



Université Mohamed Khider de Biskra

Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie

Département des sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Référence / 2022

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté et soutenu par :
Moussaoui Fatima et Guidouam Amina

Le : jeudi 23 juin 2022

Etude de l'état sanitaire du vignoble Algérien (les maladies virales qui affectent la vigne)

Jury:

Dr.	Toufik Amairi	MCA	Université de Biskra	Président
Mme.	ACHOUR Hanane	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Dr.	Fethi Benbelaid	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire: 2021-2022

Remerciements

Au terme de cette étude, nous tenons tout d'abord à remercier Allah est le Seigneur Tout-Puissant de l'univers qui nous donne la capacité, la volonté et la patience nécessaires pour faire le travail qui nous a guidés sur le bon chemin.

Nous tenons ensuite à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur M. Achour Hanane, qui nous a suivi tout au long de nos travaux et nous est très reconnaissant de ses conseils avisés, de sa disponibilité continue et de sa surveillance sans faille.

Merci à tous les enseignants qui nous ont enseigné, depuis le primaire jusqu'au supérieur.

Enfin, merci à tous ceux de près ou de loin qui ont contribué à la réalisation de ce modeste travail, qui ont trouvé à travers ce document l'expression de notre infinie gratitude.

Dédicaces

Moi Fatima, Je dédie mon mémoire à :

-Mes très chers parents : PAPA et MAMA, la source d'amour et d'affection qui représentent pour moi l'exemple de sacrifice qu'ils m'ont encouragé et m'aide dans ma vie et mes études.

- Mes chères sœurs Hassiba et Sihem ; je leur souhaite une vie pleine de joie.

- Mes chers frères : Okba, Abdlbaki et Moncef ; je leur souhaite une vie pleine de réussite et de brillance dans tous les domaines et beaucoup de solidarité.

- Et à tous mes chers amis, merci d'être là et je souhaite tout le bonheur et le succès.

En fin, je dédie ce mémoire à tous ceux qui m'aiment et surtout à tous ceux que j'aime.

Et moi Amina, Je dédie mon mémoire à :

- Chers parents, merci de votre présence et de votre soutien tout au long des années scolaires, Vous êtes un exemple de travail, de diligence et de persévérance.

- A mes sœurs Karima et Roaya, tout le bonheur et le succès pour vous.

- À mes frères Mourad et Fares, tout le meilleur pour vous dans votre vie et tout le bonheur. La miséricorde de Dieu sur mon frère Mohamed.

- Merci à toutes les bonnes personnes qui ont été la source de tout ce qui est beau dans ma vie et en particulier ma chère amie et mon binôme Fatima, Je vous souhaite tout le bonheur et le succès dans votre vie toujours et toujours. Tu es la meilleure amie et sœur de tous les jours, méritent le meilleur et le plus beau.

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Sommaire	
Liste des tableaux	I
Listes des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Partie 1 : Synthèse Bibliographique

Chapitre 1 : Généralité sur la vigne

1. Origine et développement de la viticulture	3
2. La viticulture en Algérie	3
3. Les principales variétés de vigne en Algérie	4
3.1. Cépages de tables	4
3.2. Cépages à raisin sec	5
4. Systématique (Taxonomie de la vigne)	5
5. Eléments de morphologie et d'anatomie de la vigne	6
5.1. Morphologie de la vigne	6
5.1.1. Organes végétatifs	6
5.1.2. Organes reproducteurs	7

Chapitre 2 : Les Maladies Virales de la Vigne

1. Les Maladies Virales Chez La Vigne.....	9
1.1. Le court-noué ou dégénérescence infectieuse	9
1.1.1. Description.....	9
1.1.2. Symptômes	9
1.1.3. Transmission	11

1.1.4. Les effets de la maladie sur les cultures	11
1.2. Virus de l'enroulement foliaire	11
1.2.1. Description.....	11
1.2.2. Symptôme	12
1.2.3. Transmission.....	12
1.2.4. Les effets de la maladie sur les cultures	12
1.3. Le complexe du bois strié (Le bois rugueux).....	13
1.3.1. Description.....	13
1.3.2. Symptômes	13
1.3.3. Transmission	14
1.3.4. Les effets de la maladie sur les cultures	14

Chapitre 3 : les méthodes de diagnostic des maladies virales.

1. Diagnostic des maladies virales	15
1.1. Méthodes de détection des viroses par l'observation directes des symptômes (La symptomatologie directe) (Amedjkouh, 2004) :	15
1.2. Détection par la sérologie	15
1.2.1. Le test Elisa.....	15
1.2.2. Principes du Test Elisa	16
1.2.3. Le protocole d'Elisa (DAS-ELISA).....	16
1.2.4. Les étapes de protocole d'Elisa :.....	17
1.3. Technique de biologie moléculaire (RT-PCR).....	18
1.3.1. Le principe de PCR	18
1.3.2. Protocole pour la détection des virus par reverse transcription-PCR (Arezki, 2016) :	18

Partie 2 : Partie expérimentale

Chapitre 4 : Matériels et Méthodes

1. Stratégie de travail	20
2. Matériel biologique	20

2.1. L'étude A d'Amedjkouh Hafida(2004)	20
2.2. L'étude B de Tabouche Aicha (2004)	20
2.3. L'étude C de Lehad Arezki (2012).....	21
2.4. L'étude D d'A.Lehad et <i>al.</i> (2014).....	21
2.5. L'étude E d'Idir Idris (2016).....	21
2.6. L'étude F de M. Rahali et <i>al.</i> (2019)	22
2.7. L'étude G de M.Tahirine et <i>al.</i> (2019).....	23
2.8. L'étude H d'Aleš Eichmeier et <i>al.</i> (2020).....	23
3. Méthodes de diagnostic	24
3.1. L'étude A d'Amedjkouh Hafida (2004)	24
3.1.1. L'inoculation mécanique sur indicateurs herbacés	24
3.1.2. La méthode classique directe DAS-ELISA (double antibody sandwich)	25
3.2. L'étude B de Tabouche Aicha (2004)	26
3.2.1. Détection biologique: l'inoculation mécanique à des plantes testes herbacées (Tabouche, 2004).....	26
3.2.2. Méthode de l'indexage biologique :.....	26
3.2.3. Séro-détection	27
3.4. L'étude C de Lehad Arezki(2012).....	27
3.4.1. Le test immuno-enzymatique.....	27
3.4.2. Identification des virus <i>GLRaV-3</i> et <i>5</i> par RT-PCR.....	28
3.5. L'étude D d'A. Lehad et <i>al.</i> (2014).....	29
3.5.1. Méthodes sérologique DAS-ELISA.....	30
3.5.2. Méthodes biochimique par RT-PCR.....	30
3.6. L'étude E d'Idir Idris (2016).....	32
3.7. L'étude F de M. Rahali et <i>al.</i> (2019)	33
3.7.1. Extraction des ARN totaux.....	34
3.7.2. Rétro transcription (RT)	34

3.7.3. PCR quantitatif.....	35
3.8. L'étude G de M.Tahirine et al. (2019).....	36
3.8.1. Test DAS-ELISA	36
3.8.2. Test Electrophorèse SDS-PAGE.....	37
3.9. L'étude d'Aleš Eichmeier et <i>al.</i> (2020)	38

Chapitre 5 : Résultats et discussion

1. Les résultats	41
1.1. L'étude A d'Amedjkouh Hafida (2004)	41
1.1.1. Observation directe des symptômes	41
1.1.2. Indexage par inoculation mécanique sur indicateurs herbacés	42
1.1.3. Test Elisa	43
1.2. L'étude B de Tabouche (2004).....	43
1.2.1. Pour l'indexage biologique.....	43
1.2.2. Résultats de la DAS-ELISA	45
1.3. L'étude C de Lehad Arezki (2012).....	45
1.3.1. Observations des symptômes dans les vignobles prospectés (l'état général des vignobles).	45
1.3.2. Analyse sérologique	46
1.3.3. Détection RT-PCR des virus <i>GLRaV-3</i> et <i>5</i>	49
1.3.4. Comparaison test sérologique et RT-PCR.....	50
1.4. L'étude D d'A. Lehad et <i>al.</i> , (2014).....	51
1.4.1. Etat générale des vignobles	51
1.4.2. Analyse sérologique	52
1.4.3. Analyse moléculaire	55
1.5. L'étude D d'Idir Idris (2016)	56
1.5.1. Analyse symptomatologique.....	56
1.5.2. Analyse biologique.....	57

1.5.3. Analyse sérologique (test DAS-ELISA)	58
1.6. L'étude E de M. Rahali et <i>al.</i> (2019).....	60
1.7. L'étude F de M.Tahirine et <i>al.</i> (2019)	62
1.7.1. Etat générale des vignobles (observation symptomatologique) :	62
1.7.2. Test sérologique	63
1.7.3. Test biochimique : Electrophorèse (SDS-PAGE).....	65
1.8. L'étude d'Aleš Eichmeier et <i>al.</i> (2020).....	66
1.8.1. Résultats de la détection du <i>GPGV</i> par RT-PCR.....	66
1.8.2. Détection des virus et viroïdes par séquençage des petits ARN	67
1.8.3. Description des virus détectés (Aleš Eichmeier et <i>al.</i> 2020) :	67
1. Discussion analytique	67
2. Discussion des résultats	68
Conclusion & perspectives	41
Références Bibliographiques	71
Annexes	71

Liste des tableaux

Tableau 1. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	20
Tableau 2. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	20
Tableau 3. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	21
Tableau 4. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	21
Tableau 5. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	Error! Bookmark not defined.
Tableau 6. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	22
Tableau 7. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	23
Tableau 8. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.....	23
Tableau 9. Matériel végétal utilisé pour le test Elisa.	25
Tableau 10. Les amorces utilisées pour la détection de <i>GLRaV-3 et GLRaV-5</i>	29
Tableau 11. Les amorces utilisés pour la détection de la <i>GLRaV-1, 2, 3</i>	31
Tableau 12. Les conditions d'amplification.	31
Tableau 13. Les paires d'amorces oligonucléotidiques qui ont été utilisées pour l'analyse qPCR.....	35
Tableau 14. Les symptômes pathologiques de chaque maladie.....	41
Tableau 15. Expression des plants de concombre à l'inoculation	44
Tableau 16. Taux d'infection dans les stations prospectées	45
Tableau 17. Les réactions des échantillons vis-à-vis de différents antisérums.....	46
Tableau 18. La prédominance des virus de l'enroulement foliaire de chaque type de cépage	47
Tableau 19. La prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne entre la région centre et ouest de l'Algérie.	49
Tableau 20. Le nombre d'échantillons testés par cépages.....	49
Tableau 21. Comparaison des résultats obtenus ELISA et RT-PCR de la détection des virus <i>GRLaV-3 et 5</i>	50
Tableau 22. La comparaison entre les infections simples et les infections multiples	53
Tableau 23. Prévalence des virus <i>GLRaV-1, 2 et 3</i> dans les différents cépages.....	54
Tableau 24. Les résultats observés pour chaque virus par RT-PCR.....	55
Tableau 25. Les résultats de la transmission mécanique sur le concombre (<i>Cucumis sativus</i>) par des souches virales et de différentes stations.	57
Tableau 26. Les résultats de test sérologique DAS-ELISA selon les stations et différentes cépages	59

Listes des figures

Figure 1. Production viticole mondiale par région.	3
Figure 2. Classification de la vigne (Famille des <i>Vitacées</i>).....	6
Figure 3. Morphologie générale de la vigne	8
Figure 4. Symptômes du court-noué de la vigne sur la plante	10
Figure 5. Dégât de la maladie de court-noué dans une parcelle.....	10
Figure 6. Les symptômes de l'enroulement foliaire, chez une variété rouge.....	12
Figure 7. Symptômes de la maladie du bois strié, avec des piqûres et gorges sur la tige.	13
Figure 8. Plaque de polystyrène de test d'Elisa	16
Figure 9. Les différents symptômes induits par le virus <i>GLRaV</i> sur les feuilles, chez les trois espèces indicatrices	42
Figure 10. Symptôme d'enroulement foliaire de la vigne : Sur un cépage rouge <i>Alicante de Bouchet</i> (A), et cépage <i>Dattier de Beyrouth</i>	52
Figure 11. Comparaison entre l'infection multiple et simple	53
Figure 12. Colonnes graphiques illustrant le nombre des symptômes observées dans les différentes régions et cépages.	57
Figure 13. Un diagramme circulaire montre le taux d'infection à partir de test DAS-ELISA	59
Figure 14. Répartition montrant en pourcentages le statut sanitaire de la vigne cultivée à Babar.....	61
Figure 15. Répartition montrant en pourcentages l'infection par chaque virus de la vigne cultivée à Babar	61
Figure 16. Des modifications de couleur observées durant la prospection.....	62
Figure 17. Histogramme de fréquence d'infection des échantillons prélevés par cépage.	64
Figure 18. Histogramme de fréquence d'infection des échantillons prélevés par wilaya prospecté	65
Figure 19. Le gel de la SDS-PAGE.....	66
Figure 20. Symptômes fréquemment observés chez les positifs au <i>GPGV. Sabel</i> échantillonné dans la région de Boumerdes.....	67

Liste des abréviations

ArMV	Arabis mosaic virus
CP	Protéine d'enveloppe
DO	Densité optique
EDTA	Éthylène-diamine-tétra-acétique
É.SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Assay
GLRaV	Grapevine leafroll-associated virus
GFLV	Grapevine fanleaf virus
GRSPaV	Grapevine Rupestris stem pitting-associated
GVA	Grapevine virus A
HSP70h	Gène de l'homologue 70 de la protéine de choc thermique
Nbre	Nombre
NLS	Non-linear Schrodinger
Mg²⁺	Magnésium
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction / Réaction de polymérisation en chaîne
PBS-Tween	Phosphate Buffered Saline with Tween TM 20
PNPP	P. Nitrophenyl-phosphate
qPCR	PCR quantitative
RFU	Unités de fluorescence relative
RNase	Ribonucléase
rpm	Rotation Par minute

RT-PCR	Reverse trascription- PCR
RT-qPCR	Reverse transcriptase quantitative PCR
RW	Rugose Wood
Taq	Thermus aquaticus
TNA	Acide nucléique total
UV	Ultraviolet

Introduction

La vigne est l'une des cultures les plus importantes et les plus répandues dans les régions à climat tempéré et revêt d'une grande importance économique, en particulier dans le bassin méditerranéen (Amedjkouh, 2004).

La viticulture en Algérie remonte à l'Antiquité, et notamment à la colonisation romaine car elle a trouvé les conditions agro-climatiques idéales pour son développement. Ainsi, la vigne algérienne était à l'origine un fait colonial, marqué par une richesse naturelle sous le soleil de notre pays, enracinée dans nos terroirs avec la force de la tradition (Elmaghili, 2017).

La vigne joue un rôle important dans l'agriculture de nombreux pays. En Algérie, les conditions climatiques favorisent son développement, et ces conditions expliquent la richesse des cépages viticoles algériens. La vigne porteuse de culture ancestrale et l'art de vivre, est une plante ligneuse très importante grâce à sa rusticité, elle permet de mettre en valeur les sols à fortes pentes, rocheux et pauvres (A.Lehad, 2012 ; Mahboub, 2017).

Son importance réside dans la production de fruits, de raisins, Commercialisé sous forme de raisin de table et de jus. Il y a d'autres usages des produits Viticoles : production de dérivés brassage (moût, tartre), boissons à base de raisins, dérivés alimentaires (huile de pépins de raisin) et produits cosmétique (Allali, 2017).

Comme tout autre organisme vivant animal ou organisme humain, la vigne est attaquée par des agresseurs biologiques (facteurs biotiques) tels que les bactéries, les virus, les nématodes, les champignons, et les insectes, etc. Il est également être endommagé par divers facteurs environnementaux (facteurs abiotiques) tels que la chaleur, le vent, l'humidité ou la sécheresse (Rezgui, 2016).

Aujourd'hui, la grande majorité des vignobles algériens souffrent de maladies dégénératives virales, telles que le court-noué et le virus de l'enroulement foliaire, ce qui peut aggraver la situation actuelle (Tahirine, 2015).

Les maladies virales sont le plus gros problème de la vigne dans le monde car la lutte chimique est impossible. Ces virus sont responsables de pertes importantes de récolte, de vigueur et de longévité de la vigne (Amedjkouh, 2004). Ces maladies sont transmises par le matériel reproductifs infecté (greffons et porte greffes). Risque accru

lorsqu'elles sont transmises par des vecteurs (nématodes, cochenilles, cicadelles) (Morsli, 1995).

L'objectif de notre travail est d'analyser l'état sanitaire du vignoble algérien et l'étude des maladies virales et les méthodes de diagnostic de ces maladies qui causent des pertes annuelles considérables.

Pour réaliser ce travail on a suivi cinq chapitres :

- Le premier concernera la recherche bibliographique (généralité sur la vigne, présentation de la vigne).
- Le deuxième chapitre présente les différentes maladies virales de la vigne.
- Le troisième chapitre traite les différentes méthodes de diagnostic de ces maladies.
- Le quatrième chapitre présente le matériel et les méthodes qui sont utilisés par les études choisies.
- Le cinquième chapitre est consacré aux résultats étudiés suivis d'une partie de Discussion.

Partie 1 :

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1 :

Généralité sur la vigne

1. Origine et développement de la viticulture

Les origines de cette culture, que l'on retrouve aujourd'hui dans le monde entier, pourraient avoir été dans le nord-ouest de la Turquie, le nord de l'Irak, l'Azerbaïdjan et la Géorgie (Creasy et *al.* (2009) ; A.Lehad, (2012). La production viticole mondiale est concentrée en Europe, et les plus grands producteurs sont l'Italie, l'Espagne et la France. En Asie est représenté presque les $\frac{3}{4}$ de la production mondiale (figure 1). La Chine occupe la première place suivie par l'Italie, les Etats Unis d'Amérique puis l'Espagne en termes de production. En revanche, la production africaine ne représente que 5.8% de la production mondiale, les principaux producteurs étant l'Afrique du Sud, l'Egypte, l'Algérie, le Maroc et la Tunisie. Par conséquent, l'Algérie classée comme le troisième plus grand pays producteur de viticole en Afrique (Arezki, 2016).

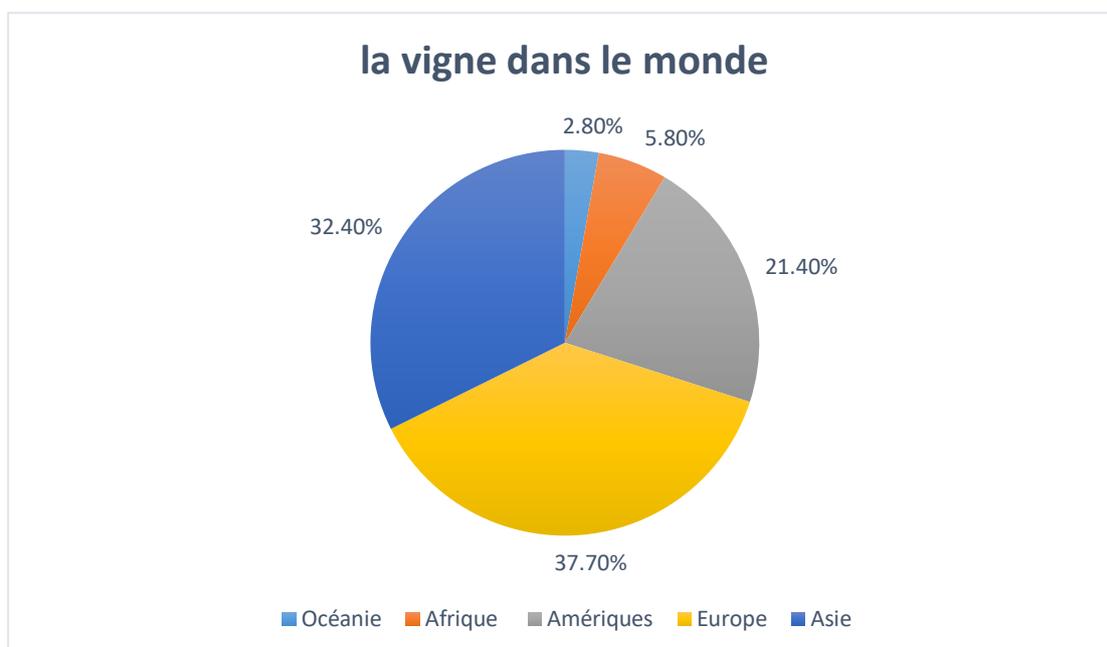


Figure 1. Production viticole mondiale par région (Arezki, 2016).

2. La viticulture en Algérie

Bien que la vigne soit cultivée depuis l'Antiquité, la viticulture en Algérie a connu un énorme essor pendant la période coloniale, le vignoble passant de 23 000 hectares à 123 000 hectares entre 1880 et 1896. Cependant, après l'indépendance, en raison de facteurs politico-économiques et pédo-climatiques, la culture de la vigne en Algérie a considérablement diminué. A partir de 2000, un programme de soutien a permis de faire revivre cette culture (A.Lehad, 2012).

3. Les principales variétés de vigne en Algérie

D'après Elmaghili (2017), Il existe des centaines de raisins ou cépages, parmi lesquels on distingue : raisins de cuve, les raisins blancs ou rouges, les cépages de table et les autres cépages utilisés pour le séchage. Les vignes cultivées pour la production de raisins de table doivent produire des fruits de haute qualité propres à la consommation en frais. Les raisins de table doivent avoir un certain nombre de qualités commerciales (flatter l'œil, conserver ces qualités lors des opérations de conditionnement et de transport).

La période de maturité joue un rôle économique et permet de classer les cépages selon l'échelle commerciale en :

- Raisins précoce → Mi-juin/début juillet.
- Raisins de saison → Fin juillet/début novembre.
- Raisins tardifs → De mai à fin décembre.

3.1. Cépages de tables

Les raisins de table sont les fruits de la vigne, et du fait de ces propriétés, ils sont essentiellement destinés à la consommation en nature, avec une grande hétérogénéité dans les conditions naturelles (raisin précoce, de saison et tardif) (MAHBOUB, 2017).

➤ Les raisins précoces

En Algérie, les raisins précoces sont les premiers à arriver sur le marché car ils mûrissent dans les premières semaines de juillet (MAHBOUB, 2017).

✚ **Chasselas** : Le chasselas est un cépage blanc de très bonnes qualités gustatives (MAHBOUB, 2017).

✚ **Le cardinal** : cépage noir adaptés aux zones côtières, centrales et occidentales (MAHBOUB, 2017).

➤ **Raisins de saison** : Ce sont des véritables raisins de table (Mahboub, 2017) :

✚ **Dattier de Beyrouth** : raisin blanc, excellent raisin de table.

✚ **Alphonse la vallée** : Appelé aussi gros noir en raison de la dimension et de la couleur de ses baies.

✚ **Muscat de Hambourg** : Grosses grappes de raisins noirs.

✚ **Muscat d'Alexandrie (Muscat de Cherrhell)**: Grappes grandes, Résiste assez bien à la sécheresse.

✚ **Italia** : Raisin blanc, Grappes assez grandes.

➤ Raisins tardifs

Ils sont cultivés dans les zones montagneuses (Mahboub, 2017) :

- ✚ **Ahmar Bou-Amar** : Raisins roses (Cépage rouge) de « troisième époque », un beau cépage de table aux grosses grappes, cultivée dans toutes les régions de montagne (Kabylie, Médéa, Tlemcen, Mascara, Jijel) (Figure 5A) (Mahboub, 2017 ; Sahli, 2009).
- ✚ **Valenci ou mokrani** : D'origine espagnole de la région de Valence, c'est une variété de « quatrième époque ». Il est cultivé dans les zones de montagnes (Médéa, Tlemcen, Mascara, Maghnia). Il est modérément plus résistant au transport et plus résistant aux maladies qu'Ahmar Bou Amar (Figure 5B) (Mahboub, 2017 ; Sahli, 2009).

3.2. Cépages à raisin sec

Sont des raisins secs. Ils peuvent être consommés crus dans certaines recettes. Les raisins secs sont très sucrés (Mahboub, 2017).

- ✚ **King 's Ruby** : Cépages introduit en Algérie en Mascar, Médéa, Tipaza et Boumerdès. Grappe Très grandes (Figure 6B) (Mahboub, 2017).
- ✚ **Sultanine blanche** : Est un cépage blanc de raisin de table sans pépins. C'est très cultivé dans le monde pour la production de raisin frais et la préparation de raisins Sec (Figure 6A) (Mahboub, 2017).

