

Institut National Agronomique - Alger
Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Sciences Agronomiques
Département de Botanique
Spécialité : Phytopathologie

***Recherche de maladies à phtoplasmes
sur rosacées fruitières dans la région du
centre Algérien***

Présentée par
Mlle MATALLAH Hafidha
Directeur M^{me}. LOUANCHI M. Maître de conférence
Co-directeur M^{me}. AITOUADA M. Chargée de cours
Soutenu le 10/03/2008

Devant le jury composé de : Président M. GUEZLANE A. Maître de conférence Examineurs M.
BOUZNAD Z. Professeur M. Mohamed Tahar SABOU NE. Professeur

Table des matières

REMERCIEMENTS . .	5
Résumé . .	6
Abstract . .	7
ص خ لم . .	8
LISTE DES ABREVIATIONS . .	9
INTRODUCTION . .	11
I- DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES . .	13
I.1- Quelques données sur la culture des rosacées fruitières en Algérie . .	13
I.1.1- Surface et production . .	13
I.1.2- Problèmes phytosanitaires . .	13
I.2 -Les phytoplasmes . .	14
I.2.1-Propriétés des Phytoplasmes . .	15
I.2.2- Propagation dans la nature . .	16
I.3- Taxonomie . .	19
I.4 -Les phytoplasmoses affectant les rosacées fruitières . .	21
I.4.1- La prolifération du pommier, Apple prolifération Phytoplasma . .	21
I.4.2- Le dépérissement du poirier ou Pear décline phytoplasma . .	21
I.4.3- Les jaunisses européennes des fruits à noyau ou European stone fruit yellows, (ESFY) . .	22
I.5- Les méthodes de lutte . .	23
I.5.1-Sélection sanitaire, surveillance du matériel de départ : Pieds-mères . .	23
I.5.2-Élagage de plantes malades . .	24
I.5.3-Élimination des plantes-hôtes réservoirs . .	24
I.5.4-Surveillance de l'activité des vecteurs . .	24
I.5.5-Thermothérapie . .	24
I.5.6-Prémunition . .	25
I.5.7-Recherche de variétés résistantes ou tolérantes par sélection classique . .	25
I. 6-Identification . .	26
I.6.1- Méthodes biologiques . .	26
I.6.2- Méthodes histologiques . .	26
I.6.3 -Méthodes sérologiques . .	26
I.6.4-Méthodes moléculaires . .	27
II- MATERIEL ET METHODES . .	30
II.1- Matériel végétal . .	30
II.1.1- Zones de récolte des échantillons . .	30
II.1.2- Espèces végétales . .	30
II.1.3- Préparation des échantillons et conservation . .	30
II.2- Observation des symptômes . .	30
II.3 – Diagnostic moléculaire . .	31
II.3.1– Extraction des ADN Ahrens et Seemüller (1992) . .	31
II.3.2- Electrophorèse des ADN sur gel d'agarose en gradient de concentration . .	31

II.3.3- La Polymerase Chain Reaction (PCR) . .	32
II.4 - Diagnostic histologique utilisant le DAPI . .	33
II.4.1-Réalisation des coupes (Planche1) . .	34
II.4.2-Observation au microscope . .	34
III- RESULTATS ET DISCUSSIONS . .	37
III.1- Symptômes observés aux champs . .	37
III.2- Diagnostic moléculaire . .	41
III.2.1- Electrophorèse des ADN sur gel d'agarose en gradient de concentration . .	41
III.2.2- Résultats de la PCR . .	43
III.3- Observations en microscopie photonique en lumière fluorescente . .	43
CONCLUSION GENERALE . .	47
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . .	48
Annexe produits chimiques . .	54

REMERCIEMENTS

Ce document représente l'aboutissement d'un travail qui n'aurait pas pu s'accomplir sans la contribution de nombreuses personnes.

Tout d'abord, je tiens à exprimer mes remerciements, ma gratitude et mon respect les plus profonds à Mme Aitouada. M. pour toute son implication, son dévouement, sa présence et surtout sa confiance sans lesquels ce travail n'aurait jamais vu le jour

Mes remerciements et ma reconnaissance s'adressent aussi à Mme Louanchi.M pour sa disponibilité et ses efforts à tout mettre en œuvre pour faciliter le déroulement de ce travail.

Je remercie également M. Guezlane A. pour avoir bien voulu présider l'examen de ce travail.

Je tiens aussi à exprimer par ce présent document, mes remerciements à M. Belarbi B. pour avoir bien voulu examiner ce travail .

C'est avec un très grand honneur que l'on reçoit parmi nos examinateurs quelqu'un que sa réputation a précédé : M. Sabaou N.E. L'occasion m'est donc donnée de lui exprimer tous mes remerciements pour le temps qu'il nous consacre.

La coopération et l'aide de nombreuses institutions ont été pertinentes pour l'aboutissement de ce travail, c'est pourquoi, je tiens à exprimer toute ma considération et ma reconnaissance à :

L'Institut Technique d'Arboriculture Fruitière : M. le directeur général, M. Saraoui, M. Aouan, Mme Guezli, M. Haddad. Pour nous avoir ouvert les portes de leurs vergers et nous avoir guidés avec une grande patience tout au long de nos prospections.

Le Département de Biologie Appliquée à la Défense des Plantes Université d'Udine : M. Fiarro. G et Mlle Rekab. D. pour nous avoir fournis le matériel nécessaire et pour toute leur aide et précieux conseils.

L'Institut National de Recherche Agronomique : Mme Abed.F, M .Amara.B. pour nous avoir permis et aidé à réaliser une étape importante du travail.

L'Institut National de Médecine Vétérinaire : M. Djerbal, Mme Abba pour leur chaleureux accueil au sein de leur institut ainsi que toute leur aide.

Mes remerciements vont aussi à :

Mon père sans qui le travail n'aurait jamais pu débuter.

Yanis pour avoir toujours été à mes côtés.

M. Bouznad. Z. pour nous avoir permis d'accéder au laboratoire de biologie moléculaire.

Mlle Bouregda pour sa disponibilité et son soutien.

Mlle Benslimane.H pour l'aide précieuse qu'elle nous a apporté. Fatima pour sa contribution à la réalisation de ce travail.

Mme Chahed pour ses précieux conseils.

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Une étude a été entreprise dans le but de rechercher la présence de maladies à phytoplasmes pouvant toucher les rosacées fruitières du pays, cette dernière a porté sur deux points essentiels.

- Le premier consiste en une recherche de symptômes rappelant des phytoplasmoses sur les rosacées fruitières dans les stations de l'Institut technique de l'arboriculture fruitière (ITAF), ainsi que dans quelques vergers privés.

-Le second point concerne la détection des agents par utilisation de méthodes microscopiques et moléculaires.

Mot clé : Phytoplasmes ; Arbres fruitiers ; Microscopie photonique ; Polymerase Chain Reaction.

Abstract

A study was undertaken in order to search Phytoplasma diseases which can affect fruits trees. This study consists on two essential points:

- The first point is to look for symptoms reminding of phytoplasma of fruit trees situated in the Technical Institute of Fruit Trees and some private orchards.
- The second point is to find out the causal agent by using microscopic and molecular methods

Key words: Phytoplasma ; fruit trees ; photonic microscopy ; Polymerase Chain Reaction

ص خ لم

أجريت دراسة من أجل البحث عن أمراض "فيقولاسما" التي تضر الأشجار المثمرة الموجودة على مستوى البلاد . تم إنجاز هذه الأخيرة بإنتاج مرحلتين أساسيتين وهما
البحث عن أعراض التي تشبه أمراض الفيوتوبلازم التي تصيب الأشجار الموجودة على مستوى المعهد التقني للأشجار المثمرة و بعض الطفرات الخاصة.
- التعرف على السبب المحتمل طرق ميكروسكوبية و موليكولارية
كلمات مفتاح فيقولاسما أشجار مثمرة

LISTE DES ABREVIATIONS

ITAF : Institut Technique des Arbres Fruitiers.

MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural.

PDV: Prunue Dwarf Virus

PNRSV: Prunus Necrotic Ring Spot Virus

PPV: Plum Pox Virus.

ACLSV: Apple chlorotic leaf spot virus

AlmWB: Almond witch Broom Phytoplasma.

AP: Apple Proliferation.

AY: Aster Yellow.

ESFY: European Stone Fruit Yellow.

PD: Pear Decline.

APS: Ammonium Persulfat.

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide.

DAPI: 4'-6 diamidino-2 phénylindole-2 HCl.

EDTA: Ethylene Diamin tetra Acetic Acid

FAA: Formalin - Aceto- Alcool.

PG: Phytoplasma Grinding

PVP: Poly Vinyl Pyrrolidone.

SDS: Sodium diéthylthiocarbamate.

TBE: Tris Borate- EDTA

TE: Tris -EDTA.

% : Pourcent.

° : Degrés.

°C: Degrés Celsius.

µg : Micro gramme

µl: Microlitres

µm: Micro mètre.

Atm: Atmosphère.

Da : Dalton.

g: Gramme.

Kpb: Kilo paires de Bases.

M : Molaire.

ml : Millilitres.

cm :centimètre.

nm: Nano mètre.

Pb : Paires de Bases.

V : Volt.

UV : Ultras Violet.

ADN:Acide désoxyribonucléique

ARN:Acide ribonucléique.

ARNr: Acide ribonucléique ribosomal .

dNTP: Deoxyribonucleoside Triphosphate.

A :Adénine.

C : Cytosine.

G : Guanine.

T :Thymine.

ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay

PAUP : Phylogenetic Analysis Using Parcimony

PCR : Polymerase Chain Reaction.

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

E.coli : Echirichia coli.

MLO : Mycoplasma like Organisms.

INTRODUCTION

Les phytoplasmes sont une autre catégorie d'agents pathogènes inducteurs de maladies de type jaunisse chez les végétaux. Du fait de la similitude de certaines de leurs caractéristiques avec les virus persistants (échec de la transmission mécanique, transmission possible par vecteur, greffage et cuscute, symptômes de jaunissement), ils ont pendant longtemps été assimilés à ces derniers.

Ce n'est qu'en 1967, qu'une équipe de chercheurs japonais (Doi et *al.*, 1967) par des observations en microscopie électronique de tissus infectés de plantes atteintes de jaunisses, suggère que ce type d'infection est probablement due à des agents pathogènes du même type que les mycoplasmes rencontrés dans de nombreuses affections chez les animaux et appartenant à la famille des mollicutes. Ils leur donnèrent l'appellation de « Mycoplasma-Like Organisms » (MLO). De plus, la présence d'un ADN anormal dans les tubes criblés des plantes atteintes de jaunisses et l'incapacité des chercheurs à purifier ces agents pathogènes par les méthodes classiques appliquées aux virus, les ont orientés vers la recherche d'autres micro-organismes à localisation phloémique (Cousin et Boudon-Padiou., 2001).

Enfin, avec l'avènement de la biologie moléculaire, l'acide nucléique des agents de jaunisses a pu être comparé avec celui des mycoplasmes et des bactéries à paroi, ce qui a permis de révéler un caractère unique aux phytoplasmes et a incité le comité international de taxonomie des mollicutes, en juillet 1994, à remplacer l'appellation « Mycoplasma-like Organisms » par le terme « Phytoplasma ». (Lee et *al.*, 2000).

Depuis lors, la liste des maladies liées aux phytoplasmes ne cesse de s'allonger, et les pertes engendrées de s'alourdir. Les phytoplasmes sont devenus depuis une décennie le premier facteur limitant de la production de certaines espèces végétales, et figurent en bonne place sur la liste des organismes de quarantaine.

Parmi les phytoplasmoses, celles touchant les espèces pérennes, sont les plus à craindre du fait que les pertes engendrées ont une grande importance économique. Cette importance économique englobe non seulement les investissements à long terme que demandent ces espèces, mais aussi le coût de l'arrachage et du remplacement en cas de présence de maladies incurables.

À titre d'exemple, la maladie du balai de sorcière de l'amandier (AlmWB), une maladie létale causée par un phytoplasme, s'est rapidement répandue au Liban, tuant une centaine de milliers d'arbres en 10 ans (Abou-Jawdah, et *al.*, 2003). Le jaunissement létal du palmier a entraîné près de 83% de pertes sur cocotier en Floride, et entre 95-99 % en Jamaïque (Harrison et Elliott., 2007). L'émergence de symptômes rappelant ce type d'affections sur plusieurs espèces cultivées, à travers le monde et dans les pays du pourtour méditerranéen (Choueiri et *al.*, 2002 ; Myrta et *al.*, 2003 ; Carraro et *al.*, 1998) l'importance des dégâts occasionnés, ont poussé les chercheurs à s'y intéresser. De plus, les avancées de la biologie moléculaire en matière de diagnostic ont permis, l'identification précise de ces agents, de leurs vecteurs et la mise au point de méthodes de lutte plus adéquates pour limiter leur extension.

Du fait de la dangerosité des Phytoplasmoses et de la présence de symptômes similaires à ceux qui sont décrits sur rosacées fruitières, dans certaines plantations du pays, nous avons pensé à entreprendre des recherches dans ce sens.

Cette étude, qui se situe dans le cadre global des recherches sur les maladies des arbres fruitiers, va porter sur deux points :

Le premier point concerne la recherche de symptômes rappelant des phytoplasmoses sur les rosacées fruitières dans les stations de l'Institut technique de l'arboriculture fruitière (ITAF), ainsi que dans quelques vergers privés.

Le second point concerne, lui, la détection des agents par utilisation de méthodes microscopiques et moléculaires.

I- DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I.1- Quelques données sur la culture des rosacées fruitières en Algérie

I.1.1- Surface et production

En Algérie, les cultures fruitières occupent 810 193 ha et sont essentiellement représentées par les espèces à noyaux et à pépins (34.6 %), l'olivier (32.5 %), le palmier (19.1 %), les agrumes (7.8 %), le figuier (6.1 %) (MADR., 2006). La superficie consacrée aux espèces à noyaux et à pépins est de 280 387 hectares, et est répartie entre plusieurs espèces, l'abricotier, le néflier, le pêcher, le poirier et le pommier.

Malgré l'importance qu'accorde l'Algérie à l'arboriculture fruitière de par les superficies qui lui sont consacrées et les différentes subventions de l'État, les rendements restent insuffisants et la demande non satisfaite. Cet état de fait est lié à un certain nombre de problèmes notamment l'instabilité climatique induisant des perturbations physiologiques, les carences nutritionnelles dues aux conditions pédologiques défavorables, ou encore les contraintes phytosanitaires de diverses origines.

I.1.2- Problèmes phytosanitaires

Les maladies rencontrées, sur arbres fruitiers sont d'origines diverses, et peuvent être dues à différents types d'organismes ; champignons, bactéries, phytoplasmes, virus, nématodes, ou viroïdes (tableau 1). Néanmoins, certains pathogènes peuvent provoquer plus de pertes économiques sur arbres fruitiers que d'autres surtout lorsqu'il s'agit de maladies pour lesquelles aucun traitement chimique n'est à l'heure actuelle mis au point, telles celles dues aux virus ou aux phytoplasmes et vis-à-vis desquelles l'agriculteur n'a pas d'autre choix que celui d'arracher et de brûler.

En Algérie, les problèmes phytosanitaires des arbres fruitiers ont déjà fait l'objet de plusieurs études, et notamment les viroses. En effet, Belhadj en 1990 identifie le Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) sur pêcher et abricotier au centre et à l'est du pays. Boussalem (1992), au niveau de la région centre, met en évidence sur pêcher et abricotier le Plum Pox Virus (PPV), le Prune Dwarf Virus (PDV), et le Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV). En 2003, l'équipe de l'ITAF, dans une enquête réalisée à travers les régions centre, est et ouest du pays détecte le PNRSV et le PDV sur pêcher et ACLSV sur abricotier (Aouan., 2003).

