantillons testés, 19 ont répondu positivement, soit un taux d'infection de 76%. Par ailleurs, dans la parcelle de Chiffa, sur 25 échantillons testés, 14 ont répondu positivement, donnant un taux d'infection de 56%. Pour la parcelle de Boufarik 1, sur 25 échantillons testés, 6 ont répondu positivement, montrant un taux d'infection de 24%.

### **3.1.2- Discussions**

Sur la base de l'existence des symptômes typiques du CTV, il apparaît que les parcelles les plus touchées par le CTV sont Boufarik 2 et Chiffa.

Les résultats du test ELISA ont montré que la parcelle de Boufarik 2 est la plus atteinte par le CTV avec un taux d'infection de 76%, où La variété Double fine a répondu positivement pour le CTV. Elle peut être considérée comme la variété la plus sensible au CTV. Suivie par la parcelle de la Chiffa classée deuxième avec un taux d'infection de 56%. Dans cette parcelle, nous avons trouvé que la variété Thomson a répondu positivement au CTV, considérée comme une variété sensible. Ce taux très élevé due probablement aux vieux arbres greffés sur bigaradiers (porte greffe le plus sensible au CTV). Globalement, nos résultats confirment ceux obtenus par plusieurs auteurs, notamment, Bové et Vogel. (1964), Roistacher *et al.* (1974). Ils rapportent que l'épidémie de la tristeza a infesté surtout les arbres greffés sur bigaradier.

Toutefois, dans la parcelle de Boufarik 1, bien que les jeunes arbres soient greffés sur Citrange carrizo (porte greffe tolérant aux CTV), comme rapporté par Rey. (1997), nous avons trouvé un taux d'infection de 24%. Ceci peut s'expliquer par l'origine des greffons utilisés, récoltés sur des arbres probablement atteint par le CTV.

## **3.2- Identification du CTV par indexage**

### **3.2.1- Résultats obtenus**

Les symptômes observés sur l'indicateur 1 (*Lime mexicaine*) sur tous les échantillons testés par l'indexage, y compris le témoin positif, sont de type éclaircissement de nervure. Par contre, dans l'indicateur 2 (*Madame venus*), nous n'avons pas observé de symptômes du type CTV pour tous les échantillons testés. Pour vérifier ces observations, nous avons utilisé le test DAS-ELISA pour confirmer la présence du virus dans les plants indexés (Tableau 12) (Figure 27 et 28).



**Figure 27** : Symptômes d'éclaircissement sur des nervures sur l'indicateur la Lime mexicaine



**Figure 28** : Aucun symptôme observé sur l'indicateur 2 (Madame venus)

**Tableau 12** : Valeurs en DO du CTV obtenues par la DAS-ELISA pour les échantillons du test biologique (l'indexage).

N° d'échantillon	Indicateur utilisé	Origine de virus	DO Ecart type	Réaction
1	Lime mexicaine	Boufarik 2	0,401±0,010	+
2			0,421±0,031	+
3			0,400±0,028	+
4			0,442±0,019	+
5			0,419±0,026	+
6		Chiffa	0,389±0,009	+
7			0,403±0,018	+
8			0,392±0,015	+
9			0,381±0,024	+
10			0,406±0,020	+
11	Madame venus	Chiffa	0,365±0,011	+
12			0,345±0,015	+
13			0,352±0,024	+
14			0,349±0,039	+
15			0,338±0,017	+
16		Boufarik 2	0,367±0,024	+
17			0,359±0,032	+
18			0,375±0,025	+
19			0,382±0,016	+
20			0,371±0,028	+
Témoin frais malade	Lime mexicaine		0,456±0,015	+
Témoin frais malade	Madame Venus		0,401±0,018	+
Tampon de broyage			0,101	-
Témoin négatif 1			0,112±0,024	-
Témoin négatif 2			0,112±0,024	-
Témoin négatif 3			0,185±0,049	-
Témoin positif			0,604	+

### **3.2.2 Discussion des résultats de l'indexage**

Les résultats obtenus par le test DAS-ELISA ont confirmé la présence du CTV dans les plants indexés. Les résultats obtenus montrent que les isolats analysés par le test biologique ont donné une faible manifestation du symptôme sur la Lime mexicaine (l'indicateur le plus sensible du CTV) et absent totalement sur Madame venus. Ceci suggère que les isolats appartiendraient à une souche peu pathogène, comme cela a été décrit par plusieurs auteurs pour les souches de la méditerranée (Roistacher, 1991 ; D'Onghia et Lacirignola, 1998).

De plus, on ne remarque aucune différence entre les deux isolats (Chiffa et Boufarik 2), ils se manifestent de la même manière avec les deux indicateurs, donc semblables. Ces résultats permettent de prendre en considération le remplacement immédiat du bigaradier par d'autres portes greffes plus tolérants au CTV, tel que le Citrange Carrizo.

Cette étude préliminaire doit être complétée par d'autres techniques de diagnostic telles que les tests moléculaires, ensuite entamer une étude comparative de notre isolat avec d'autres souches virulentes.

### **3.3- Essai de méthodes d'assainissement**

#### **3.3.1- Résultats du test ELISA**

##### **-Microgreffage**

Pour voir l'effet du microgreffage sur l'élimination du CTV, le test DAS-ELISA a été effectué. Pour cela, l'ensemble des échantillons qui ont subi le traitement du microgreffage a été analysé par la technique DAS-ELISA.

Sur 36 échantillons testés, 9 ont répondu positivement, alors que 27 ont donné des réponses négatives au test DAS-ELISA. L'échantillon est considéré comme positif lorsque sa densité optique est supérieure au seuil de détection, c'est-à-dire, 0,260 (voir Annexe).

L'analyse statistique de la variance du facteur étudié microgreffage de l'apex a révélé une différence très hautement significative (THS) de ce traitement sur le CTV (Proba 0,0000), au seuil de 5%(Tableau 13).

Le test de student et Newman - Keuls, a révélé que l'effet du microgreffage est très efficace sur la variété V2O2 (Thomson greffé sur Citrus volcameriana) suivie par la variété V2O1 (Double fine Thomson greffé sur Citrus volcameriana). En revanche le

microgreffage n'a pas pu éliminer le virus à 100% pour les deux autres variétés V1O1 et V1O2 (Double fine greffé sur bigaradier et Thomson greffé sur bigaradier)

**Tableau 13** : Analyse statistique du traitement 1 (micro-greffage d'apex)

Facteurs		Moyenne	ET	Proba.	CV%	MG	ETR
Variétés	V1O1	0,458	0,035	0,0000 THS	8.7%	0,347	0,03
	V1O2	0,451	0,013				
	V2O1	0,347	0,037				
	V2O2	0,332	0,027				
DO de virus	AVT	0,476	0,018	0,0000 THS			
	APR	0,219	0,037				
Interaction	V1O1 AVT	0,491	0,011	0,0000 THS			
	V1O2 AVT	0,424	0,015				
	V2O1 AVT	0,494	0,021				
	V2O2 AVT	0,493	0,024				
	V1O1 APR	0,225	0,050				
	V1O2 APR	0,239	0,049				
	V2O1 APR	0,209	0,030				
	V2O2 APR	0,201	0,011				

### -Thermothérapie

Pour voir l'effet de la thermothérapie sur l'élimination du CTV, le test DAS-ELISA a été effectué. Pour cela, l'ensemble des échantillons qui ont subi le traitement de la thermothérapie a été analysé par la technique DAS-ELISA.