4. Systématique (Taxonomie de la vigne)

Les vignes sont des lianes de la famille des *Vitacées*, appartenant au genre *Vitis* (Figure 02). Et largement cultivées pour leur fruit en grappes. Ainsi possédant des vrilles facilitant l'accrochement au support et la fixation sur le sol. L'espèce *Vitis vinifera* contient de nombreuses variétés qui dans le cas de la vigne portent le nom du cépage. Il existe plusieurs milliers de cépages issus de l'espèce *Vitis vinifera* (A.Lehad, 2012).

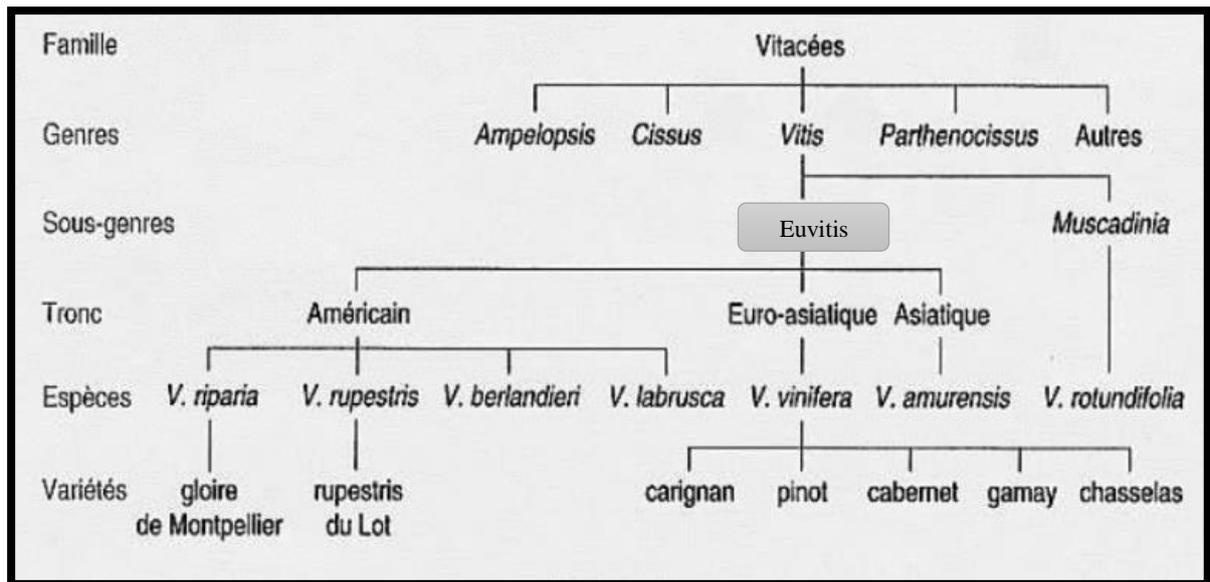


Figure 2. Classification de la vigne (Famille des *Vitacées*) (Chauvet et Reynier., 1979 ; Crespy, 1992).

Selon Amedjkouh(2004), Presque toutes les vignes cultivées appartiennent au sous genre *Euvitis*, qui peut être divisé en trois groupes :

- Groupe eurasiatique** : comporte une seule espèce *Vitis vinifera* qui comprend des milliers de variétés cultivées.
- **Groupe asiatique** : comprend dix espèces, la plus connue est *Vitis amurensis*.
- Groupe américain** : composé de plusieurs espèces, les plus importants sont *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis lambusca* et *Vitis berlandieri*.

5. Eléments de morphologie et d'anatomie de la vigne

5.1. Morphologie de la vigne

5.1.1. Organes végétatifs

- **Les racines**

Le système racinaire des plantes issues de graines est la racine pivotante, constituée de racine principale et de radicules (Chauvet et Reynier, 1979 ; Amedjkouh, 2004).

- **La tige**

Un plant de vigne est appelé couramment pied ou cep. Il présente des formes très variées. Le tronc est plus ou moins tordu car la vigne âgée, il est recouvert d'une écorce d'autant plus épaisse (voir la figure 03) (Huglin, 1986 ; Amedjkouh, 2004).

- **Les feuilles**

La feuille de vigne est simple, dentée et à des sinus plus ou moins accentués. (Huglin, 1986) Les plus largement utilisées en ampélographie pour la détermination des cépages (voir la figure 03) (Ribereau-Gayon J, Peynaud E, 1971 ; Amedjkouh, 2004).

- **Les vrilles**

Généralement, les vrilles de la vigne sont bifurquées. Ils comprennent le pédoncule (voir la figure 03) (Ribereau-Gayon J, Peynaud E, 1971 ; Amedjkouh, 2004).

- **Les bourgeons**

Ils se caractérisent par leur possibilité de développement (voir la figure 03) (Amedjkouh, 2004).

5.1.2. Organes reproducteurs

- **Les fleurs et inflorescence**

Les fleurs de la vigne sont toujours regroupées en inflorescences (grappes). Le nombre des fleurs varient selon le cépage (voir la figure 03) (Ribereau-Gayon J, Peynaud E, 1971 ; Amedjkouh, 2004).

- **Le fruit : la grappe et les baies**

Les grappes poussent des vrilles opposées aux feuilles (voir la figure 03) (Amedjkouh, 2004).

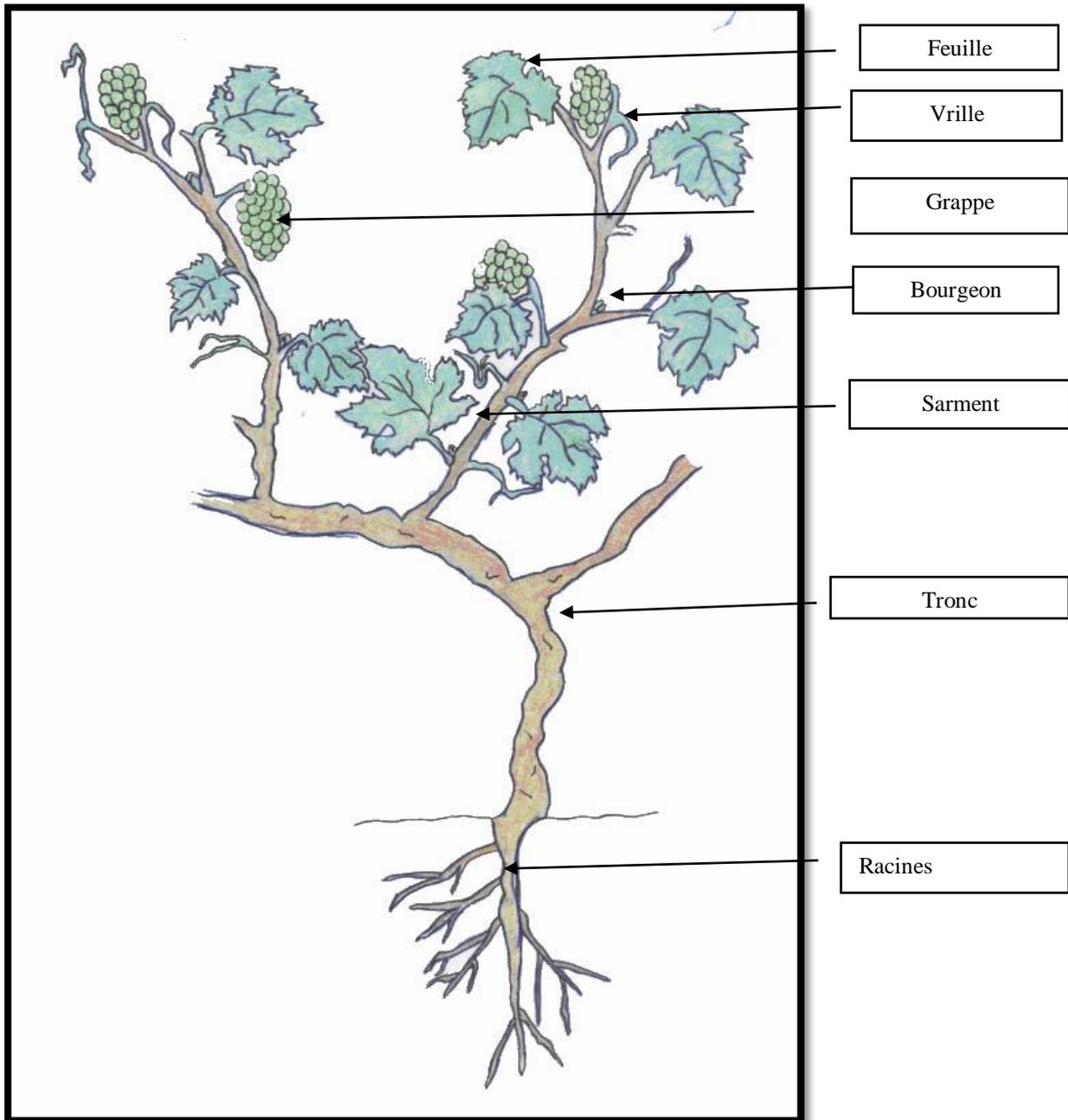


Figure 3. Morphologie générale de la vigne (Amedjkouh, 2004).

Chapitre 2 : Les Maladies

Virales de la Vigne

1. Les Maladies Virales Chez La Vigne

Les virus vivent dans les cellules des plantes contaminées, provoquent des troubles entraînant un changement dans les capacités de la plante tels que : diminution de la quantité de récolte et généralement de la qualité, affaiblissement et vieillissement prématuré des vignes (Rahali, 2020). Les maladies virales sont le plus gros problème de la vigne dans le monde (Amedjkouh, 2004). Alors que le virus de l'enroulement et le virus du court-noué et le complexe du bois strié, sont les plus à craindre et les plus largement répandus dans les vignobles du monde et surtout en Algérie.

1.1. Le court-noué ou dégénérescence infectieuse

1.1.1. Description

La dégénérescence infectieuse, communément appelée à court-noué, est la maladie qui cause le plus de dégâts et dommages à la vigne. Le court-noué est considéré comme la plus ancienne maladie virale qui a existé en Méditerranée et au Proche-Orient depuis le début de la viticulture et s'est ensuite répandue dans le monde entier (Rahali, 2020). Les agents responsables de cette maladie sont deux virus appartenant au genre *Nepovirus* de la famille *Comoviridae*, principalement : *Grapevine fanleaf virus (GFLV)*, et *Arabis mosaic virus (ArMV)* en deuxième lieu (Andret-Link et al. 2004 ; Rahali, 2020).

1.1.2. Symptômes

Le virus du court noué (*GFLV*) infecte toutes les variétés de vigne. Des symptômes variables sont observés sur les feuilles, les rameaux, et les grappes des vignes infectées. Le court-noué se manifeste par une série de symptômes divisés en trois syndromes principaux, induits par les *Nepovirus* sont : des malformations, des distorsions et une mosaïque jaune ou une panachure et qui se manifestent sur les différents organes de la vigne infectée (Tahirine, 2015).

Sur les feuilles

Les principaux symptômes correspondent à une décoloration (jaunissement, panachures réticulées, taches annulaires) ou à des déformations des limbes (Figure 04A) (Tahirine, 2015).

Sur les sarments

Le raccourcissement des entre-nœuds (d'où le nom de la maladie Le court-noué) (Figure 04C), des doubles nœuds et des symptômes fasciaux sont souvent notés. (Tahirine, 2015).

Sur les grappes

Selon Amedjkouh (2004), Les grappes sont moins nombreuses et plus petites que les vignes saines (Figure 04D).

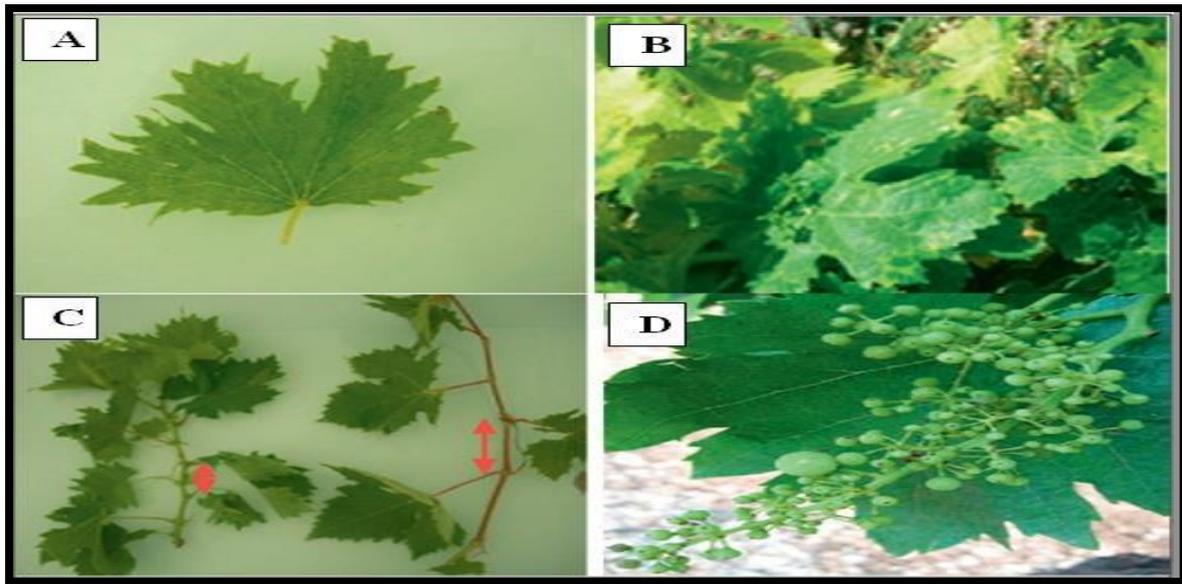


Figure 4. Symptômes du court-noué de la vigne sur la plante : les feuilles (A et B), les sarments (C), les fruits (D) (Samaali et *al.*2015 ; Rahali, 2020)



Figure 5. Dégât de la maladie de court-noué dans une parcelle (Mahboub, 2017).

1.1.3. Transmission

Le terme «*Nepovirus* » fait référence à un virus icosaédrique transmis par les nématodes (Tahirine, 2015). Ces deux *Nepovirus* sont spécifiquement transmis entre vignes par deux espèces différentes de nématodes ectoparasites : *Xiphinema index* pour le *GFLV* et *Xiphinema diversicaudatum* pour l'*ArMV* (Rahali, 2020). En fait, des nombreux nématodes ne transmettent que 2 ou 3 espèces de virus différentes. C'est le cas de *Xiphinema diversicaudatum* (Tahirine, 2015).

1.1.4. Les effets de la maladie sur les cultures

Selon Martelli (1992) ; Galet (1995) et Amedjkouh (2004), le court-noué détermine des effets négatifs sur la vigne :

- Diminution du rendement et de la qualité.
- Mauvaise tolérance aux conditions climatiques.
- Raccourcir la vie productive du vignoble.
- Déclin progressif et mort des vignes.

1.2. Virus de l'enroulement foliaire

1.2.1. Description

Est l'une des maladies virales les plus importantes de la vigne. Il est largement distribué dans tous les pays viticoles du monde (Amedjkouh, 2004). Ce virus provoque des pertes de rendement importantes (jusqu'à 30–68%) (Rahali, 2020).

Selon la classification actuelle, le virus de l'enroulement appartient à la famille des *Closteroviridae* et son nom a été identifié comme *Grapevine leafroll-associated virus* (*GLRaV*) en anglais, suivi d'un nombre de 1 à 10 tel que (*GLRaV-1*, *GLRaV-2*, *GLRaV-3*, etc.), sachant que les espèces les plus courantes sont *GLRaV-2* et *GLRaV-3*. Tous les virus de l'enroulement appartiennent au genre *Ampelovirus*, seul le *GLRaV-2* appartenant au genre *Closterovirus* de la même famille (Maree et al., 2013 ; Rahali, 2020).

La séparation taxonomique de *GLRaV-2* de tous les autres virus est principalement basée sur la structure du génome (nombre de gènes et leur disposition spatiale dans le génome) et les différences entre les vecteurs biologiques (Rahali, 2020).

1.2.2. Symptôme

Les symptômes de la maladie sont comprennent un enroulement des limbes des feuilles et des changements dans la pigmentation des feuilles. D'abord apparus sur les feuilles de la partie inférieure des sarments par des taches rougeâtres et avec le durcissement du limbe pour les cépages rouges (Figure 06B) et par des taches jaunâtres et épaissement du limbe pour les cépages blancs (Figure 06B). Sur les grappes, les baies se décolorent (Bovey et *al.*1974 ; Crespy, 1992 ; Walter et *al.*1996, Amedjkouh, 2004). Ces symptômes peuvent être détectés à partir de juin, mais la période d'observation la plus favorable est l'automne (A.Lehad, 2012).

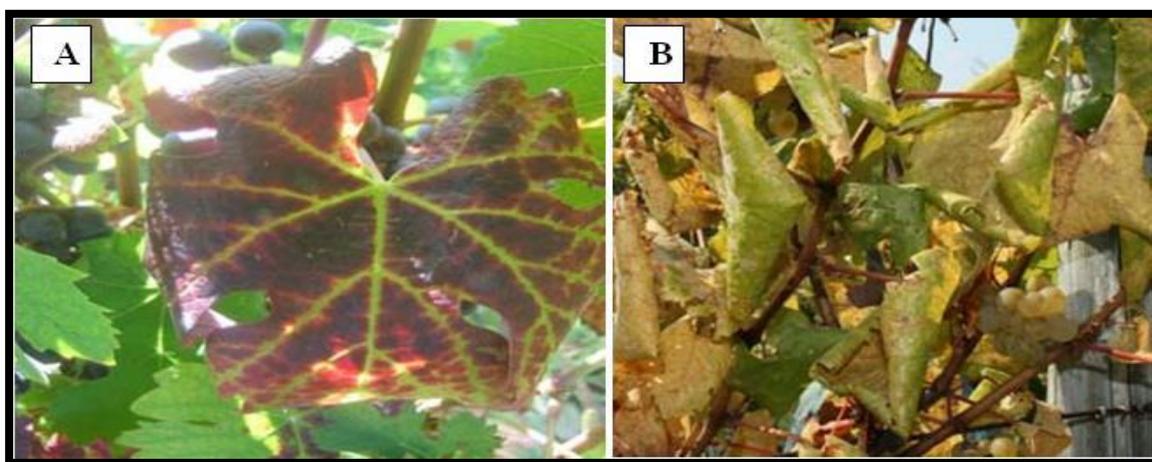


Figure 6. Les symptômes de l'enroulement foliaire, chez une variété rouge (A), chez une variété blanche (B) (Martinson et *al.* 2008 ; Rahali, 2020).

1.2.3. Transmission

La dissémination de l'enroulement foliaire (*GLRaV*) dans le vignoble est le résultat d'une intervention humaine, soit par l'utilisation incontrôlée de matériel de multiplication (greffons et porte-greffes infectés) (Brugnon A., Bessis R., 1968 ; Amedjkouh, 2004), soit par multiplication végétative, Et ainsi par la plantation de jeunes pieds contaminés.

1.2.4. Les effets de la maladie sur les cultures

La présence d'enroulement entraîne souvent une diminution simultanée de la quantité du raisin produit et de la teneur en sucre. (Vuittenez, 1984 ; Martelli, 1995 ; Gugerli et *al.*1997 ; Amedjkouh, 2004).

Il réduit le rendement, retarde la maturation des fruits et augmente l'acidité du jus (Rahali, 2020).

1.3. Le complexe du bois strié (Le bois rugueux)

1.3.1. Description

Rugose Wood (RW) en anglais est un groupe de maladies d'origine virale affectant la vigne dans la plupart des régions viticoles du monde (Rahali, 2020). Il était considéré comme un problème local jusqu'à sa découverte en Hongrie en 1967, il est maintenant connu dans le monde entier (Martelli et Boudon-Padieu, 2006).

Le bois rugueux peut affecter la tige, provoquant des piqûres, des gorges et d'autres déformations. Ce complexe pathologique est causé par des virus restreints au phloème appartenant à deux genres de la famille des *Betaflexiviridae*. Il s'agit du *Grapevine virus A, B et D*, appartenant au genre *Vitivirus* et *Grapevine rupestris virus* associé aux piqûres de tige en anglais *Grapevine Rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)*, qui appartient au genre *Foveavirus* (Rahali, 2020).

1.3.2. Symptômes

La maladie du bois strié se manifeste par une diminution de la taille et de la vigueur (Idris, 2016). Des changements dans l'apparence des cylindres de bois, tels que des fosses et des rainures qui peuvent apparaître sur le greffon et le porte-greffe, ou sur les deux (Figure 07) (Rahali, 2020).

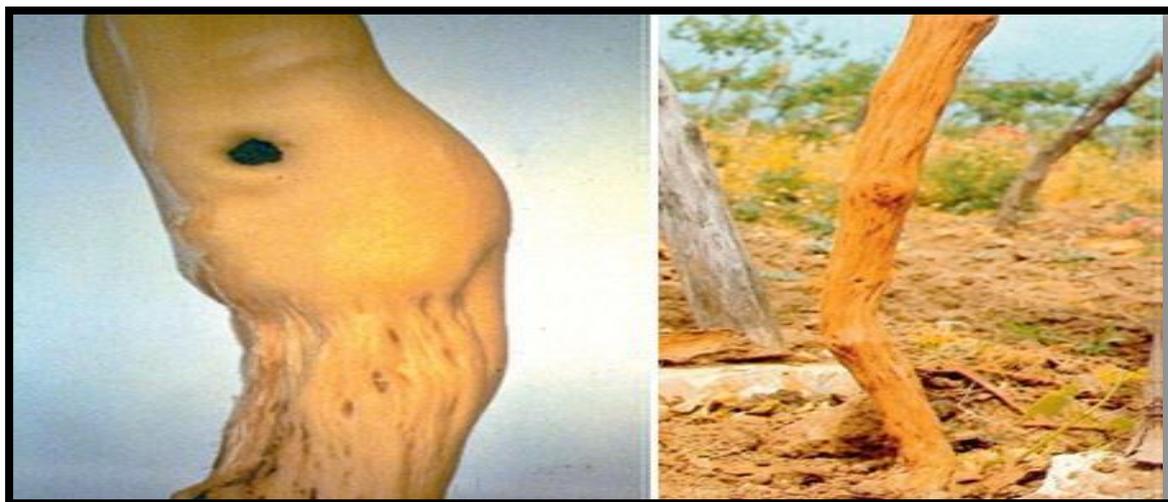


Figure 7. Symptômes de la maladie du bois strié, avec des piqûres et gorges sur la tige (Maliogka et al. 2014 ; Rahali, 2020).

1.3.3. Transmission

La transmission de tous ces virus est principalement associée à la reproduction végétative (asexuée) et au greffage de matériel végétal infecté. La *GVA* est généralement propagée dans les vignes par du matériel de propagation infecté et peut être propagée par des cochenilles. Selon divers chercheurs, la propagation de *GVA* se produit généralement en même temps que *GLRaV-1* et *GLRaV-3* (Rahali, 2020).

1.3.4. Les effets de la maladie sur les cultures

- Diminution des rendements des cultures et de la qualité des fruits (Martelli et *al.* 1993).
- Les vignes atteintes ont montré une vigueur et une croissance réduites, en déclin et dans les cas les plus graves, elles meurent (Martelli et Jelkmann, 1998 ; Minafra et *al.* 1997 ; Selmi et *al.* 2018).
- Les grappes peuvent être de plus en plus petites par rapport à la normale, avec une réduction de récolte de 20 à 30 % (Rahali, 2020).

Chapitre 3 : les méthodes de diagnostic des maladies virales.

Au stade de la détection et du diagnostic des maladies virales affectant les vignobles, nous expliquerons certaines méthodes importantes, les plus efficaces et les plus utilisées.

1. Diagnostic des maladies virales

Selon Walter (1988); Semal (1993) et Amedjkouh (2004), l'identification spécifique d'une infection virale fait appel à une série de techniques conduisant à l'identification du virus ce sont :

- Méthodes de détection des viroses par l'observation directes des symptômes (Détection symptomatologique).
- Détection sérologique (test Elisa).
- Méthode de biologie moléculaire (la RT-PCR).