	Nom(s) français	Nom(s) Latin(s)	Nom(s) anglais	Mot(s) principal (aux)
Virus	Galle du bois, cicatris du bois, émission des feuilles du Citrus	Genre <i>Luteovirus</i>	Citrus vein mottling virus, woody gall	Citrus.
	Taches annulaires du fraiser	Genre <i>Aspovirus</i>	Strawberry latent ringpot virus (SLRSV)	Arbres fruitiers à noyaux, principalement du genre <i>Prunus</i> .
	Taches annulaires du framboisier	Genre <i>Aspovirus</i>	Raspberry ringpot virus (RpRSV)	cerisier, vigne.
	Tristeza	Genre <i>Closterovirus</i>	Citrus Tristeza Virus	Epicé, ciliatras et lythales de Citrus et certains genres appartenés aux agurmes tels que <i>Aglypsis</i> , <i>Afanga</i> , <i>Fennouille</i> et <i>Fambouras</i> .
	Virus des anneaux noirs de la tomate	Genre <i>Aspovirus</i>	Tomato black ring virus (TRBV)	Dicotylédones, monocotylédones herbacées et ligneuses, vigne, arbres fruitiers, pois froids, arêtes florissantes et arbores.
	Fluorescence soignée		Orpette fluorescence dorée	Vigne.
Phytoplasmes	Phytoplasme de la profloraison du pommar		Apple proliferation phytoplasma	Pommiers dont particulièrement les variétés Belle de Boskoop, Genesius, Starkspur Golden Delicious, Winter Banana, Reinette du Canada et Reinette du Mars.
	Phytoplasme de l'enroulement chlorotique de l'abricotier (PCA)		European stone fruit yellow phytoplasma (ECSF)	Abricotier, pêcher, prunier et prunier japonais.
	Phytoplasme du dépérissement du cocher		Pear decline	Pommier (<i>Pyrus</i>) et cognassier.
	Phytoplasme du stobur de la vigne Stubborn	<i>Spizovskia citri</i>	Orpette Stubborn disease	Vigne, Citrus.
Bactéries	Désordre bactérien bactérien du pêcher (Maldie du feu saurage)	<i>Pseudomonas syzygiae</i> , <i>peroviae</i>	Bacterial blight, spot, peach tree, wild fire	Pêcher.
	Echaboures du noyau	<i>Xanthomonas axonopoda</i>	Bacterial spot of stone fruits	Arbres fruitiers à noyaux, prunier, prunier japonais, pêcher, abricotier.
	Feu bactérien	<i>Brevia amylovora</i>	Fire blight of pear	Arbres fruitiers à pépins (principalement le pommier).
	Nécrose bactérienne de la vigne	<i>Xylella ampelae</i>	Orpette bacterial necrosis	Vigne.
Champignons	Bûche des rambeaux des arbres fruitiers	<i>Adonia/Puccinia</i>	Brown rot of fruit tree	Arbres à noyaux et arbres à pépins.
	Désordre de la vigne	<i>Phoma radicum</i> , <i>Phoma</i>	Mal secco	Agurmes.
	Euphrosie de la vigne, dépérissement du groviller	<i>Botrytis</i>	Botrytis rot, grapevine dieback	Vigne.
	Maldie du pommier paratatale (des arbres fruitiers)	<i>Sorbus pyramidalis</i>	Tree collar leaf of fruit trees	Arbres fruitiers.
Nématodes	Arrosage miteuse du bananier	<i>Rhizoglyphis similis</i>	Nematode root rot, Black head disease of banana	Banancier, agurmes.

Tableau 1 : Les principales maladies de quarantaine touchant les arbres fruitiers (OEPP., 1999)

I.2 -Les phytoplasmes

Les phytoplasmes sont des organismes de la classe des Mollicutes (de mollis = molle, souple) et qui ont comme principales caractéristiques :

- L'absence de paroi (acide nucléique entouré par une simple membrane).
- Une forte sensibilité aux variations de pression osmotique, d'où leur localisation presque exclusive dans la sève des tubes criblés dont la pression osmotique atteint 10 à 12 atmosphères (Cousin et Boudon-Padieu., 2001).
- L'impossibilité de les cultiver in vitro ce qui rend leur étude très difficile.

I.2.1-Propriétés des Phytoplasmes

I.2.1.1-Propriétés physico –chimiques des Phytoplasmes

Les phytoplasmes se présentent sous forme de corps « pleimorphiques, de morphologie ovoïde, filamenteuse, en Y, ou haltères, mais jamais spiralée, capables de franchir les cribles des tubes criblés (figure 1).

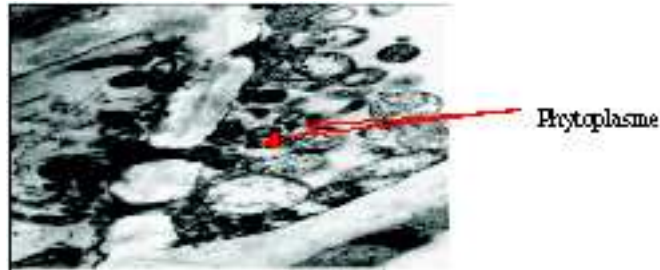


Figure 1 : Ultrastructure des phytoplasmes. Phytoplasmes polymorphes. Déformation de certains d'entre eux qui franchissent les cribles de la paroi du tube criblé. À gauche, fibres de protéine P (protéine caractéristique du phloème) (Cousin et Boudon-Padieu., 2001).

Ce polymorphisme est particulièrement visible sur coupes épaisses, atteignant un micron d'épaisseur, observées en microscopie électronique à transmission ou en balayage. Leur taille varie de 100 nm(au microscope électronique) à plus d'un micron (en balayage) (Lee et *al.*, en 2000 ; De La Rue et *al.* , 2003).

L'observation de coupes ultrafines de plantes infectées par les phytoplasmes révèle que ces derniers sont limités par une membrane à trois feuillets (deux feuillets denses aux électrons entourant un feuillet clair), à l'intérieur de laquelle on distingue des filaments d'ADN ainsi que des ribosomes de taille différente de ceux de la plante hôte (Cousin et Boudon-Padieu., 2001)

L'incapacité de cultiver les phytoplasmes « in vitro » rend l'étude de leurs propriétés physico –chimiques difficile. Néanmoins, les phytoplasmes sont connus pour être sensibles aux variations de pression osmotique qui doit être située entre 10 et 12 atmosphères.

L'absence de paroi chez les phytoplasmes explique que ces micro-organismes soient sensibles aux antibiotiques du groupe des tétracyclines qui agissent sur la synthèse protéique, mais résistants aux pénicillines qui agissent sur la paroi bactérienne.

I.2.1.2- Propriétés moléculaires

I.2.1.2.1-L'ADN ribosomique des phytoplasmes

L'étude de l'ADN ribosomique (gène de l'ARNr) (fraction 16 S et espaceur situé entre les fractions 16 S et 23S), montre un caractère unique aux phytoplasmes, l'espaceur contient un seul ARNt isoleucine, contrairement aux mycoplasmes *stricto sensu* qui en sont dépourvus ou aux spiroplasmes et aux bactéries à paroi où l'on observe une diversité de l'ARNt dans deux ou trois espaceurs différents. De plus, chez les phytoplasmes, le codon UGA fonctionne comme codon d'arrêt, comme chez les bactéries à paroi et les acholéplasmes, contrairement aux spiroplasmes qui ont un codon UGA correspondant au tryptophane (Cousin et Boudon-Padieu., 2001).

Récemment, et grâce aux techniques d'électrophorèse en champ pulsé, on a pu séparer le chromosome entier de certains phytoplasmes, agents de dépérissement chez des espèces ligneuses. La taille du chromosome ne dépasse pas 600 kpb, et serait la plus petite actuellement connue parmi les organismes pouvant se répliquer de façon autonome.

Fraction 16S de L'ARNr

Elle contient 1536 paires de bases, elle débute de la base 271733 et se termine à la base 273268. (Bai et *al.*, 2006)

Espaceur 16S-23S

Il comprend 239 paires de bases (de 273269 à 273510) constituées de:

- Un espaceur inter génique transcrit (ITS1) contenant 102 paires de bases (de 273269 à 273370) (Bai et *al.*, 2006).

- Un ARNt isoleucine (Ile ARNt) contenant 77 paires de bases (de 273371 à 273447) (Bai et *al.*, 2006).

- Un espaceur inter génique transcrit (ITS2) contenant 63 paires de bases (de 273448 à 273510) (Bai et *al.*, 2006).

Fraction 23S de L'ARNr

Elle est constituée de 2868 paires de bases débutant de la base 273510 jusqu'à 276378 (Bai et *al.*, 2006).

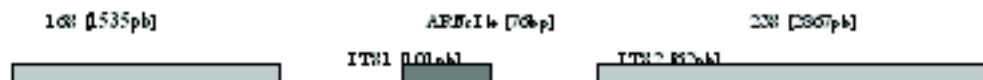


Figure 2: Schéma représentant de la sous-unité ribosomique des phytoplasmes (Bai et *al.*, 2006).

1.2.1.2.2- Evolution

Selon Lee et *al.* (2000), la réduction de la taille génomique et la divergence de la complexité génomique pourraient résulter d'une perte de gènes durant l'évolution. Ainsi dans le cas de l'agent de la jaunisse de la reine-marguerite (*aster yellow*, AY), le génome mesure 1 200 kpb et est constitué de deux chromosomes ayant un grand nombre de séquences en commun. Au cours de l'évolution, seul un chromosome aurait subsisté chez les agents du dépérissement des ligneux (Cousin et Boudon-Padieu., 2001). Cette perte de gène concernerait, selon ces mêmes auteurs, les gènes codant pour la synthèse des précurseurs de certaines macromolécules comme les composants de la paroi cellulaire, les acides aminés, les vitamines et les longues chaînes d'acides gras. Les principaux caractères distinctifs entre phytoplasmes, Spiroplasma, Mycoplasma et *E.coli*, sont donnés dans le tableau 2.

- :Absence ,+ :Présence

1.2.2- Propagation dans la nature

La propagation des phytoplasmes dans la nature est essentiellement liée à la présence d'insectes vecteurs et à la multiplication végétative du matériel.

1.2.2.1- La transmission par vecteurs

Les phytoplasmes sont véhiculés par des insectes piqueurs-suceurs de l'ordre des Hémiptères (Figure 2) qui prélèvent la sève dans les tubes criblés du liber et notamment les cicadelles ou *leafhoppers* (en particulier *Jassidae*), les Fulgoromorphes, *planthoppers* (en particulier *Cixiidae*) et les *Psyllidae* (psylles) (Maixner.,1994 ;Campbell et al.,1995 ; Cousin et Boudon-Padieu., 2002).

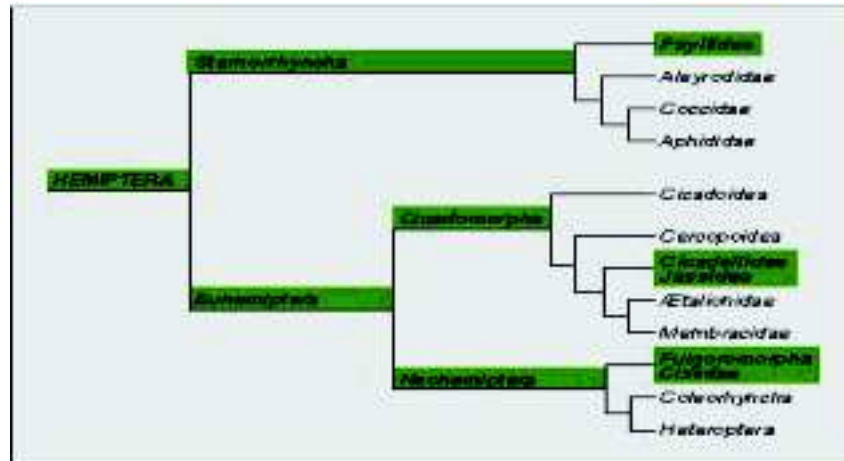


Figure 3 : Phylogénie des Hemiptera (Campbell et al., 1995).

Les vecteurs de phytoplasmes sont signalés en vert

I.2.2.1.1-Les principaux groupes de vecteurs

La majorité des vecteurs de phytoplasmes actuellement identifiés appartient au groupe des Jassides. Le rôle de certains d'entre eux dans la transmission des maladies de type, jaunisse a été mis en évidence depuis longtemps. Ainsi par exemple, dès 1952, la multiplication de l'agent pathogène de la « jaunisse de l'aster » était signalée à la fois chez la plante et son vecteur *Macrostelus fascifrons* (Maramoroschs., 1952). Il en est de même pour *Scaphoideus titanus* (*S. littoralis*) mentionné comme vecteur de la « flavescence dorée » de la vigne en France vers les années 60 (Schvester et al.,1962).

Certains « cixiides » sont vecteurs de maladies à phytoplasmes, *Hyalesthes obsoletus* Sign, a été décrit, par Suchov et al. dès 1948 comme vecteur du « stolbur » des solanacées et est présent autour du bassin méditerranéen, en Allemagne et en Alsace. En 1968, il a été identifié dans le Midi de la France comme vecteur des phytoplasmes du groupe « stolbur » responsables, chez la vigne du « bois noir » et chez la lavande et le lavandin du « dépérissement jaune » (Leclant et Lacok.,1969 ; Sforza et al.,1998) . Récemment, un cixiide appartenant au genre *Pentastiridius* a été décrit en France sur la betterave, où il transmet le « syndrome des basses richesses » (SBR), maladie associée à un phytoplasme du groupe « stolbur » (Gatineau et al., 2001)

Dès 1964, le rôle des psylles dans la transmission du « dépérissement du poirier, *pear decline* » (PD), est mentionné et ceci alors que la maladie était considérée comme étant d'origine virale (Jensen et al .,1964). *Cacopsylla pyri* a été identifiée en France (Lemoine et al .,1991), le *C. pyricola* a été identifié en Angleterre (Davies.,1992) comme vecteurs de cette maladie. En 1998,*C. pruni* est reconnu vecteur de la « jaunisse européenne des fruits à noyau, *European stone fruit yellows* » (ESFY) (Carraro, et al.,1998), puis en 1999, et en 2000 les rôles respectifs de *C. melanoneura* et *C. costalis* dans la transmission de la « prolifération du pommier » en Italie, sont mis en évidence (Alma, et al.,1999 ; Frisinghelli et al., 2000).

1.2.2.1.2-Cycle de l'infection

Le schéma général du cycle des phytoplasmes dans l'insecte et dans la plante a été proposé à la suite d'observations réalisées en microscopie électronique au cours de la transmission des phytoplasmes d'*Euscelis lineolatus* à la plante hôte par Lherminier et al., (1990). Ces derniers révèlent que le phytoplasme est transporté de la lumière aux cellules du tube digestif, puis de l'hémolymphe vers les glandes salivaires pour atteindre la salive à partir de laquelle ils seront transmis à la plante par le biais du canal salivaire et acquis de la plante par le canal alimentaire (Cousin et Boudon-Padieu., 2002)

Au niveau de la plante, les phytoplasmes sont toujours « intracellulaires » car localisés à l'intérieur des parois de la cellule hôte mais alternativement « extra cytoplasmiques », dans la sève des tubes criblés adultes dont le cytoplasme a disparu, et « intra cytoplasmiques », dans les cellules des jeunes tubes criblés non différenciés. De même, chez l'insecte, ils sont « extra cytoplasmiques » dans l'hémolymphe, la lumière de l'intestin moyen et la salive et « intra cytoplasmiques » dans les cellules du tube digestif, des glandes salivaires et d'autres cellules de l'insecte (Fletcher ., 1999). (Figures 3 et 4).

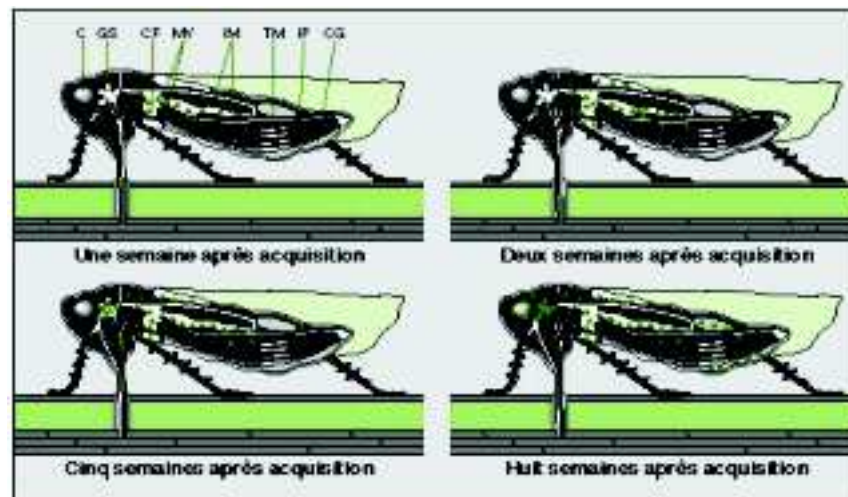


Figure 4 : Trajet des phytoplasmes à l'intérieur d'un insecte-vecteur au cours des semaines suivant le repas d'acquisition (Lefol et al., 1994). C : cerveau ; GS : glandes salivaires ; CF : chambre filtrante ; MY : mycétome ; IM : intestin moyen ; TM : tubes de Malpighi ; IP : intestin postérieur ; CG : corps gras. (Phytoplasmes figurés en vert.)