Sur 36 échantillons testés, 9 ont répondu positivement, alors que 27 ont donné des réponses négatives. L'échantillon est considéré comme positif lorsque sa densité optique est supérieure au seuil de détection, c'est-à-dire, 0,260 (voir Annexe).

L'analyse statistique de la variance du facteur étudié thermothérapie a révélé une différence très hautement significative (THS) sur ce virus, avec un pourcentage de 83,33%. (Tableau 14).

Le test de student et Newman Keuls, a révélé que l'effet de la thermothérapie est très efficace sur la variété V2O2 (Thomson greffé sur Citrus volcameriana) suivie par la variété V2O1 (Double fine Thomson greffé sur Citrus volcameriana). Par contre la

thermothérapie n'a pas pu éliminer le virus totalement sur les deux autres variétés V1O1 et V1O2 (Double fine greffé sur bigaradier et Thomson greffé sur bigaradier).

**Tableau 14 : Analyse statistique du traitement 2 (thermothérapie)**

Facteurs		Moyenne	ET	Proba	CV%	MG	ETR
Variétés	V1O1	0,346	0,054	0,0001 THS	8.3%	0,323	0,049
	V1O2	0,357	0,041				
	V2O1	0,298	0,054				
	V2O2	0,291	0,041				
DO de virus	AVT	0,440	0,053	0,0000 THS			
	APR	0,206	0,041				
Interaction	V1O1 AVT	0,443	0,011	0,0000 THS			
	V1O2 AVT	0,452	0,015				
	V2O1 AVT	0,431	0,021				
	V2O2 AVT	0,433	0,024				
	V1O1 APR	0,250	0,050				
	V1O2 APR	0,262	0,011				
	V2O1 APR	0,165	0,049				
	V2O2 APR	0,148	0,030				

#### - La combinaison des deux traitements

La combinaison des deux traitements, thermothérapie et microgreffage a été réalisée pour étudier son effet sur l'élimination du CTV. Pour cela, l'ensemble des échantillons qui ont subi les deux traitements a été analysé par la technique DAS-ELISA.

36 échantillons ont donné des réponses négatives au test DAS-ELISA. L'échantillon est considéré comme positif lorsque sa densité optique est supérieure au seuil de détection, c'est-à-dire, 0,260 (voir Annexe).

L'analyse statistique de la variance du facteur étudié microgreffage de l'apex combiné à la thermothérapie a révélé une différence très hautement significative (THS) concernant l'effet de ce traitement sur le virus, avec un pourcentage de 100%. (Tableau 15).

Le test de student et Newman - Keuls, a révélé que l'effet de la combinaison des deux traitements est très efficace sur toutes les variétés [variété V2O2 (Thomson greffé sur Citrus volkameriana) suivie par la variété V2O1 (Double fine Thomson greffé sur

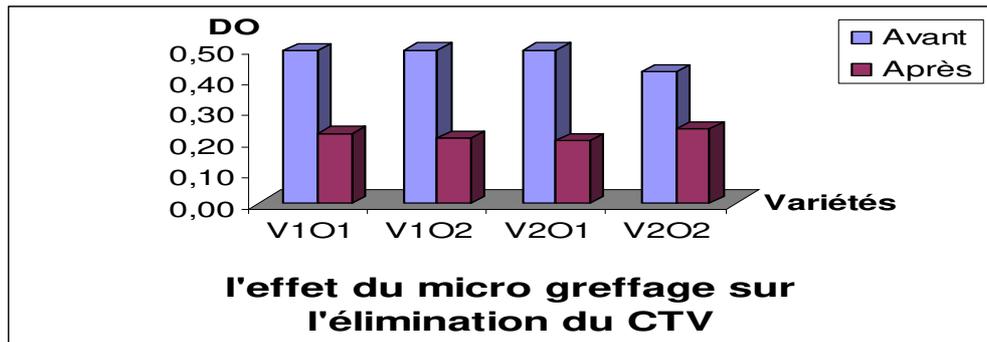
Citrus volckameriana) ensuite par les deux variétés V1O1 et V1O2 (Double fine greffé sur bigaradier et Thomson greffé sur bigaradier)].

**Tableau 15** : Analyse statistique du traitement 3 (la combinaison de la thermothérapie avec le micro-greffage de l'apex).

Facteurs		Moyenne	ET	Proba	CV%	MG	ETR
Variétés	V1O1	0,273	0,030	0,0000 THS	9%	0,347	0,027
	V1O2	0,273	0,025				
	V2O1	0,318	0,016				
	V2O2	0,320	0,030				
DO de virus	AVT	0,427	0,024	0.0000 THS			
	APR	0,164	0,027				
Interaction	V1O1 AVT	0,397	0,017	0,0000 THS			
	V1O2 AVT	0,403	0,019				
	V2O1 AVT	0,493	0,012				
	V2O2 AVT	0,416	0,041				
	V1O1 APR	0,150	0,041				
	V1O2 APR	0,223	0,031				
	V2O1 APR	0,143	0,020				
	V2O2 APR	0,142	0,014				

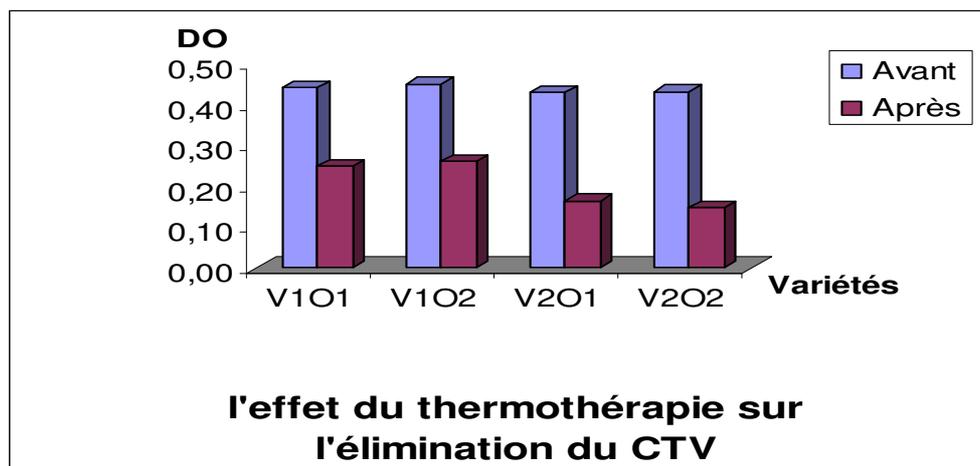
### 3.3.2- Effet de différents traitements sur l'élimination du CTV

D'après les résultats obtenus à partir du test ELISA, on peut dire que la combinaison des deux méthodes de traitement (microgreffage associé avec la thermothérapie T3) est la plus efficace pour l'élimination du CTV, avec un pourcentage de 100% viennent ensuite la thermothérapie par un pourcentage de 83,33% et le microgreffage avec un pourcentage de 75% (Figure 29, 30 et 31).