1.1. Méthodes de détection des viroses par l'observation directes des symptômes (La symptomatologie directe) (Amedjkouh, 2004) :

L'observation précise des symptômes chez la plante hôte constitue la première étape du diagnostic. Plusieurs inspections visuelles des symptômes ont été effectuées dans le vignoble pour noter les symptômes sur les feuilles, les rameaux et aussi sur les grappes, par des changements observés sur leur couleur, leur forme et leur taille. Les symptômes sont également observés et notés après le bon développement des plantes par exemple cultivées en serre (40 jours après la transplantation) et jusqu'à la fin du cycle végétatif (septembre à octobre).

Cependant, La symptomatologie directe ne peut être considérée comme une méthode générale de diagnostic car elle présente plusieurs insuffisances.

1.2. Détection par la sérologie

Les méthodes sérologiques sont à la base des tests de dépistage direct des vignes infectées pour un contrôle sain des clones de vigne sélectionnés (Vuittenez, 1974 ; Amedjkouh, 2004).

1.2.1. Le test Elisa

Le test ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) permet de détecter plusieurs virus végétaux (A.Lehad, 2012).

Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA) est la technologie Elisa la plus largement utilisée, développée et bien appliquée pour la majorité des virus connus de la vigne (Selmi, 2018).

1.2.2. Principes du Test Elisa

La technologie ELISA est une technique de détection immuno-enzymatique qui visualise la réaction antigène-anticorps due à la réaction colorée de l'enzyme pré-fixée à l'anticorps agissant sur le substrat (Idris, 2016).

1.2.3. Le protocole d'Elisa (DAS-ELISA)

Le protocole ELISA le plus couramment utilisé est la méthode classique directe appelé ELISA sandwich à 2 anticorps (DAS-ELISA), où l'antigène est situé entre deux anticorps spécifiques. L'utilisation de DAS-ELISA nécessite 2 anticorps (monoclonaux) qui reconnaissent différents épitopes sur l'antigène (Idris, 2016).

Les tests Elisa sont effectués sur des plaques de polystyrène qui contiennent généralement 96 puits (Figure 08) (Vézina, et *al.*2006)

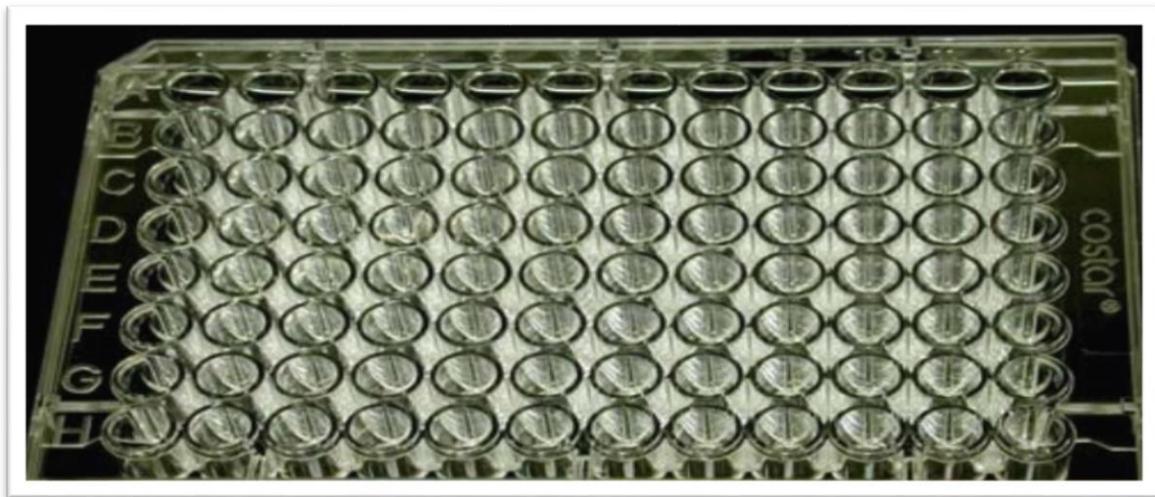


Figure 8. Plaque de polystyrène de test d'Elisa (Vézina, et *al.*2006)

➤ **Extraction du virus :**

Les bourgeons, les racines, les feuilles et le bois de vigne sont disponibles pour analyse. Les meilleures pour le dépistage des virus sont les jeunes feuilles récoltées au printemps (Walter et *al.* 2000, Idris, 2016).

Broyer les différents échantillons individuellement dans une solution tampon d'extraction spéciale "vigne" dans le sac d'extraction à l'aide d'un broyeur, et stocker le jus des échantillons dans un sac d'extraction à froid à une température 4°C (Idris, 2016).

1.2.4. Les étapes de protocole d'Elisa :

Le protocole d'Elisa la plus utilisé est appelé DAS-ELISA (A deux anticorps monoclonaux reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène) et selon Idris (2016) est comme suit:

1. Extraction du virus
2. La première étape appelée "coating" de l'antigène (sensibilisation des microplaques avec un anticorps spécifique)
3. La deuxième étape "Echantillon" : incubation de l'extrait de plant (antigène) ;
4. La troisième étape "conjugué" : incubation avec les anticorps conjugués à l'enzyme (conjugate)
5. La quatrième étape "substrat" : une réaction colorée indique la présence d'un échantillon infecté
6. Lecture à spectrophotomètre à 405 nm.

➤ Lecture des résultats :

D'après Idris (2016), La réaction de l'hydrolyses du substrat est observée et le développement de la coloration est noté visuellement dans quelques minutes et à l'aide d'un spectrophotomètre à 405 nm. L'utilisation d'un lecteur de densité optique (DO) permet d'obtenir un résultat quantitatif (Vézina, et *al.*2006), qui donne la densité optique de chaque échantillon donc :

- Les échantillons dont la DO est supérieur à deux fois la DO de témoin négatif sont considérés comme positifs (la vigne est malade) et ceux dont la DO inférieures à deux fois la DO du témoin négatif sont considérés négatifs (vigne sains) (IDRIS, 2016).
- Le taux d'infection (I) pour chaque wilaya ainsi que pour chaque variété est exprimé en pourcentage(%) de plantes infectées (ni) par rapport au nombre total de plantes testées (N) (Idris, 2016):

$$I\% = (\sum ni/N) \times 100$$

1.3. Technique de biologie moléculaire (RT-PCR)

La réaction en chaîne par polymérase de la transcriptase inverse (RT-PCR) est une variante de la PCR ou de la réaction en chaîne par polymérase. Les deux techniques reposent sur le même processus, mais la RT-PCR fournit une étape supplémentaire est la transcription inverse de l'ARN en ADN ou RT, qui est nécessaire pour l'amplification du matériel génétique in vitro. La technologie RT-PCR temps réel très sensible et spécialisée permet d'établir un diagnostic fiable (Jawerth, 2020).

1.3.1. Le principe de PCR

Cela implique une amplification sélective des fragments cibles à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques sélectionnées à partir de séquences bien définies, l'ADN génomique viral et enzyme thermostable (Taqpolymérase) (Saiki et *al.* 1988 ; Selmi, 2018).

❖ Mise en œuvre d'un test PCR

Un milieu réactionnel pour PCR contient :

- L'ADN cible initial, selon le cas, est de l'ADN viral ou de l'ADN complémentaire synthétisé dans les étapes préliminaires.
- Deux amorces qui s'hybrident l'une sur le fragment sens l'autre sur le fragment antisens et qui délimite la zone amplifiée.
- Désoxynucléotides triphosphate (dNTP).
- Magnésium (Mg²⁺) (cofacteur enzymatique).
- Taq polymérase

1.3.2. Protocole pour la détection des virus par reverse transcription-PCR (Arezki, 2016) :

1. Extraction des acides nucléiques: les acides nucléiques ont été extraits selon le protocole développé par Foissac et *al.* (2001) à partir par exemple de phloème cortical décortiqué à l'aide de scalpel sur des boutures de vigne.

2. Quantification et contrôle de pureté de l'ADN extrait : le rendement et la pureté de l'ADN extrait ont été déterminés en mesurant l'absorbance sous lumière UV à 260, 230 et 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (RAHALI, 2020).

3. Amplification de l'ADN complémentaire (ADNc) : après l'obtention de l'ADN complémentaire (A.Lehad, 2012):

- Choisir les amorces ADN utilisées pour la RT-PCR : permettent d'identifier les types des viroses (A.Lehad, 2012).

Par conséquent, cette technique peut doubler la quantité d'ADN dans des régions sélectionnées selon trois étapes principale (RAHALI, 2020) :

- Etape de dénaturation.
- Etape d'hybridation.
- Étape de polymérisation ou d'extension.

4. Préparation des échantillons pour PCR : ajouter chaque échantillon d'ADNc au milieu réactionnel avec des amorces sens et antisens ainsi que de la polymérase Taq et de l'eau distillée. Les échantillons ont ensuite placés dans un thermocycleur (A.Lehad, 2012).

5. Analyse des produits de PCR

Après amplification, une séparation électrophorétique a été effectuée sur un gel d'agarose. La présence d'ADN peut être observée à l'aide d'un intercalant d'ADN, tel que le bromure d'éthidium, qui devient fluorescent sous la lumière UV.

Partie 2 :

Partie expérimentale

Chapitre 4 :

Matériels et Méthodes

1. Stratégie de travail

L'objectif de notre travail est de faire une base de données sur l'état sanitaire du vignoble Algérien par l'analyse des données des recherches.

Le recueil des données a été effectué par des recherches bibliographiques sur les bases de données scientifiques comme : NCBI web site, Google Scholar, ScienceDirect, ResearchGate, dspace. En utilisant les mots clés suivants (sanitary status of grapevine cultivars in Algeria, viruses infecting grapevine in Algeria, Detection of grapevine viruses, etc.)

Après la sélection des études trouvés, nous avons sélectionné huit études disponibles, de l'année 2004 jusqu'à l'année 2020. Dont, en Algérie il n'y a pas des études suffisantes sur ce sujet.

Après la sélection des études, nous allons présenter le matériel biologique utilisé et la méthode de diagnostic des maladies de chaque étude. Nous allons analyser leurs résultats et de déterminer les maladies virales les plus répandues et leur diagnostic efficace, ainsi que leur impact sur l'état sanitaire de la vigne en Algérie.

2. Matériel biologique

2.1. L'étude A d'Amedjkouh Hafida(2004)

Le matériel biologique utilisé est présenté dans le tableau sous-dessous.

Tableau 1. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.

Cépage étudié	Nbre des échantillons testés	Région d'étude	La partie étudiée
vigne de table (<i>Vitis vinifera</i> L.) : <i>Ahmar bou amar, Valensi et Muscat de cherchell.</i>	Ne pas mettre	- Benchicao (Médéa) - Cherchell (Tipasa)	Les baguettes de bois

2.2. L'étude B de Tabouche Aicha (2004)

Tableau 2. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.

Cépage étudié	Nbre des échantillons testés	Région d'étude	La partie étudiée
différents plantes de vigne	870	Le nombre de	Les feuilles et les

		stations prospectées était de 8 : Chiffa, Médéa, Blida, Mouzaia, El Affroun, Bourroumi, Hamr El Ain, Hoceinia.	rameaux
--	--	--	---------

2.3. L'étude C de Lehad Arezki (2012)

Tableau 3. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.

Cépage étudié	Nbre des échantillons testés	Région d'étude	La partie étudiée
- <i>Alicante Bouchet (10)</i> , <i>Alicante Bouchet 2 (10)</i> , <i>Alicante Bouchet 3 (11)</i> , <i>Valencie 1 (09)</i> , <i>Valencie 2(10)</i> , <i>Alphonse Lavallé (10)</i> , <i>Dattier de Beyrouth (10)</i> , <i>Chaouch Blanc (10)</i> , <i>Dattier de Beyrouth (10)</i> , <i>Cardinal (10)</i>	100	-La région de centre (Wilaya de Boumerdès) -La région Ouest (Wilaya de Ain Témouchent et Mascara).	Un échantillonnage aléatoire à partir de sarments à deux nœuds.

2.4. L'étude D d'A. Lehad et al. (2014)

Tableau 4. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.

Cépage étudié	Nbre d'échantillons testés	Région d'étude	La partie étudiée
- <i>Dattier de Beyrouth</i> - <i>Gros noir</i> - <i>King's Rubi</i> - <i>Muscat d'Alexandrie</i> - <i>Cardinal</i>	484	-L'Ouest de l'Algérie (Ain Témouchent, Mascar) -centre de l'Algérie (Alger, Blida, Boumerdès, Tizi-Ouzou).	Tissu de phloème

2.5. L'étude E d'Idir Idris (2016)

Tableau 5. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.

Cépage étudié	Nbre d'échantillons testé	Région d'étude	La partie étudiée

-Gros noir -Cardinal -Dattier de Beyrouth -Muscat italia /	Ne pas mettre	-La station <i>expérimentale de département de biotechnologie végétale : université Blida 1 (Blida)</i> -la station d'El Affroun (Blida) -la commune d'Ain Benian (Alger) - la commune de Tassala-El-Merdja (Alger) - la station de l'ITAF de Ben Chicao (Médéa)	Les jeunes Feuilles
--	---------------	---	---------------------

2.6. L'étude F de M. Rahali et al. (2019)

Les nomenclatures de variétés étudiées sont prend de la couleur, la taille, la forme ou la destination des raisins. Comme certaines personnes héritent la plante sans connaître son nom, donc elles choisissent le nom le plus couramment utilisé par les locaux ou donnent le nom de la région (Ex : dans le tableau : *Anabi, Aneb Takhatelt*) ou le nom du propriétaire (Ex : *Nabil Athmani, Bousada, Khoudja, Rahali mohamed cherif*) à des échantillons anonymes (Rahali et al. 2019).

Tableau 5. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.

Cépage étudié	Nbre d'échantillons testé	Région étudié	La partie étudié
<i>Azizao, Arabth, Nabil Athmani, Azanjari, Agogalth, Aneb, Takhatelt, Datte, Azogar Anonymous, Amellal, Afagoss, Amazigh, Sbaa Laroussa, Anabi</i>	37	Région de Babar au nord-est de L'Algérie (Khenchela).	Feuilles ou Tissu de cambium du bois ou les raclages corticaux des cannes.

<i>Mokrani noir, Amanzo, Bousada, Aberkan,, Khoudja, Amokran, Talyani, Azbib, Rahali mohamed chérif, Amezian, Aneb Babar, Azorith ,Lanab, amesski, Babari , Azogagh</i>			
---	--	--	--

2.7. L'étude G de M.Tahirine et al. (2019)

Tableau 6. Le matériel végétal utilisé et région d'étude

Cépage étudié	Nbre d'échantillons testé	Région étudié	La partie étudié
-Aberkane (nombre d'échantillon 17) -Ahmar de Mascara (16) -Alicante Bouchet (81) -Alphonse Lavallée (16) -Aneb El Kadi (8) -Cardinal (31) -Chaouche Blanc (7) -Dattier de Beyrouth (17) -Muscat de Gustave (8) RedGlob (25) Sabel (9) Valencie (65)	300	-le centre de l'Algérie (Blida, Alger, Boumerdès) -Et l'ouest de l'Algérie (Ain Témouchent Tlemcen, Sidi Belabès, Mascara, Relizan, Oran, Tlemcen, Mostaganem)	Les feuilles

2.8. L'étude H d'Aleš Eichmeier et al. (2020)

Cette étude fournit la première enquête sur la présence du *GPGV* en Algérie. Le matériel biologique utilisé est présenté dans le tableau suivant.

Tableau 7. Le matériel végétal utilisé et région d'étude.

Cépage étudié	Nbre d'échantillons testé	Région étudié	La partie étudié
-Ahmar bou Amar (12) - Carignan (6) - Alphonse-Lavallée - Sabel (12)	54 (Cinquante-quatre vignes)	Cinq régions viticoles algériennes : Médéa (Benchicao), Tipaza (Hamr El	les tissus du phloème. Les entre-nœuds en bois.

- Cardinal, Alphonse-Lavallée (12)		Ain), Tipaza (Hadjout), Boumerdes et Alger (Ain Benian)	
------------------------------------	--	---	--

3. Méthodes de diagnostic

3.1. L'étude A d'Amedjkouh Hafida (2004)

Cette étude a été utilisée trois tests de diagnostic des virus, le test d'observation directe des symptômes, l'inoculation mécanique sur indicateurs herbacés et le test DAS-ELISA.

3.1.1. L'inoculation mécanique sur indicateurs herbacés

L'inoculation mécanique est une méthode biologique de propagation mécanique des particules virales aux plantes indicatrices de santé (Cornuet, (1987) ; Cloquemin, (1988) ; Giles et Verhoyen, (1992) ; Amedjkouh, (2004).

A. Préparation des plantes indicatrices

Selon l'équipe d'Amedjkouh (2004), pour la transmission mécanique du virus comme l'enroulement foliaire (*GLRaV*), ils ont choisi par exemple d'utiliser trois espèces appartenant à trois familles des plantes telles que :

- *Cucurbitacées* : *Cucurbita* sp. Variété : Quarantaine « courgette » ;
- *Solanacées*: *Lycopersicum esculentum* Mill. Variété : *Tres cantos* « tomate » ;
- *Légumineuses* : *Pisum sativum*. Variété : *Onward* « petit pois ».

D'après Amedjkouh (2004), des graines de plantes indicatrices ont été semées dans des pots avec un substrat stérile constitué de 1/3 de terre, 1/3 de sable et 1/3 de tourbe. Ils ont utilisé 15 graines pour chaque variété.

B. Préparation de l'inoculum

Des feuilles de vigne infectées (1g) par le virus (variété *Muscat de Chercell*) ont été broyées dans un 5 ml de tampon phosphate contenant de la base nicotinée (qui stabilise le virus). Puis, ils ont extrait le virus en solution aqueuse à 2,5% dans un mortier pré-refroidi (en faisant neutraliser le précipité par les tanins, inactivant ainsi le virus dans le jus). 100 mg.ml⁻¹

de charbon actif ont été ajoutés à l'extrait obtenu (pour absorber les composés toxiques libérés lors de l'extraction) (Amedjkouh, 2004).

C. Mode opératoire

L'inoculum obtenu est appliqué doucement à la surface des jeunes feuilles ou des cotylédons avec un coton-tige (Amedjkouh, 2004).

Les plantes inoculées ont été rincées à l'eau courante pour éviter l'abrasion des feuilles et stockées dans une serre à 25°C. Surveillez les symptômes tous les 3 jours à partir du 6^{ème} jour et du 15^{ème} jour (Amedjkouh, 2004).

Ils ont inoculé la souche *Muscat de Chercell* à 3 espèces indicatrices : les cucurbitacées au stade cotylédon, *Lycopersicum esculentum* Mill. Au stade 3 à 4 feuilles et *Pisum sativum* au stade 3 à 4 feuilles. 3 répétitions ont été faites pour chacune et pour chaque répétition, ils ont inoculé 4 plants et un plant non inoculé est gardé comme témoin, soit au total 45 plants. (Amedjkouh, 2004).

3.1.2. La méthode classique directe DAS-ELISA (double antibody sandwich)

Le test Elisa a été réalisé à l'aide d'un kit commercialisé par la société française Sanofi. Chaque kit contient une plaque de microtitration et les produits nécessaires à la détection du virus. Ils ont utilisé le sérum anti-*GFLV* (Court-noué) et ses conjugués dilués au 1/1000, les sérums anti-*GLRVa* type I et III (rouleau de feuilles) et leurs conjugués dilués au 1/1000 et 1/1000 Sérum anti-*GLRVa-GFKV* (marbrure) et ses conjugués ont été dilués au 1/1000 (Amedjkouh, 2004).

Le matériel végétal utilisé pour la détermination des virus par voie sérologique est représenté dans le Tableau 09.

Tableau 8. Matériel végétal utilisé pour le test Elisa (Amedjkouh, 2004).

Les variétés	Période de prélèvement	Plantes Indicatrices	Période de prélèvement
- <i>Ahmar bou amar</i> - <i>Valensi</i> - <i>Muscat de Chercell</i>	Printemps	-La courgette -La tomate -Le petit pois	15 jours après l'inoculation mécanique

--	--	--	--

- **Mode opératoire** (Amedjkouh, 2004)
 1. Fixation des anticorps sur la paroi de la plaque. Incubation à 37°C pendant 3 heures
 2. Préparation antigénique : Les feuilles sont broyées dans du tampon d'extraction à raison de 5 ml pour 1 gramme de feuilles. Le broyat ainsi obtenu est centrifugé à 3000 rpm pendant 5 à 10 minutes pour décanter. L'extrait obtenu a été conservé à 4°C avant utilisation ;
 3. Lavage des plaques puis remplir chaque puits avec la solution PBS-Tween .Trois lavages sont faits pendant 10 mn ;
 4. Fixation des anticorps conjugués à enzyme sur les antigènes : la solution du conjugué (anticorps + enzyme : la phosphatase alcaline). Incubation + Lavage ;
 5. Dépôt du substrat (P. Nitrophenyl-phosphate PNPP). Et lecture des résultats à spectrophotomètre à 405 nm.

Une réaction chimique entre une enzyme et un substrat incolore transforme ce dernier en un produit coloré. Par conséquent, la coloration ne se produit que dans les puits où l'enzyme est présente, donc là où se trouvent des échantillons infectés par le virus.

3.2. L'étude B de Tabouche Aicha (2004)

Cette étude a été appliqué trois tests de diagnostic des virus, l'inoculation mécanique ; l'indexage biologique et test ELISA.

3.2.1. Détection biologique: l'inoculation mécanique à des plantes testes herbacées (Tabouche, 2004)

3.2.2. Méthode de l'indexage biologique : Pour la détection du *GFLV* par voie mécanique, ils ont utilisé une seule plante herbacée disponible qu'il s'agit du concombre (*Cucumis sativus L*), selon les étapes suivantes (Tabouche, 2004) :

- Des pots en plastique sont remplis d'un mélange (1/3 sable, 1/3 terre et 1/3tourbe) préalablement stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.
- Ils ont préparé 50 pots à raison de 10 pots par parcelle de chaque station, 10 pots pour le témoin malade et 10 pots pour le témoin sain.
- Des feuilles de vigne prélevés du terrain ont été broyées dans un mortier, dont il mélange 1g de poudre des feuilles avec 4ml de tampon phosphate, pour stabiliser le virus.

- L'inoculation est effectuée par frottis avec l'index sur jeunes feuilles, après une minute les feuilles sont rincées à l'eau du robinet. Les plantules sont placées au phytotron à une température de 25°C. La lecture des résultats a été effectuée 14 jours après l'inoculation.

3.2.3. Séro-détection

a) Sérum utilisé :

L'identification de virus *GFLV* par le test ELISA nécessite l'utilisation d'un sérum composé d'un anticorps polyclonal et d'un anticorps couplé à l'enzyme phosphatase 38 alcaline. Le sérum utilisé pour le diagnostic du *GFLV* provient du laboratoire BIORAD en France.

b) Technique DAS-ELISA

Cette méthode est très sollicitée. En raison du risque réduit d'apparition des réactions non spécifiques, réaction des protéines végétales avec le sérum spécifique (Tabouche, 2004).

Les étapes essentielles sont :

1. Fixation des anticorps polyclonaux
2. Dépôt des échantillons à tester
3. Dépôt du conjugué
4. Dépôt du substrat

3.3. L'étude Cde Lehad Arezki(2012)

L'étude A.Lehad, 2012 a été fait l'analyse viral par deux méthodes :

- la méthode sérologique(ELISA) ;
- Identification des virus Par RT-PCR.

3.3.1. Le test immuno-enzymatique

Ce test utilisé pour la détection sérologique des anticorps polyclonaux dirigés contre les *GLRaV-1, 2,3 et 6* provenant d'un kit (Sanofi, Biorad). IgG utilisé pour *GLRaV-1*(dilués au 1/1000), pour *GLRaV-2*(dilués au 1/500), pour *GLRaV-3*(dilué au 1/500), pour *GLRaV-5*(dilué au 1/1000) et contre *GLRaV-6* (dilué au 1/500). Le test immuno-enzymatique a été réalisé sur le cortex des sarments obtenus par décorticage et broyage dans un tampon (Lehad.A, 2012), Ils ont effectué deux types d'ALISA, direct et indirect.

La méthode DAS-ELISA direct pour la détection des virus *GLRaV-1, 2,3* et 6 (Planche 1). La méthode DAS-ELISA indirect pour la détection le virus *GLRva-5* (Planche 2) (Lehad.A, 2012).