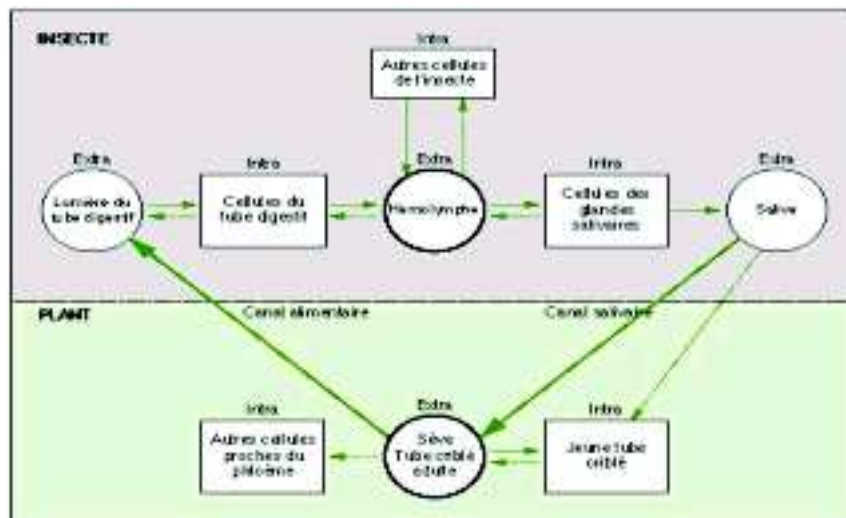


Figure 5 : Passage des phytoplasmes de la plante à l'insecte et inversement (Maillet et Gouranton ., 1971).

I.2.2.2- La transmission par le matériel végétal contaminé.

Le matériel végétal, issu de la multiplication végétative de plantes infectées, peut au cours de pratiques culturales, tel le bouturage ou le greffage, propager les phytoplasmes. Ceci est particulièrement dangereux dans le cas de la production des plantes ligneuses. Le bouturage de scions à partir de pieds-mères infectés est responsable de la propagation de multiples maladies à phytoplasmes notamment celle de la flavescence dorée de la vigne. Cette propagation est insidieuse lorsque la prise de bouture est faite sur des pieds-mères contaminés l'année précédente et qui ne montrent pas encore de symptômes ou des pieds-mères de porte-greffes tolérants infectés (Caudwell et *al.*, 1994). Lorsque les greffes sont effectuées à partir de matériel (porte-greffe ou greffon) contaminé, le matériel greffé peut dépérir rapidement, ou paraître sain pendant plusieurs saisons avant de présenter des symptômes de la maladie. Ce dernier cas s'avère particulièrement dangereux si le matériel a été expédié dans des zones où la maladie n'existe pas, mais où le vecteur potentiel est présent (Boudon-Padieu et *al.*, 1999).

I.3- Taxonomie

En 1980, Woese développe de nouvelles procédures permettant l'étude de la fraction 16 S de l'ADNr des phytoplasmes et la détermination de leur position taxonomique parmi les mollicutes. Il suggéra alors que les mollicutes dériveraient d'une lignée ancestrale de bactéries à gram + (Woese et *al.*, 1980).

En comparant les fractions 16 S de l'ADNr des différents membres des mollicutes, Weisburg indiqua que cette bactérie ancestrale était de la lignée des *Lactobacillus* dont le génome contient une faible fraction de guanine plus cytosine (G+C). Ils identifièrent ainsi quatre groupes distincts appartenant aux mollicutes : *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Spiroplasma* et *Anaeroplasmatales*. Le groupe des *Anaeroplasmatales* contient deux ordres : les *Anaeroplasmatales* et les *Acholeplasmatales* (Weisburg et *al.*, 1982).

En 1989 Lins et Sears firent la comparaison de la séquence génétique de la fraction 16 S de l'ADN r des MLO avec celles des *Acholeplasma* et des Mycoplasmes animaux, ils remarquèrent que les MLO étaient étroitement liés aux *Acholeplasma*. Cette découverte inspira beaucoup d'autres recherches sur les MLO (Lins et Sears., 1989) .

La confirmation de ces résultats a été faite quelques années plus tard avec l'étude de l'ADN ribosomique (fraction 16 S et espaceur 16 S/23S). En effet, le clonage et le séquençage de l'ADN r16 S de phytoplasmes et de bactéries classiques ont montré, en utilisant la méthode cladistique ou de parcimonie qui consiste à comparer des séquences entières, base à base et à établir l'arbre phylogénétique avec le logiciel PAUP (*Phylogenetic Analysis Using Parsimony*), que les phytoplasmes dérivent de *Bacillus subtilis* (bactérie gram⁺). Les résultats obtenus montrent que les phytoplasmes sont plus proches, phylogénétiquement, des *Acholeplasma* et des *Anaeroplasmataceae*, que des mycoplasmes animaux et des spiroplasmes. Tous possèdent *Bacillus subtilis* comme ancêtre commun. Les résultats obtenus à partir de l'espaceur 16 S/23S ont précisé la position phylogénétique des phytoplasmes (figure5).

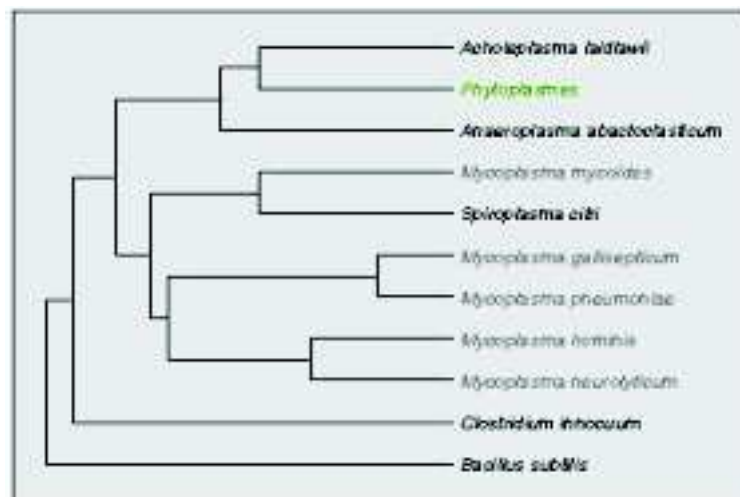


Figure 6 : Situation des *Phytoplasmes* parmi les mollicutes et deux bactéries classiques (arbre phylogénétique établis à partir de la fraction 16 S de l'ADN ribosomique) (Cousin et Boudon-Padieu., 2001).

La classification des phytoplasmes, quant à elle, a souvent été changée en fonction de l'évolution des techniques mises en œuvre pour l'étude de ces derniers. Néanmoins les derniers changements ont été établis en 2006 et c'est à partir de cette année que le nom du genre *Phytoplasma* a été définitivement révisé pour laisser place au statut de *Candidatus* (Anonyme., 2006).

La place des *Phytoplasmes* dans la taxonomie est donc la suivante :

Règne : Bacteria.

Division : Firmicutes.

Classe : Mollicutes.

Ordre : *Acholeplasmatales*.

Famille : *Acholeplasmataceae*.

Genre : *Candidatus phytoplasma*.

Espèce : Candidatus phytoplasma sp.

I.4 -Les phytoplasmoses affectant les rosacées fruitières

En se basant sur le séquençage de la fraction 16S de l'ARN par RFLP, 15 groupes, caractérisés par des propriétés biologiques, phytopathologiques et génétiques qui leur sont propres, ont été établis (Tableau 3).

En régions tempérées, les maladies à phytoplasmes des arbres fruitiers appartiennent à deux groupes principaux phylogénétiquement distincts, celui des X diseases, et celui de l'Apple proliferation (Anonyme., 2006).

Le premier groupe rassemble Castern X—disease et Western X-disease qui présentent des symptômes légèrement différents mais sont actuellement considérés comme deux souches du même pathogène, le Peach X -disease phytoplasma, qui n'est présent qu'en Amérique du Nord (OEPP/CABI.,1996).

Le second se rapporte aux agents de la prolifération du pommier, du dépérissement du poirier (*Pear decline*, PD), des jaunisses européennes des fruits à noyaux (*European stone fruit yellows*, ESFY) qui affectent l'abricotier, le pêcher, l'amandier, le prunier européen et japonais (Seemüller., 1999).

I.4.1- La prolifération du pommier, Apple prolifération Phytoplasma

Cette maladie est présente dans les pays de l'Union Européenne, et probablement en Inde et en Afrique du sud. Elle affecte le pommier dont plusieurs variétés se sont montrées très sensibles. La transmission de la maladie se fait par greffage de pommier à pommier (écussonnage et autres pratiques) et par fusion des racines (Anonyme., 2006).

Les symptômes extériorisés par les arbres infectés sont la baisse de la vigueur, l'apparition de zones nécrotiques sur le tronc et les branches, des racines fines et dont l'écorce se colore en brun rougeâtre, des feuilles petites et chlorosées ou rougeâtres, des stipules anormalement longues et une défoliation prématurée (Anonyme., 2006).

Mais le symptôme le plus caractéristique est le développement prématuré des bourgeons axillaires durant les deux ou trois premières années suivant l'infection, ce qui donne l'aspect balai de sorcière. Lorsque l'infection est moyenne, l'arbre peut se rétablir(Anonyme., 2006).

Ces symptômes ne s'expriment pas uniformément sur l'ensemble de l'arbre et sont souvent localisés sur une partie de celui-ci, de même tous les symptômes décrits ne s'expriment pas en même temps. En fonction des conditions climatiques et des conditions de culture, on peut observer une rémission des symptômes plus ou moins durable. Souvent à l'état latent la maladie s'exprime après des à-coups de végétation (taille sévère, sur greffage) (Anonyme., 2006).

I.4.2- Le dépérissement du poirier ou Pear décline phytoplasma

Cette maladie est largement distribuée à travers l'Europe, le Canada et les États Unis et même en Libye, et son principal hôte est le poirier. Elle se transmet par un psylle, *Cacopsylla pyricola*.

Selon le porte greffe, les pratiques culturales et la pression en psylles vecteurs, on distingue :

Le quick decline : les arbres meurent en quelques semaines du fait que le phloème, au niveau du point de greffe est endommagé, et empêche la translocation des éléments nutritifs vers les racines, durant la période de croissance. Les fruits dans ce cas ne se développent pas et flétrissent en même temps que les feuilles.

Le slow decline : les feuilles sont petites à bords enroulés et d'une teinte vert clair qui vire au rouge en automne .Le nombre de fleurs est réduit et les fruits restent petits.

I.4.3- Les jaunisses européennes des fruits à noyau ou European stone fruit yellows, (ESFY)

Dans cet ensemble, on retrouve l'enroulement chlorotique de l'abricotier également appelé l'enroulement chlorotique du pêcher qui touche tous les prunus, et qui est pour le moment limité aux pays de l'Europe. Néanmoins, un signalement non encore confirmé a été fait en Afrique du sud (Morvan ., 1977).

Apparemment propagés par une cicadelle, *Fieberiella florii* , mais non encore confirmé, les symptômes sont repérables toute l'année et consistent surtout en un départ de végétation au cours de l'hiver, un jaunissement et enroulement des feuilles et un dépérissement des charpentes.

Groupes.	Espèces.
16SrI (groupe des Aster Yellow)	<i>Candidatus phytolasma asteris.</i>
	<i>Candidatus phytolasma japonicum.</i>
16SrII (groupe des Peanut Witches-broom).	<i>Candidatus phytolasma aurantifolia.</i>
16SrIII (groupe des X disease).	<i>Candidatus phytolasma pruni.</i>
	<i>Candidatus phytolasma palmae.</i>
	<i>Candidatus phytolasma castaneae.</i>
	<i>Candidatus phytolasma coccosuigeriae.</i>
16SrV (groupe des Elm yellow).	<i>Candidatus phytolasma ziziphi</i>
	<i>Candidatus phytolasma vitis.</i>
	<i>Candidatus phytolasma ulmi.</i>
16SrVI (groupe des Clover proliferation).	<i>Candidatus phytolasmatrifolii.</i>
16SrVII (groupe des Ash yellow).	<i>Candidatus phytolasma fraxine.</i>
16SrVIII (groupe des Luffa witches-broom)	<i>Candidatus phytolasma luffae.</i>
16SrIX (groupe des pigeon pea witches-broom)	<i>Candidatus phytolasma phoenicium.</i>
16SrX (groupe des Apple proliferation).	<i>Candidatus phytolasma mali.</i>
	<i>Candidatus phytolasma pyri.</i>
	<i>Candidatus phytolasma prunorum.</i>
	<i>Candidatus phytolasma spartii.</i>
	<i>Candidatus phytolasma rhamni.</i>
	<i>Candidatus phytolasma allocasuarinae.</i>
16SrXI (groupe des Riceyellow dwarf).	<i>Candidatus phytolasma oryzae.</i>
16SrXII (groupe des Stolbur).	<i>Candidatus phytolasma solani.</i>
	<i>Candidatus phytolasma australiense.</i>
16SrXIII (groupe des Mexican periwinkle Virescence).	Non encore définie.
16SrXIV (groupe des Bermuda White leaf).	<i>Candidatus phytolasma cynodontis.</i>
16SrXV (groupe des Hibiscus Witches-broom).	<i>Candidatus phytolasma brasiliense.</i>

Tableau 3 : Principaux groupes de maladies à phytoplasmes(Anonyme ., 2006).

1.5- Les méthodes de lutte

1.5.1-Sélection sanitaire, surveillance du matériel de départ : Pieds-mères

Les phytoplasmoses ne sont pas transmissibles par les semences, mais les parties végétatives contaminées peuvent être responsables de leur propagation, particulièrement dans le cas d'espèces ligneuses. La sélection sanitaire repose sur le choix de pieds-mères sains à la fois pour la production de scions et de porte-greffes, ce qui est particulièrement délicat car des pieds sans symptômes peuvent se révéler infectés s'ils ont été contaminés

tardivement au cours de l'été précédant le prélèvement des greffons, alors que la maladie est encore en incubation.

I.5.2-Élagage de plantes malades

Dans certains cas, l'élagage de branches malades dès l'apparition des premiers symptômes peut être recommandé. Ainsi, des vignes atteintes par la maladie du bois noir, dont les sarments présentant des symptômes ont été supprimés, peuvent se maintenir sans symptômes pendant plusieurs années. Cette méthode ne présente de risque que dans le cas où la plante hôte est un hôte préférentiel du vecteur (cas de la flavescence dorée de la vigne dont le vecteur *Scaphoides titanus* n'a pas d'autres hôtes)(Boudon-Padieu.,1999)

Dans le cas du « balai de sorcière du peuplier », l'élagage des rameaux situés à la base de l'arbre a été conseillé, car les jeunes larves de l'insecte-vecteur *Rhytidodus decimusquartus* migrent à partir de cette zone vers les parties supérieures de l'arbre au printemps.

I.5.3-Élimination des plantes-hôtes réservoirs

L'élimination des plantes-hôtes réservoirs est recommandée et, dans le cas de la « flavescence dorée » de la vigne, la destruction des vignes malades ou abandonnées, seuls hôtes et réservoirs de la maladie, est exigée.

En ce qui concerne le « bois noir » de la vigne et le « dépérissement jaune de la lavande et du lavandin » (groupe « stolbur »), l'élimination des adventices par le nettoyage des jachères et des chemins est fortement conseillée, le liseron (*Convolvulus arvensis*) et les labiées étant les principaux réservoirs de la maladie. (Cousin et Boudon-Padieu., 2002).

I.5.4-Surveillance de l'activité des vecteurs

Dans le cas de maladie dont le vecteur n'est inféodé qu'à l'espèce cultivée et lorsque le nombre de générations par année est peu élevé, on peut avoir recours à des traitements chimiques. Tel est le cas par exemple de la « flavescence dorée », *Scaphoideus titanus* est inféodé à la vigne et ne possède qu'une génération par an. Des avertissements de traitement ont été mis en place en France. Le premier, un mois, après le début de l'éclosion, est destiné à éliminer tous les insectes, car ils sont susceptibles d'être infectieux un mois après leur premier repas pris sur une vigne malade. Un ou deux traitements additionnels sont appliqués à un mois d'intervalle. Ces traitements constituent actuellement la seule méthode de lutte efficace contre la maladie.