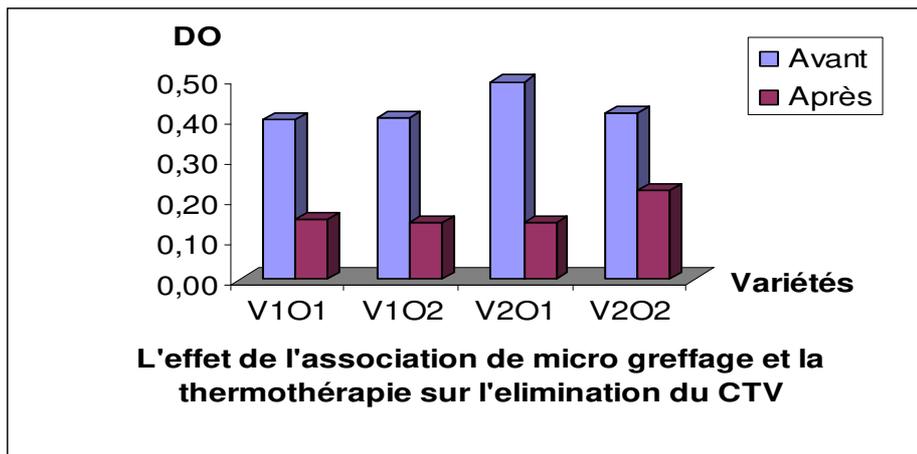
**Figure 29** : Effet du micro-greffage sur le CTV (traitement 1)

Les résultats relatifs au traitement de microgreffage montrent que ce traitement a un effet remarquable sur l'élimination du virus, surtout sur la variété V2O2 où elle a réagi positivement avec le traitement 1 (DO avant le traitement = 0,493, et DO après le traitement = 0,201) par rapport à d'autres variétés ou la variété V1O2 est classée la dernière (DO avant le traitement = 0,424, et DO après le traitement = 0,239).



**Figure 30** : Effet de la thermothérapie sur le CTV (traitement 2)

Les résultats relatifs au traitement de la thermothérapie montrent que ce traitement a un effet remarquable sur l'élimination du virus surtout sur la variété V2O2 où elle a réagi positivement avec le traitement 2 (DO avant traitement = 0,433, et DO après traitement = 0,148) par rapport aux autres variétés.



**Figure 31** : Effet de la combinaison du microgreffage avec la thermothérapie sur le CTV (traitement 3)

Les résultats relatifs à la combinaison de la thermothérapie avec le microgreffage montrent que ce traitement a un effet très remarquable sur l'élimination du virus surtout sur la variété V2O1 qui a réagi positivement avec le traitement 3 (DO avant traitement = 0,493, et DO après le traitement = 0,143) par rapport aux autres variétés qui ont réagi de manière semblable, sauf pour la variété V1O2 classée en dernière position (DO avant traitement = 0,416, et DO après traitement = 0,223).

En comparant les valeurs en DO avant et après traitement, on remarque que quel que soit le type de variété (porte-greffes et greffon) et l'origine de l'isola du CTV, la combinaison des deux traitements a éliminé le virus.

### 3.3.3- Discussion

Du point de vue général, les trois traitements sont efficaces pour éliminer le CTV à plus de 70%. Nos résultats montrent que le traitement 3 (la combinaison des deux méthodes) est le meilleur suivi par le traitement 2 (thermothérapie) et en dernier le traitement 1 (microgreffage).

Les variétés V2O2, V2O1 ont répondu positivement aux trois traitements par rapport aux variétés V1O1, V1O2. Ceci permettrait de dire que le porte greffe Citrus volkameriana a mieux réagi que le bigaradier. Le plus sûr moyen de lutter contre les affections du CTV serait de remplacer progressivement le bigaradier comme porte greffe connu pour sa sensibilité, par d'autres plus résistants.

L'analyse statistique de la variance du facteur étudié thermothérapie a révélé une différence très hautement significative (THS) concernant l'effet de ce traitement sur ce virus, avec un pourcentage de 83,33%. Ces résultats s'avèrent être en accord avec ceux rapportés par Roistacher (1977) qui obtenu 98% de plants sains de CTV après utilisation de la thermothérapie sur la souche Californienne.

L'analyse statistique de la variance du facteur étudié microgreffage de l'apex a révélé également une différence très hautement significative (THS) concernant l'effet de ce traitement sur le CTV, avec un pourcentage de 75%. Ces résultats s'avèrent être en accord aussi avec ceux de Roistacher et Navarro (1975) qui obtiennent 83% de plants sains de CTV après le microgreffage et de Fourie et Van Vuuren (1993) qui obtiennent aussi 89% de plants sains de CTV par la même technique.

L'analyse statistique de la variance du facteur étudié microgreffage de l'apex combiné à la thermothérapie a révélé une différence très hautement significative (THS) concernant l'effet de ce traitement sur le virus, avec un pourcentage de 100%. En général, nos résultats vont dans le même sens de ceux obtenus par Roistacher (1977) et Fourie et Van Vuuren (1993), qui rapportent globalement que l'association de la thermothérapie avec le microgreffage donnent d'excellents résultats pour l'élimination du CTV.

## Conclusion générale

Le verger agrumicole national traverse une situation critique par son vieillissement et son dépérissement, accentuée par la dégradation de son état sanitaire causée par de nombreuses maladies et mauvaises connaissances des techniques.

Dans le cadre de notre expérimentation, on remarque que le symptôme le plus dominant dans nos vergers est le dépérissement. Cependant, on se pose la question suivante : quel est l'agent causal de dépérissement des agrumes dans les vergers algériens ? Parmi les agents biotiques responsables de dépérissement le CTV (Citrus tristeza closterovirus) virus de quarantaine peut être l'une des causes.

