

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université de Blida 1

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département des Biotechnologies

Thèse de Doctorat

Spécialité : phytopathologie

**ETUDE DU VIRUS DE LA TRISTEZA DES AGRUMES : CARACTERISATION
BIOLOGIQUE, SEROLOGIQUE ET MOLECULAIRE DES SOUCHES
ALGERIENNES.**

Djamila Larbi

Devant le Jury composé de :

Pr. KRIMI Z.	Président	USDBLIDA1
Pr. BELKAHLA H.	Directrice de thèse	USDBLIDA1
Pr. DJELOUAH K.	Co-Directeur de thèse	IAMB ITALIE
Pr. BENCHABANE M.	Examineur	USDBLIDA1
Pr. TOUMI M.	Examineur	USALGER1
Pr. LAMMARI M.	Examineur	USDBATNA

Blida, Octobre 2017

Dédicaces

Je dédie cette thèse, à vous chers parents,

La défunte maman, toi maman, J'aurai aimé vous voir parmi nous le jour de ma soutenance, comme vous m'avez honoré par votre présence lors de ma soutenance d'ingénieur et votre soutien permanent qui m'a toujours aidé à surmonter l'éloignement de ma famille et mon pays en préparant ma thèse de Master en Italie. Chère maman c'est pour toi que je dédie d'abord ce travail

Mon papa, je n'oublierai pas tes encouragements, ton soutien et ton amour infini pour que mon travail aboutisse

Je ne saurai jamais vous rendre le minimum de ce que vous avez fait pour moi, cher Maman et papa, merci infiniment.

À mes sœurs, louiza, lola, naima, wahiba et salima

À Mes frères, Hamid, Rachid, Sidali et Djelloul

À Tous mes nièces et mes neveux et surtout « Bounty »

Ce travail est le fruit de votre soutien, vos encouragements et vos prières.

Merci d'avoir toujours cru en moi.

Votre sœur jamo qui vous aime beaucoup

REMERCIEMENTS

Le présent travail est le fruit de recherches de plusieurs années consécutives dans le domaine de la phytopathologie, il a suscité beaucoup de courage, de volonté, de persévérance et de réussite enfin, cette réussite je la dois d'abord à mon Encadreur Mme Belkahla H., Professeure à l'Université Saad dahleb Blida ,Tous mes remerciements madame, sans vous je ne saurai aujourd'hui en présence d'une telle réussite .je vous remercie également pour tous vos précieux conseils , votre soutien,et votre accompagnement scientifique et moral durant toutes ces années, je ne saurai exprimer tout le bien que vous m'avez procuré dans la réalisation de ce travail car les mots seuls ne suffisent pas

Mes vifs remerciements vont également à mon Co-encadreur Mr Djelouah k. Professeur à l'Institut Agronomique Méditerranéen de bari Italie pour avoir accepté de superviser mon travail au niveau du laboratoire de recherche de l'IAM de Bari, Pr Djelouah sachez que vos conseils, votre soutien permanent et votre contribution et collaboration ont été le précurseur quant à l'aboutissement de ce travail.

Mes plus profonds remerciements vont également pour les memnres de jury de ma soutenance d'abord Madame Pr. Krimid Z. de l'Université de Blida, qui a accepté de présider le jury, de ma soutenance, Messieurs, Pr. Lammari M. de l'Université de Batna, Pr.Toumi M. de l'Université d'Alger et Pr.Benchabane M. de l'Université de Blida, qui m'ont honoré d'avoir accepter d'examiner ma thèse de doctorat.

Il m'est très agréable de remercier le Recteur de l'Université de Blida en l'occurrence Professeur Abadlia Mohamed Tahar qui m'a beaucoup aidé pour présenter mon travail de recherche au sein de l'université de Blida en mettant à notre disposition tous les moyens pour la programmation de la soutenance dans de bonnes conditions.

Je n'oubli pas de remercier également le Recteur de l'Université de Skikda Professeur Haddad Salim qui m'a beaucoup aidé pour finaliser mes travaux de doctorat.

Je rends hommage et je remercie également l'ex-Recteur de l'Université de Skikda Professeur Kouadria Ali pour tout ce qu'il avait fait pour nous les doctorants.

Avec beaucoup de joie j'exprime mes remerciements à Madame professeur d'Onghia Anna maria Directrice et responsable du laboratoire de virologie De l'Iamb Bari Italie (Integrated Pest Managment) , qui nous a beaucoup aidé dans la réalisation de ce projet mettant à notre

disposition les moyens matériels et le savoir faire dans les analyses au laboratoire notamment les analyses moléculaires .

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au directeur de l'IAM de Bari Dr C. Lacirignola et tout son personnel, pour leur hospitalité. et leur collaboration avec notre pays en matière de développement des sciences.

Ma profonde gratitude va vers le staff administratif surtout Madame Olimpia Ontonelli Qui a toujours été présente pour le bon déroulement de mes séjours en Italie.

Je voudrais enregistrer ma grande vénération pour le professeur GP Martelli ainsi que les autres enseignants de l'Université de Bari et ceux de l'IAM de Bari qui nous ont toujours apporter leur aide et leur soutien durant notre formation de Master et également durant le stage des doctorants, en l'occurrence, Professeur Francesco Porcelli et le professeur A.M. D'Onghia Responsable du laboratoire IPM de l'IAM de Bari pour leur supervision générale et la coordination de la formation IPM.

Mon vif remerciement pour le professeur Chester N.Roistacher pour son Soutien et les suggestions constructives afin de mener à bien ce travail.

Mes sincères remerciements au professeur R.K.Yokomi United State Department of Agriculture-Agricultural California.

Également ma profonde gratitude et le respect pour tout les chercheurs du CNRS de Locorotondole Italie Mr.Antonio cardonei,, Mme francesca, Mme Sallona maria, Mme Maria etc.

Mes remerciements à tout le personnel du laboratoire de Bari , Dr Digiaro, Dr Luigi catalano et Dr Diterlizi Biagio, Dr Bochia, Dr.Minafra, Dr.Savino, ect . et je ne voudrai pas oublier tous mes professeurs que j'ai connu à bari durant mes séjours de Doctorat ou ma formation de Master et stages pratiques. Enfin à tous mes amis du laboratoire Dajiana, Toufic, Franco, Rocco, Giuseppe, Antonio, andréa.

Mes remerciements vont également aux Docteurs, Madame Dorsef de la Tunisie et Monsieur Afechtel Mohamed du Maroc.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Doyen de la Faculté des Sciences, Professeur Omairi Dj. qui m'a donné l'opportunité de poursuivre mes travaux de doctorat, et ayant reçu, Mme Professeure Belkahla H. au sein de l'Université de Skikda.

je n'oublie pas de remercier le directeur Actuel de l'ITAF Dr . Mendil M. qui m'a soutenu pour aller de l'avant dans ma recherche dans le cadre de lutte contre la tristeza et ce en représentant l'Algérie dans le MNCC (Mediterranean Net Work Citrus Certification).

Mes remerciements vont également à Monsieur Guerouabi A. qui m'a beaucoup encouragé à finaliser ma thèse de doctorat et également pour m'avoir aidé pour la publication d'un ouvrage dans la spécialité maladies des agrumes.

Mes remerciements très chaleureux à tous mes amis (e) et collègues du Département d'Agronomie de l'Université de Blida, d'abord Madame la doyenne Professeure Berima A. et Madame la vice-doyenne chargée de la pédagogie Docteur Chaouia C.

De l'Université de Skikda surtout, Dr. Kissoum Y., Dr. Boulahouache S., Dr. Zeghida Dj.

Tous mes remerciements vont également à tous les responsables de stations ou exploitations qui nous ont permis d'accéder aux vergers et ont mis à notre disposition toutes les conditions favorables au déroulement de nos activités.

Résumé

La présente étude a été réalisée au niveau de la zone de la Mitidja, la plus importante région agrumicole d'Algérie. Ce travail a été axé sur une étude de la distribution de la tristeza et la caractérisation des isolats locaux détectés. Durant les campagnes agrumicoles 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012, les prospections effectuées sur les sites étudiés, ont mis évidence la présence de symptômes associés à la présence du virus de la tristeza, comme les dépérissements rapides, le nanisme des arbres et la réduction de calibre de fruits. Les résultats des analyses au laboratoire effectués sur plus de 2000 échantillons, à travers des tests sérologiques, ont montré un taux d'infection total de 19.47%, d'abord concernant la détection du virus, par les deux méthodes sérologiques ELISA et DTBIA et sur plus de 2000 échantillons, un taux d'infection global (25.6%). Avec les orangers, une prédominance d'infection a été relevée sur la variété d'oranger Jaffa (58.8%), suivi par la double fine (22.20%) et enfin le groupe des navels (16.53%). Par contre avec les mandariniers et mandariniers similaires, le taux d'infection a été important avec le mandarinier commun (72.13%), suivi par Tarocco 53.01% et la Satsuma avec 23.04%. Par contre les taux d'infections les plus bas ont été enregistrés chez le citronnier et le clémentinier avec respectivement 5.7% et 8.2%. L'identification biologique du CTV à travers la transmission par les pucerons sur les plantes indicatrices herbacées de pois et sur des plantes ligneuses (bigaradier et lime mexicaine), a été très révélatrice de certains aspects liés à l'apparition de la maladie. La plante herbacée (pois) est un indicateur biologique, mis en contact avec les pucerons *Aphis gossypii*, *Toxoptera-aurantii* et *Aphis spiraecola* porteurs du virus prélevés sur différentes espèces d'agrumes, ont presque tous exprimé des symptômes de l'enroulement et des taches foncées sur le feuillage. L'analyse sérologique par la technique ELISA de feuilles de pois a été positive au virus de la tristeza. Des résultats sur la transmission du CTV sur le bigaradier et la lime mexicaine par les trois pucerons ont été obtenus et l'efficacité de la transmission par les trois vecteurs est différente d'une espèce à l'autre et également vis-à-vis de l'indicateur ligneux.

Une identification des pucerons sur les sites prospectés a fait l'objet de notre étude, vu l'incidence et la présence du virus de la tristeza, des pourcentages élevés ont été observés sur les vergers agrumicoles dépassant les 50% d'infestation par *Aphis gossypii*, *T. aurantii* et *A. spiraecola*, avec une prédominance de l'espèce *A.gossypii* dans l'ensemble des sites prospectés.

La caractérisation des 39 isolats locaux de CTV, en utilisant des indicateurs ligneux (Lime Mexicaine), provenant d'un verger commercial et d'un parc à bois, ont mis en évidence

l'apparition de symptômes d'éclaircissement de nervures après environ six mois post-inoculation ; par contre le symptôme de *stem-pitting*, associé à des souches sévères n'a pas été observé sur les échantillons analysés.

L'extraction des acides nucléiques totaux et le passage de l'ARNss au cDNA par la reverse transcription-PCR, et la technique du SSCP, ont permis de choisir les souches pour l'analyse, le clonage et le séquençage du gène de la capsid des particules virales. Le séquençage de la protéine de la capsid des échantillons testés, ont révélé des souches présentant des similitudes avec les isolats atténués T385 très diffus en Espagne et en région méditerranéenne.

Mots clés: Algérie, Agrumes, prospection (*CTV*), caractérisation, DTBIA, PCR, SSCP, IC-RT-PCR

Summary

This study was carried out at the level of the Mitidja zone, the most important citrus growing region of Algeria. This work focused on a study of the distribution of tristeza and the characterization of local isolates detected. During the 2009-2010, 2010-2011, 2011-2012 agronomical campaigns, the surveys carried out on the sites studied showed the presence of symptoms associated with the presence of the tristeza virus, such as rapid decline, dwarfism and reduction of fruit size.

The results of the laboratory tests carried out on more than 2,000 samples, through serological tests, showed a total infection rate of 19.47%, first with regard to the detection of the virus, by the two ELISA and DTBIA serological methods and More than 2000 samples, an overall infection rate (25.6%). In orange trees, a predominance of infection was observed on the Jaffat orange variety (58.8%), followed by double fine (22.20%) and finally the group of navels (16.53%). On the other hand, in mandarin trees and similar mandarin trees, the infection rate was high in common mandarin (72.13%), followed by Tarocco 53.01% and Satsuma with 23.04%. On the other hand, the lowest rates of infections were observed in lemon and clementine with 5.7% and 8.2%, respectively. The biological identification of CTV through aphid transmission on pea herbaceous indicator plants and on woody plants (bigarad and Mexican lime) has been very revealing of some aspects related to the appearance of the disease. The herbaceous plant (pea) is a biological indicator, brought into contact with the *Aphisgossypii*, *Toxopteraaurantii* and *Aphispiraeicola* aphids carrying virus from different citrus species, almost all expressed symptoms of winding and dark spots on the foliage. Serological analysis using pea leaf ELISA was positive for tristeza virus. Results were obtained on the transmission of VCT on yellow-grassberry and Mexican lime by the three aphids and the effectiveness of transmission by Three vectors are different from one species to another and also with respect to the ligneous indicator. Identification of the aphids on the prospected sites was the subject of our study, given the incidence and presence of tristeza virus, high percentages were observed on citrus orchards exceeding 50% of *Aphisgossypii* infestation, *T. aurantii* and *A. spiraeicola*, with a predominance of *A. gossypii* in all the sites surveyed. The characterization of the 39 local CTV isolates using woody indicators (Mexican Lime), from a commercial orchard and a woodlot, showed signs of rib clearing symptoms after about six Month post-inoculation; On the other hand the symptom of stem-pitting, associated with severe strains was not observed on the samples analyzed.

The extraction of the total nucleic acids and the passage from the ssRNA to the cDNA by the reverse transcription-PCR, and the SSCP technique, made it possible to choose the strains for the analysis, the cloning and the sequencing of the capsid gene of the viral particles. The sequencing of the capsid protein of the tested samples revealed strains with similarities to the very diffuse T385 attenuated isolates in Spain and in the Mediterranean region.

Key words: Algeria, Citrus, prospecting (CTV), characterization, DTBIA, PCR, SSCP, IC-RT-PCR

ملخص

وقد أجريت هذه الدراسة في منطقة Mitija، أكبر منطقة الحمضيات من الجزائر. وقد ركز هذا العمل على دراسة توزيع tristeza وتوصيف السلالات المحلية détectés.Durant الحملة الحمضيات 2010-2009، 2011-2010، 2011-2012، والدراسات الاستقصائية effectuéesur مواقع الدراسة، أظهرت وجود الأعراض المصاحبة مع وجود الفيروس tristeza، مثل ذبول السريع، والأشجار تقزيم والحد من حجم الفاكهة. نتائج التحاليل المختبرية التي أجريت على أكثر من 2000 عينة، من خلال الاختبارات المصلية أظهرت معدل الإصابة مجموع 19.47٪، لأول مرة في الكشف عن الفيروسات من قبل كل من إلبسا والطرق المصلية وDTBIA أكثر من 2000 عينة، وهو معدل الإصابة العام (26.5٪). بين أشجار البرتقال، لوحظ وجود غلبة الإصابة على مجموعة متنوعة من البرتقال (58 Jaffat)، تليها غرامة مزدوجة (22.20٪)، ومجموعة السرات (16.53٪). من سلبيات في الفصحي واليوسفي مماثل، كان معدل الإصابة هاما في الفصحي المشتركة (72.13٪)، تليها 53.01 Tarocco و 23.04٪ مع ساتسوما. بواسطة ضد أدنى معدلات الإصابة سجلت في الليمون وكليمنتين مع 5.7٪ و 8.2٪ على التوالي. وduCTV تحديد البيولوجية من خلال نقل من قبل المن على العشبية البازلاء النباتات مؤشر والنباتات الخشبية (البرتقال الحامض والليمون المكسيكي)، وقد تكشف جدا بعض الجوانب المتصلة بداية المرض. نبات عشبي (البازلاء) هو مؤشر البيولوجي، في اتصال مع المن Aphisgossypii Aphispiraeocola Toxopteraaurantii وحاملة للفيروس مأخوذة من أنواع الحمضيات المختلفة، وأعرب ما يقرب من جميع أعراض لف والبقع السوداء على أوراق الشجر. كان التحليل المصلي من أوراق البازلاء ELISA إيجابي في فيروس tristeza. وقد تم الحصول على النتائج على انتقال CTV على البرتقال الحامض والليمون المكسيكي من قبل المن ثلاثة وكفاءة انتقال المرض من خلال ثلاث ناقلات مختلفة من نوع إلى آخر، وكذلك وجها لوجه مع مؤشر الأخشاب.

كان تحديد المن على مواقع استكشاف موضوع دراستنا، نظرا لتأثير وجود الفيروس tristeza، لوحظت أعلى النسب في بساتين الحمضيات تزيد على 50٪ الإصابة Aphisgossypii، T. وA. spiraeocola aurantii، مع غلبة الأنواع A. gossypii في جميع المواقع التي شملها الاستطلاع. توصيف CTV 39 المحلية يعزل، وذلك باستخدام مؤشرات الخشبية (المكسيكي الجير)، من بستان التجاري وساحة الخشب، سلط الضوء على ظهور أعراض البرق بعد حوالي ستة أسابيع شهر بعد التلقيح. بواسطة ضد أعراض الجذعية تأليب،، المرتبطة الضغوط الشديدة لم يلاحظ على العينات التي تم تحليلها. جعل استخراج من مجموع الأحماض النووية والجزء ssRNA من كدنا] من قبل عكس النسخ-PCR وتقنية SSCP من الممكن تحديد سلالات لتحليلها، والاستنساخ وتسلسل الجين لالقفيفة الجسيمات الفيروسية. تسلسل عينات البروتين قفيصة اختبار كشف سلالات مع التشابه يعزل T385 مخفف منتشر جدا في اسباني و عاى مستوى

العلامات: CTV، الجزائر، والتنقيب، وتوصيف، DTBIA، PCR، SSCP، IC-RT-PCR

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	I
REMERCIEMENTS	II
RESUME	III
LISTE DES FIGURES	IV
LISTE DES TABLEAUX	V
LISTE DES ABREVIATIONS	VI
LISTES DES ANNEXES	VII
INTRODUCTION	1
Partie 1 : présentation et importance des agrumes dans le monde	1
I.1.1. Généralités sur les agrumes.....	4
I.1.2. Origine et histoire des agrumes.....	4
I.1.3. Les agrumes dans le monde et en région Méditerranéenne.....	5
Partie 2: la filière agrumicole et la tristeza en Algérie	7
I.2.1. Les agrumes en Algérie.....	7
I.2.2. L'agrumiculture Algérienne en période coloniale.....	7
I.2.3. Situation actuelle de l'Agrumiculture en Algérie	8
I.2.3.1. La production	10
I.2.3.2. Le rendement.....	10
I.2.3.3. Contraintes	11
I.2.6. Contrôle et gestion de la maladie de la tristeza en Algérie	13
Partie 3: étude de la plante hôte.....	15
I.3.1 Etude botanique des Citrus.....	15
I.3.1.1. Caractères spécifiques des Citrus.....	15
I.3.1.2. Classification botanique	15
I.3.1.3. Variétés des Citrus :	16
I.3.1.4. Conditions agro- climatiques de croissance des agrumes	18
I.3.1.5. La croissance des agrumes	18
I.3.1.6. Les étapes de la vie d'un verger d'agrumes	18
I.3.1.7. Les différents porte-greffes cultivés.....	19
Partie 4: problèmes phytosanitaires des agrumes	21
I.4.1. les principales maladies transmissibles par greffage des agrumes.....	21
I.4.2. Les maladies virales	23

I.4.2.1. La tristeza des agrumes (<i>CTV</i>) <i>Citrus tristeza virus</i>	23
I.4.2.2. La Psorose écailleuse (<i>CPsV</i>) <i>Citrus psorosis virus</i>	24
I.4.2.3. La panachure infectieuse (<i>CVV</i>) <i>Citrus variegation virus</i> (<i>Ilarvirus</i>)	25
I.4.2.4. Le nanisme du Satsuma (<i>SDV</i>) <i>Satsuma dwarf virus</i> (<i>Nepovirus</i>)	25
I.4.2.5. Tatter leaf	26
I.4.3. Les maladies de type viral (<i>Cristacortis</i> , <i>Impietratura</i> , <i>Concave gum/blind pocket</i>)	27
I.4.3.1. <i>Cristacortis</i>	28
I.4.3.2. <i>Impietratura</i>	28
I.4.3.3. <i>Concavité gommeuse</i>	28
I.4.4. Les viroïdes	30
I.4.4.1. L'exocortis	30
I.4.4.2. La cachexie-xyloporose	31
I.4.5. Les procaryotes limités au phloème	33
I.4.5.1. Le subborn (<i>St</i>) <i>Spiroplasma citri</i>	33
I.4.5.2. Le balai de sorcière (<i>WBDL</i>) <i>Witches' broom disease of lime</i>	35
I.4.5.3. Huanglongbing ou le Greening (<i>HLB</i>)	36
Partie 5 : méthodes de diagnostic des maladies transmissibles des agrumes par greffage	37
I.5.1. Evolution du diagnostic des maladies des agrumes transmissibles par greffage	37
I.5.2. Evolution dans la détection et la différenciation des souches du virus de la tristeza	38
I.5.2.1. Le test de l'iode de potassium	38
I.5.2.2. L'indexage biologique	39
I.5.2.3. La sérologie et le moléculaire	39
Partie 6: étude du virus de la tristeza	42
I.6.1. Identité de la maladie de la tristeza	42
I.6.2. L'agent causal	42
I.6.2.1. Place taxonomique du <i>CTV</i>	42
I.6.2.2. Propriétés de la particule virale	42
I.6.2.3. Taxonomie et nomenclature	43
I.6.2.4. Les plantes-hôtes	44
I.6.2.5. Localisation du virus et le comportement des espèces avec le virus de la tristeza	44
I.6.3. Histoire et origine de la tristeza	44
I.6.4. Répartition géographique	45
I.6.5. Souches du virus de la tristeza	47
I.6.6. Symptômes	48
I.6.7. Transmission	50
I.6.8. Epidémiologie	50