La lutte est beaucoup plus aléatoire dans le cas du « bois noir » de la vigne transmis par *Hyalesthes obsoletus*, un cixiide polyphage, qui ne se nourrit que très occasionnellement sur la vigne. Dans ce cas, un labour du sol permet de réduire les larves présentes sur les racines en les exposant au froid.

I.5.5-Thermothérapie

Une méthode pour guérir les vignes en immergeant les sarments dormants ou les plantes greffées, pendant 45 min dans de l'eau chaude à 50 °C s'est avérée efficace, sans danger et a été recommandée par l'*International Board for Plant Genetic Resource* (FAO/IBPGR) pour

des déplacements de germes plasmes de vigne en toute sécurité (Boudon-Padiou, 1999). Un programme d'élimination des phytoplasmes et des virus a été entrepris en Nouvelle-Zélande pour régénérer des variétés et des porte-greffes de poiriers introduits d'autres continents (Wood, 1997). La thermothérapie s'est révélée efficace en Inde pour lutter contre les « pousses étroites » (*grassy shoot*) de la canne à sucre, phytoplasme qui constitue l'une des maladies les plus dangereuses pour cette espèce, avec des pertes de rendement pouvant atteindre 100 % (Viswanathan et al., 1999). La vapeur en milieu aéré, *aerated steam therapy* (AST), à 50 °C pendant une heure, ne suffit pas pour réduire la maladie de façon significative, tandis que le traitement à 52 °C, pendant la même durée, élimine complètement les phytoplasmes, sans altération des bourgeons.

I.5.6-Prémunition

La protection croisée, dont l'efficacité a été signalée dans le cas de la « prolifération du pommier » (Kunze, 1976) et de « l'enroulement chlorotique de l'abricotier » (Castelain et al., 1997), pourrait être étendue à d'autres phytoplasmes responsables de maladies sur des arbres fruitiers et contre lesquelles il n'existe pas actuellement de méthode efficace de lutte.

I.5.7-Recherche de variétés résistantes ou tolérantes par sélection classique

Différents types de résistance à l'agent pathogène, de différence de sensibilité des cultivars, de résistance à l'insecte vecteur ou variation de l'appétence d'une plante pour les vecteurs, sont utilisés dans le cadre de la lutte contre les phytoplasmoses.

Carraro (1998) a montré que, contrairement aux variétés japonaises, les variétés européennes de pruniers sont très tolérantes au phytoplasme responsable de la « leptonécrose, *plum leptonecrosis* » (PLN), considéré comme très voisin de celui de « l'enroulement chlorotique de l'abricotier, *apricot chlorotic leaf roll* » (ACLR). Une grande diversité dans l'intensité de la maladie chez les différents *Prunus* (*P. salicina*, *P. armeniaca*, *P. cerasifera* et *P. domestica*), tous fortement infectés, a pu être observée (Carraro et al., 1998).

Aux États-Unis et en Chine, une étude menée sur *Prunus virginiana* L. atteint de la « maladie X, *Western X* » et faisant appel à des méthodes de diagnostic de plus en plus sensibles, a montré que l'absence de symptômes, corrélée à une faible teneur en phytoplasmes, pourrait être utilisée dans des programmes de sélection en l'absence de résistance vraie (Guo et al., 1998).

Dans d'autres cas, et notamment pour lutter contre le « *Pear decline* » (PD) et la « prolifération du pommier », il est possible d'utiliser des porte-greffes de moindre sensibilité (Seemüller et al., 1998). Malheureusement dans le cas de la vigne, certains porte-greffes tolérants contribuent à transmettre la maladie et à entraver le rétablissement des scions (Caudwell et al., 1994).

Les différences d'« attirance » de l'insecte-vecteur envers la plante peuvent aussi être à l'origine de variations de sensibilité. Boudon-Padiou en 1999, indique que le cépage « Chardonnay » est particulièrement attractif pour *Hyaalsthes obsoletus* vecteur de la maladie du « bois noir » de la vigne. Ainsi la recherche de cépages moins attractifs pour l'insecte pourrait constituer une méthode de lutte efficace.

Dans tous les cas, il convient d'augmenter la diversité génétique en intensifiant la recherche de nouveaux clones pour éviter les problèmes liés à la monoculture qui a grandement contribué au caractère épidémique de certaines maladies telles le dépérissement de *Populus nigra* cv Italica et le dépérissement jaune du lavandin.

Les efforts de sélection doivent donc prendre en considération la résistance ou la tolérance au phytoplasme, la répulsion à ses vecteurs, la qualité des essences produites et une bonne adaptation au milieu (Cousin et Moreau ., 1991).

I. 6-Identification

Comme pour tous les autres agents pathogènes, le diagnostic d'une maladie à phytoplasme peut se faire à l'aide de plusieurs techniques complémentaires, les méthodes biologiques (symptomatologie sur hôte et transmission de l'agent par greffage, cuscute ou vecteurs), des méthodes histologiques notamment celles utilisant la microscopie électronique ou photonique en présence de fluorochromes (DAPI), des méthodes sérologiques (ELISA) ou encore des méthodes moléculaires (PCR).

I.6.1- Méthodes biologiques

Ces méthodes consistent à transmettre le phytoplasme soit en greffant une variété à tester sur une autre sensible qui a la capacité d'extérioriser facilement les symptômes recherchés (l'indexage) ou en réalisant un pont de cuscute entre une plante étudiée et une plante hôte d'une autre famille (Cousin et Boudon-Padieu., 2001 ; Pracros.,2000).

I.6.2- Méthodes histologiques

Ces méthodes peuvent être soit non spécifiques au phytoplasme mettant ainsi en évidence des phénomènes se passant au niveau de la plante en présence du pathogène (exemple : l'autofluorescence, la détection de callose.) ou bien spécifiques au phytoplasme et particulièrement à son ADN et consistent alors en une coloration spécifique de l'ADN en utilisant certains réactifs comme le réactif de Feulgen en lumière normale ou fluorochromes en lumière fluorescente. La fluorescence en DAPI (4'-6 diamidino-2 phénylindole-2 HCl) est aussi utilisée en diagnostic des phytoplasmes, ce réactif a la capacité de détecter les acides nucléiques riches en nucléotides A et T après observation aux rayons ultra violets (Cousin et Boudon-Padieu. , 2001).

I.6.3 -Méthodes sérologiques

Ces méthodes nous permettent d'utiliser les relations qui existent entre un antigène et son anticorps spécifique dont les plus utilisées pour la détection des phytoplasmes sont les suivantes :

L'immunofluorescence

Elle utilise la fluorescence en lumière bleue (450 nm) de l'isothiocyanate de fluorescéine fixé sur un anticorps, pour révéler la présence d'antigènes homologues présents dans les tissus infectés (Cousin et Boudon-Padieu., 2001).

L'immunomarquage

Dans ce cas, l'antisérum est couplé à de l'or colloïdal qui permet le repérage en microscopie électronique ou est amplifiée par de l'argent pour le repérage en microscopie photonique (Cousin et Boudon-Padieu., 2001).

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Le test ELISA est adapté aux analyses en série des phytoplasmes, il permet de différencier entre les maladies qui portent les mêmes symptômes et peut être utilisé sur les nervures, les pétioles, les jeunes rameaux et même sur les insectes vecteurs. Ce test n'est pas assez sensible sur les tissus des portes greffes infectés qui sont généralement pauvres en phytoplasmes détectables (Anonyme., 2002).

I.6.4-Méthodes moléculaires

Les méthodes moléculaires, du fait de la faible concentration et l'inégale répartition des phytoplasmes dans l'hôte, sont celles qui sont le mieux adaptées à ce cas de figure. Très sensibles et extrêmement fiables, elles sont indispensables pour une détection de routine, en particulier dans les cas de plantes tolérantes porteuses. Plusieurs techniques sont utilisables, tout dépend du but recherché.

I.6.4.1- Localisation génomique des oligonucléotides (figure 7)

Les différents oligonucléotides utilisés pour la détection des phytoplasmes sont localisés au niveau de la fraction 16 S, l'espace inter génique non transcrit (IS) et une portion de la fraction 23S ces derniers peuvent être divisés en deux groupes :

Les amorces universelles

Elles permettent de détecter la présence ou l'absence du phytoplasme au niveau de la plante. Selon la localisation génomique de ces dernières nous pouvons distinguer :

- Les amorces pouvant amplifier l'ensemble de la fraction 16S, l'espace inter génique (IS) et une portion de la fraction 23S telles les amorces NPA2F/R (1667pb), PA2F/R (1669pb) (Heinrich et *al.*, 2001), P1/Tint (1627pb) (Smart et *al.*, 1996) et les amorces P1/P7 qui amplifient 1784 pb et qui sont les plus utilisées (Schneider et *al.*, 1995).
- Les amorces ne pouvant amplifier que la fraction 16S dont : R16m/F2/mR1 (1416pb) (Gundersen et Lee., 1996). R16F1/R0 (1300pb), R16F2n/R2 (1239pb) décrites par l'équipe de Lee en 1995, fU5/U3 (876pb) (Lorenz et *al.*, 1995) et enfin M1/2 (509pb) (Gibb et *al.*, 1995).

Les amorces spécifiques

Ces amorces sont spécifiques à des séquences non conservées de la fraction 16S de l'ADN ribosomique parmi elles deux paires spécifiques aux arbres fruitiers ont été décrites. La première étant la paire fo1/ro1 décrite par Lorenz et *al* en 1995 qui amplifie 1057 pb, la seconde, étant R16(x) F1/R1 qui amplifie 1085pb (Lee et *al.*, 1995).

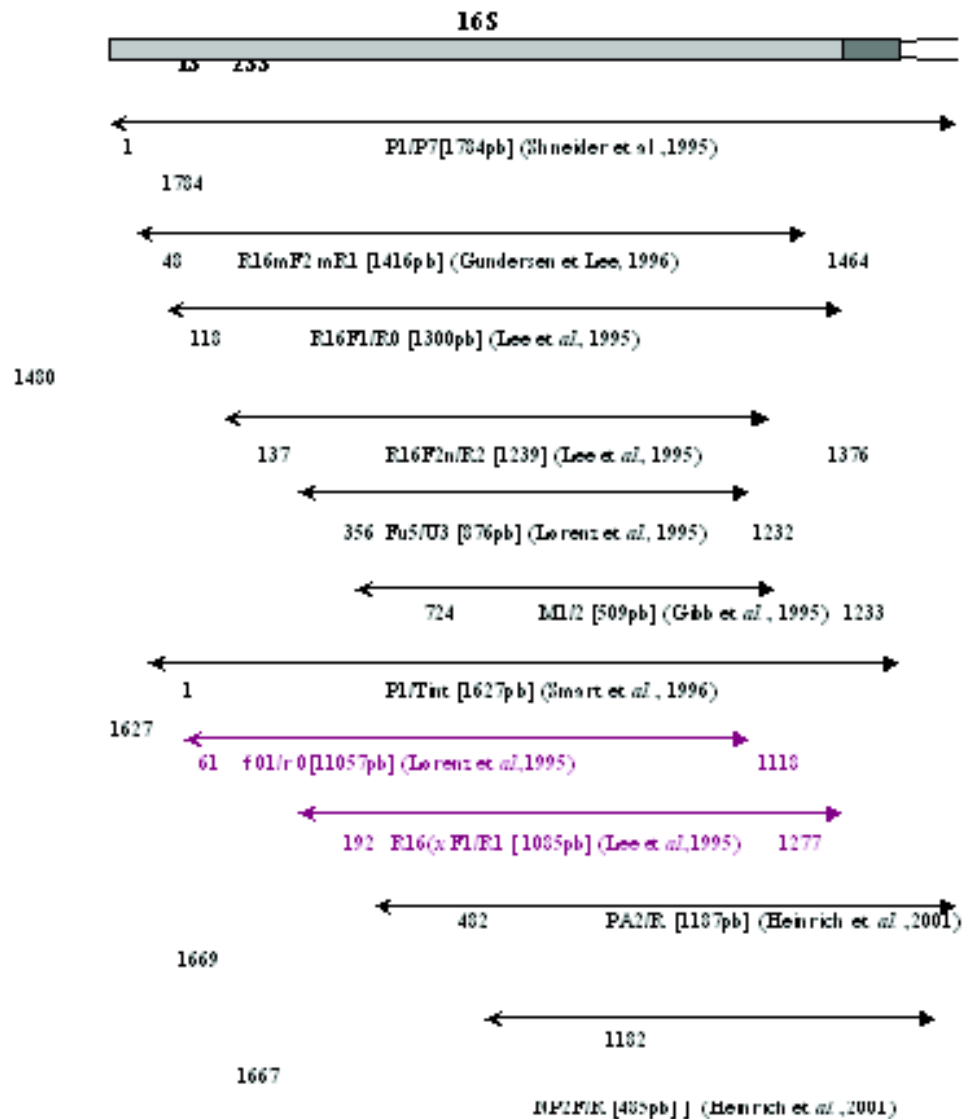


Figure 7 : Position des oligonucléotides sur l'unité ribosomique du phytoplasme.

1.6.4.2- Diagnostic

L'hybridation de l'ADN avec des sondes oligonucléotidiques permet d'une part d'établir les différents groupes génétiques des phytoplasmes (le dot blot) et d'autre part de déterminer les relations étroites entre les membres des groupes et des sous-groupes (le Southern blot) (Lee et al., 1992).

L'amplification de séquences spécifiques d'ADN par PCR s'est révélée être la méthode de choix pour le diagnostic des phytoplasmes (Cousin et Boudon-Padieu., 2001). La PCR peut être effectuée à partir du végétal infecté et même à partir d'insectes-vecteurs, ce qui permet la détection des phytoplasmes d'une part et l'établissement d'une corrélation entre la transmissibilité de la maladie et son vecteur d'autre part (Tanne et al., 2001).

Plusieurs types de protocoles de PCR sont envisageables (Cousin et Boudon-Padieu., 2001).

- La PCR utilisant des amorces universelles obtenues à partir de séquences conservées des phytoplasmes, permet de déceler un large spectre de phytoplasmoses, tant chez la plante que chez l'insecte vecteur. Les amorces P1-P7 qui amplifient l'ensemble de l'ADN r16 S et de l'espaceur 16 S/23S sont fréquemment utilisées.
- La PCR à l'aide d' amorces spécifiques choisies dans des séquences non conservées de l'ADN ribosomique (ADN r16 S, espaceur 16 S/23S) ou dans des séquences obtenues à partir de fragments d'ADN clonés au hasard.
- La PCR gigogne ou *nested PCR*, qui fait appel à deux réactions d'amplifications successives, et qui a pour but d'augmenter la sensibilité du diagnostic lorsque la détection est particulièrement difficile en raison de la faible concentration en phytoplasmes ou de la présence d'inhibiteurs dans les extraits soumis à la PCR.
- L'immunocapture PCR permet d'éviter les longs processus d'extraction de l'ADN des phytoplasmes, lorsqu'on dispose d'un antisérum spécifique de la maladie à l'étude. Cette méthode, applicable à la fois à la plante et à l'insecte, possède une spécificité élevée, une grande sensibilité et est d'exécution rapide (Kesumawati et al .,2006).
- La PCR quantitative consiste à comparer, sur un même gel d'électrophorèse, l'intensité des bandes de deux fragments d'ADN, amplifiés par les mêmes amorces, mais de taille différente, donc aisément repérables sur le gel. L'un d'eux (ADN cible à l'étude) entre en compétition avec le second (ADN compétiteur de concentration connue) pour l'utilisation des amorces. Cette méthode, très sensible, peut être appliquée à l'ensemble des phytoplasmes, à condition de choisir un compétiteur approprié. Elle permet de suivre les fluctuations de la quantité des phytoplasmes au cours des saisons et dans les différents organes de la plante, ce qui est très utile en particulier dans le cas des essences ligneuses.

II- MATERIEL ET METHODES

II.1- Matériel végétal

II.1.1- Zones de récolte des échantillons

Les prospections ont été faites au niveau des stations expérimentales de l'institut technique des arbres fruitiers (ITAF) dans les régions suivantes : Tessala el merdja, Boufarik, Ben Itamou, Ben chikao (Médéa) et Ouamri (entre Médéa et Chlef) et ce à partir du mois de juillet 2006 jusqu'au mois d'octobre 2006.