L'identification réalisée a permis de montrer la présence du CTV dans différents vergers avec un taux d'infection de 39%, mais les résultats de la deuxième partie ont montré que l'isolat algérien du CTV est peu pathogène. Ceci permet de prendre en considération le changement du bigaradier par d'autres porte greffes.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour connaître le véritable état sanitaire des verges d'agrumes et l'incidence du CTV dans le dépérissement des vergers Algériens d'une part une meilleure connaissance des souches existantes en Algérie est nécessaire pour un meilleur contrôle de la maladie. Les nouvelles méthodes d'identification seraient d'un apport appréciable notamment par l'utilisation de marqueurs moléculaire (sonde moléculaires) ou sérologique (anticorps monoclonaux)

Par ailleurs, l'Algérie tend à reconsidérer ce problème dans son ensemble, en adaptant une nouvelle orientation ayant pour objectif principal la vérification de l'état sanitaire des parcs à bois vis-à-vis des maladies virales afin d'éviter leur multiplication à travers un matériel végétal malade.

L'assainissement est devenu un outil très important dans l'amélioration de la qualité des plants utilisés aussi bien du point de vue variétal que sanitaire. IL contribue à augmenter la productivité et améliorer le niveau de vie des agrumiculteurs. La mise en place d'un programme de certification nécessite la contribution de toutes les instances impliquées directement ou indirectement dans le secteur des agrumes tant étatique que privé vu les investissements que demande un tel programme.

Parmi les techniques utilisées dans la certification, la thermothérapie et le microgreffage de l'apex ont une grande efficacité pour éliminer les maladies virales telles que le CTV comme l'ont montré nos résultats qui classent le traitement 3 (la combinaison des deux méthodes) en premier suivi par le traitement 2 (thermothérapie) et en dernier le traitement 1 (microgreffage). Ces méthodes vulgarisées au niveau des parcs à bois ainsi que des pépinières pourraient à terme offrir une disponibilité de plants sains.

## Liste des Références Bibliographiques.

- Agranovsky, J.P, Bar-Joseph, M, Gumpf, D.J, Dodds, J.A, Rosner, A et Ginsberg. 1995.** Transcriptional strategy of closteroviruses mapping the 5' termini of the citrus Tristeza virus subgenomic RNAs . Virologica. 71(8).6233-6236.
- Agrios, G.N. 1997.** Plant pathology, 4<sup>th</sup> Ed, chapter 14, p520-521.
- Al Mouie. W. 2002.** Le développement d'agrumiculture en Syrie. Ministère de L'agriculture. Direction de Tartous.37p.
- Anonyme. 1976.** La taille des agrumes, Publication SASMA-Maroc. 33p.
- Anonyme. 1992.** La conservation de ressources génétiques d'agrumes de la station de San Giuliano en Corse. Fruits 47(6) ,691-714.
- Anonyme. 1995.** Création d'un verger d'agrumes. ITAF. Agriculture 1,66p.
- Anonyme. 2001.** Production agricole mondiale. Ed FAO.5p.
- Anonyme. 2006.** Les statistiques du Ministère de l'Agriculture (série 2006), 45pp
- Aubert, B et Vullin, G. 1997.** Pépinières et plantations d'agrumes. Ed CIRAD.168pp.
- Aubert, B. 1990.** Prospects for citriculture in South- East Asia by the year 2000. Ed FAO plant protection. Bulletin.151-174.
- Aubert, D, Vogel, R, Bové, J.M et Bové, C. 1982.** Affections virales des agrumes transmises par pucerrons a l'île de la réunion. Fruits, 37(7). P441-465.
- Bar-Joseph, M, Garnsey S.M, Gonsalves D. 1979.** The Closteroviruses A distinct group of elongated plant viruses.Adv.Virus Research 25, P93-168
- Bar-Joseph, M, Roistacher, C.N et Garnsey, S.M .1983.** The epidemiology and control of citrus tristeza disease. In: Plant virus epidemiology (Ed. by Plumb, R.T.; Thresh, J.M.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, Royaume-Uni. p. 61-72.
- Bar Joseph, M, Marcus, R et Lee, R.F. 1989.** The continous challange of citrus tristeza virus control. Annual review of Phytopathology, 27 . p291-316.
- Ben cheikh. 1978.** Les porte-greffes des agrumes en Algérie, communication présentée a la journée technique sur les porte-greffes arboriculture,ITAF, 8p.
- Bitancourt, A.1943.** Recomendacoes par combater e minorar os estragos da « podrida de raices » dos citrus biologico. Instituto biologoco, Sao Paulo, Brésil, vol9. 41-42.

- Bitancourt, A. 1944.** Um teste para a identificacao precoce da tristeza dos citrus. . Instituto biologico, Sao Paulo, Brésil, vol11. 18-22.
- Balachowsky, A.S. 1951.** La lutte contre les insectes : principes, méthodes, applications. Ed. Payot. Paris. 380pp.
- Blondel, L.1967.** Quelques aspects généraux du remplacement du bigaradier et de l'utilisation des porte-greffes nouveaux. Fruit 22(1). P19-26.
- Blondel, L.1959.** La culture des agrumes en Algérie, station expérimentale d'arboriculture de Boufarik. Bull n<sup>o</sup> 142. 20p.
- Bové, J.M et Vogel, R.1964.** Stem piting sur bigaradier et sur oranger tarocco en Corse. Une maladie à virus. Fruits (19) 269-74.
- Bouderbala, M. 1978.** Influence de trois porte-greffes sur le comportement de clémentinier. Th. Magister. INA El Harrach 90p.
- Bové, J.M et Vogel, R.1981.** Maladies à virus dans les pays du bassin méditerranéen. Fruit. 22(3). P125-140.
- Cassin, J. 1983.** Diversification agrumicole et travaux de la station de recherches agronomiques de San Giuliano en Corse. Colloque agrumicole du CLAM.p36-42
- Cassin, J. 1984.** Comportement des variétés d'agrumes dans les différentes régions de production, Fruit.39 (4), pp263-275.
- Clark, M.F et Adams, A.N. 1977.** Characteristics of the microplate methode of enzyme-linked immuno sorbent assay for the detection of plants viruses. Virology.34, 475-483.
- Cohen, M et Bové, J.M.1980.** Description and installation of virus and virus-like diseases of citrus. A collection of colour slides. Paris IRFA Setco-Fruits.
- Costa, A.S et Muller, G.W. 1980.** Citrus tristeza closterovirus. Plant disease.64.538-541.
- D'onghia, A.M et Lacirignola, C. 1998.** Major virus and virus like diseases of citrus in the Mediterranean proceeding of the Mediterranean network on certification of citrus. Serie B studies and research. 21. Option mediteranean. CIHEAM. D G. 152pp.
- Davino, M, Catara,A, Russo,F, Terranova,G et Garbone,G. 1983.** A survey of CTV in Italy by the use of enzyme linked immunosorbent assay, in proc 9<sup>th</sup> conf, Argentina.p66-69.
- Davis, F.S et Albrigo, L.G.1994.** Citrus corp production in horticulture Edcab internationale wallinford.254pp.

**Dimitman, J.E.1983.** Citrus cancer survey, citrus and deciduous tree survey for diseases and pests. California. p109-24.