Partie 7: étude des vecteurs du CTV.....	52
I.7.1. Généralités	52
I.7.2. Caractéristiques biologiques	52
I.7.2.1. Le cycle de vie des pucerons.....	53
I.7.2.2. Les pucerons vecteurs de la tristeza.....	53
I.7.2.3. Morphologie des pucerons vecteurs de la tristeza.....	53
I.7.2.4. Classification des pucerons vecteurs du CTV	54
I.7.3. Etude de <i>Toxoptera citricida</i>	54
I.7.3.1. Identité du puceron.....	54
I.7.3.2 Plantes hotes.....	54
I.7.3.3. Distribution géographique.....	55
I.7.3.4 Biologie et écologie du puceron.....	55
I.7.3.5. Morphologie.....	56
I.7.3.6. Impact économique	57
I.7.4. Puceron vert <i>Aphis spiraecola</i>	57
I.7.4.1. Description	57
I.7.4.2. Distribution	58
I.7.4.3. Dégâts sur les agrumes.....	58
I.7.4.4. Cycle évolutif.....	58
I.7.5. Puceron noir	59
I.7.5.1. Description du ravageur	59
I.7.5.2. Dégâts sur les cultures.....	59
I.7.5.3. Cycle évolutif.....	60
I.7.6. Puceron du cotonnier <i>Aphis gossypii</i>	60
I.7.6.1. Description	61
I.7.6.2. Biologie et cycle de vie.....	61
I.7.7. <i>Myzus persicae</i>	62
I.7.7.1. La description.....	62
I.7.7.2. Cycle de vie.....	62
I.7.8. Mécanisme de transmission du CTV par les pucerons.....	63
I.7.9. Efficacite de la transmission	64
II.1. Sources du virus.....	69
II.1.1. Origine du matériel utilisé pour l'indexage biologique	69
II.1.2. Matériel végétal utilisé pour la transmission par les pucerons	69
II.1.2.1. Matériel végétal herbacé	69
II.1.2.2. Matériel végétal ligneux	70

II.2. Sites prospectées	70
II.3. Méthodes d'étude.....	75
II.3.1. Protocole d'échantillonnage	75
II.3.1.1. Echantillonnage de fleurs :	75
II.3.1.2 Echantillonnage des pucerons.....	78
II.3.1.3. Conservation des pucerons.....	78
II.3.1.4. Préparation des pucerons pour le montage :	78
II.4. Détection biologique et Efficacité de la Transmissions par pucerons	79
II.4.1. Transmission sur plante-hôte herbacée.....	79
II.4.2 Transmission sur plantes hôtes ligneuses	79
II.5 Indexage biologique sur indicateurs ligneux	79
II.5.1 Différentes techniques utilisées pour l'indexage biologique.....	80
II.5.2 Méthode d'indexage par greffage d'inoculation.....	80
II.6 Conservation du virus	81
II.7 Méthode d'extraction.....	81
II.7.1 Extraction de l'antigène (feuilles et de fleurs) pour la technique ELISA	81
II.7.2 Extraction des ARN totaux pour les tests moléculaires	82
II.8 Tests immuno-enzymatiques	84
II.8.1 Test DAS-ELISA.....	84
II.8.2. Technique DTBIA (Direct Tissu Blot Immuno Assay).....	85
II.9. Caractérisation moléculaire	86
II.9.1. Transcription inverse RT-PCR	86
II.9.2. Analyse de conformation du polymorphisme simple brin (SSCP).....	87
II.9.3. Immunocapture-Transcription inverse-PCR (IC/RT-PCR)	88
II.9.4. Isolation, clonage et séquençage du gène de la capsid.....	89
II.9.4.1. Ligature du produit de la IC-RT-PCR avec pGEM-T easy vector	90
II.9.4.2. Préparation des cellules compétentes.....	91
II.9.4.3. Transformation de cellules compétentes.....	91
II.9.4.4. Dépistage des colonies.....	91
II.9.4.5. Identification des colonies bactériennes portant l'ADN recombinant.....	92
II.9.4.6. Digestion enzymatique du plasmide	92
II.9.4.7. Amplification par PCR de l'ADN et la séquence du gène CP recombinant	93
Chapitre III : Résultats et discussion	94
III.1. Description des symptômes associés au virus de la Tristeza.....	94
III.2. Résultats de la collecte des populations de pucerons durant les trois campagnes agrumicoles ...	96
III.2.1. Distribution des populations de pucerons dans les sites prospectés.....	97

III.2.2. Distribution des populations de pucerons par site prospecté.....	98
III.3. Résultats de l'analyse sérologique (DTBIA, ELISA) pour les trois campagnes.....	101
III.3.1. Résultats des analyses par DTBIA (campagne agrumicole 2009/2010).....	103
III.3.2. Résultats du test DTBIA (campagne agrumicole 2010-2011).....	106
III.3.3. Résultats du test DTBIA (campagne agrumicole 2011-2012).....	107
III.3.4. Résultats du test DAS-ELISA.....	113
III.4. Efficacité de diagnostic entre le test DTBIA et DAS-ELISA.....	116
III.5. Identification biologique et efficacité de la transmission par pucerons.....	117
III.5.1. Transmission par pucerons sur plantes herbacées.....	118
III.5.2. Transmission par pucerons sur plantes ligneuses.....	120
III.6. Caractérisation biologique.....	120
III.7. Répartition spatiale de la Tristeza sur certains vergers prospectés.....	123
III.8. Caractérisation moléculaire.....	130
III.8.1. Transcription inverse-polymérase chaine réaction RT-PCR.....	130
III.8.2. Résultats de l'analyse du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP).....	131
III.8.3. La reverse transcription polymérase chaine réaction RT-PCR.....	131
III.8.4. Résultats de l'analyse du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP).....	132
III.8.5. Résultats du clonage et du séquençage du gène capsid (Cp gene) des souches.....	133
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139
ANNEXES.....	158

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Les agrumes : une forte spécialisation géographique.....	6
Figure 2. Superficie par zones.....	8
Figure 3. Bilan de production agrumicole par variétés.....	9
Figure 4. Rapport ITAFV (réhabilitation agrumiculture1997).....	9
Figure 5. Répartition de la production par an et en Tonnes.....	10
Figure 6 : Les agrumes d'Algérie.....	17
Figure7. Symptômes de la psorose sur bois et feuilles.....	24
Figure 8. Aspect gaufré de feuilles (CVV).....	25
Figure 9. Arbres nains (SDV).....	26
Figure 10. Fruits déformés dûs au virus du (SDV).....	26
Figure 11. Photo montrant le virus du Tatter leaf.....	27
Figure 12. Réaction sévère du mandarinier Satsuma greffée sur le trifolié (Tatter leaf).....	27
Figure 13. Symptômes de Cristacortis sur l'écorce, tronc et invaginations et des trous sur bois	29
Figure 14. Impietratura sur l'albedo des fruits.....	29
Figure 15. Symptômes de la Concavité gommeuse.....	30
Figure 16. Symptômes classiques de l'Exocortis sur le trifolié en Australie.....	31
Figure 17. Nanisme sévère sur l'oranger Valencia greffé sur trifolié en Californie.....	31
Figure 18. Symptômes de Cachexia sur le mandarinier Cléopatra au Venezuela.....	32
Figure 19. Symptômes de Cachexie sur le bois.....	32

Figure 20. Nanisme induit par le Stubborn.....	33
Figure 21. Tiges chlorotiques dûes au Stubborn.....	34
Figure 22. Marbrure et mosaïque chlorotique sur feuilles d'oranger doux.....	34
Figure 23. Avortement des semences (oranger Valencia en Californie).....	34
Figure 24. Symptômes de « Balais de Sorcière » sur tiges et réduction du calibre de fruits...	35
Figure 25. Transmission du « Greening » par les Psylles de <i>Diaphorina citri</i> sur feuilles....	36
Figure 26. Organisation génomique du virus de la tristeza.....	43
Figure 27. Origine de la tristeza.....	45
Figure 28. Distribution mondiale de la tristeza.....	46
Figure 29. Symptomes de la tristeza sur feuille et bois (lime mexicaine).....	49
Figure 30. Symptômes induits par certaines souches sévères du CTV.....	49
Figure 31. Bois strié sur mandarinier.....	50
Figure 32. Symptômes du jaunissement de semis (souche sévère).....	50
Figure 33. Aire de répartition et mouvement de <i>T. citricida</i> dans le monde.....	55
Figure 34_a. <i>Toxoptera citricida</i> (puceron colonisateur des agrumes).....	56
Figure 34_b. <i>Toxoptera citricida</i> (individu ailé).....	57
Figure 35. Puceron vert <i>Aphis spiraecola</i> Patch.....	58
Figure 36. Puceron noir (<i>Toxoptera aurantii</i>).....	60
Figure 37. Puceron de cotonnier <i>Aphis gossypii</i> Glover.....	61
Figure 38. <i>Myzus persicae</i> (Sulzer, 1776).....	62
Figure 39. Transmission du CTV par le puceron.....	63
Figure 40: Situation géographique de la Mitidja (Google earth, 2016).....	70
Figure 41. Image satellite Station Expérimentale du Département de Biotechnologie	

Univ. Blida 1	71
Figure 42. Image satellite EAC Tayeb Slimane 04 Fermes de Guerouaou Soumaa (Blida).	71
Figure 43. Image satellite de l'Exploitation Bouinan (Boufarik 01).....	72
Figure 44. Image satellite E.U.R.L Regueyegue parc à bois (Boufarik 02).....	72
Figure 45. Image satellite de l'Exploitation de Chebli.....	73
Figure 46. Image satellite de l'Exploitation de Mouzaia.....	73
Figure 47. Image satellite de l'Exploitation de l'EURL Semiani Hadjout.....	74
Figure 48. Image satellite de l'ITAFV SIEGE Birtouta Alger.....	74
Figure 49. Schéma représentatif du protocole du monitoring.....	75
Figure 50. Observations visuelles d'arbres suspects porteurs du <i>CTV</i>	76
Figure 51. Conservation des échantillons (fleurs et tiges).....	81
Figure 52. Echantillons de fleurs et de feuilles pour le test ELISA	82
Figure 53. Extraction des ARN totaux à partir des tiges et feuilles.....	83
Figure 54. Extraction des ANT selon le protocole de Foissac et al. (200.).....	83
Figure 55. DAS-ELISA (Vézina et Lacroix, 2017).....	85
Figure 56. Protocole du test DTBIA	86
Figure 57. Protocole SSCP (Rubio et al. 1996).....	88
Figure 58. Clonage et séquençage (Sambrook et al., 1989).....	90
Figure 59. Site du vecteur de clonage pGEM-T.....	90
Figure 60. Dépérissement partiel et complet observé à Boufarik 1.....	94
Figure 61. Symptômes sur feuilles observés à Hadjout et Boufarik.....	95
Figure 62. Nanisme observé sur certains arbres à Boufarik ₁	95
Figure 63. Tiges en forme de balais de sorcière observées à Hadjout (Larbi, 2012).....	95

Figure 64. Distribution des populations de pucerons à travers les principaux sites prospectés.....	97
Figure 65. Taux d'infestation des pucerons (Station expérimentale Univ.Blida).....	98
Figure 66. Taux d'infestation des pucerons (Boufarik ₂).....	99
Figure 67. Taux d'infestation des pucerons (Boufarik ₁).....	99
Figure 68. Taux d'infestation des pucerons (Chebli).....	100
Figure 69. Taux d'infestation des pucerons (Mouzaia).....	101
Figure 70. Taux d'infection par le <i>CTV</i> dans les différents sites échantillonnés.....	103
Figure 71. Taux d'infection par le <i>CTV</i> de différentes espèces Boufarik ₂	105
Figure 72. Taux d'infection de différentes espèces de l'exploitation de Hadjout.....	106
Figure 73. Taux d'infection par le <i>CTV</i> des espèces ou/variétés (Boufarik ₂ et Soumaa).....	107
Figure 74. Taux d'infection par le <i>CTV</i> dans les différents sites prospectés.....	107
Figure 75. Taux d'infection par le <i>CTV</i> et par espèces dans les sites prospectés.....	109
Figure 76. Taux d'infection (<i>CTV</i>) par ELISA dans les différents sites échantillonnés.....	112
Figure 77. Taux d'infection (<i>CTV</i>) par ELISA de différentes espèces (Boufarik ₂).....	113
Figure 78. Taux d'infection (<i>CTV</i>) par ELISA de différentes espèces (Hadjout).....	114
Figure 79. Inoculation par pucerons sur plantules de pois.....	118
Figure 80. Efficacité de la transmission des pucerons sur le bigradier et la lime mexicaine.	120
Figure 81. Plants de lime mexicaine indexés sous serre IAM Bari.....	121
Figure 82. Eclaircissement de nervures et feuilles en forme de cuillère IAM Bari.....	121
Figure 83. Incidence spatiale de vecteurs migrateurs et colonisateurs.....	122
Figure 84. Répartition de la maladie sur le verger de Boufarik ₁	123
Figure 85. Répartition de la maladie sur le verger d'Agronomie (Thomson).....	124

Figure 86. Répartition de la maladie sur le verger Parc à bois W. navel (Boufarik ₂).....	124
Figure 87. Répartition de la maladie sur le verger de Hadjout (Double fine).....	125
Figure 88. Répartition de la maladie sur le verger de Hadjout (Clémentine).....	126
Figure 89. Répartition de la maladie sur le verger de Hadjout (Citronnier).....	127
Figure 90. Répartition de la maladie sur le verger de Chebli.....	128
Figure 91. Répartition de la maladie sur le verger de Soumaa	128
Figure 92. Gel de l'électrophorèse du produit RT-PCR des isolats du CTV.....	130
Figure 93. SSCP Migration sur gel polyacrylamide non dénaturant 8%.....	130
Figure 94. Gel de l'électrophorèse du produit RT-PCR des isolats du CTV.....	132
Figure 95. SSCP Migration sur gel polyacrylamide non dénaturant 8%.....	133

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1. Production mondiale de fruits (moyenne 2009-2010).....	5
Tableau 2. Rendement d'agrumes par période.....	10
Tableau 3. Principales maladies transmises par greffage des agrumes	22
Tableau 4. Plantes indicatrices des souches de <i>CTV</i>	48
Tableau 5. Sources positives au <i>CTV</i> utilisées en indexage biologique.....	69
Tableau 6. Résultats des échantillons récoltés durant les campagnes agrumicoles (2009/2012).....	77
Tableau 7. Les amorces utilisées pour la RT-PCR.....	87
Tableau 8. Les amorces utilisées pour l'IC-RT-PCR.....	89
Tableau 9. Taux d'infection par le <i>CTV</i> durant les trois campagnes (2009/2012).....	102
Tableau 10. Résultats de comparaison entre DTBIA et DAS-ELISA.....	117
Tableau 11. Résultats de la transmission par pucerons sur les plantules du pois.....	117
Tableau 12. Résultats de la caractérisation biologique de 39 sources sélectionnées.....	121

LISTE DES ABREVIATIONS

bp : Paire de base

AgNO₃ : Nitrate d'argent

BRCA : Brown Citrus Aphid

BSA : Bovin Serum Albumine

ADNc : L'ADN complémentaire

CP : capside protéique

CTV : *Citrus Tristeza Virus*

Cutt. : Coupe

D-ARN : ARN défectueux

DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Assay Immunosorbend

DIG. : Digoxigénine

ADN: Acide Désoxyribonucleique

dNTP: Désoxyribonucléotides triphosphates (. DTTP, dATP, dCTP, dGTP)

ARNdb: ARN double brin

DTBIA : *Direct Tissue blot immunoassay*

EDTA : Ethylendiaminitetra acétique sel disodique de l'acide

ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ARNg : ARN génomique

Gr. : Groupe

HCl : Acide chlorhydrique

IBA : L'acide indole acétique

IC / RT-PCR: Immunocapture / transcription inverse-*Polymerase Chain Reaction*

KDa : Kilo Daltons

M : Molar

MT : Millions de tonnes

Mab : Anticorps monoclonal

mg / ml : Milligramme par millilitre

mM : mM

mol / l : Moles par litre

MuLV : Virus de la leucémie murine

Nt : Nucleotide

OD : Densité optique

ORF : Cadres de lecture ouverts

PAB : Anticorps polyclonaux

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

QD : Déclin rapide

RH : Humidité Relative

ARN: Acide ribonucléique

RNase: Ribonuclease

rpm: Rotation par minute

SSCP : Polymorphisme de conformation simple brin

SP: *Stem pitting*

Taq: *Thermophilus aquaticus*

ARNsg : ARN sous-génomique

Dosage immunoenzymatique Triple Anticorps Sandwich-Enzyme Linked: TAS-ELISA

TE Tris-EDTA

TBE : Tris borate EDTA

Tris : Tris Hydroxyméthil acide aminométhane chloridric

UTR : Régions terminales non traduites

LISTES DES ANNEXES

Annexe 1 : Clé d'identification des pucerons d'agrumes dans le monde

Annexe 2 : Solutions Tampons et Solutions (DTBIA et ELISA)

Annexe 3 : Solutions pour l'extraction des Acides nucléiques totaux

Annexe 4 : Tampons et Gels pour électrophorèse

Annexe 5 : Milieux et solutions bactériennes utilisés pour le clonage et extraction du DNA du plasmide

Annexe 6 : Résultats du test ELISA

Introduction

INTRODUCTION

Le virus de la tristeza cause une des plus dévastatrices maladies des agrumes (Bar-Joseph et Lee, 1989) et constitue le pathogène viral le plus économiquement connu sur cette culture (Lee et Bar-Joseph, 2000).

La tristeza est causée par un virus classé en liste A₂ de l'Organisme Européen de la Protection des Plantes et en liste A₁ Algérienne des organismes nuisibles de quarantaine.

La maladie de la tristeza a causé la mort de millions d'arbres greffés sur le bigaradier par le dépérissement rapide et des épidémies ont été signalées dans différents pays (Argentine, Brésil, Venezuela, Pérou, Etats-Unis d'Amérique, Espagne et d'autres régions agrumicoles du monde (Roistacher, 2002).

Dans le passé et suite aux épidémies du *Phytophthora* ayant touché les agrumes, le bigaradier a été utilisé parce qu'il présentait d'excellentes qualités agronomiques et il s'adapte bien à différents types de sol et présente également des tolérances à plusieurs maladies entre autres les maladies virales, à viroïdes. Malheureusement l'association du bigaradier avec tous les cultivars d'agrumes est extrêmement sensible à la tristeza (Roistacher, 2002).

Le virus de la tristeza infecte toutes les espèces, cultivars et hybrides des agrumes. Il infecte aussi certains genres apparentés aux agrumes tels qu'*Aeglopsis*, *Afraegle*, *Fortunella* et *Pamburus* et quelques hybrides inter-génériques (Yokomi, 2009).

Le CTV est transmis par plusieurs espèces de pucerons selon le mode semi-persistant et dont le vecteur potentiel est *Toxoptera citricida* (Bar-Joseph et al., 1983). Plusieurs souches du virus ont été décrites, différentes entre elles, par les symptômes (Bové et Vogel, 1981), qu'elles induisent sur de nombreux hôtes par leur transmissibilité par les pucerons (Bar-Joseph et al., 1983), par la configuration de leurs ARN (Dodds et al., 1987), par leur carte peptidique (Guerra et al., 1990) et par leur réaction sérologique aux anticorps monoclonaux (Permar et al., 1990).

La tristeza a été introduite dans tous les pays de la région Méditerranéenne par le citronnier Meyer contaminé importé des Etats Unis et de l'Afrique du Sud (Bové, 1995). Tous les pays ayant importé du matériel végétal contaminé, ont signalé la présence de la maladie, comme ce fut le cas de l'Algérie, Maroc et Tunisie. L'absence du vecteur potentiel *Toxoptera citricida* de la Tristeza dans cette région faisait croire que le danger était loin, malheureusement la

Introduction

situation est alarmante car la présence de ce vecteur au niveau du pourtour Méditerranéen a été signalée au Portugal à l'île Madère 1994 (Aguilar et al., 1994), disséminant des souches sévères. Après dix ans il a été trouvé au nord du Portugal et d'Espagne (Iiharco et al. 2005).

L'Algérie comme tout autre pays Méditerranéen n'est plus à l'abri du danger de la Tristeza qui menace 90% de plantations greffées sur le bigaradier et de l'introduction de son vecteur potentiel. Ce virus peut anéantir cette culture rapidement surtout en absence d'un programme de certification rigoureux et de contrôles et prospections généralisées à toutes les régions agrumicoles.

L'Algérie porte un grand intérêt à ce sujet et par le biais du ministère de l'agriculture de la pêche et du développement rural (MAPDR) ainsi que les institutions scientifiques et techniques concernées, telles que la Direction de la protection des végétaux et du contrôle technique (DPVCT), le centre national de contrôle et certification de plants et semences (CNCC), l'institut de la protection des végétaux (INPV) et l'institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne (ITAFV) et les universités (Univ. Blida) impliquées dans le contrôle et la gestion de cette maladie, des efforts sont déployés pour faire face à la Tristeza.

Cette maladie a été rapportée il y a plus de 50 ans (Frezal, 1957), et est réapparue en 2000 sous forme de foyers localisés où des cas positifs ont été identifiés et détectés par le test immunoenzymatique (ELISA et DTBIA) dans la région de la Mitidja (ITAFV, 2002). Actuellement l'incidence et la présence de cette maladie dans l'ensemble du pays reste mal connue. Egalement les souches de la Tristeza présentes en Algérie ne sont pas connues.

À cet effet, nous nous sommes proposées d'entreprendre une recherche sur ce virus de quarantaine afin de situer l'état sanitaire de nos vergers et de caractériser les souches locales du CTV. À cet effet, les objectifs principaux de notre travail ont porté sur les points suivants:

1-Détection immuno-enzymatique (DAS-ELISA) et immuno-empreinte (DTBIA) de la Tristeza, au niveau de la Mitidja, dans certains vergers commerciaux privés et étatiques.