Planche 1 : Méthode DAS-ELISA direct (Martelli et al. 1993; A.Lehad, 2012)

Les plaques sont activées en déposant du sérum spécifique dilué dans du tampon de fixation.

- Incubation 2 heures à 37°C. Puis faire une trois rinçages PBST pendant 5 min.
- Déposer l'extrait dilué dans le tampon d'extraction et Incuber une nuit à 4°C.
- Trois rinçages PBST pendant 5 min.puis déposer du conjugué dilué dans le tampon du conjugué.
- Incubation 2 heures à 37°C. Et trois rinçages de PBST pendant 5 minutes.
- Déposer de substrat dilué dans le tampon PNPP (Para-Nitro-Phényl-Phosphate)
- Incuber à 37°C à 15h. Et la lecture par spectrophotomètre à 405 nm.

Planche 2 : Méthode DAS-ELISA indirect par le système biotine –streptavidine (A.Lehad, 2012).

- Activation de la plaque par dépôt du sérum spécifique dilué dans le tampon de fixation.
- Incubation à 37°C à 2 Heures. Trois rinçages de PBST pendant 5 min.
- Déposer des extraits dilués dans le tampon d'extraction. Et incubation à 4°C durant une nuit.
- Trois rinçages de PBST pendant 5 minutes. Puis déposer du conjugué dilué dans le tampon du conjugué
- Incubation à 37°C à 2 Heures.Trois rinçages de PBST pendant 5 min.
- Déposer de streptavidine et incubation à 37°C à 30 minutes.
- Déposer de substrat dilué dans le tampon de substrat (Para-Nitro-Phényl-Phosphate,PNPP) et Incuber à 37°C à 15 Heures.
- Lecture à spectrophotomètre à 405 nm.

3.3.2. Identification des virus *GLRaV-3* et 5 par RT-PCR

L'extraction des acides nucléiques totaux a été effectuée selon la méthode décrite par Foissac et al. (2001).À partir des sarments à deux nœuds (A.Lehad, 2012).

- Obtention de l'ADN complémentaire

La linéarisation de l'ARN a été réalisée à l'aide des amorces aléatoires (du kit Invitrogen). Pour chaque échantillon, ajouter 10 µl d'acide nucléique total et 1,5 µl d'eau distillée stérile. Utiliser deux tubes contenant de l'eau au lieu d'acide nucléique comme contrôles négatifs, puis incubé les tubes à 90°C pendant 5 min (A.Lehad, 2012).

Après incubation, on obtient les ADN complémentaire, sont ensuite conservés à -20°C (A.Lehad, 2012).

- Amplification par PCR des ADNc.

Tableau 9. Les amorces utilisées pour la détection de *GLRaV-3* et *GLRaV-5* (A.Lehad, 2012)

Virus	Amorces	Séquences	Amplicons	Références
<i>GLRaV-3</i>	LR3-LC1F	CGC TAG GGC TGT GGA AGT ATT	546pb	Ling et al. , (1998)
	LR3-LC2R	GTT GTC CCG GGT ACC AGA TAT		
<i>GLRaV-5</i>	LR5-1F	CCC GTG ATA CAA GGT AGG ACA	690pb	Good et Monis, (2001)
	LR5-1R	CAG ACT TCA CCT CCT GTTAC		

- **Préparation des échantillons pour PCR**

Chaque échantillon, ajouter 2,5 µl d'ADNc au milieu réactionnel : 5 µl de tampon 5X, 1 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTP, 0,5 µl de l'amorces sens (10 mM), 0,5 µl de l'amorces antisens (10 mM), 0,25 µl de Taq polymérase et 14,25 µl d'eau distillée stérile (A.Lehad, 2012).

- **Révélation et visualisation des bandes**

Les amplicons ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %. Les bandes attendues devraient correspondre à une taille de 546 pb pour *GLRaV-3* et 690 pb pour *GLRaV-5*. La visualisation des bandes a été réalisée en immergeant le gel dans une solution contenant du bromure d'éthidium et en visualisant sous la lumière UV (A.Lehad, 2012).

3.4. L'étude de A. Lehad et al. (2014)

L'équipe d'A.Lehad *et al.* (2014) ont été appliquées deux méthodes d'analyse (méthode sérologique DAS-ELISA et méthode moléculaire par RT-PCR) pour détecter la présence des virus *GLRaV-1*, *-2*, *-3*.

Les isolats *GLRaV* ont été dérivés de 484 échantillons de vigne. Tous les échantillons ont été testés pour la présence de *GLRaV-3* par DAS-ELISA en utilisant un kit commercial (Agrit-est, Italie). Les extraits ont été obtenus par macération de tissus de phloème dans un tampon PBS. L'absorbance a été enregistrée à 405nm à l'aide d'un lecteur de microplaques automatisé, et les échantillons avec une absorbance supérieure ou égale à trois fois celle des échantillons sains ont été considérés comme positifs. Pour confirmer la présence de ce virus, ils ont analysé les échantillons positifs par RT-PCR (A.Lehad *et al.* 2014).

3.4.1. Méthodes sérologique DAS-ELISA

Le phloème des sarments a été décortiqué à l'aide d'un scalpel jusqu'à obtention de 1 g de phloème et broyé dans un mortier en présence de tampon d'extraction (Arezki, 2016). Les autres étapes sont les suivantes (Arezki, 2016) :

1. Les puits des microplaques ont été sensibilisés avec des IgG diluées au 1/1000 dans du tampon de sensibilisation (Annexe 1).
2. Puis une incubation à 37°C pendant 2 heures. La microplaque a été lavée trois fois pendant 3 minutes avec du tampon de lavage, et l'extrait de chaque échantillon a été ajouté aux puits.
3. Les plaques ont été incubées pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages consécutifs, ajouter 100 µl de conjugué dilué dans du tampon de couplage (Annexe 2) dans chaque puits.
4. Puis incuber pendant deux heures à 37°C. Après lavage, du p-nitrophényl phosphate (PNP) a été ajouté et la plaque a été incubée pendant 3 min à température ambiante. Lire les résultats avec un spectrophotomètre à 405 nm.

4.3.2. Méthodes biochimique par RT-PCR

L'acide nucléique total extrait de 0.2 g de raclages corticaux. Le protocole développé par Foissac *et al.* (2001), Les étapes essentielles sont :

- Extraction des acides nucléiques totaux (TNA).
- Obtention de l'ADN complémentaire.
- Préparation des échantillons pour la PCR.

Les amorces d'ADN ont été utilisées pour le RT-PCR permettent d'identifier les *GLRaV-1, 2,3*se présentent dans le tableau 11.

Tableau 10. Les amorces utilisés pour la détection de la *GLRaV-1, 2, 3* (Arezki, 2016).

Virus	Amorce	Séquences	Amplicon	Référence
<i>GLRaV-3</i>	CP3U	5'- ATGGCATTGAACTGAAATTAGGGC- 3'	484pb	Turturo et al. (2005)
	CP3D	5'-CGGCGCCATAACCTTCTTACA-3'		
<i>GLRaV-3</i>	LR3- LC1F	5'-CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT-3''	545pb	Ling et al. (1998)
	LR3- LC2R	5'-GTTGTCCCGGGTACCAGATAT-3'		
<i>GLRaV-2</i>	L2F	5'-ATAATTCGGCGTACATCCCCACTT	331pb	Bertazzon et al. ((2010)
	U2R	5'-GCCCTCCGCGCAACTAATGACAG 3''		
<i>GLRaV-1</i>	HSP70- 417F	5'-GAGCGACTTGCGACTTATCGA 3''	320pb	Osman et Rawhani (2006)
	HSP70- 737F	5'-GGTAAACGGGTGTTCTTCAATTCT 3''		

Pour l'identification de *GLRaV-3*, les conditions d'amplification comprenaient une première étape, une dénaturation à 94°C pendant 5 minutes. Puis 35 cycles d'amplification ont été réalisés dans les conditions suivantes (Tab.12) (Arezki, 2016).

Tableau 11. Les conditions d'amplification.

L'étape	Température °C	La durée	Nombre des cycles
La dénaturation	94 °C	30 s	
		35 s	

L'hybridation	57 °C	20 s	35 cycles d'amplification
	56 °C	45 s	
Elongation	72 °C	50 s	
Extension (élongation finale)	72 °C	7 min	

Pour *GLRaV-1* et *GLRaV-2*, à l'exception des mêmes conditions que pour *GLRaV-3*, la dénaturation a été effectuées pendant 30 s, les amorces ont été annelées à 58°C pendant 45 s et étendues à 72°C pendant 1 min (Arezki, 2016).

A. Visualisation des amplicons

Les amplicons ont été visualisés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,2 %. Les bandes attendues doivent correspondre à des tailles de 546 bp et 484 bp pour les gènes CP et HSP70h de *GLRaV-3*, 320 bp pour *GLRaV-1*, respectivement. L'électrophorèse a été réalisée à 140 volts pendant 30 minutes. La visualisation des bandes a été réalisée en immergeant le gel dans une solution contenant du bromure d'éthidium et visualisée sous lumière UV (Arezki, 2016).

3.5. L'étude E d'Idris (2016)

Cette étude a été utilisé la méthode DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA), une technique qui peut détecter de très petites quantités de virus. Le sérum utilisé était de kit BIOREBA AG (Idris, 2016). Il se réalise en 4 étapes essentielles :

1. La première étape appelée "coating" de l'antigène (sensibilisation des microplaques avec un anticorps spécifique) :

- Dilution de l'anticorps de coating (IgG) dans le tampon de coating ;
- Ajouter la solution spécifique à l'antigène obtenue de l'anticorps souhaité dans chaque puits de la microplaque ;
- Couvrir la plaque et placer dans une étuve humidifiée pendant 4 heures à 30°C ;
- Les puits sont ensuite lavés une première fois avec du tampon de lavage pour éliminer l'excès d'antigène ;

- L'immobilisation de l'antigène au fond du puits se fait électrostatiquement (Vézina, et al, 2006).
2. La deuxième étape "Echantillon", incubation de l'extrait de plante (antigène) :
- Dilution de l'extrait végétal dans le tampon d'extraction (la nature du tampon d'extraction et le taux de dilution peuvent varier d'un échantillon à l'autre) ;
 - Ajouter l'extrait de plante après dilution dans chaque puits. Couvrez la plaque et placez-la dans une étuve humide. Incuber une nuit à +4°C ;
 - Réalisation du deuxième lavage comme le premier lavage.
3. La troisième étape "conjugué", incubation avec les anticorps conjugués à l'enzyme (conjugate) :
- Dilution de l'anticorps conjugué dans un tampon de conjugaison. La solution résultante a été ajoutée à chaque puits ;
 - Couvrez la plaque et placez-la dans une étuve humide. Incuber 5 heures à 30°C. Puis un troisième lavage est effectué.
4. La quatrième étape "substrat", une réaction colorée indique la présence d'un échantillon infecté :
- Les pastilles de substrat sont diluées dans un tampon de substrat, puis la solution de substrat est déposée dans chaque puits ;
 - La plaque doit être recouverte d'une feuille d'aluminium ou placée dans une pièce sombre car l'incubation doit se faire dans l'obscurité (Vézina, et al, 2006) ;
 - Incuber à température ambiante pendant 20 à 30 minutes.

Selon (Vézina, et al. 2006) l'addition du Substrat de L'enzyme doit être préparée juste avant son utilisation. Les substrats les plus utilisés :

Peroxydase = OPD (ortho-phénylène diamine).

Phosphatase = P-nitrophényl phosphate.

D'après Idris (2016), pour observer la réaction d'hydrolyse du substrat, faire la lecture au spectrophotomètre à 405 nm et observez visuellement le développement de la couleur en quelques minutes.

3.6. L'étude F de M. Rahali et al. (2019)

Cette étude a été utilisée la méthode RT-qPCR. La détection des virus de la vigne : *Virus de la mosaïque Arabis (ArMV)*, *Virus de l'enroulement de la vigne : (GLRaV-1, 2 et 3)*,

(GVA et GVB) et le virus associé à la piqûre des tiges de la vigne *Grapevine Rupestris* (GRSPaV) dans les 37 échantillons a été effectuée comme suite:

3.6.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plant Mini (Qiagen) :

- Les nervures des feuilles fraîches ont été coupées et homogénéisées dans l'azote liquide, puis stockées à -80°C . Les tissus végétaux ont été placés dans un sac d'échantillon et homogénéisés avec 5 ml de tampon de lyse.
- Mélanger l'homogénat (1 ml) avec 100 μl de sarkosyle à 20% dans un tube à centrifuger sous l'agitation (1200 rpm) à 70°C pendant 10 min à l'aide d'un thermo mélangeur Eppendorf.
- Transférer Environ 600 à 650 μl de l'homogénat à la colonne fournie avec le kit (QIAshredder Mini spin column, Qiagen) puis centrifugé à $14\,000 \times g$ pendant 2 min dans une Microcentrifugeuse Eppendorf.
- Mélanger 250 μl de filtrat obtenue dans un nouveau tube de 1.5 ml avec 225 μl d'éthanol à 95%.
- Ensuite, le mélange a été transféré sur une colonne (RNeasy, Qiagen), puis centrifugé à $8000 \times g$ pendant 45 secondes.
- 700 μl de tampon RW1 (Qiagen) ont été appliqués sur la colonne puis centrifugés à $8000 \times g$ pendant 15 secondes.
- La colonne a été placée dans un tube de collecte propre de 2 ml et 500 μl de tampon RPE (Qiagen) ont été appliqués sur la colonne, suivis d'une centrifugation à $8000 \times g$ pendant 15 secondes.
- Répétez l'étape ci-dessus avec une centrifugation à $14\,000 \times g$ pendant 5 min pour assurer l'élimination de l'alcool.
- La colonne est ensuite placée dans un nouveau et l'ARN est élué en ajoutant 100 μl d'eau ultra pure, suivi d'une centrifugation à $8000 \times g$ pendant 1 min.
- Les tubes de prélèvement ont été étiquetés de manière appropriée et l'ARN a été stocké à -80°C jusqu'à son utilisation pour l'analyse RT-PCR.

3.6.2. Rétro transcription (RT)

L'ARN a été traité avec DNase I sans RNase pendant 45 min à 37°C . Cette réaction a été arrêtée avec 1 μl d'EDTA. Après dénaturation à 95°C pendant 5 min, l'ARN a été reverse

transcrit à l'aide d'un thermocycleur (Bio-Rad, modèle CFX96), par incubation à 42°C pendant 50 min en présence de 0,8 µl de reverse transcriptase et 2,5 µl de chaque dNTP (2,5 mM) et 2 µl d'amorces aléatoires (0,5 µg/µl)(Rahali, 2020).

3.6.3. PCR quantitatif

Il est possible de suivre la réaction PCR lors de son étape d'élongation, en utilisant la technologie basée sur le SYBR Green I comme bon émetteur de fluorescence. Et en utilisant différents couples d'amorces spécifiques listées dans le tableau 13. Dans les conditions thermiques suivantes : 3 min à 50 °C, 3 min à 95 °C, puis 49 cycles d'un pas de 5 secondes à 95 °C et un pas de 30 secondes à 60°C (Rahali, 2020).

Tableau 12. Les paires d'amorces oligonucléotidiques qui ont été utilisées pour l'analyse qPCR (Rahali, 2020).

Spécificité	Amorce sens	Amorce anti sens	Référence	La Cible
<i>ArMVT</i>	CTTATGGCATAGTCCT AAGAGTTGT	GGAATCAAGTRTTTAAATA CCCCG	(Bianchi et al., 2010)	Protéine de capsid e
<i>GFLV</i>	GGGACCACTATGGA TGGAATGA	TTCGGTGATATGGAGAGCG AAT	(Osman et al., 2007)	Protéine de capsid e
<i>GLRaV-1</i>	TGAAGGGACCGGGA GGTTAT	GTGCTGAAGTGATGGGTA A	(Bertazon et al., 2009)	Protéine de capsid e
<i>GLRaV-</i>	CTAACAATTTCTTCT	TTGGATCGCAT	(Beuve	Protéi

2	TTGGATCGCAT	AGAATGTCTTCAGCTTCAT AAGGAG	et al., 2007)	ne de capsid e
<i>GLRaV-3</i>	AAGTGCTCTAGTTAA GGTCAGGAGTGA	GTATTGGACTACCTTTCGG GAAAAT	(Osman et al., 2007)	HSP7 0
<i>GVA</i>	GACCGAAMWATGTA CCTGAAYACTCTCTT	TATGGYGAGGTAGATATA GTAGGWCCTA	(Bianchi et al., 2010)	Protéi ne de capsid e
<i>GVB</i>	GTGCTAAGAACGTCTTC ACAGC	CGAGTAGCCCTTCGTTTAG CCGC	(Minafra et Hadidi, 1994)	
<i>RSPaV</i>	AATAATTCCCCGATT TCAAGGC	AGGATTTAGCATRGAAAGG GAATAC	(Bianchi et al. 2010)	Protéi ne de capsid e

Le logiciel CFX Maestro™ qui fait l'analyse de représentation graphique de données deqPCR (Rahali, 2020).

3.7. L'étude G de M.Tahirine et al. (2019)

Dans cette étude, deux méthodes ont été utilisées :

- Test DAS-ELISA
- Test Electrophorèse SDS-PAGE

3.7.1. Test DAS-ELISA

La méthode utilisée était ELISA (Enzyme LinkedImmuno-SorbentAssay), ils ont utilisés un premier anticorps monoclonal anti-*GFLV* fourni par Agritest® (sérum et conjugué), et la seconde était l'anti-*GFLV/ArMV* fourni par Bioreba (Kit complet). Pour le sérum anti-*GFLV*, les échantillons de test ont été analysés par dosage immunoenzymatique DAS-ELISA. Le choix des variantes ELISA directes dépend de la disponibilité des conjugués (M.Tahirine et *al.* 2019).

Selon l'équipe M.Tahirine et *al.* (2019), Broyer les différents échantillons dans du PBS à raison de 1 g d'échantillon dans 4 ml de PBS et filtrer le broyat à l'aide d'une étamine. Pour le sérum anti-*GFLV-ArMV*, utiliser le kit d'extraction fourni avec le sérum pour l'extraction.

Différents échantillons ont été broyés dans du PBS, à raison 1g d'échantillon dans 4ml du PBS, Le broyat filtré à l'aide d'une étamine (Tahirine, 2015). Selon Tahirine, (2015) Le protocole utilisé en DAS-ELISA décrit par Trenynck et Avrameas (1991) est :

- Sensibilisation sur plaque : Dépôt d'anticorps spécifique dilué au 1/1000 dans un tampon carbonate bicarbonate (0.1M PH 9.6).
- Incubation de la plaque : deux heures à 37°C ou une nuit à 4°C
- Lavage : 3 x 5 min avec PBS-Tween
- Dépôt d'antigène : extraction directe en PBS à raison de 1g/4ml
- Incubation : 2 heures à 37°C
- Lavage : 3 x 5 min avec PBS-Tween
- Dépôt d'anticorps spécifiques liés au phosphate alcalin: Diluer au 1/1000 dans du PBS
- Incubation : 2 heures à 37°C
- Lavage : 3 x 5 min avec PBS-Tween
- Dépôt du substrat : PNPP dilué dans du tampon diéthanolamine ;
- Incubation à température ambiante
- Lecture à 405 nm
- Ajouter du NaOH 1N pour stopper la réaction.

Les résultats ont été lus par spectrophotométrie (lecteur de plaques ELISA à 405 nm après 30 min d'incubation puis 1 h à température ambiante (M.Tahirine et *al.*2019).

3.7.2. Test Electrophorèse SDS-PAGE

La méthode utilisée est l'électrophorèse discontinue sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (en présence de SDS). Les 16 extraits viraux sérologiquement positifs ont été testés (M.Tahirine et *al.* 2019). Alors que :

- Les feuilles des échantillons ont été broyées dans du tampon laemmelli (1970) (Annexe 3). Les extraits ont été dénaturés dans un bain d'eau bouillante pendant 3 minutes puis déposés séparément dans des puits sur des gels de concentration électrophorétiques.
- La migration s'est produite à 4° pendant au moins 4 heures (Tahirine, 2015).

Le poids moléculaire de chaque bande protéique a été estimé sur un courbe étalon établi à partir du logarithme du poids moléculaire des protéines marquées et des distances de migration de ces mêmes protéines. L'équation de la droite de régression est nécessaire pour la taille moléculaire de la protéine (Tahirine, 2015). (Eichmeier A., Baranek M., Pidra M. , 2011)

3.8. L'étude d'Aleš Eichmeier et *al.* (2020)

Dans cette étude, Ils visent à l'analyse de séquençage de l'ARN comme outil pour obtenir des informations générales et complètent sur la diversité virale dans des vignes sélectionnées (Aleš Eichmeier et *al.* 2020). Ils ont suivis les étapes suivantes (Aleš Eichmeier et *al.* 2020) :

1. Échantillonnage et collecte d'isolats viraux :

- En juin, 2018, dans neuf vignobles situés dans cinq régions viticoles d'Algérie, Cinquante-quatre vignes présentant des déformations foliaires ont été collectées dans les vignobles, qui avaient plus de 10 ans ;
- Les entre-nœuds en bois ont été coupés, emballés et transférés au Laboratoire Mendelem, Département de génétique, Faculté d'horticulture, MENDELU, République tchèque. Au total, 54 vignes ont été testées pour la présence du GPGV.

2. Extraction de l'ARN et détection du GPGV par RT-PCR et séquençage des amplicons PCR :

- L'ARN a été extrait directement de 1 g de phloème raclé à l'aide du kit Spectrum Plant Total RNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). L'ARN a été rétro-transcrit en ADNc comme décrit par Eichmeier et *al.* (2011).

- Ensuite, la PCR a été réalisée en utilisant l'ADN polymérase GoTaq® G2 Flexi (Promega, Madison, WI, USA). Pour élargir nos connaissances sur la présence du GPGV en Algérie. Les amplicons PCR ont été séquencés par séquençage Sanger comme décrit par Eichmeier et *al.* (2011).

3. Séquençage des petits ARN

- L'ARN total extrait obtenu par la RT-PCR a été utilisé pour la préparation de la bibliothèque. Une bibliothèque de petits ARN a été construite à l'aide du TruSeq Small RNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) puis ils ont fait la purification et le contrôle de qualité.

- Pour le séquençage, la bibliothèque finale groupée en petits ARN qui était constituée de deux échantillons :

- AL_41 a été marqué avec l'indice 9 (GATCAG).
- AL_42 a été marqué avec l'indice 10 (TAGCTT).

- La bibliothèque a été séquencée avec l'instrument MiniSeq (Illumina) à l'aide de la trousse de réactifs MiniSeq à haut rendement (75 cycles) (Illumina) fournissant des lectures de 36 nucléotides.

4. Détermination de la présence des virus de la vigne

La présence des virus a été déterminée sur la base du consensus des résultats, concernant les contigs BLASTn et les lectures mappées dans les références. Dans leur étude, ils ont acquis un faible nombre de lectures, et Ils n'ont pas établi le seuil de couverture du génome et de profondeur de séquençage pour déterminer clairement la présence du virus. Dans chaque cas où des lectures virales ont été obtenues, ils ont exécuté les protocoles RT-PCR spécifiques.

Chapitre 5 : Résultats et discussion

1. Les résultats

1.1. L'étude A d'Amedjkouh Hafida (2004)

1.1.1. Observation directe des symptômes

Le diagnostic symptomatique ou visuel est la première étape de l'évaluation sanitaire du vignoble (Tab.14) (Amedjkouh, 2004).

Tableau 13. Les symptômes pathologiques de chaque maladie (Amedjkouh, 2004).

Les Maladies	Les symptômes	
	Au vignoble	Sous serre
La court-noué	<p>1/ Sur les variétés <i>Ahmar bou amar et Valensi</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sur les feuilles, différentes déformations sont notées tels que des taches jaunes sous forme d'anneaux chlorotiques. - Sur les rameaux : bifurcation anormale et fasciation des rameaux. <p>2/ Chez la variété <i>Muscat de Cherchell</i> : aucun symptôme</p>	<p>1/ Sur les variétés <i>Ahmar bou amar et Valensi</i> des feuilles asymétriques sont observées avec dentelures aiguës des bords</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sur les rameaux, présence des entre nœuds courts accompagnés d'un développement en zigzag. <p>2/ Chez <i>Muscat de Cherchell</i>, aucun symptôme de court noué n'a été révélé.</p>
la marbrure	les trois variétés n'ont révélé aucun symptôme accordé à cette maladie.	<p>1/ Sur les variétés <i>Ahmar bou amar et Valensi</i>, les plants montrent des éclaircissements des nervures des feuilles du sommet.</p> <p>2/ Chez <i>Muscat de Cherchell</i>, les symptômes de la marbrure ne sont pas observés.</p>
L'enroulement foliaire	1/ Aucun symptôme au vignoble de <i>Benchicao</i> , sur la variété <i>Ahmar bou amar et la variété Valensi</i>	Aucun symptôme d'enroulement foliaire n'a été observé sur les trois variétés de vigne.