**Doumandji B et Doumandji S. 1996.** La lutte biologique contre les déprédateurs des cultures. Ed OPU. Alger. 71pp.

**El. Saqua, B. 2001.** Les pucerons et leurs ennemis naturels en agrumiculture. Ministère de L'agriculture de Syrie. Ed Dare EL Machirique. p26

**El.Faiz, M.1995.** L'agronomie de la Mésopotamie antique (Analyse du livre de l'agriculture nabatéenne de qutamia). New.york/Koln, leider. 32pp.

**Fawcett, F.S. et Wallace, J.M.1946.** Citrus tristeza closterovirus. Plant viruses online. California. Citrograph 32, pp88-89.

**Fraser, L. 1952.** Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. Agricultural Gazette of New South Wales 63, 125-131.

**Frezal, P.1953.** Les principales maladies virusiformes des agrumes. Extrait des comptes rendus des congrès pomologiques. Alger.pp 81-119.

**Fourie, C.J, Van Vuuren, S.P. 1993.** Improved procedures for virus elimination and pre-immunization for the South African citrus improvement programme. Science Bulletin of the Department of Agriculture South Africa n° 145. p61-66.

**Gargo-Zachert, S, Costa, N, Semorile, L et Gran, O. 1999.** Analysis of sequence variability in p27 gene of CTV isolates by single-strand conformation polymorphisme (sscp) method. Virus Research 71. p97-106.

**Garnsey, S.M, Gumpf, D.J, Roistacher, C.N, Civerolo, E.L, Lee, R.F, Yokomi, R.K, et Bar-Joseph, M.1987.** Toward a standardized evaluation of biological properties of citrus tristeza virus. Phytophylactica. 19 .p151-157.

**Giovani, P et Martelli, G.P. 1997.** Cour de virologie végétale. Virus Taxa : properties and epidemiological characteristic.Ed Cirad. 36pp.

**Hodgson, S.M et Webber, J.H. 1967.** Horticultural varieties of citrus. Plant pathology.p :19.48.

**Hughes, W.A et Lister, C.A. 1949.** Lime disease in the Gold Coast. Nature 164, 880pp.

**Jaquemonde, C et Blondel, L.1986.** Contribution à l'étude de porte-greffes d'agrumes poncirus trifolita. Etude des caractères botanique.Fruit 41(5).p303-339.

**Jelloul, B.1995.** La certification des agrumes au Maroc. Ed Ciheam. p 3.

**Karasev, A.V, Boyko, V.P, Gowda, S, Nikolaeva, O.V, Hilf, M.E, Koonin, E.V, Niblett, C.L, Cline, K, Gumpf, D.J, Lee, R.F, Garnsey, S.M, Lewandowski, D.J, et Dawson, W.O. 1995.** Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. Virology.208. p511-520.

**Lee, R.F. 1989.** Plant viruses online, citrus tristeza closterovirus. Calif. Citrogr.p35-69.

**Lee, R.F, Baker, P.S et Rocha-pena, M.A. 1994.** Citrus tristeza virus (CTV) : an introduction to current priorities, with special reference to the worsening situation in central American and the Caribbean international Institute of Biological control, centre for agriculture organisation (FAO), united Kingdom.197pp.

**Lee, R.F, Lehman, P.S et Navarro, L. 1999.** Nursery practices and certification programs for budwood and rootstocks, in citrus health management. APS.ST. p35-46.

**Lee, R.F.2000.** Citrus tristeza : biology, potential impact and control strategies. Arab j pl prot, 18(2) : p143-148.

**Loussert, R.1985.** Les agrumes-collection « technique agricole »INRA Rabat. p85-90.

**Loussert, R.1987.** Les agrumes volume1, arboriculture. Technique et documentation. Ed Lavoisier.90pp.

**Mc Clean, A.P.D.1957.** Les infections à virus chez les Citrus. Fruit et primeur d'Afrique du nord. Phytoma 8.p203-208.

**Murashigue et Skoog 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Ed Cirad, p13.

**Navarro, L., Juarez, J., Pina, J.A., Ballester, J.F. 1984.** The citrus quarantine station in Spain. In: Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Ed. by Garnsey, S.M.; Timmer, L.W.; Dodds, J.A.), p365-370. IOCV, Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, Etats-Unis.

**Navarro, L., Juarez, J., Pina, J.A., Ballester, J.F., Arregui, J.M. 1988** The citrus variety improvement programme in Spain. In: Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Ed. by Timmer, L.W.; Garnsey, S.M.; Navarro, L.), p400-406. IOCV, Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, Etats-Unis.

**Nicoli, M.1985.** La régénération des agrumes en Corse par la technique du micro-greffage de méristème « in vitro ». Fruit.40.p113-136.

- Nolasco, G, Mendes, C et Fernandes, A. 1995.** Aspect of the molecular epidemiology of citrus tristeza virus as elucidated by restriction site polymorphis analysis, Virology 208. p229-231.
- Oberholzer, P.C.J, Wallace, J.M, et Hofmeyer, J.D.J. 1949** Distribution of viruses of tristeza and other propagative material. Science Bulletin of the Department of Agriculture South Africa No. 297. p4.
- Permar, T.A, Garsey, S.M, Gumpf, D et Jandlee, R.F. 1990.** A monoclonal antibody to discriminate strains of CTV. Phytopathologie, 19. P224-228.
- Permar, T.A et Garnsey, S.M. 1991.** Comparison of biological indexing and immunological assays for identifying severe Florida isolates of citrus tristeza virus. Phytopathologie, 21. p113-117.
- Praloran, J.C.1971.** Les agrumes. Ed GP Maisonneuve et Larose. Paris. 565pp.
- Rebour, H.1957.** Les agrumes. Manuel de culture des citrus pour le bassin méditerranéen. Ed JB. Baillier et Fils, Paris, 278pp.
- Rey, J.Y. 1997.** L'agriculture de la production agrumicole d'Afrique de l'ouest et du centre in : proceeding of the VISCN congress, March 1997, Montpellier, France Cirad-Flor.p8
- Rocha Pena, M.A, Lee, R.F, Lastra, R.J, Niblett, C.L, Ochoa-Corona, F.M, Garnsey, S.M et Yokomi, P.K. 1995.** Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the caribbean and central and north america. Plant disease, 49. p437-445.
- Roistacher, C.N, Blue R.L, Nauer, E.M et Calavan, E.C. 1974.** Suppression of tristeza virus, symptoms in mexican lime seedling grown at warm temperatures. Plant disease reporter 58(8). p757-760.
- Roistacher, C.N, Navarro, L.1975.** Elimination of a bud union abnormality of sweet orange grafted on rough lemon by shoot-tip grafting in vitro. . 10th Conference of IOCV, Spain, p.71-76.
- Roistacher, C.N. 1977.** Cross protection against citrus tristeza seedling yellows (CTV-SY) and stem pitting (CTV-SP) viruses by protective isolates developed in greenhouse plants. Ed CIRAD p. 69-75.
- Roistacher, C.N Moreno, P. 1991.** The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus - A review. Plant disease, 52. p214-221.
- Roistacher, C.N.1991.** Graft-transmissible diseases of citrus. In Handbook for detection and diagnosis. FAO. Ed Rome. 286pp.