2- Caractérisation biologique

3- Caractérisation moléculaire des souches présentes en Algérie

4- Comparaison des souches virales Algériennes avec les souches Méditerranéennes du point de vue virulence

Ce travail a été effectué en partie :

Introduction

En Algérie à l'université de Blida¹, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, du Département des Biotechnologies Végétales (ex: Agronomie) au niveau du laboratoire de recherche de la protection et valorisation des produits agrobiologiques (PVRAB) dirigé par Madame le Professeure Belkahla Hadjira. Dans ce laboratoire les premiers tests immuno-enzymatiques (DAS-ELISA), les empreintes sur les membranes de nitrocellulose (DTBIA) ainsi que la transmission par des pucerons ont été réalisés. Les premières identifications des pucerons ont eu lieu au niveau du laboratoire d'entomologie et les secondes à l'INA d'El-Harrach

-En Italie à l'Institut Agronomique Méditerranéen de Bari (IAMB) au laboratoire « Integrated Pest Management » sous la direction de Madame le Docteur Anna Maria D'Oghia et Docteur Djelouah Khaled. La réalisation de toutes les analyses sur les membranes de nitrocellulose (DTBIA), moléculaires (Extraction des acides nucléiques totaux, RT-PCR, SSCP) ont été effectuées au niveau de ce laboratoire. Une partie concernant la caractérisation moléculaire et le séquençage des souches d'échantillons positifs au virus de la Tristeza y a été réalisée à l'Université de Turin en Italie.

CHAPITRE I
SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE 1
PRESENTATION ET
IMPORTANCE DES
AGRUMES
DANS LE MONDE

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Partie 1 : PRESENTATION ET IMPORTANCE DES AGRUMES

DANS LE MONDE

I.1.1. Généralités sur les agrumes

Les agrumes appelés aussi hespéridés, sont des arbres produisant des fruits caractérisés par une surface de peau (zeste) riche en glandes à huiles essentielles, et une pulpe organisée en quartiers comprenant des pépins et de nombreux poils succulents gorgés de jus (Luro et al., 2013). Le mot « agrumes », d'origine italienne, désigne les fruits comestibles et par extension les arbres qui les portent, appartenant au genre « Citrus ». Les principaux agrumes cultivés pour la production de fruit sont : les orangiers, les mandariniers, les clémentiniers, les citronniers, les pomelos. Toutes ces espèces appartenant à la famille des Rutacées qui comprend trois genres (*Poncirus*, *Fortunelle* et le genre *Citrus* (Loussert, 1987).

I.1.2. Origine et histoire des agrumes

L'ancienneté de la culture des agrumes ne permet pas de définir précisément leur zone d'origine, cependant, selon Tanaka (1954) et Jackson (1991), celle-ci serait originaire du nord-est de l'Inde, alors que selon Swingle et Reece, (1967), Soost et Cameron (1975), Davies et Albrigo (1994), Spiegel Roy et Goldschmidt (1996), plusieurs espèces d'agrumes seraient probablement originaires de la Chine.

Selon Luro et al. (2013), les agrumes sont originaires d'Asie subtropicale et plus particulièrement d'une zone allant du nord-est de l'Inde jusqu'au nord de l'Indonésie, en passant par le Myanmar (Birmanie) et le sud de la Chine. La première importation d'un agrume en zone méditerranéenne remontait au III^e siècle av. J.-C., et certains auteurs situent celle-ci lors de l'épopée d'Alexandre le Grand en Perse, où le cédratier était cultivé. Appelé à l'époque « Pomme de Perse », le cédrat rapporté en Grèce a rapidement conquis le reste de la Méditerranée. Plusieurs siècles se seraient écoulés avant que d'autres variétés d'agrumes ne soient introduites en occident. La primauté du cédratier en occident et l'absence d'autres agrumes sur une période s'étalant de l'Antiquité au Moyen Âge sont controversés chez les historiens et les archéologues.

En dehors du sud-est asiatique, le Bassin méditerranéen est considéré comme le tremplin de la diffusion de la culture des agrumes à travers le monde. C'est lors des échanges commerciaux

Chapitre I : Synthèse bibliographique

avec l'Asie, à partir du X^e siècle, que les Génois et les Portugais introduisirent dans le Bassin méditerranéen l'oranger, le bigaradier et le citronnier. Les Maures implantèrent la culture des orangers dans tout le Maghreb et l'ouest de la méditerranée. Leur introduction dans de nouvelles contrées a souvent été liée à la découverte de nouvelles terres.

1.1.3. Les agrumes dans le monde et en région Méditerranéenne

La culture des agrumes s'est intensifiée à l'échelon mondial au cours des XIX^e et XX^e siècles, et couvre aujourd'hui plusieurs millions d'hectares. Les agrumes sont aujourd'hui cultivés du cap de Bonne-Espérance au Bassin méditerranéen, de l'Argentine à la Californie et de l'Australie au Japon. Cette extension permet d'expliquer la place de tout premier plan que cette famille occupe dans la production fruitière mondiale (Tab.1). Selon la FAO, la récolte mondiale approchait 123 millions de tonnes en 2009-2010 (Imbert, 2013). Les niveaux de production des différents agrumes sont très hétérogènes.

Bien que l'aire moderne de culture des agrumes soit très vaste, le Brésil, le Bassin méditerranéen, la Chine et les Etats Unis contrôlent à eux seuls les deux tiers de la production mondiale. À chaque zone de production il y a une spécialisation, l'Amérique domine l'industrie de la transformation et la moitié des agrumes frais exportés à travers le monde provient de la Méditerranée. La Méditerranée s'est spécialisée dans le commerce mondial des agrumes frais, ainsi, en fruits frais, le Bassin Méditerranéen contrôle pas moins de 60% du commerce mondial des oranges et des citrons (hors lime) et plus de 70% de petits agrumes (Imbert,2013).

Tableau 1. Production mondiale de fruits (moyenne 2009-2010).

Production fruitière	Millions de tonnes	% de production totale
Banane et plantain	136	23
Agrumes	123	21
Pomme	70	12
Raisin	68	11
Goyave, mangue, mangoustan	36	6
Total fruits, hors melon et pastèque	600	-

Source : FAO (2010)

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Cependant, selon Imbert (2005), la majeure partie de la production se concentre dans certaines zones géographiques, la plupart est cultivée dans l'hémisphère nord, comptant pour environ 70% de la production totale. Les principaux pays producteurs d'agrumes sont le Brésil (20 Mt), les pays du bassin Méditerranéen (17 Mt), la Chine (4 Mt) et les États-Unis (14 Mt) (Fig.1).

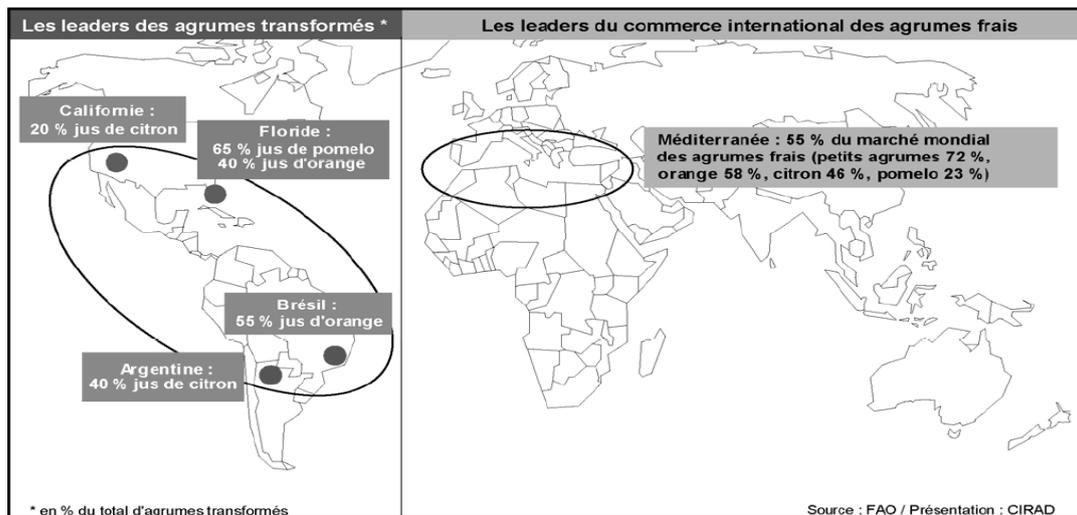


Figure 1. Les agrumes une forte spécialisation géographique (Imbert, 2005)

PARTIE 2

LA FILIERE
AGRUMICOLE ET
LA TRISTEZA EN
ALGERIE

Partie 2: la filière agrumicole et la tristeza en Algérie

I.2.1. Les agrumes en Algérie

Les agrumes sont une source d'approvisionnement en fruit entre les mois de Novembre et Mai. Les terres utilisées pour la culture des agrumes sont parmi les plus riches du pays. Les zones de l'ouest sont rassemblées dans des périmètres irrigués. Au centre un bon pourcentage est concentré hors des périmètres irrigués, alors que pour l'est une occupation appréciable dans les périmètres de Skikda Annaba et Guelma. L'est de l'Algérie reste une région où les agrumes n'ont pas connu un développement important, plus de la moitié du verger se trouve au centre du pays. Les rendements des agrumes restent en dessous de la moyenne internationale est plus faible que les rendements de nos voisins Méditerranéens (Bellabas, 2010). La production des agrumes pour la campagne agrumicole (2014), a atteint 11 millions de quintaux sur une surface globale de 65 000 ha, avec une hausse de 20 000 ha depuis 2000. Pour les agrumes, l'ITAFV développe actuellement de nouvelles variétés destinées à l'industrie des jus, et tend à augmenter la production à 17 millions de quintaux dans les cinq prochaines années (Anonyme, 2014).

I.2.2. L'agrumiculture Algérienne en période coloniale

L'agrumiculture Algérienne a progressé en trois étapes successives, la première partie a commencé depuis 1850, date d'introduction du mandarinier, au premier recensement Algérien, en 1858, on dénombre 170 ha d'orangeries avec 22.330 arbres dont la plupart se trouve dans la région de Blida. En 1850, les exportations avaient augmenté passant de 13 tonnes pour atteindre 1000 tonnes en 1913. La superficie était alors de 4000 ha. Quelques années plus tard elle passait à plus de 8000 ha et en 1928 le début d'exportation de la clémentine. La seconde partie part de 1936, année caractérisée par une amélioration de l'agrumiculture, on assiste alors à des plantations d'agrumes à un rythme de 2000 à 3000 ha/an. Dès 1946, les plantations étaient stimulées par de nombreux facteurs (besoins alimentaires, utilisations de techniques nouvelles, etc.). L'accroissement des plantations se fit à un rythme accru jusqu'au 1956. La superficie était alors de 35000 ha et une production de 360.000 tonnes (Ferhat et al. 2010).

I.2.3. Situation actuelle de l'Agrumiculture en Algérie

La culture des agrumes représente pour notre pays un segment stratégique occupant 0,7 % de la surface agricole utile couvrant ainsi 8% de la superficie totale occupée par les cultures pérennes (ITAFV, 2013). L'ensemble du verger agrumicole est constitué de 64771 ha dont 57479 ha en rapport. Le reste étant constitué de 7292 ha de jeunes plantations. La superficie des vergers improductifs reste à déterminer (comprise dans la superficie en rapport) (MADR, 2013). Le potentiel agrumicole national est réparti, à l'échelle régionale comme suit (Fig.2).

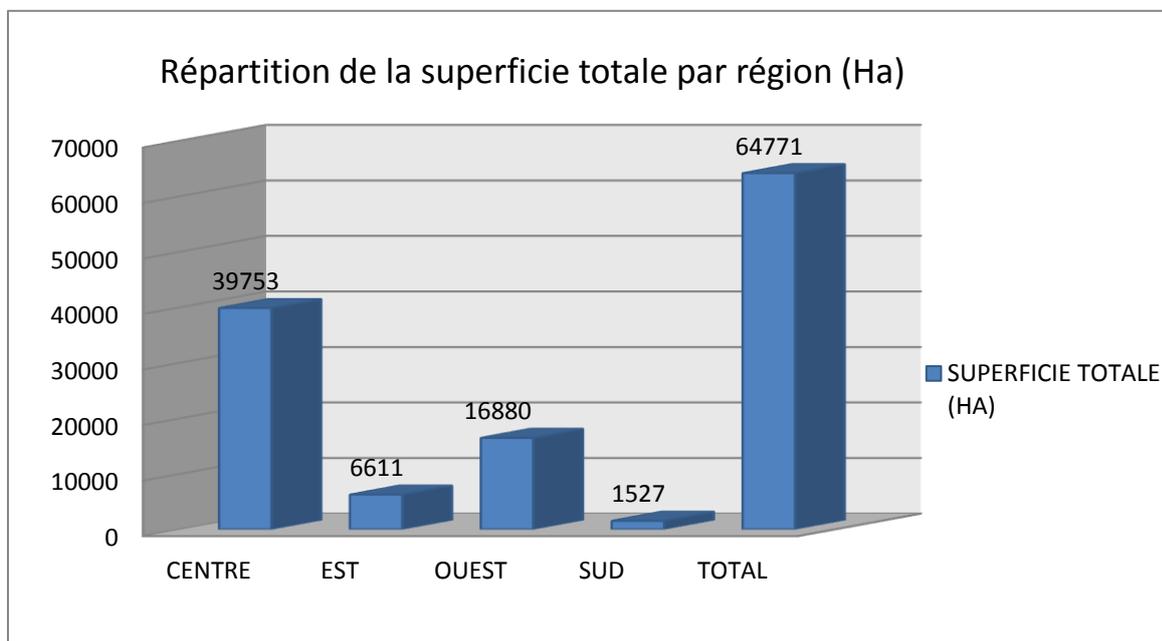


Figure 2. Superficie par zones / Source Bilan de production agrumicole par variétés (DRDPA 2000 /2010)

Selon les exigences pédo- climatiques des agrumes, la plaine de la Mitidja occupe 43%, suivi par le périmètre de la Mina et Bas- Chélif 27%, vient ensuite la plaine du Saf-Saf (Skikda) avec 10%, enfin le périmètre de la Habra (Mascara) avec 07%. La structure variétale commercialisée se distingue par l'importance des oranges et des clémentines en matière de superficie (Hadj-Sahraoui, 2007) (Fig.3).

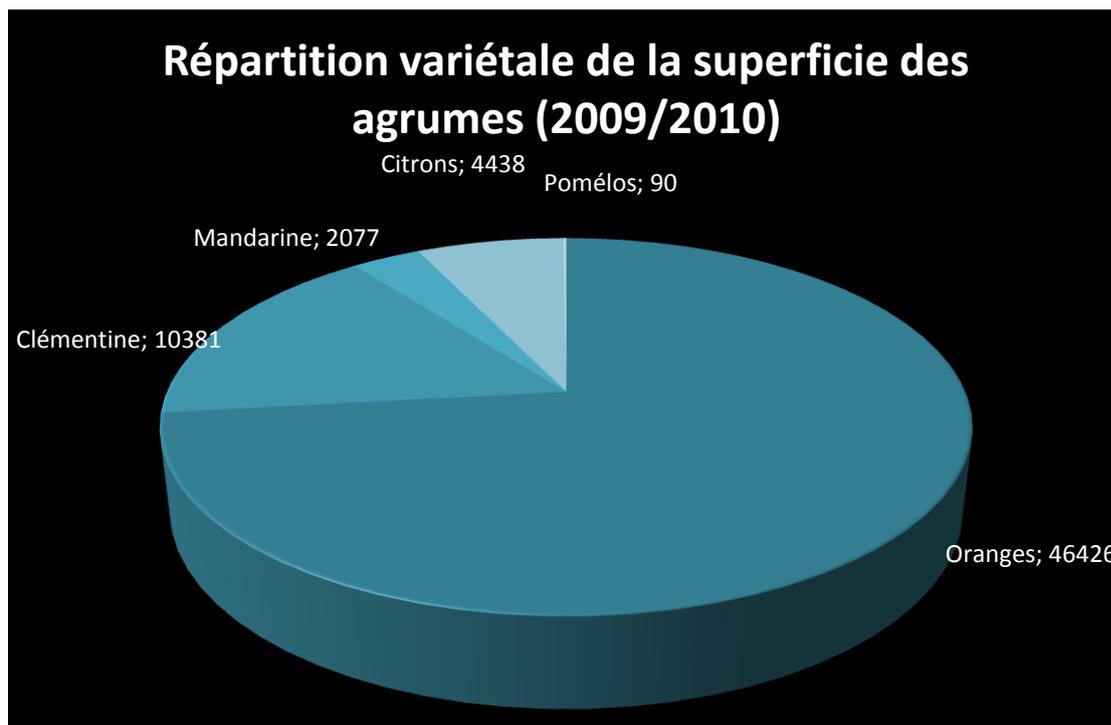


Figure 3. Superficie de la structure variétale Source (Bilan de production agrumicole par variétés) (DRDPA/2013)

Selon les arbres qui constituent le verger agrumicole Algérien, il apparaît que la plupart des plantations sont anciennes datant de la période coloniale, malgré la politique de renouvellement, on enregistre un faible taux de plantation (Fig.4).

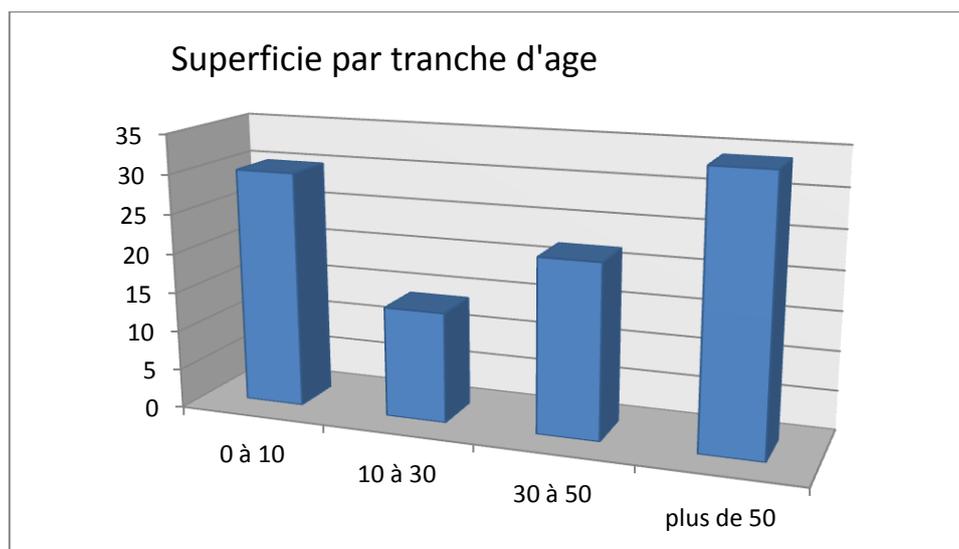


Figure 4. Rapport ITAFV (réhabilitation agrumiculture 1997) Source DSA (2001-2007 ; DRDPA (2010-2013)

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.2.3.1. La production

Concernant la production, il est à signaler que la rentabilité économique d'un verger d'agrumes commence à décroître à partir de l'âge de 50 ans. Durant la période post-réformes (Loi 19/87), les nouvelles plantations d'agrumes ont connues une forte régression. Toutes les nouvelles plantations, dans la tranche d'âge (0-10 ans) ont été réalisées dans le cadre du Projet National du Développement Agricole (PNDA). La production est beaucoup plus marquée dans le centre et l'ouest du pays (Fig.5).

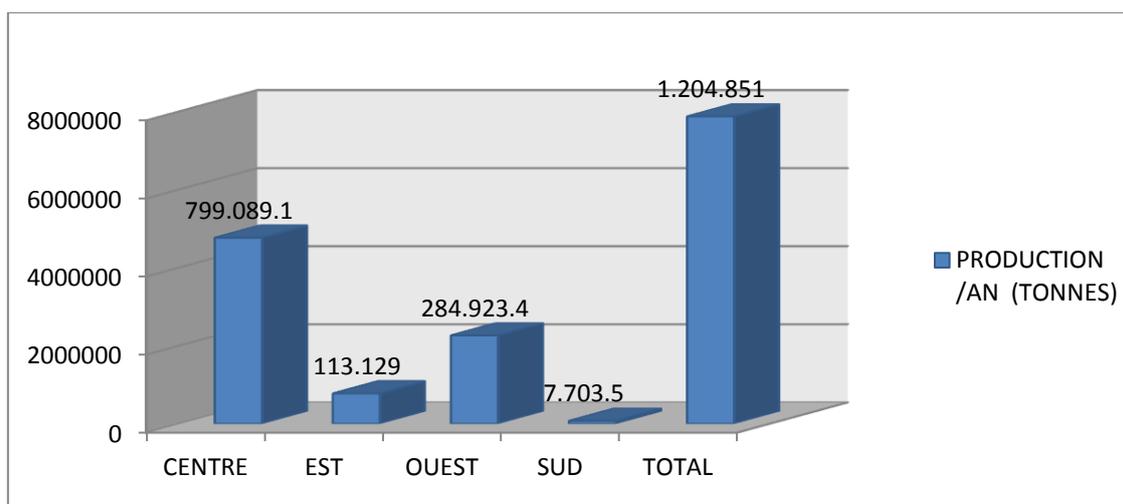


Figure 5. Répartition de la production en Tonnes (Source : DRDPA(2013))

I.2.3.2. Le rendement

Le rendement national par rapport aux surfaces complantées est de l'ordre de 209,6 qx/ha (Tab.2). Ce niveau est faible par rapport au potentiel de production d'une culture d'agrumes conduite aux normes techniques admises. Les rendements dans la plupart des pays agrumicoles méditerranéens sont de 200 à 350 qx/ha. En Algérie, les meilleurs rendements se situent au niveau des wilayas de Mostaganem, Tipaza, Boumerdes, Blida, Relizane, Alger (Innal, 2015).