	2/ Chez <i>Muscat de Chercell</i> , Ils ont noté un jaunissement des feuilles	
--	---	--

Les symptômes caractéristiques de court-noué observés dans les serres des variétés *Ahmar bou amar* et *Valensi* confirment les résultats obtenus au vignoble. Cependant, l'absence de la marbrure dans le vignoble, Ils ont observé des réponses positives dans les variétés *Ahmar bou amar* et *Valensi* en serre (Amedjkouh, 2004).

Concernant l'enroulement, les variétés *Ahmar bou amar* et *Valensi* ne présentent aucun symptôme au vignoble conduisant à une période de prospection (juin), alors que les symptômes d'enroulement sont meilleurs en automne. Pour la variété *Muscat de Chercell*, les symptômes de l'enroulement foliaire en serre sont moins prononcés que ceux enregistrés à la vigne. De tous les résultats obtenus, l'état sanitaire de certains vignobles algériens en matière de maladies virales est préoccupante (Amedjkouh, 2004).

1.1.2. Indexage par inoculation mécanique sur indicateurs herbacés

Les trois plantes utilisées (courgette, tomate et pois) ont développé divers symptômes après inoculation mécanique d'une gamme d'hôtes herbacés. Les observations ont porté sur la nature des symptômes et le pourcentage de plantes atteintes 15 jours après l'inoculation (Figure 09) (Amedjkouh, 2004).

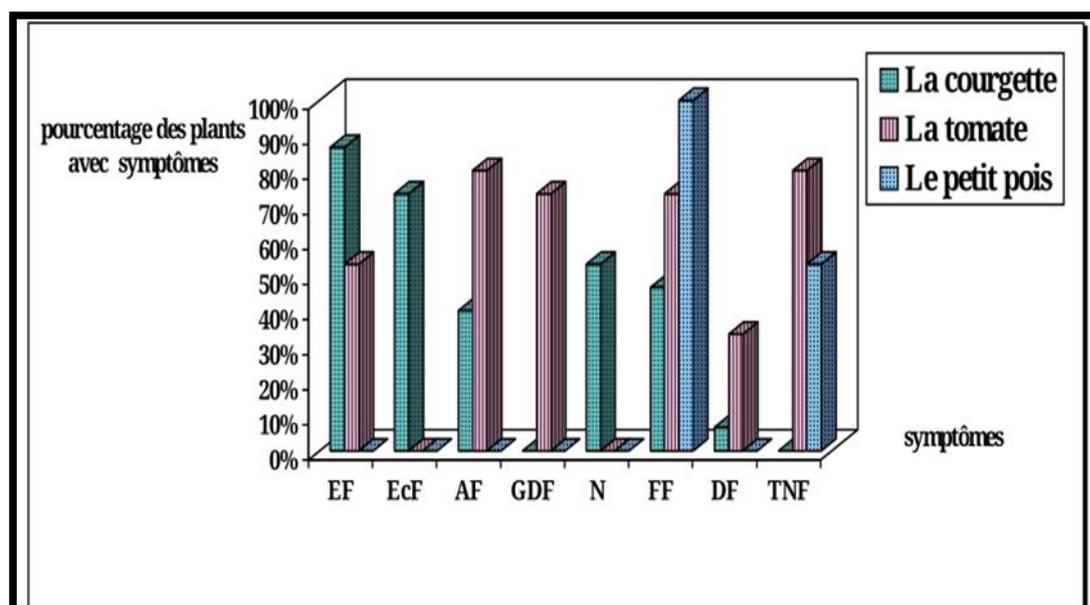


Figure 9. Les différents symptômes induits par le virus *GLRaV* sur les feuilles, chez les trois espèces indicatrices (Amedjkouh, 2004). Légendes : Enroulement des feuilles (EF) ;

Eclaircissement des feuilles (ECF) ; Asymétrie des feuilles (AF) ; Gaufrage et Dessèchement des feuilles (GDF) ; Nanismes (N) ; Flétrissement des feuilles (FF) ; Déformation des feuilles (DF) ; Taches nécrotiques des feuilles (TNF).

Ces résultats ont montré que les trois espèces inoculées (courgette, tomate et pois) réagissaient différemment à la présence du virus. Le virus correspond au *GLRaV* sur la base des symptômes extériorisés chez les trois espèces indicatrices. Ils ont constaté que les tomates et les pois étaient plus sensibles, mais que les pois présentaient moins de symptômes. Ils ont remarqué que les courgettes répondaient mieux à la présence du virus, avec une moyenne de 43,33 % de symptômes. Ainsi, la courgette est répertoriée comme la meilleure plante indicatrice.

En effet, l'utilisation de plantes indicatrices à base d'herbacées est très avantageuse car elles sont faciles à cultiver. De plus, elles se caractérisent par une croissance très rapide et une extériorisation des symptômes (durée maximale de 15 jours).

1.1.3. Test Elisa

a. Résultat du test Elisa pour les trois variétés de vigne

Les résultats des tests Elisa pour trois cépages (*Ahmarbou amar*, *Valensi* et *Muscat de Chercell*) ont montré que *Ahmar bou amar* et *Valensi* étaient positifs pour les virus du court noué (*GFLV*) et de la marbrure (*GFKV*), et pour le virus de l'enroulement foliaire (*GLRaV I* et *GLRaV III*) étaient négatifs. Par contre, le cultivar *Muscat de Chercell* était positif pour le virus de l'enroulement (*GLRaV III*) mais pas pour (*GFLV*, *GFKV* et *GLRaV I*). Les résultats des tests Elisa ont confirmé les observations visuelles dans les vignobles et les serres, et ont révélé la présence du virus d'enroulement foliaire (*GLRaV III*) (Amedjkouh, 2004).

b. Résultat du test Elisa pour les plantes indicatrices

Les résultats du test Elisa pour les trois espèces indicatrices (courgette, tomate et pois) ont indiqué que les trois espèces de courgette, tomate et pois étaient négatives pour *GLRaV I* et positives pour *GLRaV III*. Ces résultats confirment également les résultats obtenus par le test Elisa sur la variété *Muscat de Chercell*. Ainsi que, l'observation visuelle, une inoculation mécanique ont confirmé que les cultivars de *Muscat de Chercell* étaient infectés par l'enroulement foliaire (*GLRaV III*) (Amedjkouh, 2004).

1.2. L'étude B de Tabouche (2004)

1.2.1. Pour l'indexage biologique

Tableau 14. Expression des plants de concombre à l'inoculation (Tabouche, 2004).

Stations	Parcelle	Nbre Echantillons Testés	Symptômes observés
Station1(Chiffa)	P1	7 * / 10 **	-Eclaircissement des nervures
	P2	5 * / 10 **	-Eclaircissement des nervures. -Jaunissement.
Station 2 (Médéa)	P1	4 * / 10 **	-Eclaircissement des nervures. -Jaunissement.
	P2	7 * / 10 **	-Eclaircissement des nervures
Station 3 (Blida)	P	1* / 10 **	-Jaunissement.
Témoin malade		10 * / 10 **	-Jaunissement total des plants -Eclaircissement des nervures
Témoin sain			-Absence de jaunissement

Légende : * : Numérateur : Nbre de plants positifs

** : Denominateur : Nbre de plants inoculés

Selon les résultats obtenus, on remarque que les deux stations de Chiffa et Médéa, ont enregistré le plus grand nombre de plantes positives (infectés).

1.2.2. Résultats de la DAS-ELISA

Le test sérologique s'est effectué sur 870 échantillons (feuilles et rameaux) (Tab. 16)

Tableau 15. **Taux d'infection dans les stations prospectées (Tabouche, 2004).**

Stations	échant. Testés	échant. Positifs	Taux d'infection (%)
Chiffa (1)	169	48	28,40
Blida (2)	100	20	20
Mouzaia (3)	181	57	31,49
El Affroune (4)	90	54	60
Bourroumi (5)	118	95	80,5
HamrEl Ain (6)	114	91	79,82
Hocienia (7)	98	30	20,61
Total	870	395	45,40

D'après les résultats de test sérologique, la station la plus infectée était les deux stations de Bourroumi et Hamr El Ain avec un taux d'infection 80,5 % et 79,82 respectivement. Alors que les stations de Blida et Hocienia étaient, le moins infectées avec un taux d'infection $\approx 20\%$.

1.3. L'étude C de Lehad Arezki (2012)

1.3.1. Observations des symptômes dans les vignobles prospectés (l'état général des vignobles).

Six cépages différents ont été étudiés dans 5 vignobles de l'ouest et 5 vignobles de la région centrale. Ils ont juste regardé les différents symptômes d'enroulement parmi les six cépages par une certaine spécificité. Comme le cépage *Alcinate de Bouchet*, il a une couleur rouge brique foncée. Contrairement au cépage *Alphonse Lavallé* avec des boursoufflures et coloration rouge brique. Les *Dattier de Bayrouth* présentent un léger jaunissement des feuilles (A.Lehad, 2012).

Ils ont constaté que les cépages *Alcinate de Bouchet*, *Dattier de Bayrouth* et *Alphonse Lavallé* étaient extrêmement sensibles aux symptômes d'enroulement par rapport aux cépages *Cardinal*, *Valenci* et *El-baydha* (*Chaouch Blanc*). Toutes les vignes atteintes avaient des feuilles plus épaisses par rapport aux sujets sains.

Les observations suggèrent que la maladie de l'enroulement des vignes est répandue et peut être d'origine virale ou bien phytoplasmique. En conséquence, les rendements continuent de baisser, affectant la maturité des raisins

1.3.2. Analyse sérologique

1.3.2.1. Réactions sérologique

Le tableau suivant montre les réactions des échantillons vis-à-vis de différents antisérums (anticorps polyclonaux contre le *GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6*).

Tableau 16. Les réactions des échantillons vis-à-vis de différents antisérums (A.Lehad 2012).

Réaction sérologique	
Type de l'antisérum polyclonal	Réaction des échantillons
l'antisérum <i>GLRaV-1</i>	1/Réaction positive des six échantillons vis à vis de l'antisérum : deux échantillon sur le cépage <i>Alicante Bouchet</i> , deux échantillon sur le cépage <i>Valenci</i> , un échantillon sur le cépage <i>El-Baydha</i> et un échantillon sur le cépage <i>Dattier de Beyrouth</i> .
l'antisérum <i>GLRaV-2</i>	2/ Ils ont trouvé qu'une réaction positive des 16 échantillons avec l'antisérum <i>GLRaV-2</i> : 8 échantillon sur le cépage <i>Alcinate de Bouchet</i> , 4 échantillon sur le cépage <i>Valenci</i> , Un échantillon sur le cépage <i>Chaouch Blanc</i> et le cépage de <i>cardinal</i> , et deux échantillon sur le cépage de <i>Dattier de Beyrouth</i> .
l'antisérum <i>GLRaV-3</i>	67 échantillons montrés une réaction positive : 16 échantillons sur le cépage <i>Alcinate Bouchet</i> et

	<i>Dattier de Beyrouth</i> , et 9 échantillons sur le cépage de <i>Valenci</i> et aussi de <i>Alphonse Lavallé</i> , 10 échantillons sur le cépage <i>El-Baydha</i> , et 7 échantillon sur le cépage <i>Cardinal</i> .
l'antisérum <i>GLRaV-5</i>	Il y a six échantillons montrés une réaction positive : un échantillon sur le cépage de <i>Alcinate Bouchet et El-Baydha</i> , deux pour le cépage <i>Valenci</i> et <i>Dattier de Beyrouth</i> .
l'antisérum <i>GLRaV-6</i>	Deux échantillons montrés une réaction positive : 1 échantillon sur le cépage <i>Valenci</i> et un sue le cépage <i>El-Baydha</i> .

Selon le tableau, cette étude sérologique montre que la présence de *GLRaV-1, 2, 3, 5 et 6*, et le virus le plus répandu est *LeGLRaV-3*. Ils ont trouvé 67 échantillons réagit positivement avec l'antisérum *GLRaV-3*, Ce qui prouve la menace de ce virus le vignoble algérien. Les virus de l'enroulement foliaire de la vigne sont largement répandus dans tous les vignobles algériens (A.Lehad, 2012).

Ils ont détecté la présence de *GLRaV-5* et *6* pour la première fois. Des tests par d'autres techniques plus sensibles sont nécessaires pour éliminer le risque de faux négatifs de test ELISA.

1.3.2.2. Prédominance des virus de l'enroulement foliaire de la vigne

a) Pourcentage de plante infectée.

Ils ont déterminé la prédominance des virus de l'enroulement foliaire de chaque type de cépage (Tab.18).

Tableau 17. La prédominance des virus de l'enroulement foliaire de chaque type de cépage (A.Lehad, 2012).

Vignoble	Nbre d'échantillon	Echantillon (+)	Pourcentage d'infection

<i>Valenci 1</i>	10	6	60 %
<i>Valenci 2</i>	10	8	80 %
<i>Alicante 1</i>	10	6	60 %
<i>Alicante 2</i>	10	9	90 %
<i>Alicante 3</i>	11	7	63.63 %
<i>Alphonse Lavallé</i>	9	9	90 %
<i>Cardinal</i>	10	7	70 %
<i>Dattier de Beyrouth</i>	10	9	90 %
<i>Dattier de Beyrouth 2</i>	10	7	70
<i>El-Baydha</i>	10	10	100 %
Total	100	78	78 %

Le tableau montre que certains cépages sont plus sensibles à l'infection par les virus de l'enroulement foliaire de la vigne que d'autres (A.Lehad, 2012).

Le taux d'infection global était de 78 %, dont 64 % étaient des infections simples et 14 % étaient des infections mixtes. Cela a confirmé que les enroulements foliaires observés au cours des prospections étaient dus à la présence de ces virus. En conséquence, certains échantillons ont été infectés par plusieurs virus en même temps. Deux vignobles de *Valenci* avaient des taux d'infection entre 60 % et 80 %, et trois vignobles *d'Alicante Bouchet* avaient des taux d'infection entre 60 %, 90 % et 63 %. Le taux d'infection du *Dattier de Beyrouth* dans les deux vignobles était compris entre 90 et 70 %. Les taux d'infection pour les cépages *Alphonse Lavalle*, *Cardinal* et *El Beydha* étaient respectivement de 100 %, 70 % et 100 % (A.Lehad, 2012).

Ils ont noté que les cépages *d'Alphonse Lavallé* et *El Beydha* présentaient des taux d'infection les plus élevés, avec un taux d'infection de 100 %. Les cépages avec des taux d'infection supérieurs à 60% indiquent un mauvais état sanitaire des vignobles prospectés (A.Lehad, 2012).

b) Prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne entre la région centre et ouest de l'Algérie

Prélèvements dans 5 vignobles du centre et 5 de l'ouest. D'après les résultats de test sérologique, la prévalence du virus associé à l'enroulement foliaire de vigne (*GLRaV-3*) était presque doublée dans les vignobles de l'ouest par rapport à la région centre, avec des taux d'infection de 85,81 % et 70,59 %, respectivement. Cependant, *GLRaV-2* est presque trois fois plus dominant dans la région ouest avec 21,57 % par rapport à la région centre avec 8,16% (Tab.19) (A.Lehad, 2012).

Tableau 18. La prédominance des virus associés à l'enroulement foliaire de la vigne entre la région centre et ouest de l'Algérie (A.Lehad, 2012).

Région	Nbre d'échantillon	<i>GLRaV-1</i>	<i>GLRaV-2</i>	<i>GLRaV-3</i>	<i>GLRaV-5</i>	<i>GLRaV-6</i>	Taux d'infection
Ouest	49	4.08 %	21.57 %	85.71 %	2.04 %	2.04 %	85.81 %
Centre	51	7.84 %	8.16 %	49.02 %	9.80 %	1.96 %	70.59

1.3.3. Détection RT-PCR des virus *GLRaV-3* et 5

Ils ont sélectionné au hasard 58 échantillons parmi les 100 échantillons testés par Elisa (Tab.20). Ces échantillons ont été analysés par PCR de transcription inverse (RT-PCR) (A.Lehad, 2012).

Tableau 19. Le nombre d'échantillons testés par cépages (A.Lehad, 2012).

Nom de cépage	Localisation	Echantillon testés
<i>Alicante Bouchet</i>	Ain Témouchent	20
<i>Valenci</i>	Mascar	12
<i>Alphonse Lavallé</i>	Alger	4
<i>Chaouch de Blanc</i>	Alger	6
<i>Dattier de Beyrouyh</i>	Boumerdès	10

<i>Cardinal</i>	Boumerdès	6
-----------------	-----------	---

1.3.3.1. Identification du *GLRaV-3*

L'amplification du fragment de 546 pb s'est produite dans 36 des 58 échantillons testés. Les identifications *GLRaV-3* suivantes ont été observées : 9 échantillons de cépage *Alicante Bouchet*, 7 échantillons de *Valenci*, 10 échantillons de *Dattier de Beyrouth*, 1 échantillon de *L'Alphonse Lavallé*, 5 échantillons de *Chaouch Blanc*, pour le *Cardinal* il y a 4 échantillons (A.Lehad, 2012).

1.3.3.2. Identification du *GLRaV-5*

L'amplification du fragment de 690 pb s'est produite dans 3 des 58 échantillons testés. L'identification de *GLRaV-5* a été observée dans un échantillon du cépage *Dattier de Beyrouth* et dans 2 échantillons du cépage *Valenci* (A.Lehad, 2012).

D'après les résultats des analyses moléculaires, le virus *GLRaV-3* infecte tous les cépages et présent dans les deux régions. C'est donc le plus répandu.

1.3.4. Comparaison test sérologique et RT-PCR

La comparaison des tests sérologiques et de la RT-PCR pour les deux virus *GRLaV-3* et 5 a montré que certains échantillons étaient positifs par Elisa mais pas par RT-PCR, et vice versa (Tab.21) (A.Lehad, 2012).

Tableau 20. Comparaison des résultats obtenus ELISA et RT-PCR de la détection des virus *GRLaV-3* et 5 (A.Lehad, 2012).

Cépages	Nbre d'échantillon	<i>GRLaV-3</i>		<i>GRLaV-5</i>	
		ELISA	RT-PCR	ELISA	RT-PCR
<i>Alicante Bouchet</i>	20	5	9	2	0
<i>Valensi</i>	12	3	7	2	2
<i>Alphonse Lavallé</i>	4	4	1	0	0

<i>Cardinal</i>	6	4	4	0	0
<i>Dattier de Beyrouth</i>	10	6	10	0	0
<i>Chaouch Blanc</i>	6	6	5	0	0
Total	58	28	36	4	3

Selon le tableau, Le pourcentage de plantes infectées a été estimé pour chacune des deux méthodes. Concernant *GRLaV-3*, sur les 58 échantillons testés, 28 étaient positifs par Elisa et 36 par RT-PCR. Pour Le *GLRaV-5*, sur les 58 échantillons testés, 4 ont répandu positivement au test Elisa et 3 échantillons pour le test de RT-PCR (A.Lehad, 2012).

Une comparaison entre les tests sérologiques et la RT-PCR montre que les limites de chaque test. Pour les tests immuno-enzymatiques, l'un des facteurs limitant est la concentration virale, qui dans certains cas peut être très faible, et les tests sérologiques peuvent produire des réponses négatives même en présence d'antigène. Pour les tests moléculaires, le principal inconvénient est la spécificité des amorces.

D'après ces résultats, ils voient que la combinaison des deux techniques semble recommandable. Le développement de ces outils serait d'un apport précieux pour le contrôle de la maladie (A.Lehad, 2012).

1.4. L'étude D d'A. Lehad et al., (2014)

1.4.1. Etat générale des vignobles

Le nombre total d'échantillons collectés en décembre 2012 était de 484 (automne), 100 échantillons de la wilaya d'Ain Témouchent, 100 échantillons de la wilaya de Mascara et 29 échantillons de la collection de vigne autochtone du LITAF à Tighenif. Dans la région centre, Ils ont collecté 77 échantillons de wilaya d'Alger, 100 échantillons dans la wilaya de Boumerdès, et 78 de la wilaya de Tizi-Ouzou (Arezki, 2016).

Ils ont observé que les symptômes d'enroulement étaient fréquents dans les vignobles algériens, en particulier dans l'ouest algérien. Ils ont constaté que la plupart des vignobles d'Ain Témouchent et de Mascar, composés principalement des cépages *Alicante Bouchet et*

Valensi, présentait des symptômes d'enroulement généralisés, qui variaient selon les cépages. Ils ont observé aussi le cépage *Alicante Bouchet* qui avait un enroulement rouge brique foncé, légèrement différent du jaunissement du cépage *Dattier de Bayrouth* (voir la Figure 10) (Arezki, 2016).

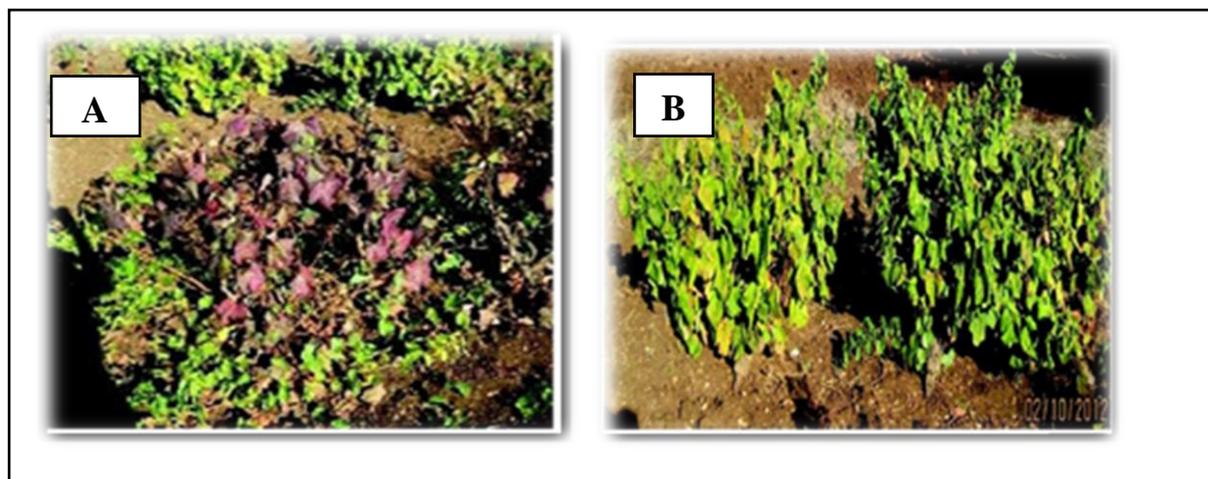


Figure 10. Symptôme d'enroulement foliaire de la vigne : Sur un cépage rouge *Alicante de Bouchet* (A), et cépage *Dattier de Beyrouth* (Arezki, 2016).

1.4.2. Analyse sérologique

Les résultats obtenus par le test immun-enzymatique sur 484 échantillons, ils ont noté que 245 échantillons étaient infectés par au moins un des trois virus testés, soit environ 50,6 %. Sur les 245 échantillons infectés, 26 % (64/245) présentaient une infection mixte causée par au moins deux virus et 74 % (181/245) présentent d'infections simples (Figure 11) (Arezki, 2016).