- Savage, E.M , Gardner, F.R. 1965.** The troyer and carrizo citrange. Calif. Citrog. 36(3). p111-116.
- Sylvie, D, Abouy, J, Sasier, S et Monifacier. 1992.** La lutte contre les maladies à virus des arbres fruitiers apport du génie génétique. Phytoma 6, p32-34.
- Service d'information OEPP n° 504/02. 1999.** Liste des organismes de Quarantaines (CTV). Document technique de l'OEPP n°93, citrus tristeza virus. Bulletin 8 (2).5pp
- Van Regenmortel, M.H, Fauquet, S.M, Bichop, D.H, Carstents, E.B, Estes, M.K, Manillof, J, Mayo, M.A, McGeoch, D.J, Princele, C.R et Wickner, R.B. 2000.** The classification and nomenclature of viruses. The seventh report of the international committe on taxonomy of viruses .Academic press (book), Sandiego.1167pp.
- Van Regenmortel, M.H, Fauquet, S.M, Bichop, D.H, Carstents, E.B, Estes, M.K, Manillof, J, Mayo, M.A, McGeoch, D.J, Princele, C.R et Wickner, R.B. 2001.** The classification and nomenclature of viruses. Primarily based on the 7<sup>th</sup> ICTV report plus subsequent taxonomic decision.Academic press, Sandiego wein New York.1024pp
- Vogel, R. 1980.** Influence des maladies transmissibles sur le développement et la production du clémentinier en Corse .Fruits. 37, p229-235.
- Wallace, J.M. 1978.** ltrus tristeza closterovirus. Plant viruses. Calif.citrogr,36 :136pp.
- Yokomi, R.K et Damstreegt, S.M. 1991.** Comparison of citrus tristeza closterovirus transmission efficacy by *toxoptera citridus* and *aphis gossypii*. Phytopatology,75.p161-162.
- Yokomi, R.K, Laster, R, Stoetzel, M.B, Garnsey, S.M, Gottwald, T.R, Rocha-pena, M.A et Niblett, C.L. 1994.** Central America and the Caribbean bassin an dits transmission of citrus tristeza virus. J. Econ. Entomol.87 : p1078-1085.
- Zemane, V.1931.** Una enfermedad nueva en los narajales de covientes. Physis. 19, p410-411.

## Les Annexes

### **Solution P.B.S (Phosphate Buffer Saline). pH = 7.4**

Elle est composée de:

- NaCl ..... 8 g
- K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> .....0,2 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 2,9g
- K CL.....0,2 g
- Eau distilléec .....1000 ml

### **Solution de lavage (washing buffer). pH = 7,4**

Celle-ci est composée de 1000 ml de tampon P.B.S additionnée de 0,5 ml de tween 20.

### **Solution de broyage (extraction buffer). pH = 7,4**

. Pour 1000 ml de P. B. S, nous ajoutons :

- Tween 20 ..... 0,5 g
- Polyéthylène – pyrrolidone..... 10 g

### **Solution de substrat (substrat - buffer). pH = 9,8**

. Elle contient :

- Diethanolamine ..... 9,7ml
- Na N3 ..... 0 ,20g
- Eau distillée ..... 1000ml

### **Solution du conjugué (conjugate buffer). pH = 9 ,6**

Elle est composée de :

- BSA fraction S ..... 2 g
- Rouge congo .....40 mg
- Tween 20.....0,5 ml
- P.B.S .....1000 ml

### **Solution de fixation (coating Buffer). pH = 9,7**

Sa composition est :

Na <sub>2</sub> Co <sub>3</sub> .....	1,59 g
NaHCo <sub>3</sub> .....	2,93 g
Na N3 .....	0,2 g
Pourpre de bromorésol .....	5 m g
Eau distillé .....	1000 ml

### **Milieu de Murashige et Skoog <sup>1</sup>**

**En Mg/L**

Nitrate d'ammonium	1650
Nitrate de potassium	1900
Sulfate de magnésium	370
Sulfate de manganèse	16,9
Sulfate de Zinc	8,9
Sulfate de cuivre	0,025
Chlorure de calcium	440
Iodure de potassium	0,83
Chlorure de cobalt	0,025
Dihydrogenophosphate de potassium	170
Acide borique	6,2
Mobyldate de sodium	0,25
Sulfate de fer	25,85
Acide ethylenedinitrilotraacetique	37,25
Thiamine HCl	0,2
Pyridoxine HCl	1,0
Acide nicotinique	1,0
Inositol	100

Saccharose <sup>1</sup> 75G

Gélose <sup>2</sup> 8G

Milieu de germination des porte greffes: I+2

Milieu d'élevage des plantes micro greffes : I+1

Valeurs en DO de CTV obtenues par la DAS-ELISA pour les échantillons expérimentés.

N° de l'échantillon	Parcelle	Type de variétés	DO± Ecart type	Réaction
1	Boufarik 1	Thomson	0,225± 0,010	-
2			0,212±0,011	-
3			0,223±0,008	-
4			0,271±0,019	+
5			0,331±0,016	+
6			0,224±0,009	-
7			0,266±0,008	+
8			0,301±0,015	+
9			0,200±0,004	-
10			0,186±0,020	-
11			0,221±0,015	-
12			0,207±0,005	-
13			0,216±0,024	-
14			0,109±0,002	-
15			0,234±0,009	-
16			0,127±0,019	-
17			0,114±0,021	-
18			0,298±0,002	+
19			0,228±0,016	-
20			0,175±0,028	-
21			0,232±0,015	-
22			0,302±0,005	+
23			0,215±0,018	-
24			0,198±0,024	-
25			0,128±0,030	-
26	Boufarik 2	Thomson	0,245±0,020	+
27			0,202±0,038	-
28			0,278±0,025	+
29			0,314±0,010	+
30			0,291±0,025	+
31			0,241±0,009	+
32			0,225±0,017	-
33		0,221±0,012	-	
34		Double fine	0,408±0,015	+
35			0,488±0,022	+
36			0,395±0,031	+
37			0,188±0,010	-
38			0,320±0,015	+
39			0,216±0,022	-
40			0,265±0,035	+
41			0,214±0,015	-
42			0,380±0,036	+