Tableau 2. Rendement d'agrumes par période

Période	Décennie 1990	Décennie 2000	Année2013
Rendement (qx/ha)	80	137	209,6

Source : Programme de réhabilitation agrumicole (1997) / DRDPA(2013)

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.2.3.3. Contraintes

Plusieurs contraintes constituent des entraves pour le développement de l'agrumiculture en Algérie :

- **Contraintes hydriques** : la culture des agrumes exige un volume d'eau important soit 1200 mm, ainsi sous une pluviométrie de 700 à 800 mm, un apport d'eau supplémentaire de 4000 à 5000m³/ha est à effectuer en période estivale L'insuffisance en apport d'eau d'irrigation influe considérablement sur la production entraînant rapidement la chute de production et le dépérissement des plants. Cette situation caractérise certains périmètres par les importantes pertes d'eau occasionnées due à l'état défectueux des réseaux de distribution. À cela s'ajoute, la réduction du volume d'eau réservé à l'agriculture et à l'agrumiculture en particulier due à l'effet à la sécheresse et au manque d'eau au niveau des périmètres (Hadj Sahraoui, 2007).
- **Les contraintes techniques** : les travaux d'entretien du sol sont généralement mal exécutés et réalisés à des périodes inadéquates. La fertilisation minérale n'est pas exécutée rationnellement; l'absence de couverture sanitaire adéquate et rationnelle a engendré l'apparition de maladies virales ayant causé le dépérissement d'une partie du verger; la vente sur pied des vergers sans aucune restriction réglementaire a aggravé la situation (Saraoui, 2006).
- **Les Contraintes sanitaires** : le problème phytosanitaire qui reste peu connu constitue un danger permanent pour les agrumes, étant donné que les principales maladies transmises par greffage ont été signalées dans diverses régions du pays (Bové, 1995). Actuellement beaucoup de travaux signalent la présence de la tristeza, qui représente un danger pour les agrumes, mais la situation dans tout le pays reste mal connue (Belkahla et al., 2013).

I.2.4. Aperçu sur les maladies transmissibles par greffage des agrumes en Algérie

Les maladies transmises par greffage, ont été signalées dans les vergers d'agrumes il y a plus de 50 ans (Brichet, 1944 ; Lamour, 1950 ; Blondel, 1953 ; Amizet, 1954 ; Frezal, 1957 ; Chapot, 1959) ; d'autres maladies aussi importantes tels que le *mal secco*, le *Phytophthora* et l'*anthracnose*, causées par des champignons ont aussi été rapportées dans divers vergers commerciaux (Bové, 1995).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Récemment, des recherches sur le dépérissement des agrumes dans la région de la Mitidja ont montré des symptômes très associés à la présence d'agents fongiques tels que le *Fusarium solani* et le *Phytophthora* (Yahou-Benrabe, 2015). D'autres travaux plus poussés sur les maladies fongiques montrent une grande diversité de la flore fongique impliquée dans le processus de dépérissement (Benzohra, 2016).

La psorose, maladie cosmopolite, rapportée dans les principaux pays producteurs d'agrumes, sous ses diverses formes, a été signalée par divers auteurs (Briquet, 1944 ; Frezal, 1949 ; Lamour, 1950 ; Amizet, 1954 ; Chapot, 1959). Les arbres malades étaient en général des orangiers doux dépassant 15 ans d'âge, et présentaient des symptômes sévères d'écaillage de l'écorce sur Valencia late à El-Harrach), sur Thompson Navel à Boufarik, et sur clémentine à Chlef (Bové, 1995). Des travaux sur la psorose ont été effectués par bon nombre d'auteurs, dont les travaux de (Larbi, 2016), où les résultats ont révélé un taux d'infection de 12.4% sur les vergers échantillonnés. D'autres travaux entrepris par (Felkai, 2008) et (Belkahla et al., 2016) sur la psorose dans différents vergers agrumicoles dans la région de la Mitidja, ont révélé des taux plus élevés dépassant les 50%. Cette maladie figure parmi les maladies qui sont contrôlées dans le matériel végétal de propagation des agrumes avec la tristeza par le biais de la certification (Roistacher, 1991).

Des symptômes évidents associés à la panachure infectieuse ont été observés, dans la région d'Oran et Boufarik, sur fruits et feuilles de la variété Jaffa orangier doux greffé sur bigaradier (Bové, 1995) et récemment dans les travaux de (Larbi, 2016).

La maladie de la tristeza est ancienne en Algérie (Larbi, 2009), sa présence fut signalée depuis les années 50 (Bové; 1995). Selon des études récentes effectuées dans la zone de la Mitidja, la tristeza est bien installée dans cette zone. Elle a été détectée dans plusieurs zones de la Mitidja (Bayoud, 2001) de l'Université de Blida, dans la même période, dans les résultats de contrôle du matériel végétal de propagation de l'ITAFV (2000/2002), par la suite dans différents travaux de mémoires de fin d'études (Univ. Blida), entre autres, (Alloune, 2011), (El Ferran, 2003), (Bouafia, 2011), (Moudoud, 2012), (Guétouche, 2013), (Merouane, 2013) et (Belkahla et al., 2013).

Le stubborn maladie caractéristique des régions arides et semi arides, a également été signalée par Chapot (1959), récemment citée dans les travaux de Benazzouz (2006) où l'incidence de la maladie a été forte enregistrant des taux d'infection élevés atteignant les 35%. Les maladies causées par des viroïdes ont été rapportées dans de nombreux vergers agrumicoles; c'est ainsi que des symptômes associés à la cachexie xyloporose ont été observés sur mandariniers par

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Frézal, (1957). L'exocortis, maladie affectant surtout les arbres greffés sur oranger trifolié a été rapportée par Bové (1995), à travers l'observation des symptômes sévères d'écaillage de l'écorce sur des clémentiniers greffés sur oranger trifolié.

La maladie du *gummy bark* a été signalée en Algérie; cependant, aucune prospection n'a été effectuée pour confirmer sa présence (Bové, 1995). Par ailleurs d'autres maladies des agrumes, induites par des agents de type viral, ont été signalées en Algérie, et des symptômes sévères associés au "*crisacortis*", au "*concave gum*" et à l'*impietratura*" ont été observés (Bové et Vogel, 1975 ; Catara et Scaramuzzi, 1975; Bové, 1995).

Selon Bové (1995), les symptômes associés à certaines maladies des agrumes, comme le "*satsuma dwarf*", le "*vein enation-woody gall*", le "*tatterleaf*", le "*gumpocket*", le "*leaf curl*", la "*leprosis*", le "*yellow vein*", le "*blight*" et le "*decline*" n'ont jamais été observés dans les vergers Algériens

I.2.5. Histoire et situation actuelle de la tristeza en Algérie

La tristeza a été rapportée en Algérie il y a plus de 50 ans (Frézal, 1957). À cette époque pas de dissémination naturelle connue sauf la propagation par le matériel de multiplication. L'éradication des arbres du citronnier Meyer et les caractéristiques de la souche virale ont diminué le risque de dissémination du virus. (Bové, 1967). Dans le cadre de la mission COFFROR en 1971 (Anonyme, 1971). Ferraj et Omar en (1969) ont suspecté la présence de la maladie sur une trentaine d'arbres. En 1967, Bové dans le cadre d'une mission en Algérie, trouva la tristeza sur certains arbres de la collection variétale (Owari Satsuma, Tangerine) et quelques clémentines de la même collection de la Ferme d'Expérimentation de Boufarik (ITAFV). En 1982, Bové a détecté deux arbres montrant les symptômes de CTV au niveau de la collection variétale de la Ferme d'Expérimentation de Boufarik. Ces arbres ont été confirmés par indexage biologique et détruites.

Des travaux ont rapporté la présence du CTV dans la zone de la Mitidja (Bayoud, 2001) et (Belkahla et al. 2013).

I.2.6. Contrôle et gestion de la maladie de la tristeza en Algérie

En Algérie, la tristeza n'avait toujours pas constitué un problème pour l'agrumiculture algérienne, peut être c'est à cause de la nature de la souche virale et des conditions environnementaux, des vecteurs présents ainsi que les variétés infectées à l'époque (Larbi, 2009). Malheureusement, la situation est devenue délicate depuis sa détection et sa

Chapitre I : Synthèse bibliographique

propagation (Bayoud,2001), (ITAFV, 2002).L'étude de cette maladie est restée trop limitée, on ignore à l'heure actuelle l'incidence et la présence de ce virus sur l'ensemble de l'agrumiculture en Algérie, surtout avec les nouvelles données sur l'apparition du vecteur potentiel *T. citricida* dans le pourtour méditerranéen (Aguilar et al.,1994). sa présence est confirmée au nord du Portugal et l'Espagne (Ilharco et al., 2005).

En Algérie la politique de gestion de cette maladie reste encore à ses débuts. Cette situation n'est guère favorable pour lutter contre cette maladie en cas d'épidémies et d'introduction de souches exotiques avec la probable présence du *T.citricida* en Algérie. L'Algérie étant membre au MNCC (Mediterranean Net Work Citrus Certification), doit suivre le schéma proposé par le Réseau Méditerranéen de Recherche sur la Certification des Citrus (MNCC) du CIHEAM / MAIB pour la prévention et / ou le contrôle de la propagation du virus de la tristeza par ce puceron qui peut disséminer des souches sévère rapidement et endommager tous les arbres greffés sur n'importe quel porte-greffe (Rocha-peña et al. 1995). La proposition du projet de lutte contre la tristeza par le MNCC a pour objectif de prévenir une telle catastrophe, à travers des efforts conjoints de tous les pays de la région pour mettre en œuvre des mesures préventives d'urgence et des mesures de lutte contre le virus et son vecteur (D'Onghia, 2009).

PARTIE 3

ETUDE DE LA

PLANTE-HOTE

Partie 3: étude de la plante hôte

I.3.1 Etude botanique des Citrus

I.3.1.1. Caractères spécifiques des Citrus

Les agrumes sont de petits arbres ou arbustes dont la taille peut varier de 2 à 10 m de haut suivant les espèces. Leurs feuilles sont persistantes à l'exception du *Poncirus* et leur frondaison est généralement dense. Les fleurs sont généralement blanches, de 4 à 5 pétales, selon les espèces la floraison est en grappe ou en fleur isolée. L'époque de floraison dépend des espèces et du climat. Les fruits mûrissent selon les espèces (Benedicte et Bachés, 2011). Les agrumes sont hermaphrodites. Les fleurs ont 3 à 5 sépales, 4 à 8 pétales et habituellement 20 à 40 étamines, plus ou moins soudées entre elles à la base par groupe de 3 (Praloran, 1971).

I.3.1.2. Classification botanique

Le genre *Citrus* regroupe la plupart des espèces d'agrumes cultivés et renferme, suivant les taxonomistes, entre seize (Swingle et Reece, 1967) et cent cinquante-six espèces (Tanaka, 1961). La complexité relative de ces classifications résulte, entre autres, d'une large diversité morphologique et de la compatibilité sexuelle des espèces du genre *Citrus*. Récemment, une nouvelle proposition de taxonomie des agrumes a été suggérée par Mabberley (1997), dans laquelle la notion de fertilité de croisements est mieux respectée que celle des deux précédentes, elle regroupe ainsi six genres des agrumes vrais, *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus* et *Clymenia*, sous une seule dénomination de genre : *Citrus* (Luro et al., 2013) in Jacquemond C. (2013). Les principaux genres cultivés sont :

- **Le genre *Fortunella*** : petits fruits qui se mangent avec la peau (Kumquat), deux variétés sont connues dans ce genre : *Fortunella japonica* (T) Kumquat rond, *Fortunella margarita* (L) Kumquat ovale.
- **Le genre *Poncirus*** : ils sont utilisés comme porte-greffes (fruits non comestibles) *Poncirus trifolia* (L).
- **Le genre *Citrus* Linné** : toutes les autres espèces d'agrumes (16 espèces dont chacune contient plusieurs variétés ou cultivars).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

D'après Swingle et Reece (1967), la Position systématique des agrumes est la suivante :

Règne : Végétal

Embranchement : Spermaphytes

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : Eudicotylédones

Ordre : *Rutales*

Sous-classe : *Rosidées*

Famille : *Rutaceae*

Genres : *Poncirus*, *Fortunella*, *Citrus* (sexuellement compatibles entre eux).

I.3.1.3. Variétés des Citrus : parmi les principales espèces et variétés cultivées en région méditerranéenne (Loussert, 1987). Parmi les principales espèces et variétés d'agrumes cultivés en Algérie, la clémentine et beaucoup de variétés d'agrumes (Fig.6).

- **Les orangiers :** l'orangier doux (*Citrus Sinensis*), est l'espèce du genre Citrus la plus importante, tant par le nombre de variétés qu'elle renferme, que par l'importance de ses productions. Les fruits sont très différents ce qui permet de les classer en quatre groupes : Les oranges blondes Navel
 - Les oranges blondes
 - Les oranges sanguines
 - Les oranges sans acidité
- **Le mandarinier (*Citrus nobilis*),** constitue un groupe d'espèces que l'on peut différencier comme suit :
 - Les mandariniers Satsuma (*Citrus unshiu*)
 - Les mandariniers Communs (*Citrus deliciosa*)
 - Les clémentiniers (*Citrus clémentina*)
 - Et les autres mandariniers (*Citrus reticulata*) et les hybrides.
- **Les citronniers :** les principales variétés cultivées sont : Eureka, Lisbonne, Verna et Femminello ovale
- **Les pomelos :** les principales variétés cultivées en méditerranée sont : Marsh seedless, Duncan, Ruby et Shambar
- **Le Cédratier :** deux principales variétés cultivées sont : le cédrat de Corse à pulpe douce et le cédrat Diamante à pulpe acide.



Différents agrumes (*Citrus*)



Clémentinier
Citrus clementina ou *reticulata*



Mandarinier
Citrus deliciosa



Citronnier *Citrus limon*



Le bigaradier *Citrus aurantium*

Figure 6 : Les agrumes d'Algérie (Source internet-Google)

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.3.1.4. Conditions agro- climatiques de croissance des agrumes

Les agrumes prospèrent bien dans un sol de consistance moyenne, ayant une perméabilité suffisante, car l'excès d'eau provoque la gommose, le pourridié et l'asphyxie racinaire. La précocité est améliorée dans les sols légers. Avec un sol argileux, les racines ont du mal à se développer et les fruits ont une peau plus épaisse. Il faut éviter de planter les agrumes dans une terre où la nappe phréatique est à faible profondeur (2 à 3 mètres), surtout si le verger est situé dans une cuvette. Les sols trop humides sont améliorés par drainage. Une bonne fertilisation est nécessaire. Le potentiel hydrogène, ou pH, a son importance, et l'on estime qu'il devrait se maintenir entre 6 et 7, d'où une légère acidité (De Ravel d'Esclapen, 1984)

I.3.1.5. La croissance des agrumes

Les températures moyennes favorables à la culture des agrumes sont de l'ordre de 10 à 12° C pour l'hiver et 22 à 24° C en été, quant au printemps, les températures inférieures à plus de 12° C peuvent entraver la formation du fruit suite à une mauvaise pollinisation et fécondation due à la faible activité des insectes (Loussert, 1987). Selon Blondel (1959), l'humidité excessive de l'air ambiant et le vent sont deux facteurs non négligeables qui peuvent parfois endommager non seulement la production mais également l'arbre.

Les zones exposées aux gelées et mal ventilées, comme les bas fonds, doivent absolument être évitées. L'hygrométrie est un facteur important à prendre en considération car l'excès d'hygrométrie favorise le développement de maladies fongiques et bactériennes, ce qui implique une surveillance redoublée et des soins constants pour protéger les arbres et leurs fruits (Jacquemond et al. 2013).

I.3.1.6. Les étapes de la vie d'un verger d'agrumes : la vie d'un verger d'agrumes débute à la plantation des scions issus de pépinière. Schématiquement, elle comprend cinq phases correspondant à des périodes plus ou moins longues et d'intérêt très différent pour l'arboriculteur. D'après Loussert (1987), les étapes de la vie d'un verger passent par plusieurs périodes :

- **Période d'élevage en pépinière :** Cette période dure de 12 à 36 mois et se déroule en pépinière. Cette phase est improductive ; néanmoins, les arbres nécessitent des soins attentifs (fumure, irrigation, taille de formation, traitements phytosanitaire, etc.).

Chapitre I : Synthèse bibliographique

- **Phase d'entrée en production:** La mise à fruit devient progressivement plus importante selon les espèces et variétés, mais aussi en rapport avec les techniques mises en œuvre par l'agrumiculteur.
- **Phase de pleine production :** Lorsque le niveau des rendements permet de compenser les frais annuels, le verger est dit "en production". La durée de cette phase ne dépasse guère une vingtaine d'années.
- **Phase de vieillissement et de décrépitude :** Les productions des arbres, dont ils sont en place depuis 30 à 40 ans, vont progressivement diminuer. La pratique de certaines techniques culturales (sous-solage, taille de rajeunissement, fumure, etc.) dans une certaine mesure, peut redonner un "coup de fouet" à la végétation.

I.3.1.7. Les différents porte-greffes cultivés

Les agrumes présentent une très grande diversité de porte-greffe, mais le choix du porte-greffe tient compte du pouvoir d'adaptation de ce dernier aux conditions édaphiques, ainsi que sa résistance aux différentes maladies (*Phytophthora* Tristeza, Psorose, Cachexie, Exocortis) et aux nématodes. Selon Aubert et Vullin (1997), les porte-greffes des agrumes conventionnels sont les suivants :

- ***Citrus aurantium* (Bigaradier) ou orangier amer :** il s'agit du porte-greffe le plus anciennement utilisé en raison de sa résistance à la gommose à *Phytophthora*, sa tolérance à la cachexie -xyloporose et à l'exocortis, mais sensible aux nématodes notamment ceux du type *Tylenchulus semipenetrans* malheureusement il présente des associations très vis du virus de la tristeza.
- ***Poncirus trifoliata* (trifolié):** Ce porte-greffe forme des associations tolérantes à la tristeza, mais il est sensible au blight et à l'exocortis.
- **Citrangle troyer issu du croisement *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* :** Il est sensible aux chlorures et craint les sols secs (Rey,1997).Ce porte-greffe est assez résistant à la gommose à *Phytophthora*. Le citrangle troyer forme des associations tolérantes à la tristeza .
- **Citrangle carrizo** issu du croisement *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata* : Le citrangle carrizo est semblable au citrangle troyer. Aujourd'hui, il est utilisé dans plusieurs pays

Chapitre I : Synthèse bibliographique

agrumicoles de la zone tropicale et subtropicale. Il donne des associations tolérantes à la tristeza.

- **Mandarine Cléopâtre** ou *Citrus reticulata blanco* : Ce porte-greffe est utilisé pour sa tolérance à la cachexie-xyloporose et à l'exocortis. Il donne également des associations tolérantes à la tristeza.
- **Citrus volkameriana** : Ce porte-greffe résiste correctement à la gommose à *Phytophthora*. Il donne des associations tolérantes à la tristeza à l'exocortis, à la cachéxie-xyloporeuse, mais sensible au *blight*.
- **Citrus macrophylla** : Ce porte-greffe peut être recommandé de préférence pour les citronniers et les limetiers à gros fruits, dans les régions indemnes de tristeza. Il est sensible à la tristeza et la cachexie-xyloporose, tolérant à la gommose à *Phytophthora*.
- **Poncirus Flying-dragon** : C'est un porte-greffe appartenant à l'espèce *Poncirus trifoliata*. Il est résistant à la tristeza et à la gommose à *Phytophthora*. Il est sensible à l'exocortis mais tolérant aux nématodes.
- **Les citrumelos** issus du croisement *Citrus paradisi* x *Poncirus trifoliata* : Une longue série d'observation a conduit à préférer les citrumelos comme porte-greffe des pomelos, notamment la sélection Swingle, ou 447, tolérante à la tristeza. Ce porte greffe montre une certaine sensibilité au sel, il peut convenir pour l'orangier et le mandarinier.

PARTIE 4

PROBLEMES

PHYTOSANITAIRES

DES AGRUMES

PARTIE 4: PROBLÈMES PHYTOSANITAIRES DES AGRUMES

I.4.1. LES PRINCIPALES MALADIES TRANSMISSIBLES PAR GREFFAGE DES AGRUMES

Les agrumes sont sujets à de nombreuses maladies causées par des champignons, bactéries, nématodes, virus, agents de type viral et viroïdes (Tab.3) (Whiteside et al. 1988; Roistacher, 1991 ; Bové, 1995). Selon Roistacher (1991) et Bové (1995), les maladies transmises, par greffage sur agrumes, connues depuis plus de 40 ans, sont complexes et diversifiées et sont regroupées comme suit :

- **Maladies virales:** Tristeza (*CTV*), Psorosis (*CPsV*), Citrus Satsuma dwarf (*SDV*), Citrus Vein enation (*CVEV*), Citrus Leprosis (*CLPV*), Variegation (*CVV*), Citrus Leaf blotch (*CLBV*),
- **Maladies à agents non identifiés dites de type viral :** sont représentées par le complexe OLP (*Ock leaf pattern*), incluant le cristacortis, l'impetratura, la convavité gommeuse et le Citrus Chlorotic dwarf (*CCD*)
- **Maladies à Viroïdes et de type viroïde :** Cachexia, Exocortis, Kassala disease, Gummy bark.
- **Maladies à bactéries endogènes (agents prokaryotes limités au phloème) :** la maladie du balais de sorcière (*Witche's broom lime disease*), le Stubborn et la chlorose variegée.
- **Maladies à étiologie inconnue :** Citrus Sudden Death (*CSD*), Blight.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau 3. Principales maladies transmises par greffage des agrumes (Roistacher, 1998)

Groupe	Maladies	Mode de transmission			Pathogène
		Greffage	Vecteur	Trans.mécanique	
Procaryote					
	Greening	+	+	-	<i>Candi. liberobacter sp.</i>
	Stubborn	+	+	-	<i>Spiroplasma citri</i>
	Withces' broom	+	+	-	<i>Cand. Phytoplasma aurantifolia</i>
	Chlorose variéguée				<i>Xylella fastidiosa</i>
Virus					
	Tristeza	+	+	-	Virus (CTV)
	Vein enation	+	+	-	Virus (CVEV)
	Psorose	-	+	+*	Virus (CPsV)
	Ring spot	+	N	+	Virus (CPsV)
	Panachure infectieuse	+	-	+	Virus CVV)
	Satsuma Dwarf		N	+	Virus (SDV)
	Tatter leaf	+	-	+	Virus (CTLV)
		+			
Probable virus					
	Concavité gommeuse	+	-	-	Virus Probable
	Impietratura	+	-	-	Virus Probable
	Cristacortis	+	-	-	Virus ou viroïde Probable
Viroides	Exocortis	+	-	+	Viroïde (CEVd)
	Cachexie	+	-	+	Viroïde (HSVd)
	Gommy bark	+	-	-	Viroïde similaire
Miscellaneous	Blight	+	n	-	Inconnu
	Declino	+	n	-	Inconnu
	Fruta bolita	N	n	-	Inconnu
	Abnormal bud-union	+	-	-	Inconnu

+ : Positif ; - : Négatif ; n : inconnue

* : certaines souches de la psorose ont été transmises mécaniquement

Les maladies des agrumes dues à des agents pathogènes transmissibles par la greffe ont posé un grand défi pour la communauté scientifique par leur grand nombre et leur importance économique. Le défi a pu être levé grâce aux efforts de collaboration internationale, ainsi les études sur l'étiologie des maladies ont révélé des agents pathogènes nouveaux,

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

insoupçonnés : viroïdes, Ophiovirus, Celivirus, Spiroplasma, Libéribactères... En dépit de ces efforts tous les agents pathogènes ne sont tous identifiés, c'est le cas du blight.