II.1.2- Espèces végétales

Les échantillons sont prélevés sur différentes espèces (néflier, pêcher, prunier, abricotier, pommier et poirier) montrant des symptômes rappelant ceux dus aux phloplasmes. Les différentes espèces et variétés ainsi que les symptômes extériorisés sont reportés dans le tableau 5. Les témoins (ne présentant aucun symptôme) sont récoltés sur une exploitation privée.

II.1.3- Préparation des échantillons et conservation

Les échantillons de feuilles prélevés au niveau des différentes parcelles sont lavés à l'eau du robinet, puis séchés entre deux couches de papier absorbant. Les feuilles destinées à une utilisation ultérieure sont pesées, placées dans des sachets en matière plastique puis entreposées dans un congélateur réglé à -20°C. Notons que sur les grandes feuilles seules les nervures sont découpées et conservées.

II.2- Observation des symptômes

Le diagnostic au champ est effectué sur la base des symptômes décrits dans les ouvrages. En effet, le jaunissement des feuilles et le dépérissement de certaines charpentes, sur abricotier, sont des symptômes qui ont été observés lors d'infections liées à la présence de L'European Stone Fruit Yellows phytoplasma (ESAFY) (Myrta et *al.*, 2003, Ramel et *al.*, 2003). Concernant le pêcher, le prunier et le néflier, ces espèces sont sensibles aux mêmes phytoplasmes, (peach rosette phytoplasma, peach X disease phytoplasma, peach yellows phytoplasma et apricot chlorotic leafroll phytoplasma) (Anonyme., 2003a) .

Dans le cas du pommier, hôte du phytoplasme de la prolifération du pommier ou Apple Prolifération, qui selon (2000) et Anonyme (2001a), s'exprime par un feuillage clairsemé et d'aspect jaunissant, une réduction de la taille des feuilles et un développement en rosette. Ces symptômes sont parfois accompagnés par une coloration rougeâtre des feuilles des

extrémités des pousses ainsi qu'un chevelu racinaire fin et abondant et une réduction ou une inhibition de la fructification.

Pour ce qui est du poirier, la maladie du Pear Decline décrite sur poirier s'exprime par un rougissement des feuilles qui, selon la gravité (dépérissement lent ou rapide), entraîne les années suivantes soit un flétrissement des feuilles et un dépérissement soit un enroulement avec nanisme des feuilles et un affaiblissement plus lent de l'arbre (Anonyme., 2001b).

Les prélèvements sont effectués sur le maximum d'individus présentant des symptômes rappelant ceux induits par les phytoplasmes (tableau 5).

II.3 – Diagnostic moléculaire

II.3.1– Extraction des ADN Ahrens et Seemüller (1992)

Les acides nucléiques sont extraits à partir des nervures principales des échantillons de feuilles conservés au congélateur à -20°C. La méthode utilisée pour l'extraction des ADN est celle décrite par Ahrens et Seemüller en 1992.

Dans cette méthode 1,5 g de l'échantillon à analyser sont mis en incubation durant 10 minutes dans 8 ml de tampon PGB, à l'intérieur d'un mortier maintenu au froid. Après broyage, 5 ml du même tampon sont ajoutés et le mélange est centrifugé durant 5 minutes à 2500 g. Le surnageant est récupéré puis soumis à une nouvelle centrifugation de 25 minutes à 18000 g. Le culot repris dans 1 ml de CTAB est mis en incubation au bain mari durant 1 heure à 60°C (bain Marie) ; les ADN sont alors extraits de la phase aqueuse après addition d'un mélange chloroforme –isomyalcool (24v/1v) et d'un volume égal d'isopropanol froid, suivie d'une incubation de 1 heure au froid (sur de la glace), le mélange est ensuite centrifugé à 12000g durant 10 minutes. Le culot récupéré est dissous dans 400µl de tampon TE additionné de 40µl d'acétate de sodium à 3M, et de 0,9 ml d'éthanol à 95°. Après une nouvelle incubation de 12 à 24 heures à -20°C, le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec de l'éthanol à 80°, puis dissous dans 100µl d'eau stérile. Les ADN sont ensuite lyophilisés et conservés sous cette forme jusqu'à leur utilisation.

La composition complète des tampons utilisés pour cette étape est donnée en annexe.

II.3.2- Electrophorèse des ADN sur gel d'agarose en gradient de concentration

Ne disposant pas d'ADN marqueurs, nous avons réalisé une série d'électrophorèses sur des gels d'agarose à différents gradients de concentration (de 1 % à 2.5%.) de manière à déterminer les limites inférieures et supérieures de la taille des fragments purifiés.

Nous avons utilisé la méthode de Querci et *al.* (2004) qui permet de déterminer la taille des fragments d'ADN retenus en fonction de la concentration du gel en agarose. Les gels sont soumis à une migration de 2 heures à 100V soit pour une distance de migration 10 cm pour tous les gels. Après migration, les gels sont colorés au bromure d'éthidium pendant 30 minutes, l'observation des bandes se fait sous UV.

II.3.3- La Polymerase Chain Reaction (PCR)

La portion des gènes codant pour les ARN ribosomiques a été obtenue en utilisant des amorces nucléotidiques synthétiques celles ci nous ont été fournies par la Professeur FERRAO de l'université d'Udine (figure 6). La synthèse de l'ADN double brin est réalisée en amplification par PCR gigogne « Nested PCR » décrite par Querci et *al.* (2004). La PCR gigogne est plus précise qu'une PCR simple dans la mesure où elle utilise deux types d'amorces (tableau 4). Son principe est le même qu'une PCR classique sauf qu'elle se fait en deux étapes :

Dans un premier temps, les amorces P1 et P7 ont permis l'amplification de l'ADN correspondant à l'extrémité 5' de la fraction 16S, l'espaceur 16S-23S et une petite portion de 10 paires de bases de la fraction 23S soit 1784 paires de bases en tout . Les produits de cette

première amplification sont amplifiés une seconde fois par les amorces fU5 et RU3 qui permettent d'amplifier l'ADN correspondant à 876 paires de bases de la fraction 16S.

Cette manipulation se déroule en totalité dans un thermocycleur (Mj.Reasearch.INC). Durant la première amplification, les ADN purifiés sont tout d'abord dénaturés à 94°C durant 2 minutes. Ils sont ensuite soumis à un premier cycle d'amplification comprenant une dénaturation (1 minutes à 94°C), une hybridation par les amorces P1 P7 (1 minute à 55°C) puis une élongation (2 minutes à 72°C). Ce cycle qui est répété 40 fois est suivi d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

Dans la seconde amplification, ces mêmes ADN sont dénaturés à 95°C durant 2 minutes, puis soumis à un second cycle d'amplification avec les amorces fU5/RU3, soit une dénaturation secondaire (30 secondes à 94°C), une hybridation par les amorces (30 secondes à 55°C) puis une élongation (1 minutes 30 secondes à 72°C). Ces trois étapes sont répétées 38 fois, avant une dernière élongation de 10 minutes à 72°C.

Les produits amplifiés par PCR gigogne sont analysés par électrophorèse dans un gel d'agarose (1,5 % dans du tampon TBE 0,5*) puis colorés au bromure d'éthidium. Les fragments d'ADN amplifiés sont enfin visualisés à la lumière ultraviolette grâce à un transilluminateur (Konrad Benda Wiesloch). L'apparition de bande au niveau du gel révèle que l'échantillon est infecté par contre son absence indique que l'individu est sain.

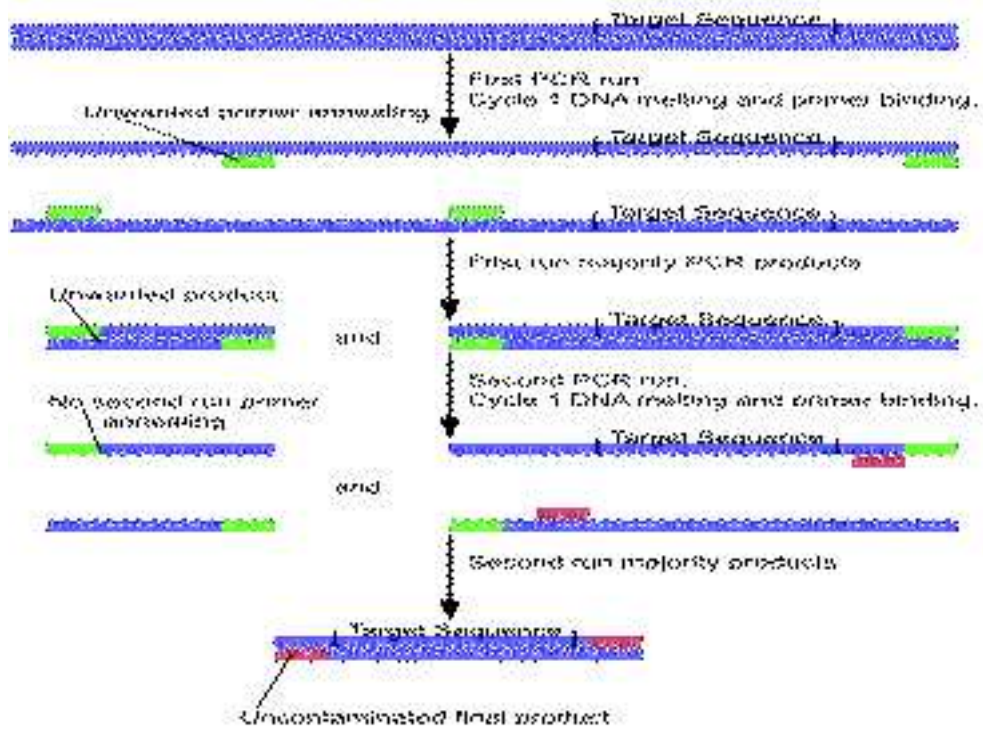


Figure 8: Schéma descriptif de la PCR gigogne (Nested PCR) (Bai et al., 2006)

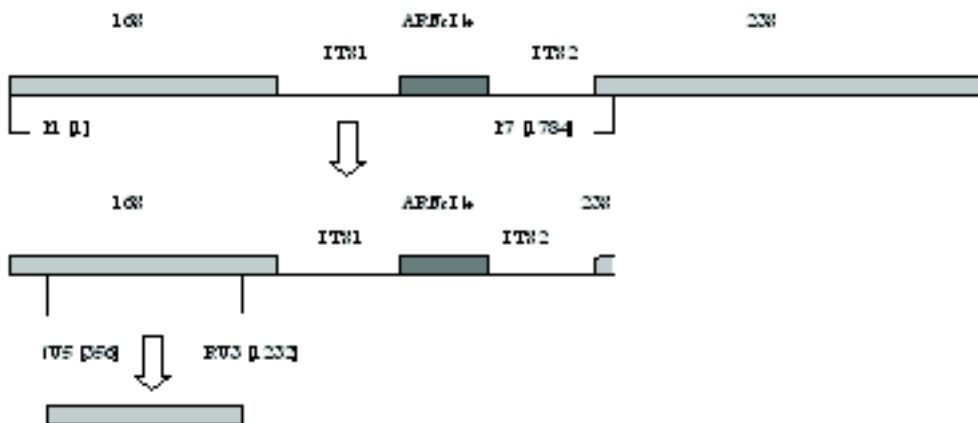


Figure 9 : Position des oligonucléotides sur l'unité ribosomique du phytoplasme lors de la PCR gigogne.

II.4 - Diagnostic histologique utilisant le DAPI

En lumière ultra violette (380 nm), la fluorescence au DAPI (4'-6 diamidino-2 phénylindole-2 HCl) détecte préférentiellement les molécules d'ADN riches en nucléotides A et T ce qui est le cas des phytoplasmes. Cette méthode n'est pas spécifique aux phytoplasmes mais représente un moyen de diagnostic préliminaire.

II.4.1-Réalisation des coupes (Planche1)

Fixation et inclusion (Planche2)

La méthode employée est celle utilisée par Sahraoui en 1989. Dans cette méthode, les nervures principales prélevées sur des échantillons encore frais, sont découpées en fragments de 1 cm de long. Ces fragments sont fixés durant 24 heures et plus dans un mélange constitué de formol, acide acétique et alcool (FAA), puis déshydratés par passages successifs dans des bains d'alcool de degré croissant (70-100°). Après substitution progressive de l'alcool par le toluène (miscible à la paraffine), puis du toluène par la paraffine, les échantillons sont alors définitivement montés dans des moules contenant de la paraffine liquide (58°C) et pure (filtrée). Après refroidissement complet de la paraffine à l'air ambiant, les blocs de paraffine sont démoulés, puis préparés pour la coupe au microtome. La composition complète des tampons utilisés pour le diagnostic en microscopie photonique à fluorescence est donnée en annexe.

Réalisation des coupes en paraffine

Les blocs obtenus après inclusion définitive sont montés dans le porte-bloc du microtome (LKB), le couteau de ce dernier est réglé de manière à dresser une face de coupe nette (coupes épaisses). L'épaisseur du ruban sera ensuite définitivement fixée à 8 microns avant de procéder à la confection des coupes histologiques sériées.

Collage et déparaffinage des coupes

Les rubans de paraffine portant les échantillons sont recueillis sur des lames propres inondées par de l'eau albuminée à 0.1%. Les lames sont ensuite déposées sur une plaque chauffante réglée à 30°C pour permettre l'étirement des coupes une fois l'excès d'eau évaporé. Elles sont ensuite placées à l'étuve réglée à 37°C pendant 24 heures pour assurer une bonne adhésion des coupes sur celles-ci. Après déparaffinage par passage progressif d'abord dans du toluène puis dans des bains d'alcool de degré décroissant (100- 70°), les coupes sont réhydratées dans de l'eau distillée puis colorées selon la technique de Savoure (1984).

Coloration au réactif de HOECHST et observation

La solution stock de coloration est directement préparée à partir du réactif de Hoechst 33 258 dissous dans de l'eau distillée (annexe) puis conservée à 4°C. Au moment de l'emploi, la solution est diluée dans du tampon cacodylate (0.1M, pH 7.2) pour l'obtention d'une concentration finale de 0.5 à 1 µg /ml.

Les coupes réhydratées sont plongées durant 20 minutes dans la solution de coloration puis rincées dans deux bains successifs de tampon cacodylate (0.1M) de 2 à 3 minutes chacun. Elles sont ensuite montées, entre lame et lamelle, dans une solution constituée d'un mélange de 50% de tampon cacodylate (0.2M) et 50% de glycérine puis scellées par du vernis à ongles.

II.4.2-Observation au microscope

Les coupes sont observées en lumière ultra violette bleue à l'aide d'un microscope photonique (Hund Wilover Swtziar), équipé d'une lampe à mercure et de filtres (1 filtre excitateur: 0.3 ; 1 filtre d'arrêt: G 247 ; 1 filtre bleu: 510).

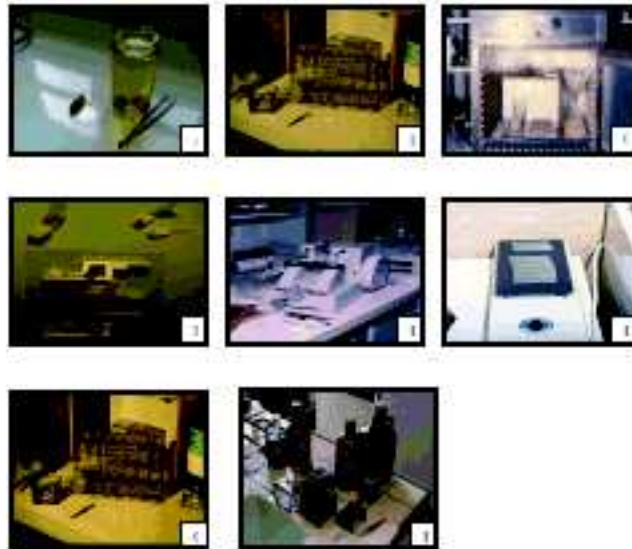


Planche 1 : Etapes suivies pour la préparation histologique pour la microscopie photonique.

- A** : Fixation,
- B** : Déshydratation et substitution,
- C** : Inclusion progressive.
- D** : Inclusion définitive et moulage,
- E** : Réalisation des coupes en paraffine.
- F** : Collage,
- G** : déparaffinage des coupes,
- H** : Coloration.