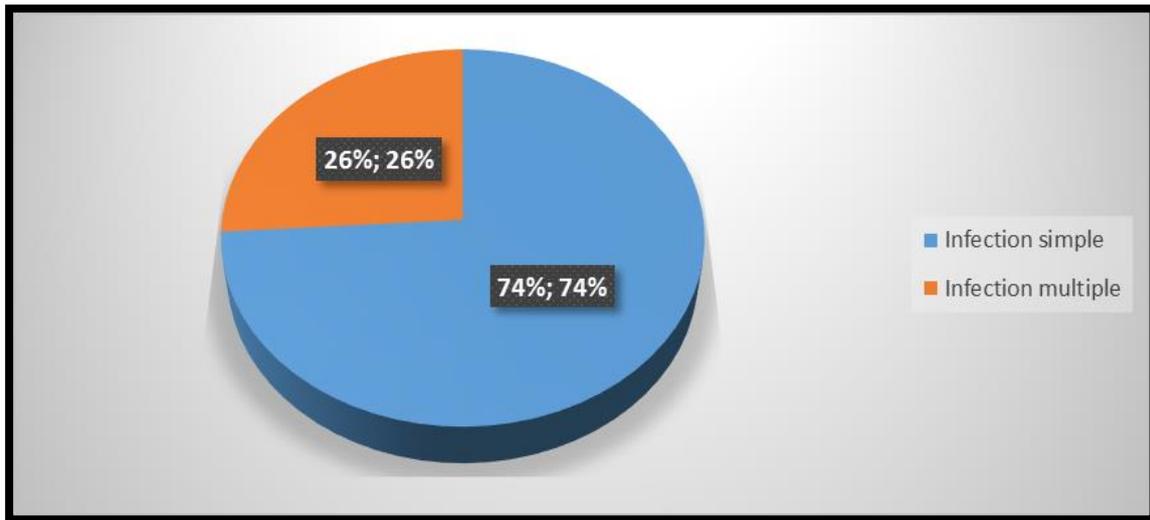


Figure 11. Comparaison entre l'infection multiple et simple (Arezki, 2016).

Ils ont montré que les infections simples sont plus importantes que les infections multiples pour *GLRaV-3*, contrairement aux infections multiples pour *GLRaV-1* et 2. Ils ont noté que l'association entre les virus *GLRaV-2* et 3 était plus forte que les virus *GLRaV-1* et 3. (Tab.22) (Arezki, 2016).

Tableau 21. La comparaison entre les infections simples et les infections multiples (Arezki, 2016).

Simple infection	<i>GLRaV-1</i>	<i>GLRaV-2</i>	<i>GLRaV-3</i>	Total
Infection simple	11	21	149	181
Infection multiple	15	56	63	64
Association <i>GLRaV-1</i> et 3	15			
Association <i>GLRaV-2</i> et 3	56			
Infection total	245			

D'après le tableau, Le *GLRaV-3* c'est le virus le plus répandu, suivi par le virus *GLRaV-2* et le *GLRaV-1*(Arezki, 2016).

Le cultivar *King's Rubi* était le plus infecté par *GLRaV-3* avec un taux d'infection de 88,9% (Tab.24). Le taux d'infection de l'ITAF dans le suivi des variétés autochtones atteignait 79 %, et le cépage autochtone le plus cultivé, le *Gros noir*, était infecté par le *GLRaV-3* dans 60 % des cas. Cinsault a le taux d'infection le plus bas à 7,5%(Arezki, 2016).

Le *GLRaV-2* est le deuxième virus responsable de l'infection virale de la vigne Algérienne.

Les cépages les plus touchés par le virus étaient *l'Alicante Bouchet* (26,7%), le *King's Rubi* (22,2%), *Gros Noir* (29%), le *Dattier de Bayrouth* (21,1%), le *Valensi* (11,9%) et le *Muscat d'Alexandrie* (10%). Le taux d'infection des autres cépages était inférieur à 10 %, tandis que le cépage Merseguerra n'avait aucune infection (Tab.23).

Ils ont trouvé que Le virus *GLRaV-1* est le moins répandu avec le taux d'infection 5.4% et il est absent dans certains cépages, tels que : *King's Rubi*, cépage autochtone ITAF, Merseguerra (Arezki, 2016).

Tableau 22. Prévalence des virus *GLRaV-1*, 2 et 3 dans les différents cépages (Arezki, 2016).

Cépage autochtone	Nbre	<i>GLRaV-1</i>	<i>GLRaV-2</i>	<i>GLRaV-3</i>	Echantillons infectés
<i>Dattier de Bayrouth</i>	71	8.5%	21.1%	40.8%	33 (46.5%)
<i>Gros noir</i>	100	7%	29.0%	60.0%	66 (66.0%)
<i>Cardinal</i>	52	1.9%	5.8%	46.2%	24 (46.2%)
<i>Alicante</i>	30	3.3%	26.7%	36.7%	16 (53.3%)
<i>King's Rubi</i>	9	0.0%	22.2%	88.90%	8 (88.9%)
<i>Muscat d'Alexandrie</i>	70	11.4%	10.0%	37.1%	35(50.0%)
<i>Merseguerra</i>	10	0.0%	0.0%	70.0%	7 (70%)
<i>Cinsault</i>	40	2.5%	7.5%	7.5%	6 (15.0%)

<i>Carignon</i>	31	3.2%	9.7%	32.3%	10 (32.3%)
<i>Valensi</i>	42	2.4%	11.9%	26.2%	16 (38.1%)
Autochtones ITAF	29	0.0%	6.9%	79.3%	24 (82.8%)
Total	484	5.4%	15.9%	43.8%	245 (50.6%)

Selon le tableau 23, La totalité des échantillons infectés par les différents virus sont 245 sur 484 que le nombre total des échantillons collectés. Et le *GLRaV-3*, de genre *Ampelovirus*, est le plus répandu.

1.4.3. Analyse moléculaire

Tous les échantillons positifs ont été analysés par RT-PCR pour déterminer la diversité génétique d'isolats *GLRaV-3* sélectionnés en caractérisant des fragments du gène de l'homologue 70 de la protéine de choc thermique (HSP70h) et de la protéine d'enveloppe (CP) (Tableau 24) (A.Lehad et al. 2014).

Tableau 23. Les résultats observés pour chaque virus par RT-PCR (Arezki, 2016).

Type de virus	Les résultats d'analyse moléculaire
<i>GLRaV-1</i>	1/ une bande amplifiée de 320 pb. Donc le gène HSP70h de <i>GLRaV-1</i> a été identifié. 2/ Tous les échantillons positifs lors du test ELISA ont réagi positivement.
<i>GLRaV-2</i>	1/ une bande amplifiée de taille 331pb, donc le produit PCR du gène HSP70h du <i>GLRaV-2</i> .
<i>GLRaV-3</i>	1/ Les amorces utilisées amplifiaient respectivement une bande de 484pb et 545pb des CP et HSP70h. 2/ Tous les échantillons testés positifs par ELISA étaient positifs par RT-PCR.

Le nombre total d'échantillons générant des amplicons du gène HSP70h était de 60. Une comparaison au niveau nucléotidique indique la possibilité de l'existence de trois variantes génétiques nécessaires à une meilleure compréhension de la diversité génétique du *GLRaV-3* en Algérie (A.Lehad et al.2014).

1.5. L'étude D d'Idir Idris (2016)

1.5.1. Analyse symptomatologique

Après l'analyse symptomatologique des échantillons collectés, ils ont remarqué deux syndromes distincts : la malformation des feuilles, des sarments et des grappes, et le changement de la pigmentation des feuilles et observé quelques symptômes foliaire et corticaux rappelant ceux du court-noué (Idris, 2016).

Ils ont trouvé 7 symptômes dans la parcelle 2 de la commune de Tassala-El-Merdja de la Wilaya d'Alger et dans la parcelle 1 de Ben Chicao Wilaya de Médéa et aussi dans la commune d'Ain Benian d'Alger qui sont occupées respectivement par les cépages : *Dattier de Beyrouth*, *Muscat* et *le cardinal*. Par conséquent, les symptômes les plus courants sont la bifurcation des sarments et le raccourcissement des entre nœuds. Le symptôme le plus sévère observé a été l'aplatissement des sarments au niveau de la commune d'Ain Benian sur le cépage Cardinal (Idris, 2016).

Ils sont observés que dans la région de Blida, le cépage Gros noir qui est le plus infecté (nombre de symptômes de la maladie plus élevé) (la figure 12). Alors que, dans la région d'Alger, le Cardinal qui est le plus touché suivi par le Dattier de Bayrouth.

Dans la région de Médéa, le *Muscat D'Alexandrie* est le cep le plus infecté. Donc, nous remarquons que les symptômes les plus élevés se trouvent dans trois variétés : *Muscat D'Alexandrie*, *Cardinal*, *Dattier de Beyrouth* et *Gros noir* dans les régions de Médéa, Alger et Blida, respectivement.

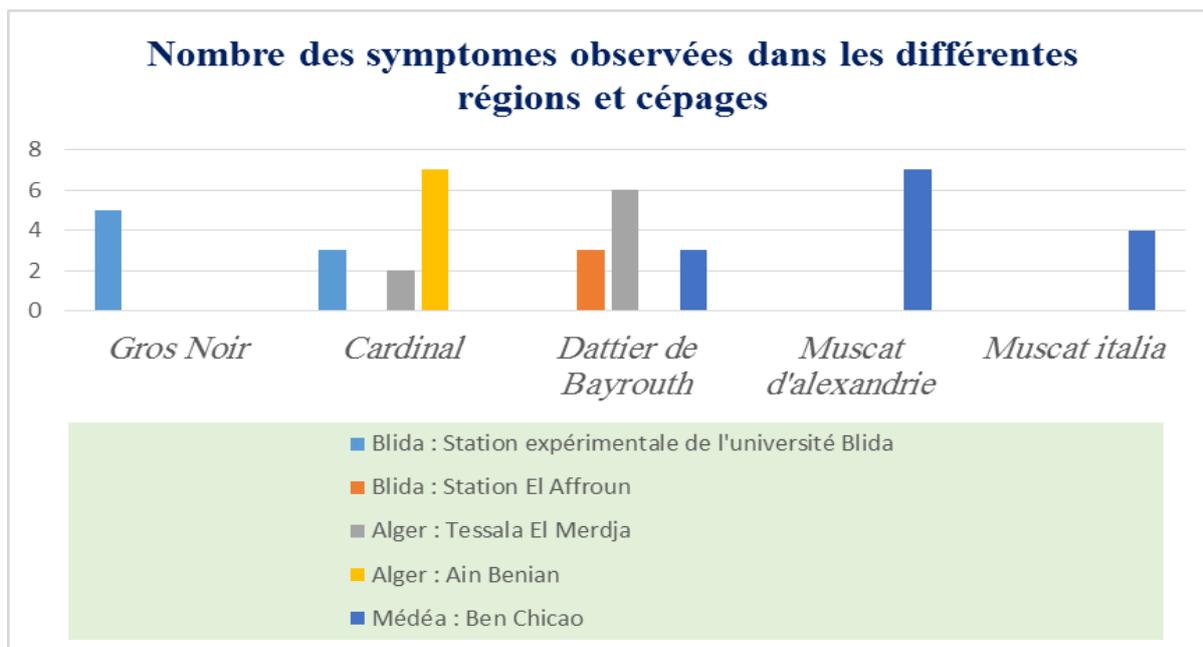


Figure 12. Colonnes graphiques illustrant le nombre des symptômes observés dans les différentes régions et cépages.

Un ensemble de symptômes foliaires observés sur les cépages, après leur travail en avril et juin, période la plus favorable à la détection des symptômes du *GFLV*. l'expression des symptômes du court-noué diffère selon les cépages en fonction des isolats de virus, et des conditions pédoclimatiques. Cette symptomatologie simple ne leur a pas permis de confirmer la présence du *GFLV* en raison de confusions possibles entre ce dernier et d'autres maladies liées à d'autres agents pathogènes, divers champignons ou facteurs abiotiques.

1.5.2. Analyse biologique

L'inoculation mécanique de différentes souches de virus sur des plantes herbacées de trois stations (Ain Benian, Tessala El Merdja et Ben Chicao). Ils ont observé les symptômes caractéristiques des *Cucurbitacées* manifestés par l'espèce *Cucumis sativus* (Voir le tableau 25) (Idris, 2016).

Tableau 24. Les résultats de la transmission mécanique sur le concombre (*Cucumis sativus*) par des souches virales et de différentes stations (IDRIS.2016).

Station	Nombre d'échantillons testés	Symptômes observés
Ain Benian	7*/10**	Eclaircissement des nervures
Tessala El Merdja	6*/10**	Eclaircissement des nervures,

		Lésions locales chlorotiques
Ben Chicao	8*/10**	Eclaircissement des nervures, Jaunissement
Témoin	0/10	Absence

Remarque : * Numérateur = Nombre des plants positifs ; ** Dénominateur = Nombre des plants inoculés (IDRIS.2016).

Selon le tableau 23, dans le vignoble d'Ain Benian, ils ont constaté que 7 plantes sur 10 plantes (70%) avaient extériorisé les symptômes d'éclaircissement des nervures. Donc dans le vignoble de Ben Chicao, il y a 8 plantes (80%) ont extériorisé les symptômes l'éclaircissement des nervures et le jaunissement. Ainsi que pour le dernière vignoble le Tessala El Merdja, Ils ont observé 6 de plants (60%) ont extériorisé le symptôme d'éclaircissement des nervures avec Lésions locales chlorotiques (Idris, 2016).

1.5.3. Analyse sérologique (test DAS-ELISA)

Pour déterminer la présence du *GLFV*, un test DAS-ELISA a été utilisé pour 94 échantillons provenant de différents sites (Ain Benian, Tessala El Merdja, El Affroun, Blida et Ben Chicao) et différentes cépages (*Cardinal*, *Gros Noir*, *Muscat d'Alexandrie*, *Muscat italiae* et *Dattier de Bayrouth*), seules 11 ont été testées positives au DAS-ELISA, montrant un taux d'infection de 11,70% (voir la figure 13) (Idris, 2016).

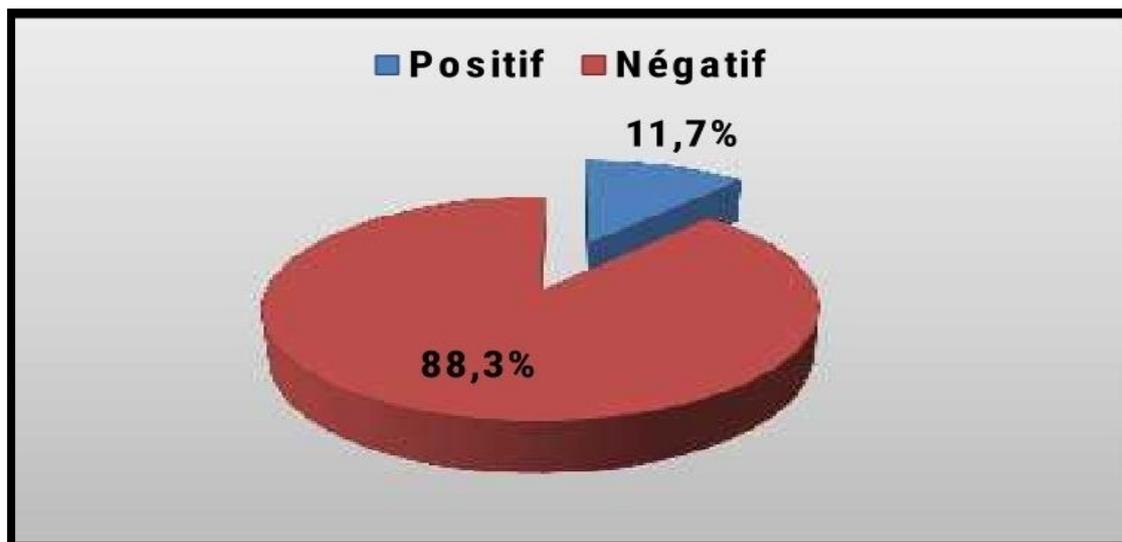


Figure 13. Un diagramme circulaire montre le taux d'infection à partir de test DAS-ELISA (Idris, 2016).

Un taux d'infection plus faible a été obtenu pourrait s'expliquer par de faibles concentrations du virus dans les plantes, ce qui aurait pu empêcher sa détection par le test DAS-ELISA. Les feuilles les plus adaptées au dépistage viral sont les feuilles les plus jeunes recueillies au printemps, lorsque le virus *GFLV* est difficile à détecter en été (Idris, 2016).

D'après le tableau 26, les échantillons testés positifs par DAS-ELISA appartenaient à la station de Ben chicao. Sur les 10 échantillons positifs, 5 appartient au cépage *Muscat d'Alexandrie*, 4 appartient au cépage *Dattier de Bayrouth*, et seulement 1 cépage *Muscat Italia*, dans la station Tessala El Merdja, un seul échantillon qui a donné une réponse positive (Idris, 2016).

Tableau 25. Les résultats de test sérologique DAS-ELISA selon les stations et différentes cépages (Idris, 2016).

Stations	Cépages	Positifs	Négatifs
Blida	<i>Gros Noir</i>	0	7
Blida	<i>Cardinal</i>	0	9
El Affroun	<i>Dattier de Bayrouth</i>	0	16
Tessala El Merdja	<i>Cardinal</i>	0	7

Tessala El Merdja	<i>Dattier de Bayrouth</i>	1	8
Ain Beniane	<i>Cardinal</i>	0	14
Ben Chicao	<i>Muscat D'Alexandrie</i>	5	9
Ben Chicao	<i>Dattier Bayrouth</i>	4	7
Ben Chicao	<i>Muscat italiae</i>	1	8
/	<i>Total</i>	11	83

1.6. L'étude E de M. Rahali et al. (2019)

L'Etat sanitaire de plantes étudiées était généralement très bon. En effet, le greffage est l'un des principaux vecteurs de propagation des virus dans la vigne (Rahali et al, 2019).

La charge virale de 37 échantillons a été déterminée à l'aide de profils d'amplification qPCR. Ils sont estimés la charge virale de leurs échantillons et à la base des résultats qu'ils ont obtenus, on peut constater que l'état sanitaire des vignes cultivées à « Babar » était généralement très bon.

Dans cette étude, 12 des 37 plantes étudiées (32,4%) ne contenaient pas tous les virus recherchés. (Figure 14) (Rahali, 2020).

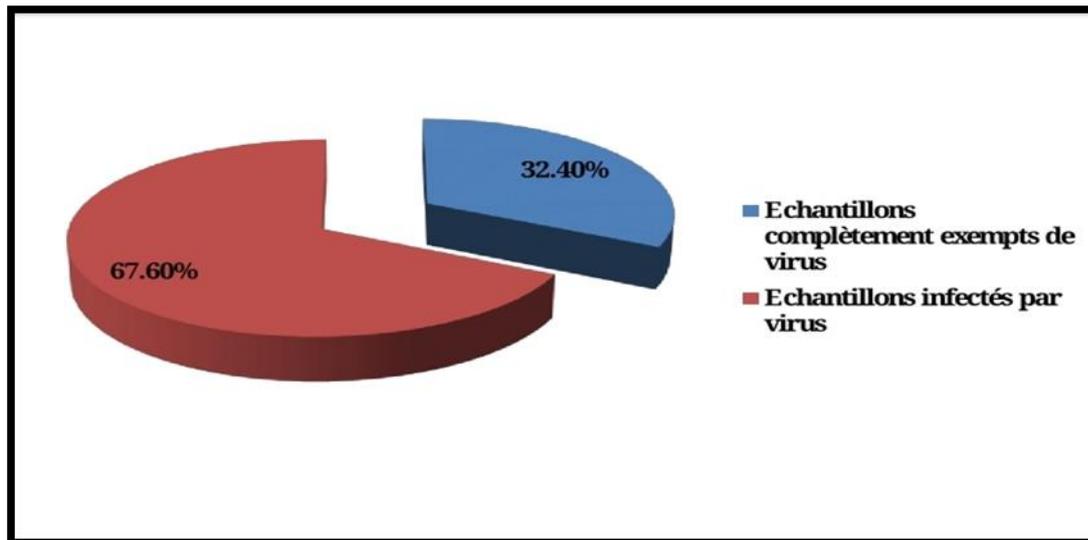


Figure 14. Répartition montrant en pourcentages le statut sanitaire de la vigne cultivée à Babar (Rahali, 2020).

Certains virus, à savoir les *Nepovirus ArMv* et *GFLV*, l'*Ampélovirus GLRaV-1* et le *Vitivirus GVB*, n'étaient présents dans aucune des plantes analysées. Aucun *nepovirus* n'est intéressant car on connaît des nématodes vecteurs de ces virus, par exemple (*Xiphinema spp*). *GFLV* présent dans la quasi-totalité des régions viticoles (M.Rahali et al. 2019).

Il y avait d'autres infections virales, telles que *GRSPaV*, *GLRaV-3*, *GVA*, *GLRaV-2*, et le pourcentage d'infection pour chaque virus est illustré à la figure 15 (M.Rahali et al.2019).

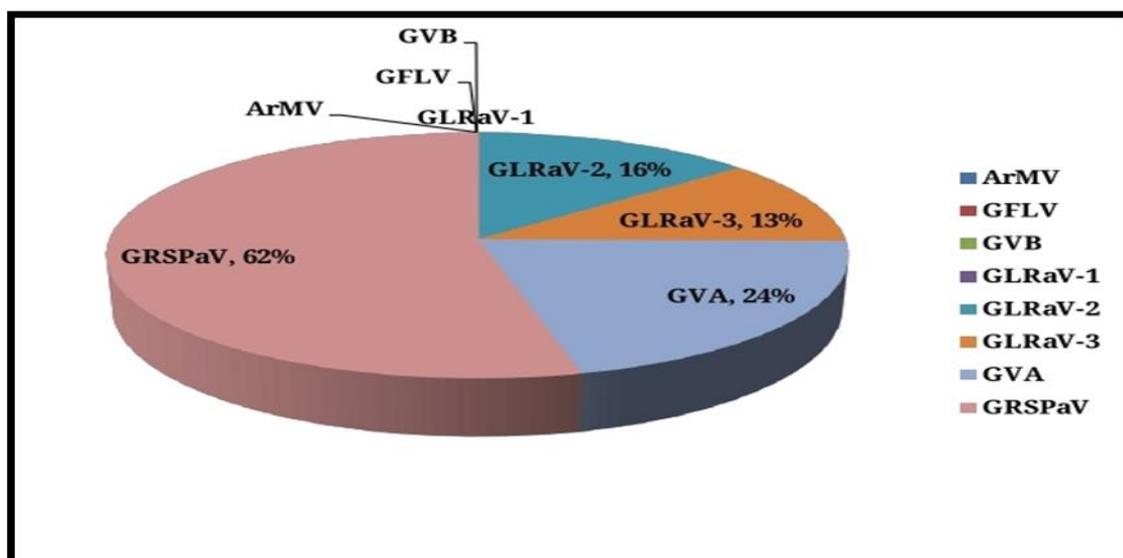


Figure 15. Répartition montrant en pourcentages l'infection par chaque virus de la vigne cultivée à Babar (Rahali, 2020).

Tandis que, le virus le plus répandu dans leurs échantillons était le *GRSPaV*, 62 % des échantillons positifs. Le virus s'est réparti aléatoirement entre les différentes vignes, notamment à "Dabouki", où il a été retrouvé dans les huit prélèvements analysés. *Virus GLRaV-3a* été identifié dans 13% des vignes collectées, en revanche le *GVA* a été détecté dans 24 % du total des prélèvements, les deux virus, bien qu'appartenant à des genres différents, sont connus pour être transmis par de nombreuses espèces de cochenilles. Fait intéressant, *GLRaV-2* était présent dans 16% des échantillons (Rahali et al, 2019).

L'état sanitaire général de la vigne de Babar était très bonne, probablement due à l'enracinement naturel, à cet égard leurs échantillons étaient exempts de tous les virus recherchés, avec une absence totale de *Néporus ArMv*, *GFLV*, l'*Ampelovirus GLRaV-1*, le *Vitivirus GVB*. Cependant, le virus *GRSPaV* a été enregistré dans 62% des échantillons, en particulier à "Dabouki", qui est principalement liée au nombre élevé de greffes. Tandis que le *GLRaV-3*, *GVA*, *GLRaV-2* ont été identifiés dans 13%, 24% et 16%, respectivement (Rahali et al, 2019).

1.7. L'étude F de M.Tahirine et al. (2019)

1.7.1. Etat générale des vignobles (observation symptomatologique) :

D'après M.Tahirine et al. (2019), les symptômes observés dans les vignobles étudiés peuvent être divisés en : symptômes de malformation, symptômes de modification de la coloration et la chlorose, ceux-ci sont les caractéristiques de maladie du court noué de vigne (Figure 16). Les souches les plus virulentes provoquaient des malformations de la tige chez les variétés sensibles, tandis que d'autres souches moins virulentes ne provoquaient aucun symptôme.