Certains agents pathogènes ont été largement caractérisés et partiellement ou complètement séquencés comme les virus de la tristeza, tatterleaf, satsuma dwarf, panachure infectieuse, leaf rugose, le spiroplasma des agrumes et les principaux viroïdes (Lee et Garnsey, 1996). Toutefois, il existe de nombreux agents pathogènes de type viral qui restent à ce jour non classés, comme *l'Algerian navel orange virus* (ANOV) (Garnsey, 1975) et le *Citrus yellow mottle* (Ushiyawa *et al.*, 1984), ainsi que ceux associés à d'autres types de cultures comme le *Potato mottle virus* (PMV) (Holmes, 1959), le *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Thonberry, 1966), *Tobacco necrosis virus* (TNV) (Yot Dauthy *et al.*, 1972) et *l'olive latent virus 1* (OLV 1) (Martelli *et al.*, 1996).

D'autres agents de type viral ont été signalés, à savoir celui associé au Rio grande gummosis en Floride (Hebb et Sonoda, 1992 ; Powel *et al.*, 1998) et le badnavirus des agrumes qui a été isolé caractérisé en Inde (Ahlawat *et al.*, 1996).

Ces dernières années, certaines maladies causées par des phytoplasmes et des bactéries ont fait l'objet d'études particulières, comme par exemple Witches' broom, le Greening et la chlorose variegée (Bové et Duran-Vila 2013).

I.4.2. Les maladies virales

I.4.2.1. La tristeza des agrumes (CTV) Citrus tristeza virus

Le Citrus tristeza virus (CTV) représente le pathogène le plus économiquement important pour les agrumes (Lee et Bar-Joseph, 2000). Le CTV, apparemment originaire d'Asie, a été disséminé dans tous les grands bassins agrumicoles mondiaux par des échanges internationaux de matériel végétal contaminé. De plus, l'introduction de *Toxoptera citricida* Kirkaldy, le puceron brun des agrumes, excellent vecteur de la maladie, a facilité la propagation régionale du virus. Le symptôme le plus foudroyant de la Tristeza : le Quick Decline, mort brutale affectant orangers et mandariniers greffés sur bigaradier. La transmission mécanique par taille est plus rare étant donné la grande dimension du virus. (Leblanc *et al.*, 1998).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.4.2.2. La Psorose écailléeuse (*CPsV*) *Citrus psorosis virus*

Cette maladie originaire d'Orient est maintenant rapportée dans tous les pays agrumicoles (D'Onghia et Lacirignola, 1997). Selon Bové et Duran-Vila (2013), la psorose écailléeuse est l'une des premières maladies ayant été reconnues chez les agrumes par Swingle et Webber (1896). Elle se traduit par un écaillage spectaculaire de l'écorce du tronc et des branches (Fig.7), des orangiers, des mandariniers, des clémentiniers, des tangelos et des pomelos. Il existe deux formes de la psorose, une forme sévère (psorose B) et une forme moins sévère (psorose A). Selon Fawcett (1936), les symptômes foliaires indiquent que la forme A consistent en des éclaircissements en tirets n'affectant que les jeunes feuilles, alors que le cas de la psorose B, des symptômes permanents de type ringspot décrit par Fawcett et Klotz (1948), se manifestent sur les feuilles adultes. Fawcett fut le premier à avoir suggéré l'étiologie virale du virus de la psorose après sa transmission par greffage. Récemment, à la suite des études faites par Derrick et al., 1993 (USA), Milne et al., 1996 (Italie), que le virus est purifié et sa nature précise est reconnue. Le terme « Ophiovirus » a été retenu par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV). La psorose A et la psorose B seraient dues à des souches différentes de virus.



1/ Photo/source: Moreno in Roistacher 2002 2/ Photo/source: Roistacher 2002



3/Photo/source: Roistacher 2002

4/ Photo/source : Klotz in Roistacher 2002

1 et 2 / Craquellement de l'écorce (Psorose) ; **3**/Imprégnation de gomme sur le bois ;

4/ Taches annulaires (ringspot) sur feuille du pamplemoussier

Figure 7. Symptômes de la psorose sur bois et feuille

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.4.2.3. La panachure infectieuse (CVV) Citrus variegation virus (Ilarvirus)

La panachure infectieuse fut la première à être transmise par greffage d'inoculation (Trabut, 1913). Les symptômes affichaient sur les orangiers consistent à des chloroses sévères qui augmentaient d'intensité pendant deux ou trois ans et les arbres finissent par dépérir. Plus tard, en 1950 Koltz suggérait que la chlorose de Trabut pouvait être la « Panachure infectieuse », décrite en 1939 par Fawcett et Koltz en Californie sous le nom américain de « *infectious variegation* » (Bové et Duran-Vila, 2013). La maladie a été signalée particulièrement dans le bassin Méditerranéen, affectant sérieusement le citronnier, le mandarinier (Bové, 1995). Cette maladie se trouve provoquée par deux souches différentes d'un même virus appartenant au genre Ilarvirus (Bové, 1995). Selon les souches virales deux formes sont connues :

- **La frisolée ou Crinckly leaf** : connue pour produire un gaufrage et une déformation du limbe des feuilles.
- **La panachure infectieuse** : cause des déformations considérables du feuillage au niveau la nervure centrale (Fig.8).



Figure 8. Aspect gaufré de feuilles (CVV) Photo/source: Roistacher 2002

I.4.2.4. Le nanisme du Satsuma (SDV) Satsuma dwarf virus (Nepovirus)

Cette maladie est à distribution mondiale. Elle a été observée au début au Japon, puis dans d'autres zones, spécialement en Chine, et en Turquie. Selon Roistacher (2002), la maladie est connue depuis le début du 20^{ième} siècle. Le nanisme de Satsuma est sérologiquement apparenté au virus de la mosaïque du concombre (CMV). Les symptômes au champ sont des

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

rabougrissements et nanisme des arbres, des feuilles en forme de cuillère, avec des fruits déformés (Fig.9 et 10).



Figure 9. Arbres nains (*SDV*) Photo/source: Roistacher 2002



Figure 10. Fruits déformés dus au virus du (*SDV*) Photo/source Roistacher (1976)

I.4.2.5. Tatter leaf (*CTLV*), Citrus tatter leaf virus (Capillovirus)

La maladie du tatter leaf (*CTLV*) des agrumes induite par citrus tatter leaf virus (Fig.11), a été premièrement décrite par Wallace and Drake (1962) comme maladie transmissible causant des marbrures et tattering des marges des feuilles sur le semis de l'indicateur *Citrus excelsa*, d'où le nom « tatter leaf ». Calavan et al. (1963) ont été les premiers à montrer la destruction potentielle de cette maladie sur le porte greffe citrange si on inocule par greffage des tissus infectés par le *CTLV* sur le mandarinier satsuma greffé sur Troyer citrange (Fig.12).

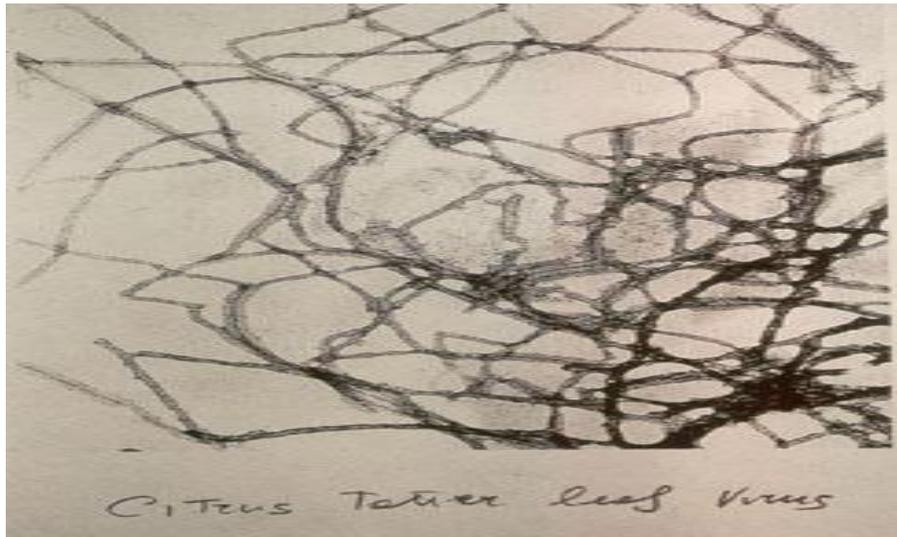


Figure 11. Photo montrant le virus du Tatter leaf

Photo/Source Nishio in Roistacher 2002



Photo/source: Calavan

Specimen Kuchinotsu, Japan

Photo/source:Roistacher 2002

Figure 12. Réaction sévère du mandarinier satsuma greffé sur le trifolié (Tatter leaf)

I.4.3. Les maladies de type viral (Cristacortis, Impietratura, Concave gum/blind pocket)

Elles constituent un seul groupe induisant le symptôme de feuille de chêne (Ock leaf pattern) observé au printemps sur feuilles de jeunes pousses de certaines espèces ou variétés sur le champ ou sous serre. Ces maladies dont l'agent pathogène n'a pas encore été identifié constituent un groupe de maladies dont la détection repose seulement sur l'indexage biologique en utilisant des semis de l'oranger doux ou *Dweet tangor* (Roistacher, 1991).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.4.3.1. Cristacortis

Le cristacortis comme l'impetratura et la concavité gommeuse sont retrouvées en région Méditerranéennes (Algérie, Corse, Italie, Maroc et l'Espagne (Roistacher, 2002 & 1991). Une maladie décrite pour la première fois en Corse sur orangier Tarocco par Vogel et Bové en (1964), caractérisé par du stem-pitting sur le bigaradier (Fig.13) (Bové et Duran-Vila, 2013). La propagation par greffage est le seul mode de transmission reconnu jusqu'ici. Le cristacortis est souvent trouvé sur le bigaradier et rarement sur l'oranger doux et le mandarinier (Roistacher, 1991).

I.4.3.2. Impetratura

L'impetratura est un mot Italien qui signifie pierre, se référant au fruit qui devient dure comme une pierre. Cette maladie est distribuée à travers le monde et est surtout localisée au niveau des régions Méditerranéennes (Europe et Afrique du Nord). Cette maladie a été observée pour la première fois en Italie par Ruggieri en 1961. Elle est caractérisée par la dureté des fruits, leur petite taille et la présence de gomme dans leur albedo (Fig.14) (Bové et Duran-Vila, 2013). Jusqu'à présent le greffage est le seul moyen connu de propagation de l'impetratura (Praloran, 1971). La maladie réduit le rendement en qualité et quantité mais ne cause pas de dépérissement (Moreno, 2000).

I.4.3.3. Concavité gommeuse

Les symptômes de la Concavité gommeuse ont été décrits pour la première fois en 1926 aux Etats-Unis par Fawcett et Lee. La maladie est distribuée à travers le monde mais avec plus de concentration au niveau de la région méditerranéenne. La maladie est caractérisée par de profondes dépressions concaves plus ou moins larges sur tronc et branches (Fig.15). La transmission par greffe sur des plantes de mandarinier ou semis de l'oranger doux, est la seule méthode de détection, (Roistacher, 2002).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

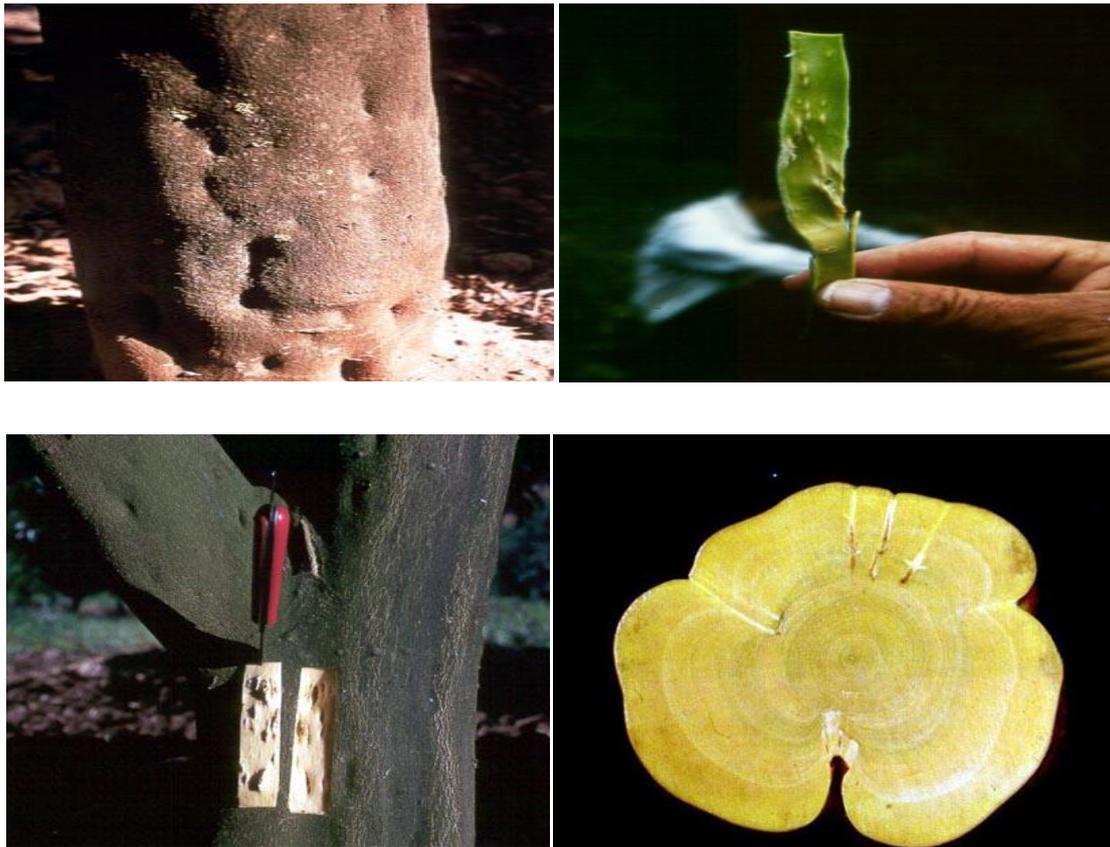


Figure 13. Symptômes de cristacortis sur l'écorce, tronc et invaginations des trous sur bois

Photo/source: Vogel in Roistacher 2002



Figure 14. Impietratura sur l'albedo des fruits et symptôme de feuille de chêne sur feuilles

Photo/source: Roistacher 2002



Imprégnation de gomme sur les branches (Corse) Symptôme de feuille de chêne sur feuilles (Californie).

Figure 15. Symptômes de la concavité gommeuse Photo/source: Roistacher, 2002.

I.4.4. Les viroïdes

I.4.4.1. L'exocortis

Selon Roistacher (2002), la maladie de l'exocortis a été nommée pour la première fois par Fawcett and Klotz en (1948). Benton et al. (1949), ont décrit un sérieux détachement ou craquèlement d'écorce sur le trifolié en Australie et nommé "*Scaly Butt*" (Fig.16). La maladie est probablement présente dans plusieurs pays agrumicoles. Les principales variétés commerciales d'agrumes sont tolérantes à l'agent d'exocortis, certains porte-greffe en revanche sont sensibles et manifestent des symptômes, c'est la cas du *Poncirus trifoliata*, les Citrumelos, la lime Ranpur, la lime douce etc (Roistacher,2002).La technique d'indexation biologique a toujours été utilisée pour la détection de l'exocortis sur le Cedratier Etrog (Bové et Duran-Vila, 2013). Le viroïde peut être transmis mécaniquement par des outils de taille d'arbre en arbre. Les symptômes classiques de l'exocortis sont présentés par un sévère craquèlement d'écorce sur le trifolié ou le Rangpur lime accompagnés par divers degrés de nanisme induit sur de l'arbre (Fig.17).



Figure 16. Symptômes classiques de l'exocortis sur le trifolié en Australie

Photo/source: Roistacher, 2002



Figure 17. Nanisme sévère sur l'oranger Valencia greffé sur trifolié en Californie

Photo/source: Roistacher, 2002

I.4.4.2. La cachexie-xyloporose

La maladie a été décrite en Palestine en 1934 par Reichert et Perlberger comme une nouvelle maladie, la xyloporose, dont les symptômes s'observaient sur la lime douce *Citrus limettioides* utilisée comme porte-greffe. En 1950, des symptômes similaires, mais comprenant en plus la présence de gomme dans l'écorce, étaient décrits en Floride par Childs sous le nom de cachexie 'des kakos grecs (mauvais) et hexis (condition). En outre, Childs démontrait que les symptômes de la cachexie étaient transmissibles par greffage d'inoculation (Bové et Duran-Vila, 2013). La maladie de la cachexie a été prouvée par (Semancik et al.1988), qu'elle est causée par un viroïde. La cachexie est bien distribuée sur les agrumes dans le monde entier car elle est asymptotique sur oranger doux ou pamplemoussier

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

greffé sur le bigradier, le citrange ou le trifolié. Les symptômes de cette maladie concernent des chloroses et nanisme des plants, le mandarinier très sensible à la cachexie, des symptômes de présence de trous sur le bois avec des protubérances sur l'écorce et de la gomme (Fig.18 et 19). La Cachexie est premièrement attribuée aux mandariniers et ses hybrides (Roistacher, 2002).



Figure 18. Symptômes de Cachexia sur le mandarinier Cléopatra au Venezuela

Photo/source: Roistacher,2002



Photo/source: Ochoa in Roistacher 2002

Photo/source: Roistacher, 2002

Figure 19. Symptômes de cachexie sur le bois

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.4.5. Les procaryotes limités au phloème

I.4.5.1. Le stubborn (*St*) *Spiroplasma citri*

La maladie est causée par *Spiroplasma citri*, a été signalée en Californie en 1915 sur les orangiers navel nommée 'Stubborn'. Le nom "acorn disease" a été également donné à cette maladie à cause des fruits déformés en forme de gland (Brown, 1992). (Igwegbe et Calavan (1970) et Le Fleshe et Bové (1970) ont découvert des organismes mycoplasmatiques dans les cellules du phloème de plants d'orangiers doux infectés. Saglio et al. (1973) a nommé le nouvel organisme *Spiroplasma citri*.

La cicadelle de la betterave *Neolaliturus* (Circulifer) *tenellus* et *Scaphytopius nitridus* ont été découverts comme les premiers vecteurs du Stubborn en Californie Ing Ming Lee et al., (1973). La cicadelle *N. haematoceps* est peu être le vecteur primaire dans tous les pays du proche orient (Bové, 1995; Fos et al. 1986; Kersting et al., 1993). La maladie du stubborn peut être retrouvée dans la plupart des pays agrumicoles des régions arides et semi arides.

Sur le terrain, les arbres infectés apparaissent compressés et rabougris. Parfois, seule une partie de l'arbre est affectée et les branches sont compressées avec des feuilles plus petites. Ces symptômes sont également présents dans les jeunes plants de pépinière (Fig.20). Les tiges et les feuilles peuvent montrer une marbrure chlorotique (Fig.21 et 22). Les arbres sont rabougris restent petits et récupèrent rarement. Le fruit ne se colore pas correctement et l'extrémité stylaire conserve sa couleur verte, de petite taille, déformé et peut également montrer une apparence en forme de gland. Les fruits de variétés utilisées pour la semence peuvent avoir des graines plus petites et plus sombres et de couleur violette ou des graines complètement avortés. Ceci est appelé «l'avortement de semences" (Roistacher,2002)(Fig.23)



Figure20. Nanisme induit par le Stubborn

Photo/source: Roistacher 2002



Figure 21. Tiges chlorotiques (Stubborn) Photo/source Lee in Roistacher 2002



Figure 22. Marbrure et mosaïque chlorotique sur feuilles d'orangier doux

Photo/source: Roistacher,2002

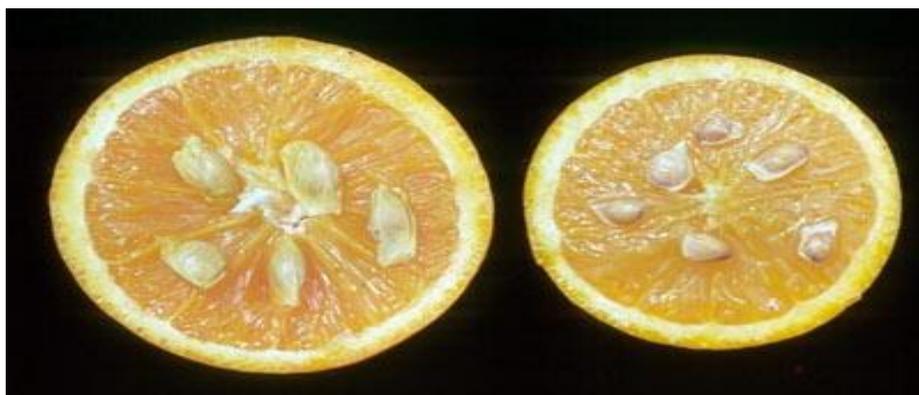


Figure 23.Avortement des semences (orangier Valencia en Californie).