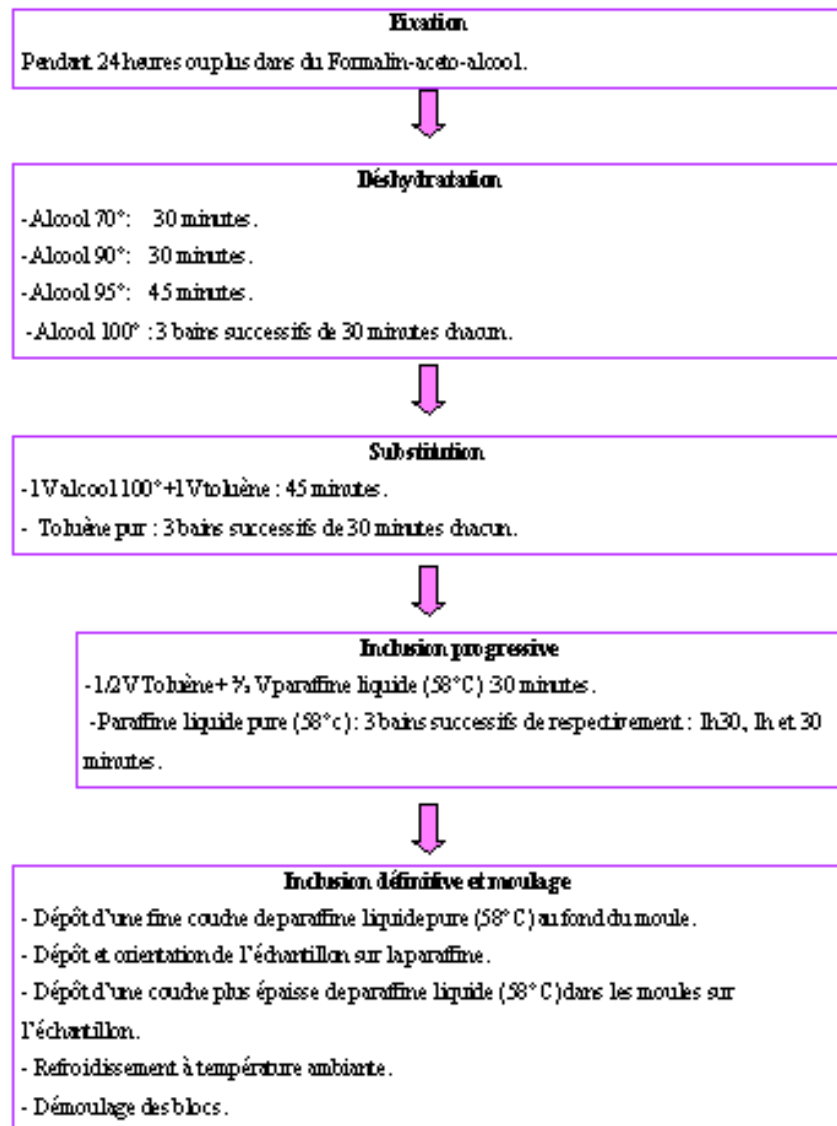


Planche2 : Technique de fixation et d'inclusion dans la paraffine pour l'observation au microscope photonique en lumière fluorescente.

III- RESULTATS ET DISCUSSIONS

III.1- Symptômes observés aux champs

Les symptômes les plus communs rencontrés sur arbres fruitiers durant les prospections sont reportés dans le tableau 5.

- Sur le pêcher : nous avons essentiellement noté un rougissement ou un noircissement des feuilles accompagné par une nécrose (Planche 3 : figures A et B). Sur certains arbres nous avons observé un développement des feuilles en rosettes (Planche 3, figure C). Quelle que soit la région, les individus porteurs de ce type de symptômes, finissent par dépérir totalement.

- Sur abricotier, le symptôme le plus frappant est le jaunissement des feuilles accompagné par un dépérissement de certaines charpentes (Planche 3, figure D).

- Le néflier présente une nécrose des feuilles, des rameaux et des inflorescences (Planche 3, figure E).

- Sur le prunier nous avons observé des mosaïques et un rougissement ou brunissement et un enroulement des feuilles, certains rameaux dépérissent (Planche 3, figures F et G).

- Les pommiers extériorisent un jaunissement qui évolue en une nécrose entraînant un dépérissement de l'arbre et un développement des feuilles en rosette. Certaines feuilles montrent des rougissements (Planche 4, figures H, I, J et K).

- Le poirier montre un jaunissement et un dessèchement des feuilles (teinte nécrotique) (Planche 4, figure L).

Pour résumer, il semble que les symptômes rencontrés quelle que soit l'espèce sont en majorité représentés par des jaunissements ou rougissements du feuillage, un développement en rosette, des enroulements des feuilles et enfin des nécroses et des dépérissements d'une partie ou de la totalité de l'arbre.

Le jaunissement des feuilles et le dépérissement de certaines charpentes, sur abricotier, sont des symptômes qui pourraient être attribués à L'European Stone Fruit Yellows phytoplasma (ESAFY).

Concernant le pêcher, le prunier et le néflier, les symptômes rencontrés lors des prospections, jaunissements ou rougissements, nécroses et enroulements des feuilles et enfin le dépérissement des arbres pourraient être attribués à l'un ou à l'autre de ces phytoplasmes

décrits précédemment (peach rosette phytoplasma, peach X disease phytoplasma, peach yellows phytoplasma et apricot chlorotic leafroll phytoplasma) qui, exception faite pour le peach X disease phytoplasma, ont été rencontrés dans plusieurs pays d'Europe et notamment en France, en Belgique, en Suisse, en Italie, en Bulgarie (OEPP, 1998) et même au Liban (Abu Jawdah et al., 2003).

Dans le cas du pommier, hôte du phytoplasme de la prolifération du pommier ou Apple Prolifération, parmi tous les symptômes décrits par les auteurs, nous avons dans notre cas noté un développement en rosette, un jaunissement et parfois un rougissement du

feuillage ainsi qu'un dépérissement. Ces symptômes pourraient être attribués à la maladie de la prolifération du pommier d'autant que selon ces mêmes auteurs, les symptômes ne s'expriment pas uniformément sur l'ensemble de l'arbre et sont souvent localisés sur une partie de celui-ci. En fonction des conditions climatiques et des conditions de culture, on peut observer une rémission des symptômes plus ou moins durables et non durables. De plus, cette maladie est souvent à l'état latent et ne s'exprime qu'après des à-coups de végétation.

Pour ce qui est du poirier, sur les parcelles visitées, les arbres montraient surtout un jaunissement et un dessèchement du feuillage, ce qui suggère la présence du pear decline. Selon les descriptions données par les auteurs (NAPPO., 2007, Anonyme., 2001b ; OEPP., 1998), les symptômes observés et décrits plus haut pourraient être attribués à des phytoplasmes. L'expression de la maladie peut varier en fonction des conditions climatiques, du mode de conduite, des portes greffes et des variétés, mais aussi en fonction de la virulence du phytoplasme. Ainsi dans le cas du balai de sorcière de *Populus nigra* cv *Italica* (groupe AY, sous-groupe B) Berges et al., (1997), puis Cousin, et al., (1998), ont montré que la virulence du pathogène était plus forte en France qu'en Allemagne et expliquent que cette différence était liée à un léger polymorphisme de séquences détecté en profils RFLP ou en analyse de la mobilité électrophorétique des hétéroduplex (Heteroduplex Mobility Analysis), HMA.

Station expérimentale de Boufarik (TTAF) le 31/07/2006.	
Echantillon.	Symptômes.
Néflier.	-Nécrose des feuilles et des rameaux. -Nécrose des inflorescences. -Absence de fruits.
Pommier variété Anna.	-Développement en rosette. -Début de jaunissement des feuilles.
Pommier variété Dorset.	-Développement en rosette. -Début de jaunissement des feuilles.
Pêcher variété Cardinal.	-Jaunissement de la périphérie des feuilles. -Rougisement des nervures. -Couleur rouille du plant. -Développement en rosettes. -Dépérissement de l'arbre.
Station expérimentale de Benitane le 01/08/2006.	
Echantillon.	Symptômes.
Pommier variété Golden.	-Nécrose des feuilles. -Dépérissement de l'arbre.
Abricotier variété Zine.	-Jaunissement des feuilles. -Nécrose de certains rameaux.
Station expérimentale de Méléa (Ben dūkao) le 18/09/06.	
Echantillon.	Symptômes.
Prunier variété Burla.	-Brunissement du limbe.
Pommier variété Star krimson.	-Développement en rosette des feuilles.
Ferme privée située dans le village de Ben Sèbsi (Ben dūkao, Méléa) le 24/09/2006.	
Echantillon.	Symptômes.
Pommier variété Golden.	-Nécrose de la périphérie des feuilles. -Dépérissement de l'arbre.
Prunier variété Stanley.	-Mosaïque du limbe. -Rougisement du limbe.
Ferme expérimentale de Ouamri le 30/09/2006.	
Echantillon.	Symptômes.
Pommier variété Golden.	-Nécrose des feuilles. -Dépérissement de l'arbre.
Pêcher variété Scarlette.	-Noircissement des feuilles. -Nécrose des feuilles. -Dépérissement de l'arbre.
Pêcher variété Top Red.	-Rougisement du limbe. -Dépérissement de l'arbre.
Poirier variété Dr Jules Guyot.	-Jaunissement des feuilles.

Tableau 5 : Prospections effectuées au niveau des vergers.

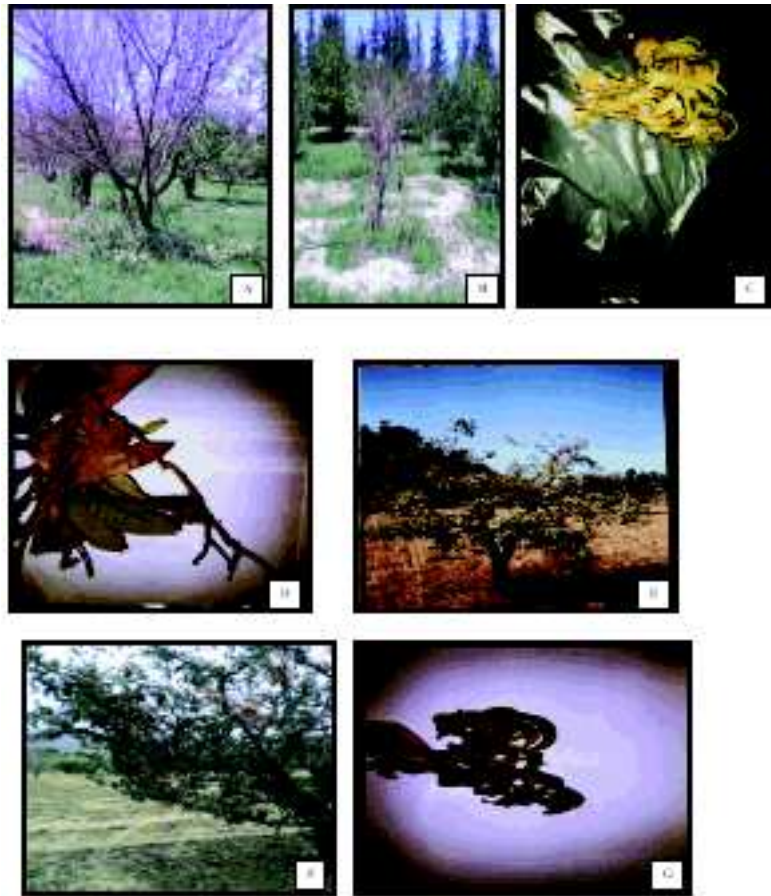


Planche 3 : Symptômes observés aux champs sur pêcher (A, B, C), néflier (D), abricotier (E) et prunier (F et G).

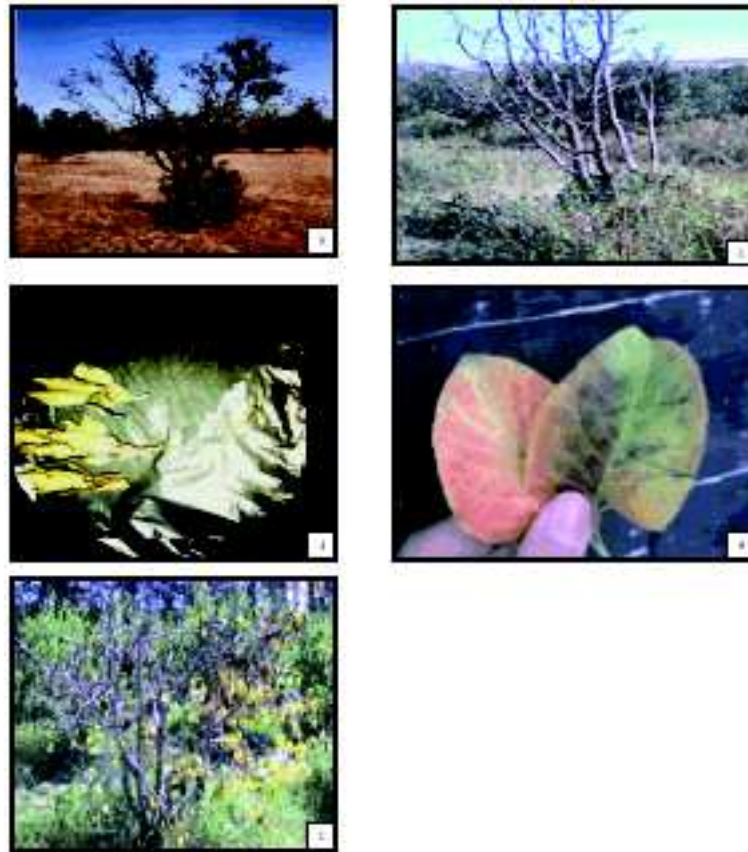


Planche 4 : Symptômes aux champs sur pommier (H, I, J, K) et poirier (L).

III.2- Diagnostic moléculaire

III.2.1- Electrophorèse des ADN sur gel d'agarose en gradient de concentration

L'observation du gel sous lumière ultraviolette, après coloration au bromure d'éthidium, révèle la présence de bandes correspondant à des fragments d'ADN de différentes tailles.

Pourcentage d'agarose.	Présence de bandes.	Taille des fragments (pb).
2.5%	Non.	<50
	Oui.	50-10000.
2%	Non.	50-100.
	Oui.	50-10000.
1.5%	Non.	50-200.
	Oui.	50-10000.
1.25%	Non.	50-300.
	Oui.	50-10000.
1%	Non.	50-500.
	Oui.	50-10000.

Tableau 6 : Détermination de la taille des fragments d'ADN des phytoplasmes (Querci et al., 2004)

Pourcentage d'agarose.	Présence de bandes.	Taille des fragments (pb).
2.5 %	Oui.	50-10000.
2 %	Oui.	50-10000.
1.5 %	Oui.	50-10000.
1.25 %	Oui.	50-10000.
1%	Non.	50-500.

Tableau 7 : Taille des fragments d'ADN après migration sur gel d'agarose de différentes concentrations.

En comparant les résultats de Querci et al., (2004), donnés dans le tableau 6 et les résultats de notre manipulation reportés dans le tableau 7, nous pouvons apporter les conclusions suivantes :

Nous remarquons que les fragments d'ADN sont apparus au niveau de quatre gels à concentrations respectives de 2.5%, 2 %, 1.5 % et 1.25 % alors que le gel à 1 % ne nous révèle aucune bande. De plus la netteté des bandes apparues est plus grande sur le gel à 1.5 % que sur ceux des autres concentrations.

Selon Querci et al., (2004), des concentrations d'agarose de 2.5%, 2 % 1.5 % et 1.25 % donnent aux gels la capacité de retenir des fragments dont la taille est comprise entre 50 et 10 000 pb. Selon la présence ou l'absence de bandes, la taille du fragment d'ADN peut être estimée. Ainsi dans le cas des concentrations en agarose de 2,5, 2, 1,5 et 1,25%, la présence de bandes pourrait indiquer que la taille des fragments d'ADN obtenus à partir de nos échantillons, est comprise entre 50 et 10 000 pb. Par contre l'absence de bandes pour une concentration d'agarose de 1 % indiquerait que la taille des fragments se situe plus précisément entre 50 et 500.

D'après Cousin et Boudon-Padiou., (2001), la taille de l'espaceur 16S/23S des phytoplasmes du groupe des Aster Yellow est de 298 pb. Etant donné que nous sommes en présence de fragments de tailles variant de 50 à 500 pb et que le gel à 1.5 % révèle

de meilleures bandes (200-400pb), nous pouvons supposer que nos échantillons d'ADN appartiendraient à des phytoplasmes du groupe Aster Yellow.