Figure 16. Des modifications de couleur observées durant la prospection : (A) symptôme de vein-banding ; (B) chlorose ; (C) : mosaïque (M.Tahirine et *al.* 2019).

L'observation symptomatologique ne suffit pas à confirmer la maladie court-noué. Elle nécessite d'autres tests qui permettent d'établir un diagnostic précis de l'existence de cette maladie dans les vignobles.

1.7.2. Test sérologique

Après l'analyse par Elisa, ils sont trouvés sur 300 échantillons : 141 (47%) échantillons étaient positifs pour le premier séropositif anti-*GFLV*, tandis que 135 (45%) étaient positifs pour le deuxième sérum anti-*GFLV-ArMv*, ce qui leur permet de dire que même si le deuxième sérum est plus spécifique, le premier sérum est plus sensible (Tahirine et al, 2019).

1.7.2.1. La fréquence d'infection des échantillons prélevés par variété

La fréquence d'infection des cépages variait significativement (Figure 17), par exemple des cépages tels *qu'Alplonse Lavallée et Aneb El Kadi* avaient des fréquences d'infection supérieures à 70 %, tandis que le groupe de cépages *Sabel ; Dattier de Beyrouth ; Ahmar de Mascara et RedGlobe* taux d'infection se situe entre 50% et 75% (M.Tahirine et al.2019).

Des fréquences d'infection inférieurs à 50% ont été obtenues dans les cépages suivantes : *Aberkane ; Valencie ; Cardinal ; Alicante Bouchet; Muscat de Gustave*. Aucun des échantillons du cépage *Chaouche Blanc* n'était positif pour le sérum anti-*GFLV/ArMV*, mais un seul échantillon était positif pour l'antisérum anti-*GFLV* (Tahirine et al, 2019).

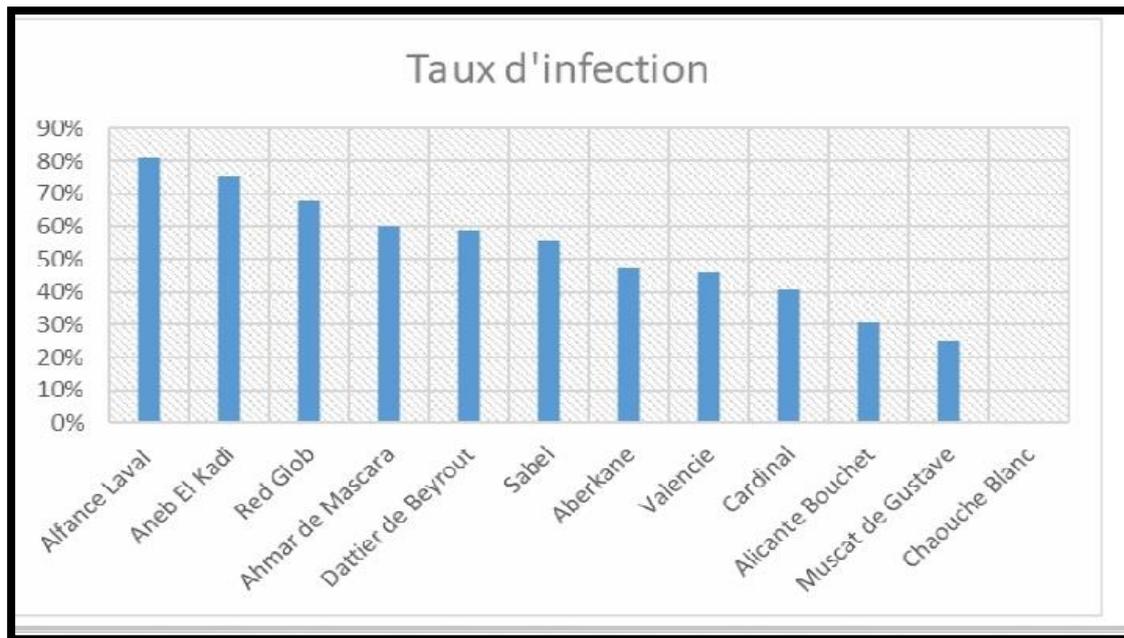


Figure 17. Histogramme de fréquence d'infection des échantillons prélevés par cépage (M.Tahirine et al.2019).

Pour les échantillons qui ne réagissaient qu'avec les antisérums anti-*GFLV/ArMV*, il peut expliquer par des simples cas d'infection par *l'ArMV*, car ils ne réagissaient pas avec les antisérums anti-*GFLV*. D'après Martelli et Boudon-Padieu (2006) ; Tahirine et al. (2019), Ils ont rapporté que l'infection simple par *l'ArMV* est possible, bien qu'elle soit encore moins fréquente que l'infection mixte ou l'infection simple par *GFLV*.

L'ArMV provoque les mêmes symptômes que le *GFLV* (M.Tahirine et al, 2019), suggérant la nécessité d'utiliser des anticorps monoclonaux pour confirmer les résultats obtenus.

1.7.2.2. La fréquence d'infection des échantillons prélevés des vignobles par wilaya

Les fréquences d'infection sont différentes d'une wilaya à une autre (Fig.18). Ils ont observé que plus de la moitié des échantillons prélevés des wilayas de Blida, Oran et Boumerdès étaient infectés par l'un des deux principaux virus du court noué. Cependant, les fréquences d'infection des wilayas de Mostaganem, Mascara et Relizane sont proches de 50%, et aucun échantillon d'Alger n'était séropositif pour l'anti-*GFLV/ArMV* (M.Tahirine et al.2019).

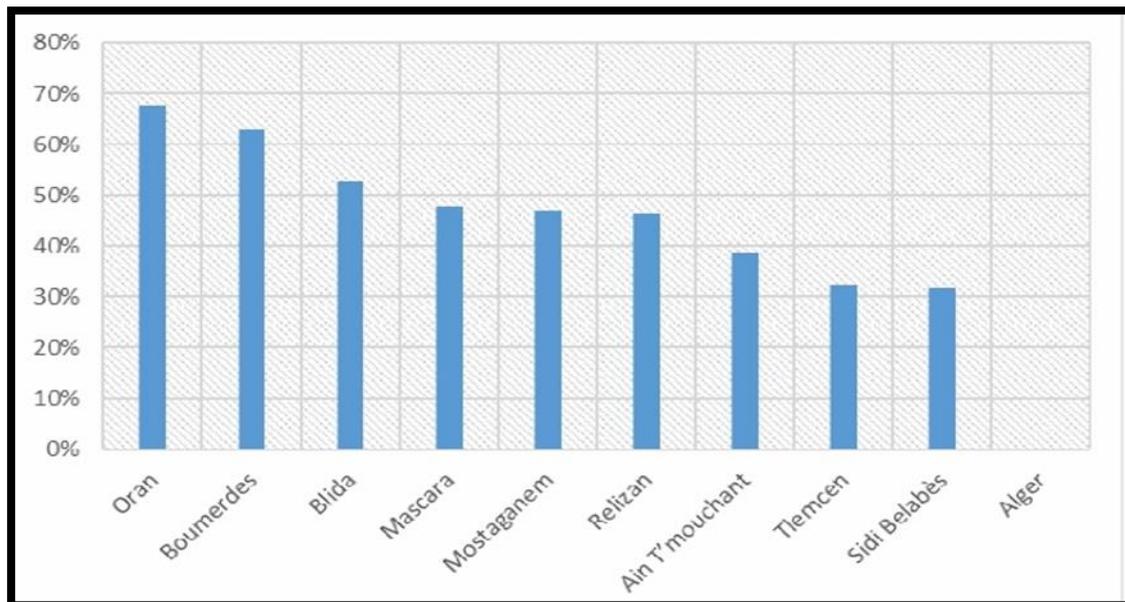


Figure 18. Histogramme de fréquence d'infection des échantillons prélevés par wilaya prospecté (M.Tahirine et *al.*2019).

1.7.3. Test biochimique : Electrophorèse (SDS-PAGE)

La SDS-PAGE a été utilisée comme outil pour confirmer les tests sérologiques et pour déterminer le poids moléculaire des protéines de la capsid, car elle constitue plus de 90 % de la taille du virion du *GFLV* et de *l'ArMV* (Zarghaniet *al.* (2014) ; M.Tahirine et *al.*2019).

Le gel obtenu par SDS-PAGE (Figure 19) a montré une bande d'origine virale suspectée sur 6 extraits (M.Tahirine et *al.*2019) :

Tessala (Valencie) ; Larbaa (RedGlob) ; Oued T'lilat (Ahmar de Mascara) ; Yellal (Aberkane) ; Sidi Ali (Valencie) ; les Issers (Cardinal).

La distance de migration de la bande concernée correspond à 55,559 Kda, ce qui est proche du poids moléculaire de la protéine de capsid *GFLV* (56 Kda) et de la protéine de capsid *ArMV* (54 Kda) (M.Tahirine et *al.* 2019).

Ces résultats confirment les résultats de l'étude de Serghini et *al.* (1990).

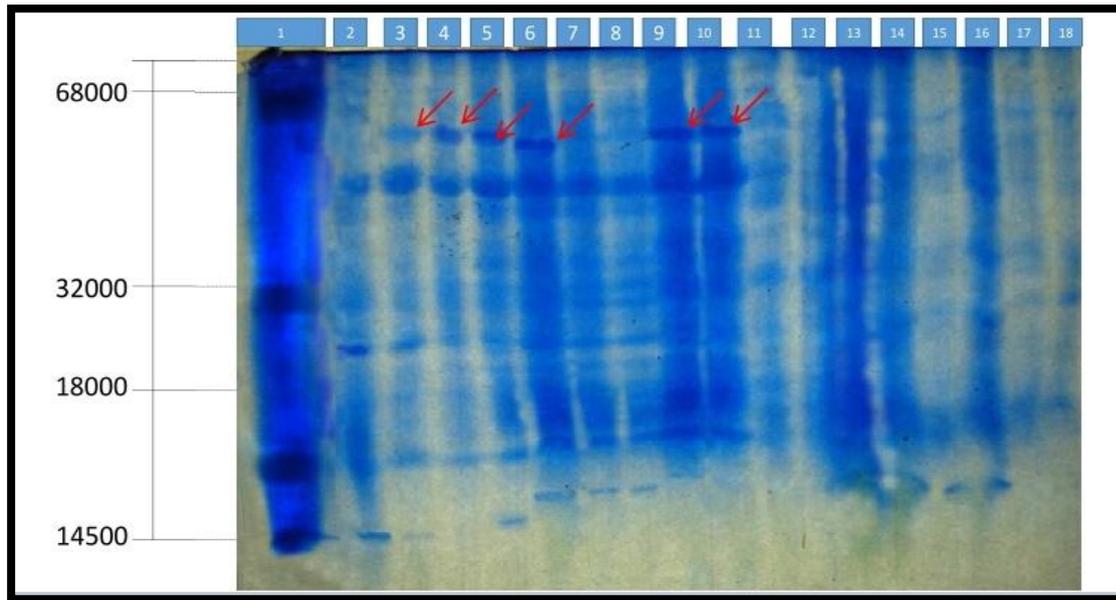


Figure 19. Le gel de la SDS-PAGE. Le puits n° 1 : protéines marqueuses et les poids moléculaires respectifs, le puits n° 2 : témoins négatif (sain), et les échantillons du puits 3 à 18 sont les extraits viraux des échantillons ; les bandes avec les flèches rouges correspondent au poids moléculaire 55,559 Kda (M.Tahirine et *al.*2019).

1.8. L'étude d'Aleš Eichmeier et *al.* (2020)

1.8.1. Résultats de la détection du *GPGV* par RT-PCR

Cinquante-quatre vignes ont été testées pour la présence de *GPGV* dans le tissu du phloème. Ils ont détecté huit vignes positives au *GPGV*. Ils ont trouvé un échantillon positif *d'Ahmer Bou amardans* la région de Médéa, un échantillon positif *d'Alphonse-Lavallée* dans la région d'Alger et un échantillon positif des vignes restantes (sur 12 au total) du *Sabel* de la région de Boumerdes. Chacun des amplicons PCR obtenus a été séquencé, et les séquences ont été déposées dans la GenBank sous les numéros d'accession (Aleš Eichmeier et *al.*2020).

Les vignes de la région de Boumerdes présentaient une déformation des feuilles (Figure 1), mais elles ne présentaient pas les symptômes typiques de marbrure (Aleš Eichmeier et *al.*2020).

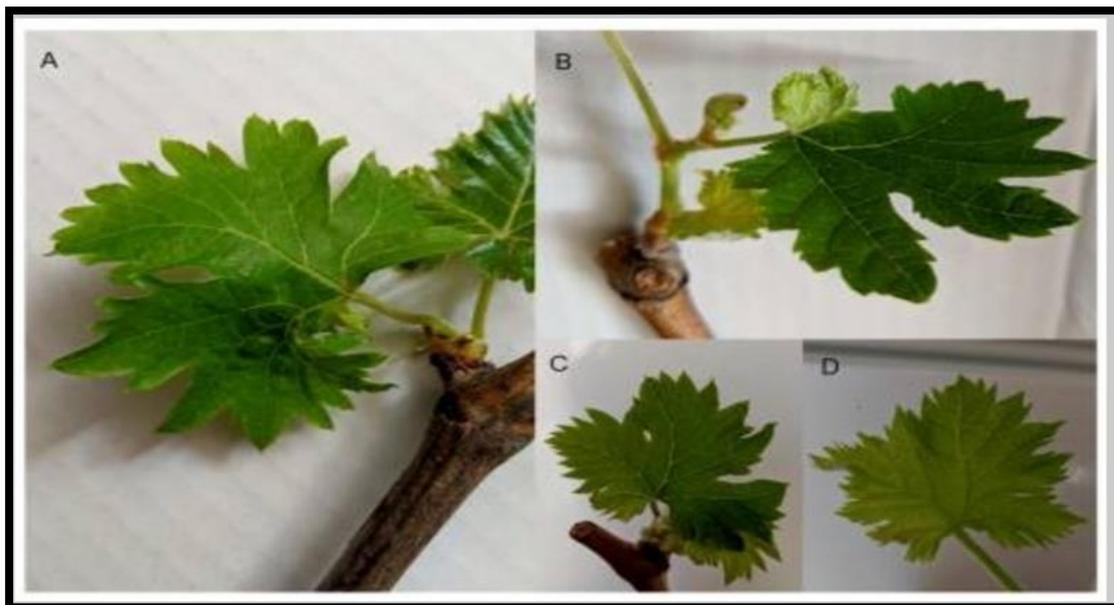


Figure 20. Symptômes fréquemment observés chez les positifs au *GPGV*. *Sabel* échantillonné dans la région de Boumerdes. (A) Déformation de la base des feuilles ; (B) verdissement de la base des feuilles ; (C, D) déformation des feuilles (Aleš Eichmeier et al. 2020).

1.8.2. Détection des virus et viroïdes par séquençage des petits ARN

Les résultats du séquençage des petits ARN ont été vérifiés par la détection RT-PCR, qui a indiqué que tous les virus et viroïdes détectés étaient effectivement présents dans le matériel testé. Et l'existence une grande similarité avec un isolat italien de *GPGV* (Aleš Eichmeier et al. 2020).

1.8.3. Description des virus détectés (Aleš Eichmeier et al. 2020)

1.8.4.

-Le *Grapevine fleck virus (GFkV)*, genre *Maculavirus*, famille *Tymoviridae*, a été détecté dans la variété *sabel* à Boumerdes. Le *GFkV* provoque des infections latentes chez les cultivars de *Vitis*.

-Le *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)*, appartenant au genre *Foveavirus*, famille *Betaflexiviridae*, a été détecté aussi dans les vignes de Boumerdes. L'infection par le *GRSPaV* a été confirmée par RT-PCR dans les deux isolats. Aucun symptôme du *GRSPaV*, bois modifié (piqûres), n'a été observé.

-Le *Grapevine virus B (GVB)*, genre *Vitivirus*, famille *Betaflexiviridae*, a été détecté dans la variété *sabel*. La RT-PCR a clairement confirmé la présence du virus. Le virus est associé à

des symptômes de bois rugueux chez la vigne et ces symptômes n'ont pas été observés sur cette plante.

-*Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)*, genre *Ampelovirus*, famille *Closteroviridae*, a été détecté dans la variété *sabel*. Les symptômes d'enroulement n'ont pas été observés.

-*Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)*, genre *Ampelovirus*, famille *Closteroviridae*, a été détecté aussi dans la variété *sabel*. Ce virus présentait le plus grand nombre de lectures parmi tous les virus. Les symptômes de l'enroulement n'ont pas été observés.

Discussion générale

Dans cette section, nous allons aborder deux types de discussion : la discussion analytique et la discussion sur les résultats pour obtenir une comparaison minutieuse de toutes les études sur lesquelles nous avons travaillé. Nous allons essayer de trouver les cépages les plus touchés en Algérie, les méthodes idéales pour le diagnostic des maladies virales, ainsi que d'identifier la maladie la plus répandue. Tout en atteignant un point important est l'état sanitaire de la vigne en Algérie.

1. Discussion analytique

- **Cas d'échantillons**

Les huit études analysées, ont été utilisés des échantillons différents pour dépister la maladie virale. Amedjkouh (2004), A.Lehad (2012), A.Lehad et *al.* (2014) et Aleš Eichmeier et *al.* (2020) ont fait les analyses à partir du tissu de phloème ou les sarments pendant la période d'automne. Dont les restes des études Tabouche (2004) ; Idris (2016) ; M.Tahirine et *al.* (2019) et M.Rahali et *al.* (2019) sont utilisés les jeunes feuilles.

Selon Tahirine (2015), Idris (2016) les jeunes feuilles sont les plus adaptées au dépistage viral. Parce que la charge virale est élevée, en particulier à la fin du printemps. Donc même la période de récolte de l'échantillon joue un rôle important dans les analyses viral.

Alors que les équipes de Mahfoudhi et *al.* (2008) ; Martelli et Boudon-Padieu (2006) ; N.Chabbouh et *al.* (2004) ; Amedjkouh (2004) ; Tahirine (2015) ; Selmi et *al.*(2020), ils recommandent d'utiliser des sarments dormants pour le dépistage des virus en hiver, mieux que les feuilles en printemps. Parce que le dépistage de certains virus tels que *ArMV* ou *GFLV* dans la période hivernale à partir des sarments dormants permet d'obtenir des résultats de diagnostic précis, en particulier dans le cas d'utilisation de test ELISA.

Même l'équipe Amedjkouh (2004) et Afechtal et *al.* (2021) ont montré que l'étude des symptômes de la maladie d'enroulement foliaire chez la vigne est meilleure en automne.

- **Les méthodes utilisées**

L'observation symptomatologique est important pour dépister les maladies virales, mais insuffisant pour confirmer la présence ou l'absence des virus et son type. Selon l'étude d'Aleš Eichmeier et *al.* (2020), l'association entre les symptômes et la présence du virus n'est pas claire. Même l'étude de N.Chabbouh et *al.* (2004) a montré que le grand nombre des symptômes d'enroulement observés sur le terrain s'est avéré, ce qu'indique une combinaison

différente des facteurs qui jouent un rôle dans la manifestation des symptômes complexes de l'enroulement de la vigne.

Ainsi que l'équipe de N.Chabbouh et *al.* (2004), ils ont dit que les tests sérologiques suggèrent également la faible implication du *GLRV2* dans les symptômes d'enroulement observés au champ. En effet, dans les échantillons montrant des symptômes, le virus n'a été détecté aucune fois alors qu'il est présent dans des échantillons ne montrant pas des symptômes. Donc, L'éventuelle association de ces symptômes avec la maladie doit être confirmée par un autre test précis.

Il y a des différentes méthodes utilisées pour analyser et dépister les maladies virales de la vigne, test ELISA, RT-PCR, le séquençage, etc.

L'étude de M.Tahirine et *al.* (2019) a été d'abord utilisé les tests sérologiques ELISA et les tests biochimiques SDS-PAGE pour confirmer les tests sérologiques, mais ils ont trouvé des différences de fréquence d'infection entre les tests.

Les résultats d'ELISA doivent être confirmés par un autre test précis tel que Western blot ou par le RT-PCR (Tahirine (2015) ; A.Lehad (2012) ; Afechtal et *al.* (2021). D'après l'équipe d'A.Lehad et *al.* (2014), ils ont montré que le test ELISA donne des faux négatifs lorsqu'il s'agit de faibles concentrations de virus.

L'étude de l'idris (2016) montre que la détection DAS-ELISA du virus *GFLV* à faible charge virale manque de fiabilité. Il est important d'effectuer des diagnostics moléculaires pour vérifier la présence ou l'absence du virus pour éliminer le risque de propagation du virus dans les vignobles.

Selon Aleš Eichmeier et *al.* (2020) ; Selmi et *al.* (2020) ; Rahali et *al.* (2019) et Selmi et *al.* (2018), il est mieux de faire l'analyse de séquençage pour obtenir des informations générales et complètes sur la diversité virale dans des vignes sélectionnées.

2. Discussion des résultats

D'après ces études, nous observons que chaque étude a déterminé le virus le plus répandu dans une région précise, ainsi que les variétés les plus infectés. Dont, la région de l'ouest Algérien (Boumerdès, Ain Témouchent, Mascara, Oran, Médéa et Tipaza) les variétés le plus infectés sont : *El-Baydha, Ring's Rubi, Autochtone ITAF, Muscat d'Alexandrie, Alphonse Lavallée-Aneb El kadi, Gros noir*, avec un pourcentage d'infection

atteint 100% pour la variété *El-Baydha*. Le virus le plus identifié est *GLRaV-3*. D'après l'étude A. Avital et al. (2021) a montré que le virus *GLRaV-3* est le plus affecté les raisins de cuve.

Selon l'étude Mahfoudhi et al. (2008) en Tunisie, le *GLRaV-3* atteint un pourcentage d'infection 76,3 %, dont le *Muscat Italia* étaient les cultivars de raisin de table les plus touchés. Alors que l'étude menée par N.Chabbouh et al. (2004) a trouvé que le virus *GLRaV-2* qui affecte le vignoble tunisien.

Alors que dans le centre d'Algérie (Blida, Alger) les variétés le plus infectés sont : *Muscat d'Alexandrie, Alphonse Lavallé et Aneb El Kadi*, avec un pourcentage d'infection supérieurs à 70% pour les variétés *Alphonse Lavallé et Aneb El Kadi*. Le virus la plus identifié est le *GFLV*. L'équipe tunisienne de Smaali et al. (2015) a trouvé que les infections virales par *GFLV et l'ArMV* sont les plus élevés (71%).

Il y a peu des études sur l'est Algérien, mais d'après l'étude de M. Rahali et al. (2019), dans la région Babar- Khenchela, la variété la plus infecté est *Dabouki*, avec un pourcentage d'infection 62%. Le virus le plus identifié est *GRSPaV*. L'état sanitaire en général est très bon dans cette région. Le *GRSPaV* peut se propager par la propagation végétative, la greffe et possiblement par les graines, mais aucun vecteur biologique n'a été signalé. C'est le même résultat obtenu par l'équipe tunisienne Selmi et al. (2020), dont ils ont trouvé que le virus *GRSPaV* (51.3%) plus fréquent dans les différentes régions tunisiennes. Ainsi que les cultivars de vigne de table étaient les plus infectés par le virus.

Alors que l'équipe Afechtal et al. (2021), a indiqué que le virus *GVA* le plus répandu (54,3 %) dans les vignobles marocains. Avec un taux d'infection 63,4% pour les raisins de cuve et 60,3% pour les raisins de table. Même l'équipe de F. Fattouh et al. (2014) a trouvé que le virus le plus affecté le vignoble égyptien est le *GVA* avec un taux d'infection 30 %.

L'étude d Aleš Eichmeier et al. (2020) est la première étude qui a détecté les virus : *Grapevine fleck virus, du Grapevine rupestris stem pitting-associated virus, du Grapevine virus B, du Grapevine rupestris vein feathering virus, et des viroïdes Hop stunt viroid et Grapevine yellow speckle viroid 1*, en Algérie.

Conclusion & perspectives

Les maladies virales sont devenues une menace majeure pour la vigne en Algérie, Tunisie et Maroc, surtout en l'absence d'une culture environnementale pour ce type de l'agriculture.

Le traitement est difficile et insuffisant pour la difficulté de contrôler la transmission de ces virus par des cultivateurs de vigne. Ces virus affectant la qualité de la production et des rendements et rendant les raisins impropres à la consommation.