Photo/source: Roistacher, 2002

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

La présence de petites graines de couleur pourpre foncé (à droite) est symptomatique de la maladie. Ces graines sont excellentes pour la culture de *S. citri*. Des semences normale à partir d'un fruit normal est sur la gauche.

I.4.5.2. Le balai de sorcière (WBDL) *Witches' broom disease of lime*

La maladie du *Witches' broom disease of lime* (WBDL) : la maladie est rapportée d'abord par Bové en 1986 au Sultanat d'Oman, mais les observations faites disent que la maladie a été peut-être présente depuis 1981 dans la région « Liwa ». En 1989, la maladie est signalée à l'Émirats Arabes Unis par Garnier et al. (1991). En Iran la maladie a été signalée par Seheli et al. 1997. En 2005, la maladie avait atteint la principale zone de production de limes en Iran, la région au nord de Bandar Abbas (Bové et Duran-Vila, 2013). Les arbres malades montrent des balais de sorcières spectaculaires. La taille des fruits sur les parties asymptomatiques des arbres gravement infectés est réduite par rapport aux fruits d'un arbre sain (Fig.24). La maladie est causée par un phytoplasme (*Phytoplasma aurantifolia*). Le phytoplasme a pu être transmis par Garnier et al. 1991 à la pervenche (*Catharanthus roseus*) par l'intermédiaire de la cuscute. Ce sont les pervenches qui ont fourni du matériel végétal à partir duquel le phytoplasme, non disponible en culture, a pu être caractérisé (Bové et Duran-Vila, 2013).



Figure 24. Symptômes de « Balais de Sorcière » sur tiges et réduction du calibre de fruits

Photo/source: Al-Zadjali in Roistacher 2002

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I.4.5.3. Huanglongbing ou le Greening (HLB) maladie des pousses jeunes

Le Huanglongbing (HLB) ou « maladie des pousses jeunes ». La HLB est une maladie très redoutable et destructrice des agrumes et est due à une bactérie *Candidatus liberobacter* située dans les tubes criblés du phloème des plants atteints. Il existe deux formes de cette maladie, la forme africaine *C. L. africanus* se manifeste à des températures basses, celle de la forme asiatique *C. L. asiaticus* apparaît à des températures élevées. En général les symptômes de la forme asiatique sont plus virulents que ceux de la forme africaine. La bactérie infecte presque tous les hybrides, cultivars et espèces d'agrumes ainsi que certaines espèces proches des agrumes. La bactérie est transmise selon le mode persistant par deux psylles : *Trioza erytreae* qui vit en Afrique et est associé à la forme africaine, et *Diaphorina citri* (Fig.25), qui est plus adaptée aux climats humides et chauds vit en Asie (Roistacher, 2002).

Aujourd'hui, les quatre premiers pays producteurs d'agrumes sont contaminés par la HLB.

Les pays méditerranéens et le proche et Moyen-Orient sont indemnes, mais le vecteur *T. erytreae* est présent à l'Ile de Madère et aux Iles Canaries depuis 1994 et 2002, respectivement. Depuis 1997, *D. citri* a envahi tout le sud-est de l'Iran et en 2008 y était signalée (Bové et Duran-Vila, 2013).



Figure 25. Transmission du Greening par les Psylles de *Diaphorina citri* sur feuilles

Photo/source: Roistacher and Teerapan Tantiwa in Roistacher 2002

PARTIE5

**METHODES DE
DETECTION DES
MALADIES DES
AGRUMES
TRANSMISSIBLES
PAR GREFFAGE**

Partie 5 : méthodes de diagnostic des maladies transmissibles des agrumes par greffage

I.5.1. Evolution du diagnostic des maladies des agrumes transmissibles par greffage

La détection des virus et des agents de type viral des agrumes a connu un progrès important durant la deuxième moitié du vingtième siècle, passant de l'observation visuelle des symptômes au champ et la détection par indexage aux différentes techniques sérologiques et moléculaires au laboratoire. Le diagnostic visuel seul reste insuffisant, quoique l'indexage et la transmission mécanique demeurent indispensables pour exclure la présence d'un pathogène inconnu (Roistacher, 1991; Bové, 1995).

Les techniques sérologiques (ELISA, DTBIA) se sont avérées très importantes dans la détection massale de plusieurs agents phytopathogènes, par ailleurs, la validation et la standardisation des différentes techniques (DAS-ELISA, TAS-ELISA) basées sur des antisérums polyclonaux et des anticorps monoclonaux produits contre divers isolats des virus, ont permis une utilisation de routine de ces techniques sur les virus du CVV (Davino et La Rosa; 1984), SDV (Kulhara *et al.*, 1982), CTV (Bar Joseph *et al.*, 1979) ; et CPsV (D'Onghia *et al.*, 1998b; Alioto *et al.*, 1999 ; Djelouah *et al.*, 2000) et d'autres agents phytopathogènes tels que le *Spiroplasma citri* (St) (Saillard *et al.*, 1980) , CVC et *Xanthomonas campestris* pv *citri* (Lee *et al.*, 1992 ; Garnier *et al.*, 1993).

La technique Direct Tissue Blot Immunoassay (DTBIA), grâce à sa sensibilité, sa rapidité d'exécution et son coût réduit a été largement utilisée dans des détections à grande échelle du CTV (Garnsey *et al.*, 1993 ; Cambra *et al.*, 2000 ; Djelouah *et al.*, 2002) et récemment, du CPsV à travers l'utilisation de fleurs (D'Onghia *et al.*, 2001 ; Djelouah *et al.*, 2002).

Les méthodes moléculaires (Palacio *et al.*, 2000; Minafra *et al.*, 2001) et l'électrophorèse utilisée pour la détection des viroïdes par l'intermédiaire du sPAGE, permettent de diagnostiquer la majeure partie des viroïdes des agrumes recensés à ce jour (Semancik et Duran Vila, 1991).

La PCR, méthode très sensible, s'est avérée efficace pour la détection de maladies des agrumes tels que le Greening, le Witches broom et le Stubborn (Bové, 1995).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

D'autres méthodes moléculaires ont contribué dans la détection et la caractérisation de beaucoup de pathogènes connus sur les agrumes, à savoir la SDS-Immunodiffusion (Bar-Joseph, et al., 1979 ; Brlansky et al., 1984 ; Garnsey et al., 1979), la RFLP (Gillings et al., 1993), SSEM (Brlansky et al., 1984), dot-immunobinding assay (Rocha-Peña et al., 1991a ; Rocha-Pena et al., 1991b), radio-immunosorbent assay (RISA) (Rocha-Peña et al., 1991b), in situ immunofluorescence (ISIF) (Brlansky et al., 1988), in situ immunoassay (ISA) (Lin et al., 2000), Wester blot assay (Guerra et al., 1990 ; Lee et al., 1988 ; Rocha-Peña et Lee, 1991), single strand polymorphism (SSCP) (Rubio et al., 1996), la transcription inverse polymérase chaîne réaction (RT-PCR) (Cevik et al., 1996 ; Hung et al., 2000).

L'hybridation des acides nucléiques utilisée pour la détection et la différenciation de plusieurs pathogènes de plantes en utilisant l'ADNc radioactive ou non-radioactive marqué et des sondes oligonuléotides citées dans la différenciation des souches de quelques virus spécifiques tels que le *CTV* (Rostner et al., 1986).

I.5.2. Evolution dans la détection et la différenciation des souches du virus de la tristeza

Depuis la technique de l'iodure de potassium, le premier essai de détection du *CTV* en plein champ les techniques de diagnostic du *CTV* ont considérablement évolué, notamment dans la sérologie et le moléculaire. Beaucoup de techniques de laboratoires peuvent être utilisées pour la détection du virus de la tristeza d'abord les techniques sérologiques (Bar Joseph et al., 1979 ; Garnsey et al., 1993) et les techniques moléculaires (Mawassi et al., 1995 ; Pappu al., 1993 ; Cevik et al 1996 ; Nolasco et al., 2002), cependant parmi ces techniques aucune ne peut remplacer l'indexage biologique sur l'indicateur universel du virus de la tristeza « La limette Mexicaine.

I.5.2.1. Le test de l'iode de potassium

Selon, Roistacher (1991), le test de l'iode de potassium était le premier essai de détection du *CTV* au niveau du point de greffage entre le bigaradier et le cultivar. La nécrose des cellules du phloème du bigaradier juste au dessus du point de greffage induisant une sorte de gaine empêchant la circulation des sèves et par conséquent causant le dépérissement des arbres. L'accumulation de l'amidon au niveau des cellules du phloème atrophiées du bigaradier était évidencié par la réaction de l'iode affichant une couleur virant vers le noir au dessus du point de greffage. Egalement l'observation des symptômes de l'inverse pitting sur la partie interne

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

de l'écorce du porte-greffe du bigaradier était le premier test sur le terrain pour la détection de la Tristeza sur des arbres en dépérissement.

I.5.2.2. L'indexage biologique

L'indexage biologique constitue un outil nécessaire à la détection et l'extériorisation de symptômes de maladies sur les agrumes. La lime mexicaine indicatrice ligneuse universelle pour la détection du virus de la tristeza (*Citrus aurantifolia*) est encore un outil très puissant pour l'extériorisation des différentes souches du CTV. Les symptômes typiques apparaissent dans la serre dans des conditions relativement fraîches, l'éclaircissement des nervures sur les jeunes feuilles de l'indicateur constitue le premier symptôme à observer par toutes les souches du CTV (Roistacher, 1991). En dehors de la lime mexicaine, le pamplemoussier Duncan, le citronnier Eureka, l'oranger Madame vinous, et le bigaradier peuvent être utilisés pour la détection et la caractérisation biologique des isolats de CTV (Chang-yong, 1996). L'indexage biologique reste le meilleur outil quoiqu'il présente certains inconvénients pour la production des indicateurs issus de semis, dans ce contexte, une nouvelle méthode pour l'indexage biologique basée sur l'utilisation des bourgeons au lieu des graines de l'indicateur ligneux a été mise au point par (D'Onghia et al., 2009) et les résultats peuvent être observés environ 20 jours après inoculation des greffons.

I.5.2.3. La sérologie et le moléculaire

Des méthodes sérologiques telles que ELISA (*Enzyme linked immunoassay*) en microplaques (Garnsey and Cambra, 1991), ou par la technique dite DTBIA (*Direct tissue blot immunoassay*) sur membrane de nitrocellulose (Garnsey et al., 1993), ont été utilisées pour la détection massive du virus de la tristeza (Garnsey et Cambra, 1991). La connaissance récente de la séquence nucléotidique du génome CTV, et des progrès supplémentaires ont été accomplis sur la différenciation des souches de CTV.

- **La technique sérologique (ELISA)** : selon Roistacher (1991), cette technique est un moyen très utilisée pour le monitoring et permet la détection des souches faibles qui ne montrent pas de symptômes clairs avec l'indexage biologique sur la Lime Mexicaine. La période d'échantillonnage reste une étape critique pour la réalisation du test ELISA qui nécessite des températures ne dépassant pas des 25°C pendant le printemps, car les températures qui dépassent les 26°C peuvent masquer la détection de la plupart des souches (Dodds et al. 1987). Cette technique peut détecter toutes les souches, cependant,

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

elle ne permet pas de distinguer entre diverses souches, mais elle est utilisée pour des détections massales permettant d'obtenir des résultats rapides (Bar-joseph et al., 1979). La validation et la standardisation des différentes techniques (DAS ELISA, TAS ELISA), basées sur des antisérums polyclonaux et des anticorps monoclonaux produits contre divers isolats des virus, ont permis une utilisation de routine de ces techniques sur les virus du CTV (Bar Joseph et al., 1979). Le développement d'anticorps monoclonaux (Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990) a été une percée majeure dans le diagnostic du CTV. L'anticorps monoclonal MCA13 est particulièrement utile car il réagit principalement avec la plupart des souches sévères. Cependant, il n'est pas possible de conclure à l'aide du MCA13 si un échantillon contient une souche du bois strié (SP) ou une souche du dépérissement rapide (QD). Par ailleurs, la réaction négative avec le MCA13, ne permet pas de conclure si l'échantillon n'est pas infecté ou infecté par une souche atténuée

- **La technique sérologique (DTBIA) :** La technique *Direct Tissue Blot Immunoassay* (DTBIA), grâce à sa sensibilité, sa rapidité d'exécution et son coût réduit a été largement utilisée dans des détections à grande échelle du CTV (Garnsey *et al.*, 1993 ; Cambra *et al.*, 2000 ; Djelouah *et al.*, 2002). Pour la réalisation de ce test, différents explants peuvent être utilisés, mais des explants de fleurs fermées et ouvertes donnent de meilleurs résultats avec les deux tests sérologiques ELISA et DTBIA (Djelouah et D'Onghia, 2001).
- **Les techniques moléculaires :** beaucoup de méthodes moléculaires ont contribué à la détection et la caractérisation du virus de la tristezza. Les méthodes moléculaires sont basées sur l'amplification des séquences du génome *in vitro* (Gillings et al., 1993). La microscopie électronique est utilisée pour la détection, l'électro microscopie immuno-spécifique est très sensible pour la détection (Garnsey et al., 1980). La microscopie « light » est un outil de performance pour la détection des inclusions au niveau du phloème de plants infectés (Edwardson and Christie 1978 ; Garnsey et al., 1980 ; Brlansky et al., 1988) in (Yokomi, 2009). Des techniques telles que le dsRNA, et le cDNA), sont aujourd'hui connues dans le domaine de diagnostic et d'identifications des souches du virus de la tristezza (Roistacher, 1991). Grâce à la PCR, Gillings et al. (1993) a développé la technique du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (PLFR) pour différencier les souches de CTV, puis, Mawassi *et al.* (1993) et Pappu *et al.* (1993b) ont déterminé les séquences nucléotidiques du gène de la capsid protéique (CP) de diverses souches de CTV. La technique SSCP (*Simple brin de polymorphisme de conformation* (Orita *et al.*, 1989; Yap et McGee, 1994), permet une identification rapide des fragments d'ADN de la même taille, mais avec des variations de séquences. Cette

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

technique peut distinguer les souches de *CTV* (Rubio *et al.* 1996). L'hybridation avec des sondes spécifiques et la transcription reverse RT-PCR ont permis de d'analyser des zones homologues sur des zones discrètes sur le génome viral. La technique de *Real-time RT-PCR* a été largement utilisée dans l'étude sur l'expression du gène et/ou la détection d'acides nucléiques spécifiques présents dans différents types d'échantillons. La haute sensibilité, spécificité et reproductibilité qu'elle procure sont les plus importantes raisons qui justifient son application pour la détection et la comparaison de pathogènes (Bustin, 2000, 2002 ; Freeman *et al.*, 1999 ; Heid *et al.*, 1996 ; Mackay *et al.*, 2002 ; Tan *et al.*, 2004 ; Whelan *et al.*, 2003), la *Real-time RT-PCR* a été développée pour détecter le virus de la tristezza (*CTV*) avec l'ARNm de plante à travers les travaux de Saponari *et al.*, 2008.

PARTIE 6

ETUDE DU VIRUS DE LA TRISTEZA

Partie 6: étude du virus de la tristeza

I.6.1. Identité de la maladie de la tristeza

Le nom de la maladie est « *Citrus tristeza Closterovirus* » *CTV* (acronyme).

Les synonymes de la maladie, Citrus quick decline virus (Fawcett & Wallace, 1946), Citrus seedling yellows virus (Fraser, 1952) Grapefruit Stem pitting virus (Oberholzer et al., 1949), Lime die-back virus, (Hughes & Lister, 1949) .

Les noms communs: Tristeza, seedling yellows, quick decline (English), Tristeza (French, Spanish) (EPPO, 2006).

I.6.2. L'agent causal

I.6.2.1. Place taxonomique du *CTV*

Le *CTV* est membre du genre *Citrivirus* appartenant à la famille des *Closteroviridae*, qui se compose de trois genres (Kitajima et al, 1964; Karasev et al. 1995).

- Le genre *Biclovirus* dont le *LIYs* (Lettuce Infectious Yellows) est membre type) avec deux génomes de 8,1 et 7,1 kb et 9 ORFs
- Le genre *Closterovirus* dont le *BYV* (Beet Yellow Virus) est le membre type avec un génome de 15,4 kb et contenant 9 ORFs.
- Le genre *Citrivirus* dont le *CTV* est le membre type, avec un génome de 19,3 kb et contenant 12 cadres ouverts de lecture (ORFs).

I.6.2.2. Propriétés de la particule virale

Le virus du *CTV* est un *Citrivirus* à structure taxonomique indéfinie (Martelli, 1994). Le virion est constitué de particules filamenteuses et flexibles, non enveloppées (Bar-Joseph et al., 1972). Le *CTV* est le plus grand virus connu chez les plantes, a une taille de (11x 2000) nm, constitué d'un simple brin d'environ 6,5 10⁶Da (Bar-joseph et al., 1989), à sens positif, le génome est formé de 19.200 à 19.300 nucléotides (Karasev et al., 1995), avec 12 cadres de lecture ouverts (ORFs) qui codent à plus de 19 protéines, deux de ces protéines, codent pour la protéine capsidiale ORFs p25 et ORFs p27, 25 kDa et 27 kDa, sont les poids des deux protéine capsidiales, qui couvrent respectivement environ 95 et 5% de la particule, (Sekiya et al, 1991;. Febres et al, 1996), et deux régions terminales non traduites (UTR) en 5 'et 3'

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

(Pappu, 1994) nécessaire pour la réaction de l'ARNg (Satyanarayana *et al.* 1999). L'ORF₁, qui couvre la moitié 5' du génome, est traduite à partir de l'ARNg pour produire des protéines liées à la réplication. L'ORF_{1a} code pour une polyprotéine de 349 kDa qui contient de la papaine-protéase, hélicase-like, et méthyltransférase comme domaines. L'ORF_{1b} code pour une protéine avec l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) domaines (Karasev *et al.*, 1995). Les dix ORF restants, qui sont exprimées par l'ARN sous-génomique (ARNsg) 3' coterminale (Ayllon *et al.*, 2005; Hilf *et al.*, 1995), encode (de 5' à 3') protéines p33, p6, p65, p61, p27, p25, p18, p13, p20, p23 (Karasev, 1995; Pappu, 1994) (Fig.26). En plus de l'ARNg et sgRNAs, le génome du CTV contient souvent des ARN défectueux (D-ARN) qui ont les 5' et 3' régions terminales du ARNg mais manque un segment variable de la région centrale (Mawassi *et al.* 1995; Yang *et al.*, 1997; Ayllón *et al.*, 1999).

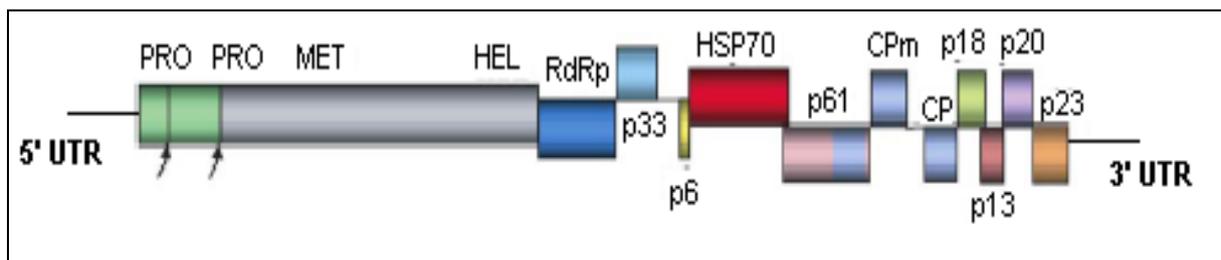


Figure 26. Organisation génomique du virus de la tristezza (Hilf *et al.* 2000)

PRO: protéases papaine, MT: méthyltransférase,
HEL: hélicase, RdRp: ARN polymérase dépendante de l'ARN, p6: protéine hydrophobe,
HSP70 protéines de choc thermique, CPM: protéine mineure d'enveloppe, CP: protéine majeure d'enveloppe, UTR: Régions terminale non traduite.

I.6.2.3. Taxonomie et nomenclature

Selon (Wallace, 1978 ; Roistacher, 1995) la maladie de la tristezza n'a été établie qu'après les observations en Afrique du Sud, malgré qu'elle a été rapportée depuis le début du vingtième siècle dans différentes zones où le bigaradier était utilisé comme porte greffe. Selon Yokomi (2009), la maladie est apparue en 1931 en Argentine et au sud du Brésil 1937 après l'importation du matériel infecté par la tristezza en Afrique du Sud. L'étiologie virale a été probablement décrite quand Meneghini (1946) a montré que l'agent causal est transmis par « *Oriental citrus aphid* (=brown citrus aphid), *Aphis citricida* (=Toxoptera citricida) (*kirkaldy*). Aussitôt après, il a été rapporté en Afrique du Sud et en Californie que le

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

dépérissement rapide était du à l'association du bigaradier. La Maladie « Lime dieback » en Afrique était éventuellement associée au *CTV* (Wallace, 1978, Bar Joseph et al. 1989) .Cette large diversité des souches du virus de la tristeza a été bien établie et les études sur la caractérisation sont actuellement bien avancés et suggèrent que le virus ce la tristeza peut bien être un complexe viral (Yokomi, 2009).

I.6.2.4. Les plantes-hôtes

Selon Yokomi (2009), les hôtes naturels du *CTV* sont toutes les espèces d'agrumes, les hybrides interspécifiques et quelques intergénériques hybrides. La seule plante-hôte naturelle n'appartenant pas aux agrumes est *Passiflora* (Roistacher, 1991). Selon Garnsey et al. (1996c), beaucoup d'hôtes naturelles du *CTV* reste asymptomatiques à l'égard d'infection par différents isolats du virus du *CTV*.