43			0,487±0,028	+	
44			0,419±0,021	+	
45			0,472±0,017	+	
46			0,431±0,029	+	
47			0,385±0,037	+	
48			0,391±0,023	+	
49			0,407±0,008	+	
50			0,501±0,039	+	
51	<b>Chiffa</b>	<b>Thomson</b>	0,218±0,017	-	
52			0,322±0,012	+	
53			0,354±0,031	+	
54			0,482±0,010	+	
55			0,390±0,021	+	
56			0,220±0,011	-	
57			0,245±0,027	+	
58			0,212±0,004	-	
59			0,404±0,031	+	
60			0,422±0,022	+	
61			0,330±0,004	+	
62			0,123±0,032	-	
63			<b>Washington navel</b>	0,233±0,008	-
64				0,268±0,025	+
65				0,251±0,021	+
66				0,136±0,036	-
67				0,239±0,009	-
68				0,209±0,022	-
69	0,272±0,031	+			
70	0,241±0,016	-			
71	<b>Washington navel</b>	0,301±0,020	+		
72		0,291±0,012	+		
73		0,302±0,008	+		
74		0,190±0,024	-		
75		0,182±0,015	-		
76	<b>Chebli</b>	<b>Thomson</b>	0,166±0,005	-	
77			0,205±0,024	-	
78			0,197±0,035	-	
79			0,231±0,002	-	
80			0,141±0,028	-	
81			0,131±0,039	-	
82			0,169±0,033	-	
83			0,212±0,012	-	
84			0,215±0,027	-	
85			0,210±0,038	-	
86			<b>Valencia</b>	0,202±0,013	-
87				0,220±0,021	-
88				0,224±0,014	-
89				0,204±0,018	-
90				0,130±0,011	-

91			0,135±0,022	-
92			0,206±0,034	-
93		Washington navel	0,216±0,019	-
94			0,211±0,009	-
95			0,215±0,011	-
96			0,159±0,010	-
97			0,183±0,003	-
98			0,212±0,009	-
99			0,168±0,011	-
100			0,205±0,021	-
<b>Tampon de broyage</b>			0,101±0,020	-
<b>Témoin frais sain</b>			0,201±0,021	-
<b>Témoin frais malade</b>			0,421±0,027	+
<b>Témoin négatif 1</b>			0,201±0,053	-
<b>Témoin négatif 2</b>			0,126±0,012	-
<b>Témoin négatif 3</b>			0,118±0,030	
<b>Témoin positif</b>			0,614	+

Valeurs en DO du CTV obtenues par la DAS-ELISA pour les échantillons du micro-greffage

N° d'échantillon	Type d'échantillon	DO avant le traitement	Réaction	DO après le traitement	Réaction
1	T1V1O1E1R1	0,483±0,021	+	0,259±0,021	+
2	T1 V1O1E1R2	0,472±0,035	+	0,190±0,032	-
3	T1 V1O1E1R3	0,485±0,040	+	0,299±0,052	+
4	T1 V1O1E2R1	0,504±0,018	+	0,188±0,032	-
5	T1 V1O1E2R2	0,502±0,016	+	0,183±0,014	-
6	T1 V1O1E2R3	0,490±0,025	+	0,292±0,012	+
7	T1 V1O1E3R1	0,494±0,039	+	0,259±0,032	+
8	T1 V1O1E3R2	0,485±0,017	+	0,251±0,012	+
9	T1 V1O1E3R3	0,506±0,037	+	0,186±0,025	-
10	T1 V1O2E1R1	0,468±0,028	+	0,189±0,031	-
11	T1 V1O2E1R2	0,499±0,014	+	0,246±0,031	+
12	T1 V1O2E1R3	0,484±0,025	+	0,217±0,028	-
13	T1 V1O2E2R1	0,486±0,037	+	0,222±0,021	-
14	T1 V1O2E2R2	0,505±0,019	+	0,206±0,031	-
15	T1 V1O2E2R3	0,512±0,024	+	0,224±0,015	-
16	T1 V1O2E3R1	0,478±0,047	+	0,213±0,029	-
17	T1 V1O2E3R2	0,497±0,034	+	0,257±0,025	+
18	T1 V1O2E3R3	0,506±0,027	+	0,204±0,026	-
19	T1 V2O1E1R1	0,515±0,031	+	0,240±0,019	-
20	T1 V2O1E1R2	0,508±0,029	+	0,226±0,023	-
21	T1 V2O1E1R3	0,515±0,041	+	0,201±0,014	-
22	T1 V2O1E2R1	0,505±0,035	+	0,127±0,029	-
23	T1 V2O1E2R2	0,483±0,024	+	0,297±0,034	-

24	T1 V2O1E2R3	0,488±0,021	+	0,222±0,021	+
25	T1 V2O1E3R1	0,493±0,036	+	0,207±0,035	-
26	T1 V2O1E3R2	0,446±0,017	+	0,256±0,041	+
27	T1 V2O1E3R3	0,492±0,046	+	0,215±0,017	-
28	T1 V2O2E1R1	0,460±0,011	+	0,202±0,018	-
29	T1 V2O2E1R2	0,439±0,036	+	0,210±0,027	-
30	T1 V2O2E1R3	0,408±0,027	+	0,198±0,041	-
31	T1 V2O2E2R1	0,399±0,019	+	0,211±0,031	-
32	T1 V2O2E2R2	0,454±0,031	+	0,123±0,011	-
33	T1 V2O2E2R3	0,440±0,028	+	0,245±0,012	-
34	T1 V2O2E3R1	0,396±0,024	+	0,209±0,027	-
35	T1 V2O2E3R2	0,409±0,037	+	0,227±0,019	-
36	T1 V2O2E3R3	0,415±0,021	+	0,179±0,045	-
<b>Tampon de broyage</b>		<b>0,102</b>	<b>-</b>	<b>0,105</b>	<b>-</b>
<b>Témoin négatif 1</b>		<b>0,185±0,051</b>	<b>-</b>	<b>0,195±0,051</b>	<b>-</b>
<b>Témoin négatif 2</b>		<b>0,121±0,014</b>	<b>-</b>	<b>0,120±0,029</b>	<b>-</b>
<b>Témoin négatif 3</b>		<b>0,117±0,019</b>	<b>-</b>	<b>0,118±0,031</b>	<b>-</b>
<b>Témoin positif</b>		<b>0,585</b>	<b>+</b>	<b>0,598</b>	<b>+</b>

Valeurs en DO du CTV obtenues par la DAS-ELISA pour les échantillons ayant subi une thermothérapie