Les virus *GLRaV* constituent une menace importante dans le vignoble algérien, en particulier le *GLRaV-3*.

Après une analyse complète des études s'effectuent sur l'état sanitaire du vignoble algérien de 2004 jusqu'au 2020, il semble que le virus le plus affecté les variétés algérienne est le *GLRaV-3*. Malgré il y a une manque des études sur certains régions comme les oasis désertiques (Les région Sahara), et les régions du Nord.

La situation sanitaire en Algérie se détériore également en raison de l'absence de diagnostics efficaces et de l'absence de surveillance périodique de ce type d'agriculture. Le mauvais de l'état sanitaire des vignobles algériens indique que les infections virales en Algérie sont plus répandues. Il est important de lancer en urgence des enquêtes épidémiologiques pour mieux comprendre la santé du vignoble et modéliser la maladie en cas d'épidémie. Ce problème ne se pose pas seulement en Algérie, mais malheureusement dans tous les pays méditerranéens.

L'Algérie doit améliorer l'agriculture, en particulier la culture des vignes, et accorder plus d'attention à ce genre de richesse vitale qui vous aidera à stimuler l'économie locale.

En outre, entreprendre des études analytiques générales de toutes ces cultures au niveau national, afin d'obtenir des données et des informations précises sur l'état général de la viticulture. Aussi, n'oublions pas la surveillance sanitaire de ces vignes, comme la prévention des maladies par des diagnostics précoces et périodiques, ainsi que le développement d'un schéma thérapeutique visant à réduire les dommages de ces cultures.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

Références

1. A. Lehad, I. Selmi, M. Louanchi, M. Aitouada and N. Mahfoudhi. (2014). GENETIC DIVERSITY OF GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS 3 IN ALGERIA. *Journal of Plant Pathology*, 203.
2. Afechtal Mahamed, Moulay Chrif Smaili, Madjid Mounir, Angelantonio Minafra, Raied Abou Kubaa. (2021). Identification and distribution of major viruses infecting grapevine in Morocco. *Journal of Plant Pathology* , 103 : 643-647.
3. Aleš Eichmeier, Akila Berraf-Tebbal, Eliška Peňázová, Jana Čechová. (2020, 09 22). Survey and Diversity of Grapevine Pinot gris virus in Algeria and Comprehensive High-Throughput Small RNA Sequencing Analysis of Two Isolates from *Vitis vinifera* cv. Sabel Revealing High Viral Diversity. *Genes (Basel)*, 11(9): 1110.
4. Aleš Eichmeier,* Eliška Peňázová, Jana Čechová, and Akila Berraf-Tebbal. (2020). Survey and Diversity of Grapevine Pinot gris virus in Algeria and Comprehensive High-Throughput Small RNA Sequencing Analysis of Two Isolates from *Vitis vinifera* cv. Sabel Revealing High Viral Diversity. *Genes (Basel)* . , 11(9): 1110.
5. Allali, A. (2017, 10 07). Détection biologique et sérologique du virus du virus du court-noué de la vigne (GFLV) en régions viticoles. DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES, Algérie/Blida.
6. Amedjkouh, H. (2004, 07 04). ESSAIS D'ASSAINISSEMENT DE TROIS VARIETES AUTOCHTONES DE VIGNE DE TABLE (*Vitis vinifera* L.) ATTEINTES DE VIROSES, PAR CULTURE IN VITRO DE MERISTEMES. DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE, Algeia.
7. Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Fuchs, M. (2004). Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, 86, 183–195.
8. Arezki, L. (2016, 01 04). Etiologie et épidémiologie de la maladie foliaire de la vigne en Algérie. El-Harrach, Ecole Nationale supérieure Agronomique, Algeria/Alger.
9. Aviram Avital, Noy Sadot Muzika, Zohar Persky, Gili Bar, Yuval Michaeli, Yulia Fridman, Avishai Karny, Jeny Shklover, Janna Shainsky, Sigal Savaldi-Goldstein, Haim Weissman, Oded Shoseyov, Avi Schroeder. (2021). Foliar Delivery of siRNA Particles for Treating Viral Infections in Agricultural Grapevines. *Advanced Functional Materials*, 10;31(44):2101003.
10. Bertazzon, N., Bazzo, I., Repetto, O., Borgo, M., Angelini, E. . (2009). Advances in molecular detection of GLRaV-1. . *Le progrès Agricole et Viticole, hors série, spécial Congrès ICVG*, 294-295.
11. Bertazzon, N., Borgo, M., Vanin, S., Angelini, E. (2010). Genetic variability and pathological properties of Grapevine leafroll associated virus -2 isolates. *European journal of plantPathology* , 127: 185-197.

12. Besma M'rabet Samaali ; Amira Hamdane Mougou ; Sadreddine Kallel. (2015, octobre-septembre). Interaction plante-virus-vecteur Cas du court-noué de la vigne en Tunisie. 24(5). Institut national agronomique de Tunisie, Tunis-Mahrajène: Cah Agric.
13. Beuve, M., Sempé, L., Lemaire, O. (2007). A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. . *Journal of Virological Methods*, 141, 117-124.
14. Bianchi, G.L., Bertazzon, N., De Amicis, F., Borgo, M., Angelini, E. (2010). Multiplex real time RT-PCR for the detection of the most important viruses of grapevine. *Petria*, 20 : 180-181.
15. Bovey, R. (1974). Sélection sanitaire de la vigne en suisse romande. *Revue. Suisse. Vitic. Arboric. Hortic.*, 77-83.
16. Brugnon A., Bessis R. (1968). *Biologie de la vigne : acquisitions récentes et problèmes actuels*. France: Masson et Cie.
17. Cloquemin, J. (1988). *Le repérage précoce des maladies des plantes : les nouvelles techniques appliquées aux viroses*. Ann du colloque ARRIA.
18. Cornuet, P. (1987). *Éléments de virologie végétale*. Paris.: Ed. INRA,.
19. Creasy, G. (2009). *Grapes*. New York: CAB Internationnal .
20. Crespy, A. (1992). *Viticulture d'aujourd'hui* (éd. 2 édition). France.
21. Eichmeier A., Baranek M., Pidra M. . (2011). Analysis of genetic diversity and phylogeny of partial coat protein domain in Czech and Italian GFLV isolates. . *Plant. Prot. Sci*, 46(4), 145-148.
22. Elmaghili, K. A. (2017, 09 14). Etude des différentes tailles viticole sur les paramètres physiologiques de la variété Sultanine dans des conditions arides. . DEPARTEMENT DE SCIENCES AGRONOMIQUES, Algeria/Mostaganem.
23. Fattouh F, Ratti C, El-Ahwany AM, Aleem EA, Babini AR, Autonell CR, . (2014). Detection and molecular characterization of Egyptian isolates of grapevine viruses. *Acta Virol*, 137-45.
24. Foissac, Xavier.,P. Gentit.,L. Svanella-Dumas.,M.J. Duluc.,Thierry Candresse . (2001). Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerated and inosine containing primers (PDO RT-PCR). *Acta Horticulturae* , 550: 37-43.
25. Galet, P. (2000). *Dictionnaire Encyclopédique des Cépages*. . Paris: Hachette.
26. Giles G.L., Verhoyen M. (1992.). Viroses et maladies apparentées des arbres fruitiers et ornementaux, assainissement et sélection. 166. Institut pour l'Encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture, France-IRSIA.
27. Giorgio Gambino, Danila Cuozzo, Marianna Fasoli, Chiara Pagliarani, Marco Vitali, Paolo Boccacci, Mario Pezzotti, Franco Mannini. (2012, 09 24). Co-evolution between Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and Vitis vinifera L. leads

- to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. *63*, 5919–5933.
28. Good, X., Monis, H. . (2001). Partial genome organization, identification of the coat protein gene, and detection of Grapevine leafroll-associated virus-5. *phytopathology*, *91*: 274-281.
 29. Gugerli P., Brugger J.J., Ramel M.E. (1997). Identification immunochimique du Gême virus associé à la maladie de l'enroulement de la vigne et amélioration des techniques de diagnostic pour la sélection sanitaire en viticulture. *Revue. Suisse. Vitic. Arboric. Hortic.*, 137-141.
 30. Habert, P. (1992). *Vignes et virus : la résistance s'organise : la lutte contre le court noué principale maladie virale de la vigne, passe par la création de plants résistants, plusieurs stratégies sont possibles.* (Vol. 23).
 31. Huglin, P. (1986). *Biologie et écologie de la vigne.* Ed. Payot, Lausanne.
 32. Idris, I. (2016, 05). Connaissances sur les viroses de la vigne (Etude du court-noué de la vigne dans trois régions viticoles Alger, Blida et Médéa). Département de Biotechnologie, Algeria/Blida.
 33. Ilhem Selmi ; Davide Pacifico ; Arezki Lehad ; Egidio Stigliano ; Dalila Crucitti. (2020). Genetic diversity of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus isolates from Tunisian grapevine germplasm. *Plant Pathology* , DOI: 10.1111/ppa.13183.
 34. Jawerth, N. (2020). Comment la RT-PCR en temps réel permet-elle de détecter le virus de la COVID-19 ? *Les maladies infectieuses*, 1-4.
 35. Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 680-685.
 36. Lehad, A. (2012). Etude du complexe viral associé à l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie. El-Harrach, Ecole Nationale supérieure Agronomique, Algeria/Alger.
 37. Levadoux, L., Benabderrabou, A., Douaouri, B. (1971). *AmpélographieAlgérienne: Cépages de Cuve et de Table Cultivés en Algérie.* Algeria: SNED.
 38. Ling KS, Zhu HY , Drong RF, Slightom JL, McFerson, gonsalves D. (1998). Nucleotide sequence of the 3"-terminal two-thirds of the grapevine leafroll-associated virus-3 genome reveals a typical monopatite closterovirus. *J Gen Virol*, *79* : 1299-1307.
 39. M. Rahali, D. Migliaro, Z. Laiadi, N. Bertazzon, E. Angeliniand M. Crespan. (2019). Genetic identification, origin and sanitary status of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) grown in Babar, Algeria. *Vitis*, 153-158.
 40. M.Tahirine; Louanchi, M.; Aitouada, M. (2019). Actualisation à la révélation de deux virus responsables à la maladie du court noué de la vigne du genre *Vitis* dans la région Centre et Ouest de l'Algérie par voie sérologique et biochimique. *Journal Algérien des Régions Arides(JARA)*, 09.

41. MacKenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S., Green, M. . (1997). Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 222-226.
42. Mahboub, S. (2017). Contribution a l'étude des maladies de quelques variétés de la vigne dans la région de Tlemcen. Département d'agronomie, Algeria/Tlemcen.
43. Mahfoudhi, N., Digiario, M., Dhouibi, M.H. (2008). Incidence and distribution of grapevine leafroll associated viruses in Tunisian vineyards. *J. Phytopathol*, 156, 556-558.
44. Maliogka, V., Martelli, G.P., Fuchs, M., Katis, N. (2014). Control of viruses infecting grapevine. *Control of Plant Viruses, Advances in Virus Research*, 175-227.
45. Marcel Chauvet et Alain Reynier. (1979). *Manuel de viticulture* (éd. 3). (J. B. Ballière, Éd.) Université de Cornell.
46. Maree, H.J., Almeida, R.P.P., Bester, R., Chooi, K.M, Cohen, D., Dolja, V.V., Burger.j. (2013). Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology*, 1-21.
47. Martelli G.P., Boudon-Padieu. (2006). *Directory of infectious diseases of grapevine and viroses and virus-link diseases of grapevine : bibliographic report 1998-2004*.
48. Martelli, G. (1995). Clostérovirus et maladies de la vigne. *révision de la situation actuelle et possible ligne de recherche fruitière.*, 26.
49. Martelli, G. P., De Sequeira, O. A., Kassemeyer, H. H., Padilla, V., Prota, U., uacquarelli, A., Savino. V. (1993). A scheme for grapevine certification in the European Economic community. *British Crop Protection Council Monograph*, 54, 279–284.
50. Martelli, G.P., Jelkmann. W. (1998). Foveavirus, a new plant virus genus. *Archives of Virology*, 142, 1245-1249.
51. Martinson, T., Fuchs, M., Loeb, G., Hoch, H. (2008). *Grapevine Leafroll – an increasing problem in the finger lakes, the US and the world. Rapport du New York State Agricultural Experiment Station*. New York : Cornell University.
52. Meng, B., Rebelo, A.R., Fisher, H. (2006). Genetic diversity analysis of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus: Revelation of distinct population structures in scion versus rootstock varieties. . *J. Gen. Virology*, 1725-1733.
53. Minafra, A., Hadidi, A. (1997). Sensitive detection of grapevine virus A, B or leafroll associated leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 47, 175-188.
54. Mohamed Afechtal · Moulay Chrif Smaili · Majid Mounir · Angelantonio Minafra · Raied Abou Kubaa. (2021). Identification and distribution of major viruses infecting grapevine. *Journal of Plant Pathology* (, 103:643–647.

55. Mohamed, T. (2015, 07 01). Identification des virus impliqués dans la maladie court noué de la vigne par des critères sérologiques et biochimiques. El-Harrach, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Algeria/Alger.
56. Morsli, D. (1995). *Évaluation sanitaire du vignoble et identification par voie biologique et sérologique d'un isolat du court noué à partir d'une variété autochtone*. . Alger: Algeria : INA.
57. N. Chabbouh, N. Mahfoudhi & R. Bessai. (2004). Mise en évidence du virus2 associé a L'enroulement de la vigne dans le vignoble tunisien (Grapevine Leaf Roll associated Virus 2 : GLRaV2). *AL AWAMIAI*, 1-2, 09-110.
58. N. Mahfoudhi ; M. Digiario ; V. Savino and B. Di Teiuizzi. (1998). Viruses and virus diseases of grapevine in Tunisia. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* , 197-204.
59. Osman, F. et Rowhani, A. (2006). application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130-136.
60. Rahali, M. (2020, 06 24). Contribution à L'analyse génétique et virale de quelques variétés de vignes cultivées à Babar, Khenchela. Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Algeria.
61. Rezgui, A. (2016, 12 23). Étude de la microflore colonisant les tissus ligneux de *Vitis vinifera*: Intérêt pour le développement d'agents de biocontrôle contre une maladie du bois de la vigne, l'esca. École Doctorale : Sciences et Technologies du vivant et des Sciences de la terre, Tunisie/.
62. Ribereau-Gayon J., Peynaud E. (1971). *Traité d'ampélographie : sciences et technique de la vigne. Tome 1 : biologie de la vigne, sols de vignobles*. Paris, France: Ed.Dunod.
63. Saiki R.H., Gelfand S., Stoffel S.J., Scharf R., Higuchi G.T., Horn K.B., Mullis H. et. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science*, 239-487.
64. Samaali, B.M., Mougou, A.H, Kallel, S. (2015). Interaction plante-virus-vecteur. Cas du court-noué de la vigne en Tunisie. 24, 292-300.
65. Selmi Ilhem , Arezki Lehad, Davide Pacifico, Francesco Carim and Naima Mahfoudhi. (2018). Prevalence and genetic diversity of Grapevine virus A in Tunisia. *Phytopathologia Mediterranea* , 57, 2, 237–244.
66. Selmi Ilhem, Davide Pacifico, Arezki Lehad, Egidio Stigliano, Dalila Crucitt, Francesco Carim, Naima Mahfoudhi. (2020). Genetic diversity of grapevine rupestris stem pitting-associated virus isolates from Tunisian Grapevine germplasm. *Plant Pathology*, 13183.
67. Selmi, I. (2018, 08 03). IDENTIFICATION, CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET ÉTUDE DE LA TRANSMISSION DES VIRUS ASSOCIÉS À LA MALADIE DU BOIS STRIÉ DE LA VIGNE EN TUNISIE. INSTITUT

NATIONAL AGRONOMIQUE DE TUNISIE. École Doctorale Sciences et Techniques de l'Agronomie et de l'Environnement, Tunisie.

68. Semal, J. (1993). *Traité de pathologie végétale*. Presse agronomique de Gembloux.
69. Serghini M.A.; Fichus, M. ; Pinck, M. ; Reinbolt. J. ; Walter, B and Pinck, L. (1990). RNA2 of grapevine fanleaf virus : sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of general virology*, 1433-1441.
70. Tabouche, A. (2004, 12). ETUDE DU VIRUS DU COURTNOUE DE LA VIGNE [GRAPEVINE FANLEAF VIRUS, NEPOVIRUS (GFLV)] EN Algérie. Département d'Agronomie, Algeria/Blida.
71. Ternynck, T., Avrameas, S. (1991). *Techniques immunoenzymatiques. In techniques en immunologie* (éd. 2^{ème} Edition). France-Paris: INSERM.S.F.I.
72. Turturo, C., Salderelli, P., Yafeng, D., Digiario, M., Minafra, A., Savino, V., et al. (2005). genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *J.Gen. Virol*, 86: 217-224.
73. Uhel, F.,L. Zafrani. (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. *Note Technique*, 9 pages.
74. Vézina Lise, Michel Lacroix. (2006, 03 14). TEST ELISA (ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSEY). *Laboratoire de diagnostic en phytoprotection*, 1-6.
75. Vuittenez, A. (1974). Tests virologiques et régénération par thermothérapie : deux voies complémentaires pour la production de plants de vigne sans virus. *Colloque International de la Multiplication de la Vigne*.
76. Vuittenez, A. (1984). Inventaire des virus et maladies de type viral étudiées en France colmar. *Symp. Intern. Sur le Stockage et la Conservation des Virus et des Eaux de Vie d'Origine Vinicole.*, 497-502.
77. Walter B., Boudon Padieu E., Ride M. (2000). *Les maladies à virus, bactéries et phytoplasmes de la vigne*. Ed Féret.
78. Walter, B. (1988). Quelques exemples de la réaction physiologique de la vigne en présence de virus. *Bulletin de l'OIV*, 383-390.
79. Walter, B. (1996). Lutte contre les virus du court noué de la vigne: objectif. *Phytoma*, 33-35.
80. Zarghani, S.N., L. Dupuis-Maguiraga, A. Bassler and T. Wetzel. (2014). Mapping of the exchangeable and dispensable domains of the RNA 2-encoded 2AHP protein of arabis mosaic nepovirus. *Virology*, 06-113.

Annexes

Annexe 1

1. Tampon de sensibilisation (Arezki, 2016)

(PH= 9.7 pour 1000 ml)

-1.5 gr Na_2CO_3 -2.93 gr NaHCO_3 -0.2 gr NaN_3 **Annexe 2**

1. Tampon de couplage (Arezki, 2016)

(PH= 7.4 pour 1000ml)

-1000ml de PBS

-0.5 ml Tween 20

-20 gr PVP

-2 gr BSA (Bovine serum albumine)

Annexe 3

1. Tampon Laemmli 1970 (Tahirine, 2015)

1. Le gel de concentration à 4% : quantité suffisante pour 5 ml :	2. Gel de séparation 12 % : quantité suffisante pour 8 ml
Tris-Hcl à 1M et ph = 6.8 5 ml	Tris-Hcl à 1.5 M et ph = 8.8 12.5 ml
Acrylamide-bisacrylamide à 30% 2.60 ml	Acrylamide-bisacrylamide à 30% 20.00 ml
Eau distillé 12 ml	Eau distillé 16.5 ml
SDS à 10% 200 μ l	SDS à 10% 500 μ l
APS à 10% 200 μ l	APS à 10% 500 μ l
Teemed 20 μ l	Teemed 50 μ l

Annexe 4

Nombre d'étude	Titre	L'étude
N°1	ESSAIS D'ASSAINISSEMENT DE TROIS VARIETES AUTOCHTONES DE VIGNE DE TABLE (<i>Vitis vinifera</i> L.) ATTEINTES DE VIROSES, PAR CULTURE IN VITRO DE MERISTEMES.	Amedjkouh (2004)
N°2	ETUDE DU VIRUS DU COURTNOUE DE LA VIGNE [GRAPEVINE FANLEAF VIRUS, NEPOVIRUS (GFLV)] EN Algérie.	Tabouche (2004)
N°3	Mise en évidence du virus2 associé à L'enroulement de la vigne dans le vignoble tunisien (Grapevine Leaf Roll associated Virus 2 : GLRaV2)	N.Chabbouh et al (2004)
N° 4	Directory of infectious diseases of grapevines	(Martelli G.P., Boudon-Padieu., 2006)
N°5	Incidence and distribution of grapevineleafroll associated viruses in Tunisian vineyards.	Mahfoudhi et al. (2008)
N°6	Etude du complexe viral associé à l'enroulement foliaire de la vigne en Algérie	A.Lehad (2012)
N°7	GENETIC DIVERSITY OF GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS 3 IN	A.Lehad et al. (2014)

	ALGERIA	
N°8	Detection and molecular characterization of Egyptian isolates of grapevine viruses	Fattouh F et al. (2014)
N°9	Interaction plante-virus-vecteur. Cas du court-noué de la vigne en Tunisie	Smaali et al. (2015)
N°10	Connaissances sur les viroses de la vigne (Etude du court-noué de la vigne dans trois régions viticoles Alger, Blida et Médéa)	Idris (2016)
N°11	Prevalence and genetic diversity of Grapevine virus A in Tunisia	Selmi et al. (2018)
N°12	Genetic identification, origin and sanitary status of grapevine cultivars (<i>Vitis vinifera</i> L.) grown in Babar, Algeria	M.Rahali et al. (2019)
N°13	Actualisation à la révélation de deux virus responsables à la maladie du court noué de la vigne du genre <i>Vitis</i> dans la région Centre et Ouest de l'Algérie par voie sérologique et biochimique	M.Tahirine et al. (2019)
N°14	Genetic diversity of grapevine rupestris stem pitting-associated virus isolates from Tunisian Grapevine germplasm	Selmi et al. (2020)
N°15	Survey and Diversity of Grapevine	Aleš Eichmeier et al. (2020)

	Pinot gris virus in Algeria and Comprehensive High-Throughput Small RNA Sequencing Analysis of Two Isolates from <i>Vitis vinifera</i> cv. Sabel Revealing High Viral Diversity	
N°16	Identification and distribution of major viruses infecting grapevine	Afechtal et al. (2021)
N°17	Foliar Delivery of siRNA Particles for Treating Viral Infections in Agricultural Grapevines	Avital et al. (2021)

المخلص

تهدف الدراسة المقارنة لثمانى دراسات من 2004 إلى 2020 فى الجزائر إلى تحديد الحالة الصحية لكرومهم والأمراض الفيروسية الأكثر ضررًا وانتشارًا. وقد لاحظنا خلال هذه السنوات تدهور الوضع العام لكروم العنب بسبب عدم وجود تشخيصات فعالة ودورية فى هذه الكروم. أظهرت هذه الدراسات أن التشخيص الأكثر فعالية ودقة يتم بواسطة طريقة RT-PCR الجزيئية. وبحسب تحليل نتائج هذه الدراسات ، فإن فيروس GLRaV يشكل تهديدا كبيرا فى مزارع الكروم الجزائرية ، ولا سيما GLRaV-3.

الكلمات مفتاحية: الكروم، الأمراض الفيروسية، التشخيص، الحالة الصحية

Résumé

L'étude comparative de huit études de 2004 à 2020 en Algérie vise à déterminer l'état sanitaire de vignoble et les maladies virales les plus nocives et les plus répandues. Nous avons constaté qu'au cours de ces années, la situation globale des vignobles s'est détériorée, en raison de l'absence de diagnostics efficaces et périodiques sur ces vignobles. Ces études ont montré que le diagnostic le plus efficace et le plus précis se réalise par la méthode moléculaire RT-PCR. D'après l'analyse des résultats de ces études, le virus *GLRaV* constitue une menace importante dans le vignoble algérien, en particulier le *GLRaV-3*.

Mots clés : Vigne, état sanitaire, Algérie, Maladies virales, diagnostic

Abstract

The comparative study of eight studies from 2004 to 2021 in Algeria aims to determine the sanitary state of their vineyards and the most harmful and widespread virus diseases. We found that during these years, the overall situation of the vineyards has deteriorated, due to the lack of effective and periodic diagnosis on these vineyards. These studies have shown that the most effective and accurate diagnosis is carried out by the molecular method RT-PCR. According to the analysis of the results of these studies, *GLRaV* viruses constitute an important threat in the Algerian vineyard, in particular *GLRaV-3*.

Key words : Vineyard, health status, Algeria, Viral diseases, diagnosis