I.6.2.5. Localisation du virus et le comportement des espèces avec le virus de la tristeza

La présence du virus est limitée aux différents tissus du phloème et peut être détectée au niveau des feuilles, tiges fruits et les racines (Yokomi, 2009).

Selon Garnsey et al., (1996c), beaucoup d'espèces hôtes affichent une tolérance à la plus part des isolats du virus de la tristeza par contre d'autres espèces montrent une sensibilité sélective quand elles sont infectés par certaines souches et pas par d'autres, par contre certaines espèces restent sans symptômes apparents. Selon Müller et Garnsey (1984) d'autres espèces hôtes telles *qu'Aegle marmelos (L.) Corr. Serr., Aeglos chevalieri Swingle*, ont été expérimentalement infectées par pucerons, inoculation par greffage ou par transmission mécanique. et également *Passiflora gracillis Jacq., P.incense, et P. incarnata* (Roistacher and Bar-Joseph, 1987).

I.6.3. Histoire et origine de la tristeza

Le nom tristeza, signifie la tristesse en espagnol et portugais (Lee et Rocha-Peña, 1992), a été à l'origine utilisée pour décrire le dépérissement et la mort rapide (déclin rapide) de millions d'arbres greffés sur le porte-greffe bigaradier en Argentine et au Brésil suite à l'introduction et la propagation du *CTV* dans les années 1930.

Le *CTV* est originaire d'Asie (Fig.27), où il existe depuis des siècles, non reconnu, peut-être parce que les variétés d'agrumes couramment cultivées ont été très tolérantes. Les agrumes étaient d'abord introduit en Europe et le Nouveau Monde en tant que semences et depuis le

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

CTV n'est pas transmis par les semences, ces arbres étaient susceptibles d'être exempts de virus. Les majeures maladies préoccupantes pour les agrumes dans le début du 20^{ième} siècle ont été *Phytophthora* à gommose et la pourriture des racines, et par conséquent, les arbres ont été greffés sur le porte-greffe bigaradier résistant et hautement adapté au *Phytophthora*. L'utilisation du bigaradier comme porte-greffe s'est vite propagé pour sa résistance au *Phytophthora* (Fawcett, 1936; Rocha- Peña *et al.*, 1995), son adaptation à de nombreux types de sol, sa résistance au calcaire. En fait, la première catastrophe de la tristeza a été signalée dans les années 1930 en Argentine, où 90% des agrumes ont été plantés sur le bigaradier. La tristeza a été considérée comme une incompatibilité entre le porte-greffe et le greffon, un trouble nutritionnel ou une maladie des racines, jusqu'en 1946, quand Meneghini a pu prouver que la maladie est d'origine virale par transmission par les pucerons dans des conditions expérimentales. Selon Roistacher et Moreno (1991), les isolats de *CTV* avec des caractéristiques biologiques et moléculaires différentes ont été rapportés dans le monde, cependant, il existe des pays qui n'ont pas connu des épidémies graves de la maladie.

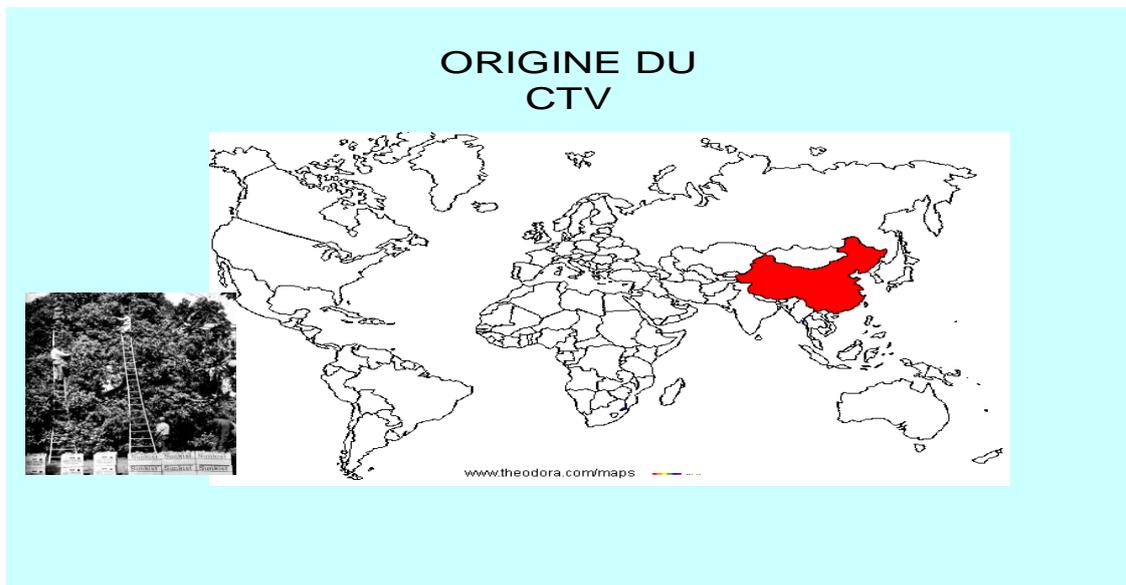


Figure 27. Origine de la tristeza (Roistacher, 2002)

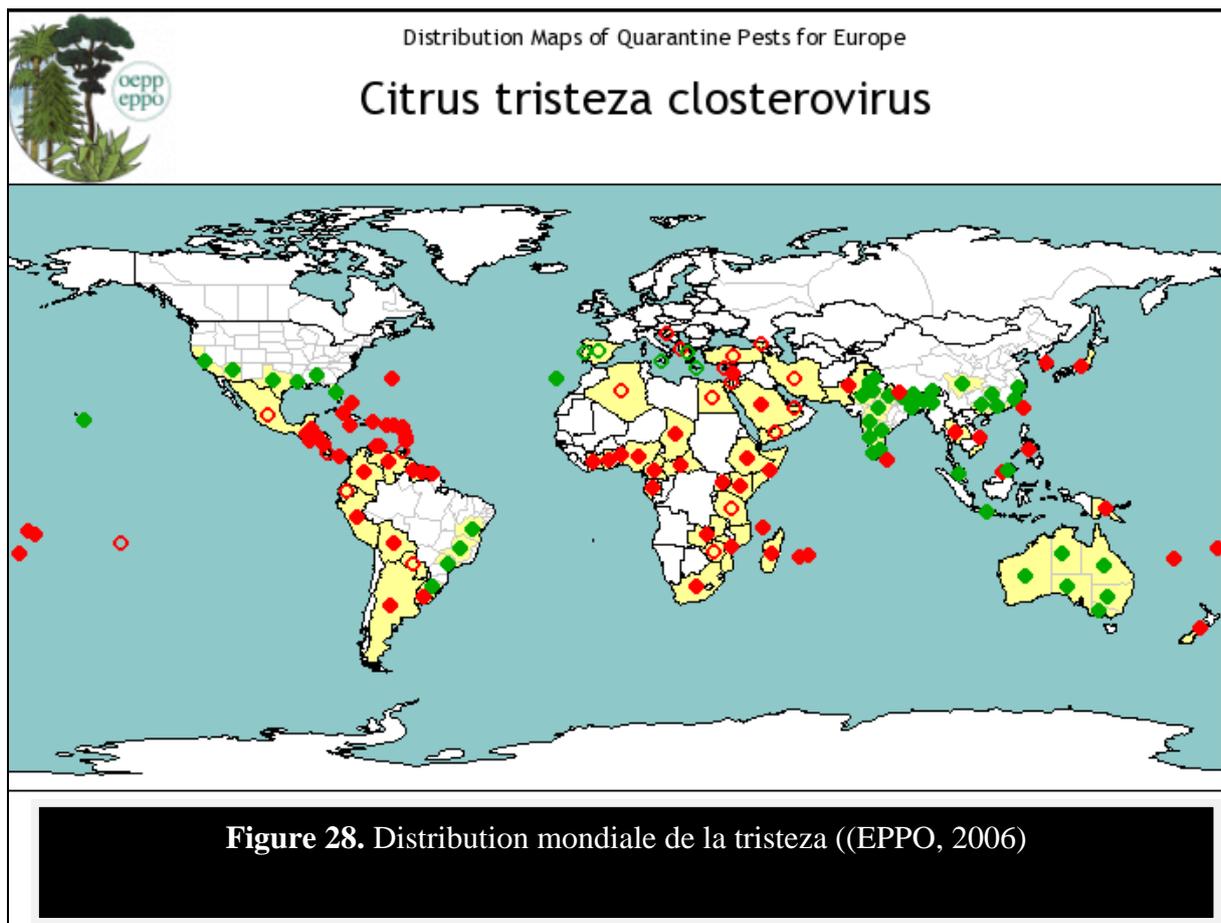
I.6.4. Répartition géographique

Apparemment, la tristeza est originaire d'Asie et existe depuis longtemps sur des cultivars tolérants multipliés par voie végétative (bouturage) et par semis (Yokomi, 2009). De nouvelles zones agrumicoles ont été créées dans d'autres continents à partir des semis et de ce fait elles étaient indemnes du virus de la tristeza. Par la suite le virus a été introduit dans

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

presque tous les pays agrumicoles suite aux échanges de matériel infecté, par conséquent, le CTV est présent dans tous les pays agrumicoles mais avec une incidence variable (Fig. 28).

Il est pratiquement endémique dans la plupart des régions de l'Asie, de l'Afrique du Sud, L'Australie et l'Amérique du Sud; possède une forte incidence dans les États-Unis d'Amérique et l'Espagne et se propage activement dans plusieurs pays d'Amérique centrale (Bové et Vogel, 1981). La tristeza a également été rapportée dans certains pays de la Méditerranée et Moyen-Orient tels que l'Albanie, l'Algérie, l'Égypte, la France, la Grèce, l'Italie, Jordanie, Liban, Libye, Maroc, Palestine, Portugal, Syrie, Tunisie, Turquie (Djelouah et D'Onghia, 2000), sans caractère épidémique et dans certains pays de l'Amérique du Centre et du Sud comme le Belize, le Chili, l'Équateur, le Salvador, le Honduras, le Mexique et le Nicaragua (Cambra et Moreno, 2000). L'Espagne est le premier pays méditerranéen où une propagation de la tristeza a eu lieu, plus précisément en Valence en 1957, depuis lors elle a causé la mort d'environ 15 millions d'arbres (Bové, 1995).



I.6.5. Souches du virus de la tristeza

Il existe plusieurs souches du virus de la tristeza induisant divers symptômes aux champs sur différents cultivars et porte-greffes (Tab.4). Le type de symptômes et leur sévérité varient en fonction de la virulence de la souche du virus, du type d'agrume infecté et de la combinaison variété/porte-greffe et des conditions environnementales. En général les mandariniers sont tolérants et les trifoliés sont beaucoup plus intéressants vis-à-vis de cette tolérance (Bové, 1995 ; Roistacher, 1991). L'oranger doux, le citronnier rugueux et le Rangpur lime sont souvent latents (asymptomatiques), mais peuvent réagir en présence de souches virulentes (Timmer et al., 1999). Les souches faibles ne produisent pas de symptômes apparents sur la plus part des combinaisons des greffons de cultivars et peuvent induire des symptômes faibles sur la lime mexicaine en conditions froides (Skaria et al. 1997). Trois souches sont connues pour la tristeza :

- (CTV-QD) Souches induisant un dépérissement rapide (déclin rapide) des arbres greffés sur bigaradier (orangers, mandariniers et pomelos) (Permar *et al.* 1990 ; Bar-Joseph et al., 2002).
- (CTV-SP) Souches induisant les symptômes du « Stem pitting » sur les cultivars de plusieurs variétés. Selon (Permar et al., 1990) ; (Bar-Joseph et al., 2002), c'est la souche la plus redoutable observée sur limettiers, pomelos et certaines variétés d'orangers.
- (CTV-SY) Certaines souches du CTV inoculées par greffage à des jeunes plants de *semis* de citronnier, de bigaradier ou de pomelo, induisent un fort rabougrissement de ces plants. Il s'agit là de souches sévères (Bové et Duran-Vila, 2013). Ces souches peuvent induire un fort dépérissement et même la mort de l'oranger doux, du pamplemoussier et du mandarinier greffés sur bigaradier (Permar et al., 1990 ; Bar-Joseph et al., 2002).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau 4. Plantes indicatrices des souches de *CTV* (Roberts et al. 2001)

Souches	Indicateurs
CTV-QD	Orangier doux greffé sur bigaradier (orange amère)
CTV-SY	Mexicaine lime, semis orangier amer
CTV-SP sur orange doux	Madam vinous, semis orangier doux
CTV-SP sur grappe fruit	Semis du Duncun grape fruit

QD:quick decline; SY: seedling yellow ; SP:stempitting

I.6.6. Symptômes

Selon Bové et al. (1998), étant un virus limité au phloème, la plupart des symptômes sont associés à une destruction virale des cellules du phloème et leurs fonctions. L'expression des symptômes sur les différentes hôtes des citrus est hautement variable affectée par les conditions environnementales, le cultivar et la virulence de la souche virale. Les mandariniers sont généralement tolérants, l'orangier doux, le bigaradier, Rough lemon et Ranpur lime sont souvent asymptomatiques mais peuvent réagir à certaines souches virulentes. Les espèces sensibles au virus de la tristeza sont le pamplemoussier, le pomelo, quelques cultivars d'oranger doux et quelques hybrides de citrus. Les symptômes sont des éclaircissements de nervures et la chlorose, la forme en cuillère de feuilles, la subérification des nervures, le Stem-pitting et la réduction de calibre des fruits sont les symptômes les plus communs observés sur les espèces sensibles au virus de la tristeza (Eppo, 2006) (Fig.29).

Les symptômes sur le champ affichent des chloroses avec un aspect fané et la réduction du calibre de fruit et le nanisme (Fig.30). Certaines souches provoquent le bois strié (Fig.31) sur certains cultivars de pamplemoussier de lime et d'oranger doux. Le bois strié ne conduit pas à la mort du plant mais affecte l'état général de l'arbre, il devient chétif faible rabougrit et donne des fruits de faible qualité avec des calibres réduits (Marais et al. 1996).

Certaines souches du *CTV* causant le jaunissement du semis (SY) (Fig.32) qui se traduit par une chlorose et un nanisme, cette affection est généralement mais pas souvent, présente avec le dépérissement sur le bigaradier et ou avec les souches du bois strié du *CTV* (OEPP, 2006 ; Yokomi, 2009).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique



Symptôme de forme en cuillère de feuilles



Eclaircissement des nervures



Bois strié sur bois induits par des souches sèvères (SP)



Suberification des nervures causées par souches virulentes (SY)

Figure 29. Symptômes de la tristeza sur feuille et bois (lime mexicaine)

Photo/source: Roistacher, 2002



Dépérissement de plants greffés sur bigaradier vue aérienne.



Souches sèvères du *CTV* Dépérissement rapide



Dépérissement rapide de l'arbre



Réduction du calibre de fruits



Nanisme et dépérissement sur les rangs

Figure 30. Symptômes induits par certaines souches sèvères du *CTV* (Roistacher, 2002)



Figure 31. Bois strié sur mandarinier

Figure 32. Symptôme du jaunissement de semis

Photo/illustration by: (Roistacher, 2002)

I.6.7. Transmission

Le CTV n'est pas transmis par la semence. La transmission naturelle du virus du CTV est premièrement attribuée au matériel végétal de propagation infectée par les pucerons.

Selon Roistacher (1991), le virus est transmis par diverses méthodes de greffage à savoir par bourgeons, sections de feuilles incluant les nervures, et les portions de tiges peuvent être tous utilisées comme inoculum. Le surgreffage est responsable de dissémination de la maladie dans certains pays. La transmission par vecteur constitue la deuxième voie de dissémination de la maladie (Bar-Joseph et al., 1979), par différents pucerons variant dans l'efficacité de transmission (Garnsey and Lee, 1988), cette transmission se fait selon le mode semi persistant (Bar-joseph and Lee 1989). Plusieurs espèces de pucerons peuvent acquérir et transmettre le virus comme il a été prouvé par la détection par ELISA (Cambra et al., 1981). *Toxoptera citricida* est le vecteur potentiel de ce virus (Yokomi et al., 1994). L'espèce *Aphis gossypii*, est le vecteur le plus important dans les pays où le *T.citricida* n'est pas encore présent. *Toxoptera aurantii* et *A. spiraeicola*, sont moins efficaces dans la transmissibilité du virus par rapport à *T.citricida* (Roistacher et Bar-Joseph, 1987).

I.6.8. Epidémiologie

Selon Yokomi (2009) et Roistacher (1991), les premières infections du CTV font suite aux échanges de matériel de propagation infectés. La présence du vecteur potentiel implique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

l'apparition des épidémies de dépérissement. L'épidémiologie est aussi en relation avec le type de cultivar et les méthodes de multiplication, les plus importants facteurs dans l'épidémiologie sont les différents isolats du virus et les vecteurs.

La présence de *T. citricida* augmente la dissémination du virus dans un laps de temps très court (Garnsey et al. 1996b). Il est 6 à 25 fois plus efficace que le puceron du melon. Il est également connu pour transmettre certaines souches de *CTV* qui ne sont pas transmissibles par d'autres espèces. Il n'était pas présent dans les pays de l'OEPP mais après Madère (Franquinho Aguiar *et al.*, 1994), il était détecté récemment au Portugal, et par conséquent, constitue une menace pour le reste de la région méditerranéenne (Ilharco *et al.*, 2005). Le puceron du melon, *A. gossypii*, peut transmettre certains isolats de *CTV* avec haute efficacité, mais en général, est beaucoup moins efficace que *T. citricida*. Il dispose d'une large gamme d'hôtes, mais il préfère les hôtes non-Rutaceae Cucurbitaceae (melon et concombre) et seulement occasionnellement il colonise les agrumes surtout le genre *Citrus* (Hullé et al., 1999).

PARTIE 7
ETUDE DES
VECTEURS DU *CTV*

Partie 7: étude des vecteurs du CTV

I.7.1. Généralités

Les pucerons sont très présents au printemps sur les agrumes ils sont visibles à l'œil nu. Ils sont jaunes, verts, noirs ou encore "farineux". Ils s'attaquent de préférence aux jeunes pousses tendres Ils forment des colonies en grappe le long des tiges, ou se réfugient sur la face inférieure des feuilles. Les symptômes sont le plus souvent des feuilles gaufrées, déformées (par injection de toxines), ou encore enroulées sur elles-mêmes. Tiges et feuilles sont collantes à cause du miellat sécrété par les pucerons, déjection sucrée qui est souvent la cause de l'apparition d'un dépôt noir du à un champignon, la fumagine (Bénédicte et Bachés, 2011). Certains pucerons sont des vecteurs de virus, ce qui provoque des maladies redoutables (Hullé et al., 1999). Quatre espèces aphidiennes sont vectrices de la Tristeza. Ces espèces appartiennent à 2 principaux genres qui sont *Aphis* et *Toxoptera* (Yokomi et, al.1994).

I.7.2. Caractéristiques biologiques

Les espèces de pucerons qui se développent sur une seule espèce végétale sont appelées "monoéciques", tandis que celles qui migrent au cours de leur cycle entre 2 espèces de plantes sont dites "hétéroéciques". La reproduction des pucerons est complexe : il existe des espèces qui ne sont composées toute l'année que de femelles, et qui se reproduisent par parthénogénèse (voie asexuée sans intervention des mâles), et d'autres qui ont au moins une génération avec présence de mâles. Parfois des formes ailées apparaissent, ce qui permet la dissémination des colonies, en particulier quand la densité de population est trop importante. La nuisibilité des pucerons vient principalement de leur capacité à se reproduire rapidement, et en très grand nombre : chaque femelle peut donner naissance de 3 à 10 larves/jour, pendant plusieurs semaines. Dans des conditions favorables, on peut avoir en moyenne une nouvelle génération par semaine, et dans certains cas, la population peut se multiplier jusqu'à 4 à 8 fois en une semaine. Lors de leur développement, les larves muent plusieurs fois : à chaque changement de stade, elles abandonnent une exuvie blanche, qui est visible sur les feuilles. La présence de ces exuvies permet de déceler la présence d'une colonie de pucerons. (Berger, 2013)

I.7.2.1. Le cycle de vie des pucerons

Les pucerons sont des insectes à métamorphose incomplète (hémimétaboles). Dans leur cycle vital il y a des variations diverses d'une espèce à l'autre. Ils se multiplient rapidement, se dispersent à longues distances et transmettent beaucoup de maladies à virus aux plantes. Les pucerons effectuent dans leur cycle de vie une reproduction sexuée et une autre asexuée. Les pucerons effectuent leur cycle sur la face inférieure des feuilles et sur les jeunes rameaux. Plusieurs dizaines de générations annuelles se succèdent et se superposent. La multiplication est essentiellement parthénogénétique, les femelles engendrent de nouvelles générations sans avoir été fécondées (Jacquemond et al., 2013 ; Hullé et al. 1999). Dans leur vie, ils peuvent apparaître sous forme ailée et aptère, selon des conditions environnementales (Hoffman et Frodsham, 1993).

Dans les régions à hivers doux une génération peut se développer dans quelques jours (une semaine environ), on parle d'Anhocyclie (Hullé et al., 1999). Certaines espèces ont un cycle qui se déroule entièrement sur une même plante hôte, d'autres changent de plantes au cours de l'année. Les pucerons qui hivernent sur d'autres plantes hôtes présentent une reproduction asexuée sur l'hôte estival ; pendant l'hiver, ils migrent sur d'autres hôtes ou se reproduisent par voie sexuée (Malais et Ravensberg, 1992).

I.7.2.2. Les pucerons vecteurs de la tristeza

Les agrumes sont colonisés par quatre espèces aphidiennes appartenant à deux genres principaux : *Aphis* et *Toxoptera* (Yokomi, 1994 ; Lee, 2000).

Le genre *Toxoptera* : Deux espèces les plus dommageables et potentielles dans la transmission du CTV sur les agrumes sont représentées par : *T. citricida* Kirkaldy et *T. aurantii* Boyer de Fonscolombe

Le genre *Aphis* : Ce genre comprend deux espèces vectrices du virus de la tristeza représentées par *A. gossypii* Glover et *A. spiraecola* Patch.