III.2.2- Résultats de la PCR

L'analyse du produit d'amplification obtenu, par électrophorèse en gel d'agarose à 1,5 % a permis l'observation de bandes correspondant à des séquences d'ADN phytoplasmique amplifié par les deux paires d'amorces (P1/P7, fU3/RU5) (figure 9), et pour les fragments d'ADN provenant des échantillons de Prunier Stanley, Pêcher Scarlette, Pommier Golden (1), Pommier Start Krimson, Prunier Burla.

Aucune amplification n'a pu être décelée dans le cas du Pommier Golden (2), Poirier Dr Jules Guyot, Pêcher Top red, Néflier, Pommier Anna, Pommier Dorset, Pêcher Cardinal, Abricotier Zine,

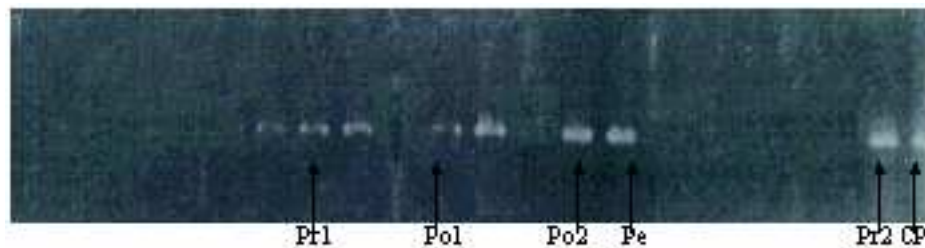


Figure 10 : Résultats de la PCR sur gel d'agarose à 1,5 % (après amplification par amorces P1/P7, RU3/fU5).

Pt1 : Prunier Burla(ITAF de Ben chikao.)

Po1 : Pommier Start Krimson (ITAF de Ben chikao).

Po2 : Pommier Golden (ITAF de Ouamri).

Pe : Pêcher Scarlette (ITAF de Ouamri).

Pr2 :Prunier Stanley (ferme privée de Ben chikao).

CP : Contrôle positif.

Nous remarquons :

- Que seuls les échantillons prélevés dans les régions de Ben chikao et Ouamri se sont révélés positifs en PCR. Pour tous ceux provenant de Tessala El Mardja, Benitamou et Boufarik, il n'y a pas eu d'amplification.

- Que seuls les ADN provenant de pêchers, pruniers et pommiers ont pu être amplifiés.

Nous pouvons également constater que dans un même verger, et au sein d'une même espèce, pour certains individus nous avons pu amplifier l'ADN pour d'autres pas, c'est le cas du pêcher provenant de l'ITAF de Ouamri, où seule la variété Scarlette a répondu positivement.

III.3- Observations en microscopie photonique en lumière fluorescente

La coloration au réactif de HOECHST 33 258 a révélé une fluorescence anormale dans les plants supposés infectés par des phytoplasmes comparée aux témoins sains pour les échantillons suivants : Prunier (Stanley), Prunier (Burla) (Planche 5, fig. M, N, et O), Pommier (Golden), Pommier (Start Krimson) (Planche 5, fig. P, Q et R), Pêcher (Scarlette) (Planche 5, fig. S et T)

La microscopie photonique ne permet pas de voir les corps phytoplasmiques mais de voir leurs effets sur les tissus libériens des plantes atteintes. Cette technique a été utilisée avec succès dans le cas de la flavescence dorée (Carle., 1965) de solanées atteintes de « stolbur (Cousin et *al.*, 1966), de la phyllodie de la féverole au Soudan (Dafalla., 1987), et d'une phytoplasmosse sur fève rencontrée à Biskra (Sahraoui., 1989).

Bien que cette méthode soit ancienne, elle reste encore d'actualité étant donné que les auteurs (Lee., 1999., Cousin et Boudon et Padiou., 2001.) la citent encore comme une méthode de référence pour un diagnostic préliminaire des phytoplasmes.

Aujourd'hui nous pouvons dire que l'utilisation du réactif de HOECHST pour le diagnostic des phytoplasmes est une méthode efficace puisque les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par la Polymérase Chain Reaction (PCR).

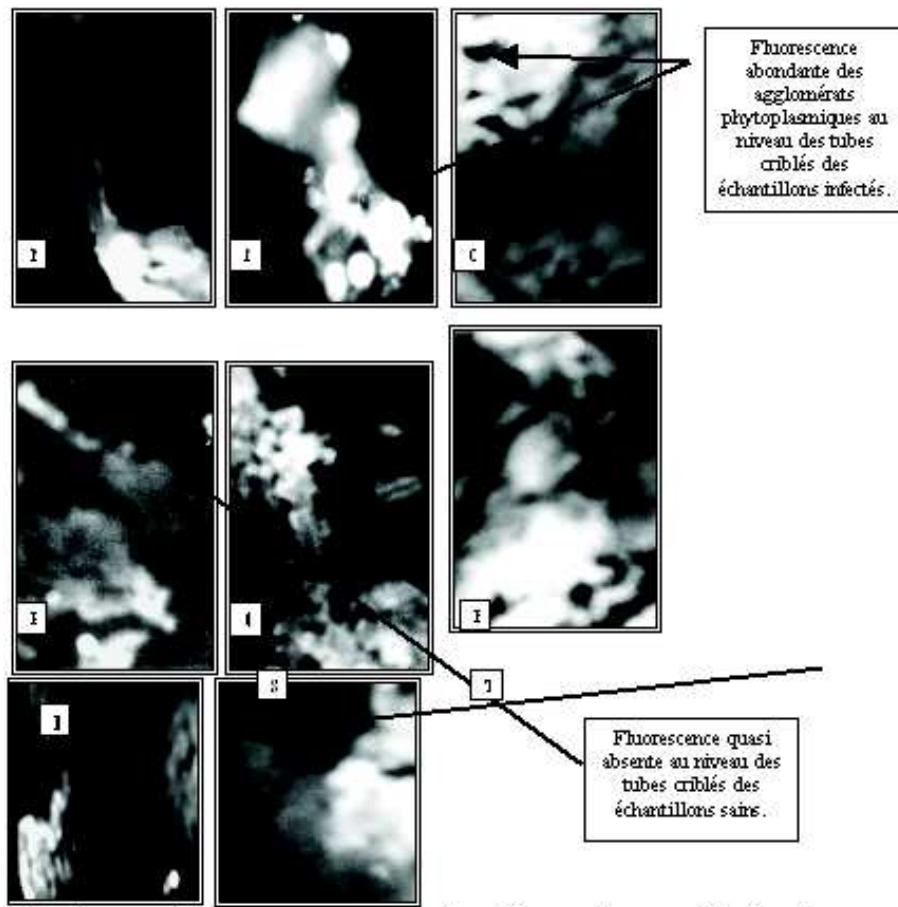


Planche 5 :

Observations au microscope photonique à lumière fluorescente (Gr x 1 0000).

M: Témoin prunier, S: Témoin pêcheur,
N: Prunier Stanley, T: Pêcheur Scarlette.

O: Prunier Burla,
P: Témoin pommier,
Q: Pommier Start
Krimson,
R: Pommier Golden,
E: Pommier Golden.

Planche 5 : Observations au microscope photonique à lumière fluorescente (Gr x 1 0000).

- M :** Témoin prunier,
- N :** Prunier Stanley,
- O :** Prunier Burla.
- P :** Témoin pommier,
- Q:** Pommier Start Krimson,
- R:** Pommier Golden,
- S:** Témoin pêcheur,
- T :** Pêcheur Scarlette.

La comparaison entre les résultats de la PCR et les symptômes extériorisés par les individus étudiés révèle ceci :

Certains échantillons dont l'ADN a été amplifié présentent les mêmes symptômes que ceux décrits en bibliographie. En effet, les échantillons de pommier de la variété Start krimson provenant de Ben Chikao dont l'ADN a été amplifié par les deux paires d'amorces présentaient un développement en rosette qui est l'un des symptômes de la maladie de l'apple proliferation (AP) (Anonyme., 2001a).

En revanche, les symptômes exprimés par le pommier de la variété Golden et dont l'ADN a pu être amplifié ne rappellent aucun de ceux décrits en bibliographie.

Notons aussi que le pêcher de la variété scarlette pour lequel nous avons obtenu une amplification montre des symptômes qui se rapprochent du peach X disease (Anonyme., 2003b).

Pour d'autres échantillons, bien que les symptômes extériorisés se rapprochent de ceux décrits en bibliographie, les fragments d'ADN n'ont pas pu être amplifiés, c'est le cas de l'abricotier de Beni Itamou qui présente un dépérissement de la charpente semblable à celui attribué à la maladie de l'European Stone Fruit Yellowings phytoplasma (ESAFY).

À ce stade de notre expérimentation, nous ne pouvons qu'avancer des hypothèses :

1- Pour certaines espèces provenant de Ben chikao et de Ouamri présentant des symptômes rappelant des phytoplasmoses, les ADN ont pu être amplifiés par les amorces utilisées en l'occurrence la P1/P7 et la RU3/fU5, et une fluorescence anormale a pu être observée dans les tissus soumis à la détection par le DAPI. Nous pouvons dans ce cas supposer la présence des pathogènes recherchés sans en donner l'identité exacte puisque les paires d'amorces ne sont pas spécifiques.

2- Pour d'autres échantillons, même si les symptômes relevés sont imputables à première vue à des phytoplasmes, l'amplification des fragments d'ADN n'a pas donné de résultats pouvant diriger notre diagnostic vers ce type de maladie. Dans ce cas, nous pouvons simplement conclure que soit les symptômes observés sont dus à d'autres causes parasitaires ou non parasitaires, soit que le pathogène est présent mais que sa concentration est trop faible pour être décelée en nested PCR.

Concernant justement la nested PCR, et bien que, selon Berges et *al.* (2000), cette technique augmenterait la sensibilité de la PCR de 10 à 100 fois pour chaque cycle d'amplification, plusieurs auteurs émettent des réserves quant à son utilisation comme méthode de diagnostic du fait d'une plus grande probabilité d'apparition de faux positifs liés aux contaminations (Palmano, 2001) ou à l'existence de séquences homologues entre les

amorces et certaines régions de la fraction 16S de chloroplastes. Pour pallier à ce problème, les auteurs suggèrent l'utilisation de méthodes d'extraction de l'ADN permettant d'augmenter la concentration finale en ADN, ou encore de confirmer les résultats obtenus par l'utilisation d'amorces spécifiques (Tanne et *al.*, 2001).

CONCLUSION GENERALE

Au terme de ce travail dont le but est la détection de maladies à phytoplasmes sur les différentes espèces fruitières du centre algérien nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

Les prospections sur terrain nous ont permis de vérifier l'état sanitaire des espèces fruitières du centre et de constater la présence de plusieurs types de symptômes sur ces individus dont certains rappellent ceux causés par les phytoplasmes.

L'analyse au laboratoire des échantillons prélevés nous a permis de conclure ceci :

- L'absence de maladies à phytoplasmes au niveau des régions suivantes : Tessala El Merdja, Benitamou et Boufarik
- La présence des phytoplasmes est concentrée au niveau de la région de Médéa (Ouamri et Ben chikao).
- Les espèces atteintes des maladies à phytoplasmes sont les suivantes : Pommier, Prunier, Pêcher.

Bien que les dégâts provoqués par les phytoplasmes au niveau de la région de Médéa n'aient pas encore pris des proportions inquiétantes la simple présence de ces derniers devrait attirer notre attention .En effet, cette région constitue un endroit où l'arboriculture fruitière est très intense et à partir de duquel certaines régions du pays s'approvisionnent en plants. C'est pourquoi il nous semble que ce travail mériterait d'être continué d'une part pour éviter la propagation de ce type de pathogène, d'autre part pour mieux comprendre ce type de maladies et connaître leur agent causal ainsi que leurs vecteurs. Ceci pourrait se faire en élargissant l'étude de ces derniers sur d'autres cultures ligneuses ou herbacées. Pour ce faire il serait intéressant d'entreprendre l'étude des aspects suivants :

- Identification des maladies dont les individus sont atteints.
- Elargissement des prospections sur d'autres régions du pays.
- Recherche des vecteurs et étude de leur évolution parallèlement à celle de la maladie.
- Caractérisation moléculaire des phytoplasmes détectés.
- Essai de production de sérum nous permettant de rendre l'identification des phytoplasmes plus simple et plus précise afin que le diagnostic de ces derniers en Algérie devienne routinier.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOU-JAWDAH Y., DAKHIL H., M.SHOAA E. et LEE I.M., 2003. Almond witches'broom phytoplasma : a potential threat to almond, peach and nectarine. *The journal of Canadian plant pathology*. 25, 1 : 28-32.
- AHRENS U., SEEMÜLLER E., 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*. 82, 828–832.
- ALMA A., NAVONE P., VISENTIN C., ARZONE A. et BOSCO D., 1999. Rilevamento di fitoplasmi di « Apple proliferation » in *Cacopsylla melanoneura* (Förster) (Homoptera Psyllidae). Atti Incontro Nazionale sulle malattie da Fitoplasmi. Stato attuale delle conoscenze, *Udine* : 7-65.
- ANONYME, 2001(a). Apple Proliferation (AP). IAM Plant Biotech Unit.13 : 5-6.
- ANONYME, 2001(b). Pear Decline (PD). IAM Plant Biotech Unit. 13 : 8-9.
- ANONYME, 2002. Jaunisses à phytoplasmes de la vigne : Flavescence dorée et bois noir . Etablissement National Technique pour l'Amélioration de la viticulture. 24p.
- ANONYME. ; 2003(a). Peach yellows phytoplasma. Fiche informative sur les organismes de quarantaine .Bulletin OEPP . 4p.
- ANONYME. ; 2003(b). Peach X-disease phytoplasma. Fiche informative sur les organismes de quarantaine .Bulletin OEPP,5pp.
- ANONYME, 2006. Phytoplasma. Wikipedia. the tree encyclopedia. [http : // www.en.wikipedia.org/wiki/phytoplasma.html](http://www.en.wikipedia.org/wiki/phytoplasma.html).
- AOUANE B., 2003. Preliminary Studies On Stone Fruit Tree Viruses In Algeria. Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *Options Méditerranéennes*.45 :39-42.
- BAI X., ZHANG J., EWING A., MILLER S.A., JANCOS RADEK A., SHEVCHENKO D.V., TSUKERMAN K., WALUNAS T., LAPIDUS A., CAMPBELL J.W. et HOGENHOUT S.A.;.2006. Living with genome instability : The adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant host. *J. Bacteriol.* 188 : 3682-3696
- BELHADJ D.,1990. Diagnostic des maladies virales touchant les rosacées à noyau au niveau des régions du centre et de l'est. Notes de virologie. INES .Blida : 12-18.
- BERGES R., COUSIN M.T., ROUX J., MAÜRER R. et SEEMÜLLER E., 1997. Detection of phytoplasma infections in declining *Populus nigra* cv *Italica* trees and molecular differentiation of the aster yellows phytoplasmas identified in various *Populus* species. *Eur J For Path*, 27: 33-43.
- BERGES R., ROTT M. et SEEMÜLLER E. ; 2000. Range of phytoplasmas concentrations in various plant host as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology* 90: 1145–1152.