N° d'échantillon	Type d'échantillon	DO avant le traitement	Réaction	DO après le traitement	Réaction
1	T2 V1O1E1R1	0,461±0,023	+	0,251±0,008	-
2	T2 V1O1E1R2	0,395±0,037	+	0,189±0,021	-
3	T2 V1O1E1R3	0,448±0,028	+	0,221±0,015	-
4	T2 V1O1E2R1	0,499±0,017	+	0,283±0,036	+
5	T2 V1O1E2R2	0,397±0,034	+	0,206±0,025	-
6	T2 V1O1E2R3	0,359±0,025	+	0,274±0,032	+
7	T2 V1O1E3R1	0,366±0,045	+	0,222±0,024	-
8	T2 V1O1E3R2	0,521±0,019	+	0,217±0,031	-
9	T2 V1O1E3R3	0,544±0,024	+	0,284±0,014	+
10	T2 V1O2E1R1	0,434±0,026	+	0,207±0,021	-
11	T2 V1O2E1R2	0,533±0,038	+	0,249±0,010	-
12	T2 V1O2E1R3	0,502±0,029	+	0,325±0,008	+
13	T2 V1O2E2R1	0,432±0,031	+	0,156±0,014	-
14	T2 V1O2E2R2	0,445±0,016	+	0,239±0,013	-
15	T2 V1O2E2R3	0,417±0,023	+	0,224±0,021	-
16	T2 V1O2E3R1	0,409±0,038	+	0,245±0,013	-
17	T2 V1O2E3R2	0,386±0,016	+	0,282±0,027	+
18	T2 V1O2E3R3	0,506±0,021	+	0,273±0,035	+
19	T2 V2O1E1R1	0,381±0,027	+	0,207±0,041	-
20	T2 V2O1E1R2	0,368±0,036	+	0,128±0,032	-
21	T2 V2O1E1R3	0,395±0,047	+	0,113±0,051	-
22	T2 V2O1E2R1	0,453±0,013	+	0,117±0,036	-
23	T2 V2O1E2R2	0,415±0,029	+	0,116±0,025	-
24	T2 V2O1E2R3	0,386±0,012	+	0,179±0,041	-
25	T2 V2O1E3R1	0,447±0,024	+	0,190±0,029	-

26	T2 V2O1E3R2	0,519±0,032	+	0,188±0,026	-
27	T2 V2O1E3R3	0,515±0,026	+	0,211±0,012	-
28	T2 V2O2E1R1	0,488±0,015	+	0,123±0,054	-
29	T2 V2O2E1R2	0,408±0,032	+	0,127±0,046	-
30	T2 V2O2E1R3	0,377±0,041	+	0,158±0,023	-
31	T2 V2O2E2R1	0,386±0,039	+	0,125±0,039	-
32	T2 V2O2E2R2	0,399±0,028	+	0,202±0,027	-
33	T2 V2O2E2R3	0,431±0,034	+	0,141±0,031	-
34	T2 V2O2E3R1	0,487±0,041	+	0,190±0,009	-
35	T2 V2O2E3R2	0,472±0,036	+	0,201±0,021	-
36	T2 V1O2E3R3	0,452±0,027	+	0,127±0,043	-
<b>Tampon de broyage</b>		0,102		0,105	-
<b>Témoin négatif 1</b>		0,185±0,051	-	0,195±0,051	-
<b>Témoin négatif 2</b>		0,121±0,014	-	0,120±0,029	-
<b>Témoin négatif 3</b>		0,117±0,017	-	0,118±0,031	-
<b>Témoin positif</b>		0,585	+	0,598	+

Valeurs en DO du CTV obtenues par la DAS-ELISA pour les échantillons de la combinaison des deux moyens d'assainissement

N° d'échantillon	Type d'échantillon	DO avant le traitement	Réaction	DO après le traitement	Réaction
1	T3 V1O1E1R1	0,404±0,032	+	0,166±0,012	-
2	T3 V1O1E1R2	0,398±0,041	+	0,206±0,050	-
3	T3 V1O1E1R3	0,376±0,028	+	0,201±0,034	-
4	T3 V1O1E2R1	0,386±0,021	+	0,115±0,056	-
5	T3 V1O1E2R2	0,388±0,030	+	0,113±0,026	-
6	T3 V1O1E2R3	0,425±0,019	+	0,108±0,035	-
7	T3 V1O1E3R1	0,414±0,045	+	0,104±0,021	-
8	T3 V1O1E3R2	0,406±0,032	+	0,166±0,026	-
9	T3 V1O1E3R3	0,373±0,025	+	0,170±0,039	-
10	T3 V1O2E1R1	0,391±0,029	+	0,178±0,041	-
11	T3 V1O2E1R2	0,380±0,031	+	0,126±0,031	-
12	T3 V1O2E1R3	0,412±0,027	+	0,132±0,029	-
13	T3 V1O2E2R1	0,399±0,014	+	0,127±0,040	-
14	T3 V1O2E2R2	0,442±0,022	+	0,126±0,014	-
15	T3 V1O2E2R3	0,381±0,015	+	0,115±0,016	-
16	T3 V1O2E3R1	0,407±0,019	+	0,209±0,023	-
17	T3 V1O2E3R2	0,414±0,024	+	0,136±0,038	-
18	T3 V1O2E3R3	0,405±0,021	+	0,129±0,031	-
19	T3 V2O1E1R1	0,508±0,034	+	0,152±0,049	-
20	T3 V2O1E1R2	0,501±0,041	+	0,113±0,056	-
21	T3 V2O1E1R3	0,481±0,016	+	0,152±0,027	-
22	T3 V2O1E2R1	0,487±0,025	+	0,126±0,046	-
23	T3 V2O1E2R2	0,472±0,019	+	0,148±0,021	-
24	T3 V2O1E2R3	0,500±0,026	+	0,169±0,045	-
25	T3 V2O1E3R1	0,502±0,018	+	0,152±0,030	-
26	T3 V2O1E3R2	0,489±0,039	+	0,135±0,041	-

27	T3 V2O1E3R3	0,498±0,021	+	0,161±0,035	-
28	T3 V2O2E1R1	0,395±0,048	+	0,244±0,010	-
29	T3 V2O2E1R2	0,380±0,024	+	0,237±0,022	-
30	T3 V2O2E1R3	0,370±0,032	+	0,223±0,019	-
31	T3 V2O2E2R1	0,510±0,054	+	0,225±0,012	-
32	T3 V2O2E2R2	0,422±0,047	+	0,226±0,023	-
33	T3 V2O2E2R3	0,410±0,009	+	0,208±0,019	-
34	T3 V2O2E3R1	0,420±0,015	+	0,205±0,034	-
35	T3 V2O2E3R2	0,435±0,024	+	0,232±0,021	-
36	T3 V2O2E3R3	0,404±0,017	+	0,206±0,028	-
<b>Tampon de broyage</b>		<b>0,102</b>		<b>0,105</b>	<b>-</b>
<b>Témoin négatif 1</b>		<b>0,185±0,051</b>	<b>-</b>	<b>0,195±0,051</b>	<b>-</b>
<b>Témoin négatif 2</b>		<b>0,121±0,014</b>	<b>-</b>	<b>0,120±0,029</b>	<b>-</b>
<b>Témoin négatif 3</b>		<b>0,117±0,017</b>	<b>-</b>	<b>0,118±0,031</b>	<b>-</b>
<b>Témoin positif</b>		<b>0,585</b>	<b>+</b>	<b>0,598</b>	<b>+</b>