- BOUDON-PADIEU E., 1999. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting grapevine in Liguria (Italy). *Phytopatol. medit.* 34:137-141.
- BOUSSALEM A., 1992. Rapport d'activités du projet 88/025.45p.
- CAMPBELL B., STEFFEN-CAMPBELL C., SORENSEN J.D. et GILL J.T., 1995. Paraphyly of Homoptera and Auchenorrhyncha inferred from 18S rDNA nucleotide sequences. *Syst Entomol.* 20 : 62-241.
- CARLE E., 1965. Fluoroscopie des coupes histologiques de la flavescence dorée de la vigne. Application à la détection rapide des lésions précoces sur cépage sensible. *Ann. epiphyties.* 16 :73-85.
- CARRARO L., OSLER R., ERMACORA N. et REFATTI P.; 1998. Transmission of the European stone fruit yellows phytoplasma *Cacopsylla pruni*. *J Plant.* 80: 9-233.
- CARRARO L., LOI N., ERMACORA P. et OSLER R. ;1998. High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis. *European Journal of Plant Pathol.* 104: 5-141.
- CASTELAIN C., CHASTELIERE M.G., JULLIAN J.P., MORVAN G. et LEMAIRE J.M. ;1997. La prémunition contre l'enroulement chlorotique de l'abricotier. Bilan de dix années d'observation sur huit vergers. *Phytoma.* 493 : 39-44.
- CAUDWELL A., J. LARRUE V. et TASSAR T., .1994. Caractère porteur de la flavescence dorée chez les vignes porte-greffes en particulier le 3309 C et le Fercal. *Agronomie.* 14: 83-94.
- CHOUËIRI E., VERDIN E., DANET J.L., JREIJIRI F., EL ZAMMAR1 S., SALARD P., BOVÉ J.M. et GARNIER M., 2002. A Phytoplasma Disease Of Almond In Lebanon. *Options Méditerranéennes.*45: 129-131.
- COUSIN M.T., J. P.MOREAU. 1966. Rôle d'Euscelis plebejus Fall dans la transmission des maladies à virus du trèfle blanc : étude de la conservation du virus au cours de l'hiver. *Ann.epiphyties.* 17:75-79.
- COUSIN M.T., MOREAU J.P., 1991. Yellow decline of Lavandin (Hybrid L. *Officinalis* x L. *Latifolia*) : a MLO (mycoplasma-like organism) disease. Symptoms, experimental transmission, ultrastructural studies, role of leafhoppers, methods of control. *In* : Raychaudhuri SP. Ed. Recent Advances in Medicinal, Aromatic and Spice Crops. New Delhi, India : Today and Tomorrow's Printers and Publishers 1 : 59-62.
- COUSIN M.T., ROUX J., BOUDON-PADIEU E., BERGES R., SEEMÜLLER E. et HIRUKI C. ;1998. Use of Heteroduplex Mobility Analysis (HMA) for differentiating phytoplasma isolates causing Witches broom disease on *Populus nigra* cv *Italica* and stolbur or Big bud on tomato. *J Phytopathol.* 146 : 97-102.
- COUSIN M. T., BOUDON-PADIEU E., 2001. Phytoplasmes et phytoplasmoses : caractéristiques, symptômes et diagnostic. *Cahier d'études et de recherches francophone/agricultures.* 10 : 76-361.
- COUSIN M.T., BOUDON-PADIEU E., 2002. Phytoplasma and phytoplasma diseases : vectors, control, and research topics. *Cahier d'études et de recherches francophone/agricultures.* 11 : 26-115.
- DAFALLA E.A., 1987. Contribution à l'étude des « jaunisses » à mycoplasmes au soudan : Inventaire partiel dans la région centrale du soudan .Etude de la

- phyllodie de la féverole. Première essais de caractérisation sérologique des agents pathogènes. *Mem. Doc. Université Paris –Sud. Centre d'Orsay*, 92p.
- DAVIES D., GUISE C.M., CLARK M.F. et ADAMS A.N., 1992. Parry's disease of pears is similar to pear decline and is associated with mycoplasma-like organisms transmitted by *Cacopsylla pyricola*. *Plant Pathol* 41 : 195-203.
- DE LA RUE S.J., HOPKINSON R., FOSTER S. et GIBB K. S., 2003. Phytoplasma host range and symptom expression in the pasture legume *Stylosanthes*. *Field Crop Research*. 84 : 327-334.
- DOI Y, TERANAKA M., YORA K.,ASUYAMA H.; 1967. Mycoplasma or PLT-group-like-microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf , potato witches'broom, aster yellows ou pawlonia witches'broom. *Ann. Phytopathol.Soc.Japan* : 3: 259-266.
- FLETCHER J., 1999. Interactions of Phytopathogenic Mollicutes With Insect and Plant Hosts.First internet conference on phytopathogenic mollicutes. <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.html>
- FRISINGHELLI C.L., DELAITI M.S., GRANDO D., FORTI M.E et VINDIMIA N., 2000. *Cacopsylla costalis* (Flor 1861), as a vector of Apple proliferation in Trentino. *J Phytopatho* 148: 425-31.
- GATINEAU F., LARRUE J., CLAIR D., LORTON F., RICHARD-MOLARD M. et BOUDON-PADIEU E., 2001. A new natural planthopper vector of stolbur phytoplasma in the genus *Pentastiridius* (Hemiptera: Cixiidae). *Eur. J. Plant Pathol.* 107 : 263-71
- GIBB K.S., PADOVAN A.C. et MOGEN B.D., 1995. Studies of sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species in northern Australia. *Phytopathol.*85:169-174.
- GUNDERSEND.E et LEE I.M., 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediteranea*. 35 : 144-151.
- GUO Y.H., CHENG Z.M. WALLA J.A. et ZHANG Z., 1998. Large-scale screening for X-disease phytoplasma infection in chokecherry. *Hort Science*. 33 : 293-5.
- HARRISON N.A et ELLIOTT M. L.,2007. Lethal Yellowing (LY) of Palm¹.<http://edis.ifas.ufl.edu>.
- HEINRICH M., BOTTI S., CAPRARA L., ARTHOFER W., STROMMER S., HANZER V., KATINGER H., BERTACCINI A. et CAMARA MACHADO M.L., 2001. Development and evaluation of improved detection methods for phytoplasmas in fruit trees. *Phytoplasma.Plant Molecular Biology Reporter*. 19:169-179.
- <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html?lang=fr&item=526&year=2005>
- JENSEN D., GRIGGS D., GONZALES W.H. et SCHNEIDER C.Q., 1964. Pear decline virus transmission by pear psylla. *Phytopathology*, 54 :51- 1346.
- KESUMAWATI E., KIMATA T., UEMACHI T., HOSOKAWA M. et YAZAWA S., 2006. Correlation of phytoplasma concentration in *Hydrangea macrophylla* with green-flowering stability. *Scientia horticultura*. 10 : 74-78.

- KUNZE L., 1976. The effect of different strains of apple proliferation on the growth and crop of infected trees. *Mitt Biol Bundesamt Land-Forstwirtschaft Berlin-Dahlem*.170: 15-107.
- LECLANT F., LACOTE J.P. ; 1969 .Recherches sur les vecteurs du stolbur dans le Midi de la France. (Homoptera : Cixiidae). *Ann Phytopatho* . 19 : 42-439.
- LEE I.M., DAVIS R.E., CHEN T.A., CHIYKOWSKI L.N., FLETCHER J., HIRUKI C. et SCHAFF D.A. ; 1992. A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms (MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology*. 82:977-986.
- LEE I.M., BERTACCINI A., VIBIO M. et GUNDRSEN D.E.;1995. Detection of multiples phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology*. 84:559-566.
- LEE I.M., 1999. Molecular- based methods for the detection and identification of phytoplasmas. First internet conference on phytopathogenic mollicutes. <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/boud8290.html>.
- LEE I.M., DAVIS R., GUNDERSEN E., et RINDAL D.E. ; 2000. PHYTOPLASMA : Phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol*. 54 : 221-255.
- LEFOL C., LHERMINIER J., BOUDON-PADIEU E., LARRUE J., LOUIS C. et CAUDWELL A. ;1994. Propagation of flavescence dorée MLO (mycoplasma-like organism) in the leafhopper vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *J Inverteb Pathol*. 63 : 285-93.
- LEMOINE J., 1991. Dépérissement du poirier : rôle de *Psylla pyri* dans sa dissémination. *Arboriculture fruitière*. 442 : 28-32.
- Maladies de dégénérescence des arbres fruitiers à pépins (Pommiers, Poiriers)
Maladies à viroïdes, virus, phytoplasmes. <http://www.angers.inra.fr/dossiers/virus/fichvir2.html>.
- LHERMINIER J., PRENSIER G., BOUDON-PADIEU E. et CAUDWELL A.; 1990: Immunolabeling of grapevine flavescence dorée MLO in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 38: 79-85.
- LINS , SEARS , 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionary distinct from animal mycoplasmas. *J Bacteriol*. 1989. 171 : 5901-6.
- LORENZ K., SCHNEIDER B., AHRENS U. et SEEMULLER E.;1995.Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathol*. 85 : 771-776.
- MAILLET P.L., GOURANTON J., 1971. Étude du cycle biologique du mycoplasme de la phyllodie du trèfle dans l'insecte vecteur, *Euscelis lineolatus* Brullé (Homoptera, Jassidae). *Journal de Microscopie*. 11 : 143-62.
- MAIXNER M., 1994. Transmission of German grapevine yellows (Vergilbungskrankheit) by the planthopper *Hyalesthes obsoletus* (Auchenorrhyncha: Cixiidae). *Vitis* .33: 14-103.

- MARAMOROSCH K., 1952. Direct evidence for multiplication of aster yellows virus in its insect vector. *Phytopathology*. 42 : 59-64.
- MCCOY R.E., HOWARD F.W., TSAI J.H.; 1993. Lethal yellowing of palms. Univ FI IFAS Agric Exp Stn Tech Bull; 834 : 1-100.
- MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DU DEVELOPPEMENT RURAL, 2005. Statistiques Agricoles : superficies et production. Série « B »2004 : 42-60.
- MORVAN G.; 1977. Apricot chlorotic leafroll. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 7. 37-55.
- MYRTA A., ERMACORA P., STAMO B. et OSLER R., 2003. Identification of European Stone Fruit Yellows from apricot and Japanese plum in Albania. Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *Options Méditerranéennes*. 45 : 129-131.
- NAPPO, 2007. Apple proliferation phytoplasma. Phytosanitary alert system. Pest alert [www ; pestalert.org](http://www.pestalert.org) .
- NYNNE M., CHRISTENSEN K.B., AXELSEN M.N. et SCHULZ A., 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Plant science*. 10 : 526-535.
- OEPP/CABI., 1996 . Peach X-disease phytoplasma. In / organismes de quarantaine pour l'Europe . 2^{ème} édition. CAB International, Wattingford, Royaume Uni.
- OEPP, 1998. Methodes phytosanitaires. Phytoplasmes des arbres fruitiers et de la vigne. méthode de test et d'inspection. <http://archives.eppo.org>.
- OEPP, 1999. Organismes nuisibles présents dans l'Union Européenne, interdits d'introduction et de dissémination et/ou de lutte obligatoire limitée dans le temps et sur une zone déterminée. Bulletin OEPP , 5p.
- PALMANO S. ;2001. A comparison of different phytoplasma DNA extraction methods using competitive PCR. *Phytopathol. Mediterr.* 40 : 99–107.
- PRACROS P., 2000. La collection de phytoplasmes. Génomique, développement, pouvoir pathogène.[http://www. phytoplasme\phytoplasmoses\Génomique, Développement, Pouvoir Pathogène collection phytoplasmes.html](http://www.phytoplasme\phytoplasmoses\Génomique, Développement, Pouvoir Pathogène collection phytoplasmes.html).
- QUERCI M., SOMMA M.; 2004. The Polymerase Chain Reaction. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. 6:3-31.
- QUERCI M., JERMINI M. et VAN DEN EEDE G., 2004. Agarose Gel Electrophoreses. *The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms*. 5, 3-12.
- RAMEL M.E., GUGERLI P. et SCHAUB L., 2003. Enroulement chlorotique de l'abricotier European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY). *Revue suisse de Viticulture, Arboriculture et Horticulture*. 35 : 522-531.
- SAHRAOUI K., 1989. Essai d'identification d'une maladie soupçonnée d'origine mycoplasémique sur fève (*Vicia faba* L). Mem. Ing. Agro. I.N.A. El Harrach, 83p.
- SAVOURE., 1984. Les mycoplasmoses des plantes ornementales : Etude de la virescence de l'hortensia. Rapport de stage . INRA Versailles.
- SCHNEIDER, B., SEEMULLER E., SMART C. et KIRPATRICK B.; 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic Mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. *Cytobios*. 102:133-147.

-
- SCHVESTER D., MOUTOUS G., BONFILS J. et CARLE P. ; 1962. Étude biologique des cicadelles de la vigne dans le Sud-Ouest de la France. *Ann Epiphyties*. 13: 37-205.
- SEEMULLER E., LORENZ K.H. et LAUER U. ;1998. Fruit tree phytoplasmas. Pear decline resistance in *Pyrus communis* rootstocks and progenies of wild and ornamental *Pyrus* taxa. In: Hadidi A, ed. Proc. 17th Int. Symp. on Fruit Tree Virus Dis. *Acta Hort*. 472 : 681-7.
- SEEMÜLLER E., 1999. On some problems in temperate fruit tree phytoplasma research. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes <http://www.iniud.it/phytoplasma/pap/seem2700.html>.
- SFORZA R., CLAIR D., DAIRE X., LARRUE J. et BOUDON-PADIEU E., 1998. The role of *Hyalesthes obsoletus* (Hemiptera: Cixiidae) in the occurrence of "Bois noir" of grapevines in France. *J Phytopathol*. 146: 56-549.
- SMART C., SHNEIDER B., BLOMQUIST C., GUERRA L., HARRISON N., AHRENS U., LORENZ K., SEEMULLER E. et KIRKPATRICK B.;1996. Phytoplasma specific PCRprimers based on sequences of the 16S-23S r RNA spacer region. *Appl Environ Microbiol*.62:2988-2993.
- SUCHOV K. C., VOVK A.M., 1948. Biology of the planthopper *Hyalesthes obsoletus* Sign, vector of the stolbur virus. *Trudy instituta genetiki* .15 : 193-202.
- TANNE E., BOUDON-PADIEU E., CLAIR D., DAVIDOVICH M., MELAMED S. et KLEIN M., 2001. Detection of Phytoplasma by Polymerase Chain Reaction of Insect Feeding Medium and Its Use in Determining Vectoring Ability. *Bacteriology*. 91:741-745.
- VISWANATHAN R., PADMANABAN P., RAMESH SUNDAR A., PRAKASAM N. et TRIPATHI B.K., 1999. Different aerated steam therapy (AST) regimes on grassy shoot disease caused by phytoplasmas in sugarcane. First Internet Conference on Phytopathogenic Mollicutes <http://www.uniud.it/phytoplasma/pap/muse0100.html>
- WOOD G.A., 1997. Viruses and phytoplasma in European pear trees in New Zealand and the role of these pathogens in the compatibility of pear with quince rootstocks. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 25 : 333-40.

Annexe produits chimiques

I- Microscopie photonique :

- Fixateur Formalin - Aceto- Alcool (FAA) :
 - Alcool éthylique à 50° ou 70°90ml
 - Acide acétique glacial.....5ml.
 - Formol..... 5ml
- Solution stock du colorant :
 - DAPI.....10mg.
 - Eau distillée.....200ml.

II- Extraction d'ADN :

- Tampon PG (Phytoplasma Grinding) :
 - K_2HPO_4
..... 8.72g
 - KH_2PO_4
..... 2.04g
 - Saccharose.....50g
 - Albumine bovine.....0.75g
 - PVP.....10g
 - EDTA.....2.92g
 - Acide ascorbique.....2.20g
 - Eau distillée.....500ml
- Tampon CTAB :
 - CTAB.....1g.
 - Tris.....0.6g
 - NaCl.....4.09g
 - EDTA.....0.29g
- Tampon TE :
 - Tris-HCl (PH=8).....0.6g
 - EDTA.....0.14g

III- Polymerase Chain Reaction:

III.1. Amplification de l'ADN :

- Préparation des amorces diluées à 1µg/µl :

-P1.....	439µg-
TE.....	439µl.
-P7.....	280µg
-TE.....	280µl-
RU3.....	369µg
-TE.....	369µl
-fU5.....	119µg
-TE.....	119µl

- Préparation des amorces diluées à 0.1µg/µl.

On prélève 50µl de chaque amorce qu'on dilue dans 450 µl d'eau distillée.

- Préparation de la mixture (pour un échantillon) :

- Tampon loading 10*.....	2.5µl
- DNTP.....	2µl
- Eau distillée.....	17.5µl
- Amorce.....	1µl
- T aq polymérase.....	0.25µl
- ADN de l'échantillon.....	1µl

III.2- Migration sur gel d'agarose (1 %) :

- Tampon TBE10*

- Tris.....	54g
- Acide borique.....	27.5g
- EDTA.....	7.44g
- Eau distillée.....	1000ml

- Tampon de charge.

- Bleu de bromophénol.....	0.25g.
- Saccharose.....	40g.

- Bromure d'ethidium

- Bromure d'éthidium.....	0.1g.
- Eau distillée.....	10ml.

- Préparation du gel.

- Tampon TBE 0.5*.....	200ml
- Agarose.....	2g
- Bromure d'ethidium.....	40µl