I.7.2.3. Morphologie des pucerons vecteurs de la tristeza

Les pucerons constituent un groupe d'insectes extrêmement répandu dans le monde, ils ont colonisé la plupart des angiospermes, ce sont de petits insectes qui se nourrissent de la sève

des plantes (Hullé et al., 1999). Ils sont dotés d'un appareil buccal piqueur-suceur constitué d'une paire de stylet, lèvres supérieures ou labre, lèvres inférieures ou labium et un système salivaire très développé (Rosen, 1977).

I.7.2.4. Classification des pucerons vecteurs du CTV

Rang taxonomique:

Règne: Animal

Phylum: Arthropodes

Classe: Insectes

Ordre : Hémiptères

Sous-ordre: *Sternorrhyncha*

Superfamille: *Aphidoidea*

Famille: *Aphididae* (Blackman et Eastop, 2007)

I.7.3. Etude de *Toxoptera citricida*

I.7.3.1. Identité du puceron

- **Nom scientifique préféré** : *Toxoptera citricida* (Kirkaldy)
- **Synonymes**: *Aphis aeglis Shinji*, *Aphis citricidus* (Kirkaldy), *Aphis citricola van der Goot*, *Aphis nigricans van der Goot*, *Aphis tavaresi Del Guercio*, *Myzus citricidus Kirkaldy*, *Paratoxoptera argentiniensis EE Blanchard*, *Toxoptera aphoides van der Goot*, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) (Yokomi, 2009).
- **Les noms communs** : Brown citrus aphid, Oriental citrus aphid, tropical citrus aphid, Black citrus aphid (en Anglais), Aburamushi (japonnais), Dà ju yá (chinois) (Yokomi, 2009). Le *Toxoptera citricida* est présent en liste A1 list : no.45, EU (EPPO, 2006)

I.7.3.2 Plantes hotes

Selon Yokomi (2009), le puceron *T.citricida* colonise la plus part des agrumes et il s'attaque aux jeunes feuilles, pousses, inflorescences de la plus part des variétés et des porte-greffes. Le puceron peut également survivre sur des espèces n'appartenant pas aux rutacées pendant sa migration (Yokomi et al., 1994).

I.7.3.3. Distribution géographique

Le puceron *T. citricida* se produit principalement dans les régions tropicales humides et est présumé originaire de l'Asie du sud-est (Fig.33). Depuis la moitié du vingtième siècle, le puceron a été trouvé largement distribué, en Asie, l'Inde, la Nouvelle Zélande, l'Australie, les Iles pacifiques (incluant Hawaii), Madagascar, les îles de l'Océan Indien et le sud d'Amérique (Yokomi, 2009).

En 1994, sa présence a été détectée dans la région OEPP, en l'île de Madère en 1994 au Portugal (Aguiar et al. 1994), disséminant des souches sévères. Après dix ans, *T. citricida* a été trouvé au nord du Portugal et d'Espagne, constituant ainsi une grave menace pour les citrus de la méditerranée (Iiharco et al., 2005). Komazaki (1982), suggère que le *T. citricida* s'adapte à différents climats suite à son origine tropicale et subtropicale

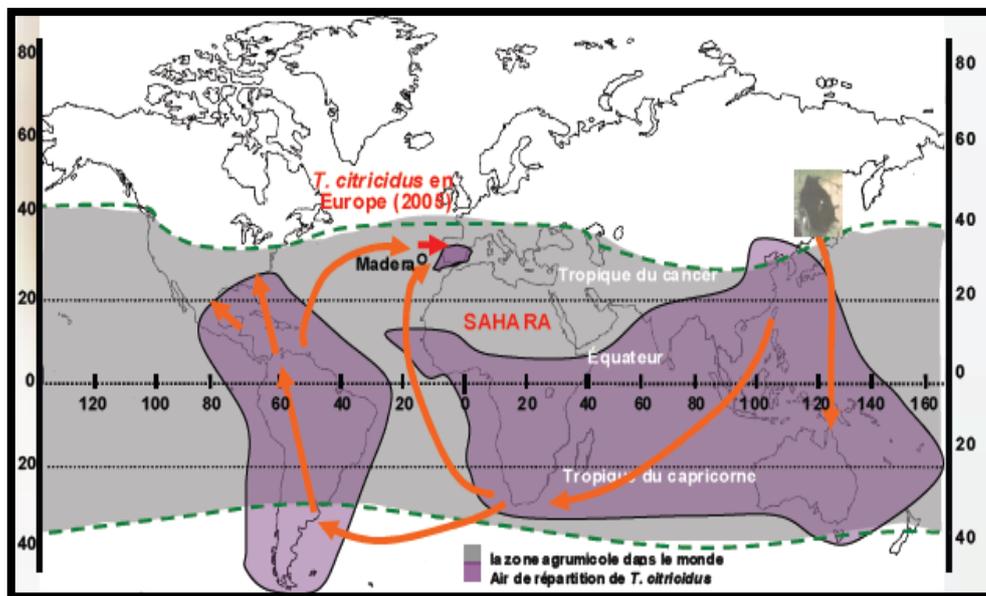


Figure 33. Aire de répartition et mouvement de *T. citricida* dans le monde (Imbert, 2005).

I.7.3.4 Biologie et écologie du puceron

Le puceron *T. citricida* a souvent été confondu avec *T. aurantii* (Boyer de Fonscolombe), le puceron noir des agrumes, de nombreux signalements de ce dernier correspondent à *T. citricida*, mais rarement dans l'autre sens (Fig. 34 a).



Figure 34 (a). *Toxoptera citricida* (pucceron colonisateur des agrumes) (Yokomi, 2005)

Les femelles sont parthénogénétiques et une génération se développe en 6-8 jours. On ne lui connaît pas de reproduction sexuelle fertile. Le potentiel de reproduction dépend plutôt de l'abondance de sève; il est compris entre plus de 47 larves pondues en 12 jours à moins de 22 larves pondues en 20 jours. Les femelles ailées donnent naissance à des nouvelles infestations. De fortes infestations s'observent à la suite de fortes pluies d'été, peut-être à cause de plus grandes quantités de pousses tendres à la disposition de ces pucerons pour l'hiver (Stoetzel, 1994).

I.7.3.5. Morphologie

L'adulte est vigoureux, de taille moyenne, marron rougeâtre à noir (Fig.34b) Les individus ailés peuvent être identifiés, par leur 3^{ième} segment antennaire totalement noir suivi d'un 4ème segment pâle. La nervure médiane des ailes antérieures est normalement ramifiée. Les siphoncules mesurent environ 1/6 de la longueur du corps et sont fortement sculptés, la partie caudale est arrondie en forme de bulbe à son extrémité. Les individus aptères doivent être examinés au microscope pour que les très longs poils fins et droits sur les pattes et sur les côtés du corps soient visibles. Les siphoncules sont similaires à ceux des individus ailés mais plus courts. La partie caudale est épaisse et brutalement arrondie à son extrémité (Stoetzel, 1994).



Figure 34 (b). *Toxoptera citricida* (individu ailé) (Yokomi, 2005)

I.7.3.6. Impact économique

T.citricida est le plus important par son haut potentiel d'efficacité de transmission, a reproduction prolifique, et la dispersion et la dissémination rapide de souches sévères (Yokomi,2009).

I.7.4. Puceron vert *Aphis spiraecola* Patch (1914)

Le puceron vert est encore appelé « puceron vert de l'oranger » ou « puceron des agrumes », espèce polyphage, très répandue dans le monde et en région méditerranéenne. Il hiverne à l'état de femelles parthénogénétiques sur les pousses (Fauque et Thouvene, 1984 ; Whiteside et al. 1988).

I.7.4.1. Description

Selon (Blackman et Eastop, 2000), *A. spiraecola* est un puceron relativement petit dont les individus ailés mesurent 1,2-2,2 mm et aptères 1,2-2,2 mm, avec les plus grandes tailles au printemps. Sa couleur de corps est vert-jaunâtre clair ou vert jaunâtre à vert pomme (Fig.35). Il a une tête brune, principalement des pattes pâles et des antennes, mais des siphoncules et des caudales qui sont de couleur brun foncé à noir. Les ailés ont une tête et un thorax brun foncé et un abdomen vert jaunâtre avec des taches latérales sombres sur chaque segment.

I.7.4.2. Distribution

Le puceron *A. spiraecola* avait probablement son origine en Extrême-Orient. Blackman et Eastop (2000) l'ont classé comme étant présent en Amérique du nord au moins depuis 1907. Tandis que les introductions se sont produites vers la région méditerranéenne vers 1939, l'Afrique en 1961, l'Australie en 1926 et la Nouvelle-Zélande en 1931. L'espèce a maintenant une distribution mondiale dans les régions tempérées et tropicales.

I.7.4.3. Dégâts sur les agrumes

Sur les agrumes, les colonies de pucerons provoquent le frisage, le froissement et la déformation des jeunes feuilles. Les fleurs et les fruits sont également endommagés. Les boutons de fleurs endommagés peuvent ne pas se transformer en fruits (Heinze, 1977).



Figure 35. Puceron vert *Aphis spiraecola* Patch (Yokomi,2005)

I.7.4.4. Cycle évolutif

L'espèce est anholocyclique et se reproduit entièrement parthénogénétiquement sur la majeure partie de sa zone géographique. Dans les régions où l'espèce est holocyclique et produit des morphes sexuels, les principaux hôtes sont *Spiraea* ou *Citrus*. En Amérique du nord et au Brésil, *Spiraea* est l'hôte principal (de Menezes, 1970). Au Japon, *Spiraea* et *Citrus* sont les principaux hôtes enregistrés (Komazaki et al. 1979). *A. spiraecola* a quatre stades larvaires (Blackman et Eastop, 2000).

Dans la région méditerranéenne, les premières petites colonies sur la croissance des agrumes nouveaux se produisent au début de Février. Par temps chaud, les nymphes peuvent se

transformer en adultes en 5-6 jours, entraînant une croissance accrue de population. En moyenne 14 générations peuvent être produites en un an. Une proportion accrue de formes ailées est produite en réponse à la surpopulation et à une détérioration de l'approvisionnement alimentaire. Le puceron ne peut pas se nourrir de feuilles d'agrumes qui deviennent durcies après le premier «flush» de croissance. Lorsque la production de jeunes feuilles s'arrête, les ailées ont commencé à former presque toute la population adulte. Ces individus migrent à la recherche de jeunes hôtes frais. En automne, la formation des fruits enrichit la sève en faveur du puceron et les populations commencent à se reconstituer. En hiver, dans les régions tempérées, peu d'adultes survivent. Cependant, dans les tropiques, où la production de nouvelles pousses est toute l'année, les niveaux de population peuvent rester relativement élevés (Heinze, 1977). Les colonies d'*A. spiraecola* sont habituellement assistées par des fourmis. Dartigues (1991) a décrit comment l'espèce de fourmi *Tapinoma simrothi* a eu une influence positive sur la croissance et la survie d'*A. Spiraecola* sur les agrumes en Algérie.

I.7.5. Puceron noir *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe 1841)

Selon Halbert et al. (2000), cette espèce est appelée aussi le puceron noir des Citrus. C'est une espèce cosmopolite présente partout où on trouve des agrumes, Dans les zones tropicales, l'espèce est polyphage. Sous climat méditerranéen, elle est quasi monophage, n'attaquant guère que les agrumes.

I.7.5.1. Description du ravageur

Toxoptera aurantii a un corps de couleur foncée ce qui le distingue des autres espèces de pucerons des agrumes. Les adultes aptères sont noirs brillant. Les antennes et les pattes sont de couleur alternativement claire et foncée (rosâtre et brunâtre le plus souvent). Le puceron adulte mesure 2 mm de long environ (Yokomi et al. 1994). (Fig.36).

I.7.5.2. Dégâts sur les cultures

Le puceron noir prélève de la sève et affaiblit les organes attaqués. Les dommages se manifestent par l'enroulement et le gaufrage des feuilles qui restent petites et déformées; un avortement des fleurs est également observé. Au printemps, il peut être très nuisible pour les agrumes en provoquant la coulure des fleurs. Le miellat abondant qu'il produit attire les fourmis et entraîne le développement de la fumagine (INRA, 2013).



36. Puceron noir (*Toxoptera aurantii*) (Yokomi, 2005).

I.7.5.3. Cycle évolutif

Une trentaine de générations annuelles se succèdent et se superposent. Chaque femelle donne naissance à 50-70 larves. Les sexués sont inconnus dans la nature. L'anholocyclie est obligatoire. Les colonies se développent de préférence à la face inférieure des feuilles. On peut les trouver aussi sur les pousses et sur les bourgeons à fleurs.. Les basses températures hivernales, et surtout les chaleurs de l'été (supérieures à 30°C) ralentissent le développement des individus. En Italie, le puceron noir passe l'hiver sous forme d'individus en très petit nombre installés sur les bourgeons et sur d'autres plantes qui se trouvent dans les plantations d'agrumes (INRA, 2013).

I.7.6. Puceron du cotonnier *Aphis gossypii* Glover

le puceron commun du melon et du cotonnier est le plus commun dans les zones où *T. citricida* n'est pas présent (Yokomi et al., 1994 ; Yokomi et Garnsey, 1987). Le puceron *A. gossypii* se trouve partout dans le monde, où ses plantes hôtes sont cultivées. Il préfère les climats chauds; dans les zones plus froides, il est souvent un parasite dans les serres. Les dégâts sont causés par l'aspiration de la sève et la production de miellat. L'attraction indirecte

qu'il exerce sur les fourmis constitue un problème supplémentaire. Ce puceron est considéré comme un vecteur parmi d'autres, du virus de la Tristeza des agrumes.

I.7.6.1. Description

Les individus aptères sont de couleur jaunâtre à vert sombre, d'une longueur de 1,2 à 2,2 mm, les antennes sont jaune pâles. Les cornicules sont très foncées et la cauda plus pâle. Les ailés sont de couleur vert à vert foncé, mesurent entre 1,8 à 2,7 mm de long, portant de courtes antennes et un abdomen avec sclérites marginaux, les cornicules sont noirs, plus courtes que chez les aptères, la cauda est pigmentée (Halbert et al. 2000) (Fig.37).



a/ Puceron s'alimentent sur les pousses



b/ pucerons s'alimentant sur les feuilles

Figure 37. Puceron de cotonnier *Aphis gossypii* Glover (Yokomi, 2005).

I.7.6.2. Biologie et cycle de vie

Cette espèce est très polyphage, montre une prédilection pour les Cucurbitacées et les Malvacées (Cotonnier, Mauve, Hibiscus). Ce Puceron est signalé sur les agrumes (Roistacher et al. 1980). Dans les pays tempérés comme l'Italie, ce puceron se reproduit toujours par parthénogenèse. Aux États-Unis, cette espèce peut être holocyclique., Ce puceron peut produire près de soixante générations par an, avec une bonne résistance à la chaleur estivale. Il

a une relation mutuellement bénéfique avec les fourmis (fourmis utilisant le miellat des pucerons qui, en retour, sont protégés de leurs ennemis) (INRA, 2013).

I.7.7. *Myzus persicae* sous-espèce *Myzus persicae nicotianae*

(Blackman, 1987), sous-espèce *Myzus persicae persicae* (Sulzer, 1776)

Le puceron vert du pêcher est une espèce polyphage. *M. persicae* est probablement d'origine asiatique, comme sa plante hôte principale (*Prunus persica*), mais se trouve maintenant partout dans le monde, sauf lorsqu'il ya des températures extrêmes. *M. persicae* est une espèce très variable; les races et les biotypes ont été distingués par leur morphologie, leur couleur, leur biologie, leur préférence pour la plante hôte, leur capacité à transmettre les virus et la résistance aux insecticides (Van Emden et al., 1969).

I.7.7.1. La description

Les femelles parthénogénétiques adultes sans ailes sont ovales, de 1,2 à 2,1 mm de longueur corporelle, de couleur très variable; vert blanchâtre, vert pâle jaune, vert gris, vert moyen, vert foncé, rose ou rouge (Fig.38). Les stades immatures sont assez brillants, mais les adultes le sont moins. Les morphes à ailes ont un patch dorsal central noir sur l'abdomen. Les sujets immatures des femelles ailées sont souvent roses ou rouges, surtout dans les populations d'automne, et les mâles immatures sont jaunâtres (Blackman et Eastop, 1984).



Figure 38. *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) (Hullé et al., 1998).

I.7.7.2. Cycle de vie

Le cycle de vie de *M. persicae* varie selon les conditions climatiques. C'est en général un parasite holocyclique hétéroécique, alternant entre des hôtes d'hiver, des arbres du genre *Prunus* (en général le pêcher), et des hôtes secondaires d'été, avec une reproduction sexuée

pendant une partie du cycle biologique. Il devient anholocyclique sur des hôtes secondaires (d'été) dans de nombreuses régions du monde, là où le pècher est absent et les températures assez douces pour permettre à l'insecte de survivre l'hiver sous forme de stades actifs. Il est généralement anholocyclique dans les zones tropicales et sub-tropicales, avec toutefois des exceptions (Stoetzel, 1994).

I.7.8. Mécanisme de transmission du CTV par les pucerons.

Le virus est transmis selon le mode semi-persistant par plusieurs espèces de pucerons (Fig.39), dont les vecteurs potentiels (Denmark, 1963; Bar-Joseph et al., 1979; Lee et Bar-Joseph, 2000; Brown et al., 1988) sont: *T. citricida*, *A. gossypii*, *A. spiraecola* et *T. aurantii*. Les pucerons acquièrent les particules virales sur l'arbre infecté pendant un temps allant de 5 min jusqu'à quelques heures. La dissémination du virus par le vecteur augmente dans les 24 heures qui suivent l'acquisition. Les pucerons restent virulifères 24 à 48 h après acquisition et passage sur des plants infectés (Leblanc et al., 1998). La transmission des pucerons varie avec les différentes espèces de pucerons (Roistacher et Bar-Joseph, 1987), avec les souches virales (Yokomi et al., 1989), et l'hôte donneur et récepteur (Roistacher, 1991). Le CTV n'est pas transmis par les semences (McClellan, 1957) et ne se transmet pas par pollen ni les nématodes. La transmission mécanique à l'hôte herbacée a été rapportée (Garnsey et al., 1977; Garnsey et Muller, 1988).

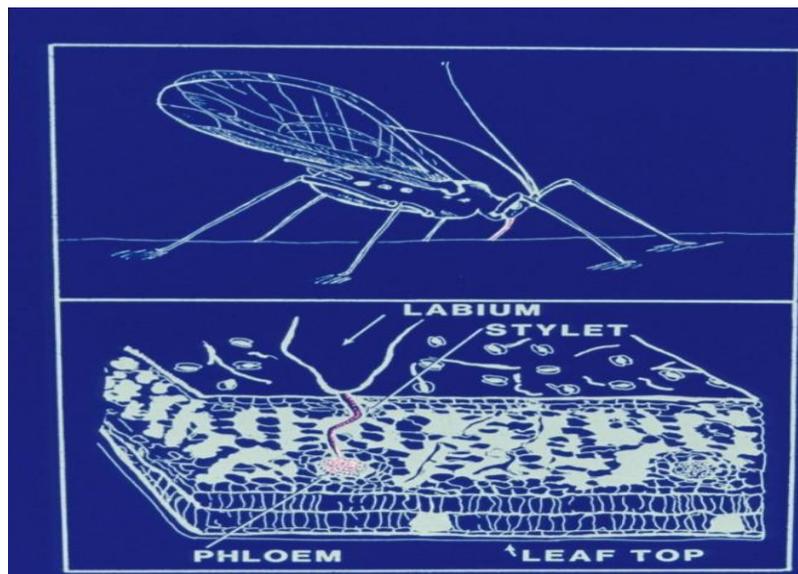


Figure 39. Transmission du CTV par le puceron (Yokomi,2005).

I.7.9. Efficacite de la transmission

Le puceron *T. aurantii* est apparemment efficace dans la transmission de certaines souches (Lee and Bar-Joseph, 2000). Huit espèces (*T. citricida* non inclus), constituent les vecteurs de différentes souches méditerranéennes (Hermoso de Mendoza et al., 1984, 1988). Dans ces régions *A. gossypii* est efficace dans la transmission à 78% . La dissémination dans le temps et dans l'espace de la tristeza dans les pays méditerranéens a été étudiée dans les travaux de plusieurs auteurs (Cambra et al., 1988, 1990 ; Gottwarld et al., 1996, 1997 ; Cambra et al., 2000a). Le puceron du melon, *A. gossypii*, peut transmettre certains isolats de *CTV* avec haute efficacité, mais en général, il est beaucoup moins efficace que *T. citricida* (Bar-Joseph et Lee, 1989), il était responsable des épidémies en Espagne en absence du vecteur potentiel *T. citricida*. Le puceron *A. spiraecola* est une espèce pas assez efficace dans la transmission du virus, mais peut le devenir si les populations deviennent importantes, il peut constituer un problème pour les agrumes. D'autres pucerons *A. craccivora* et *Uroleucon jaceae* ont été décrits en Inde comme vecteurs du *CTV* (Varma et al., 1965).

PARTIE 8

MANAGEMENT ET
LUTTE CONTRE LA
TRISTEZA

Partie 8 : management et lutte contre la tristeza

Dans la gestion et le contrôle de cette maladie et selon (Bar-Joseph et al., 1989) ; Rocha-Peña et al. (1995); Wallace, (1978), plusieurs approches ont été utilisées pour contrôler les dégâts du virus de la tristeza. La stratégie de contrôle du *CTV* n'est pas la même dans toutes les situations (Garnsey et al., 1996 a), elle diffère selon l'incidence et la sévérité des souches dans une région et avec les cultivars et les porte greffe utilisés. Le choix de l'approche dépend de l'incidence du virus du *CTV*. Dans les zones où le *CTV* est rare et la dissémination naturelle est limitée, l'accent a été mis sur l'introduction du virus. Les programmes de quarantaine et de certification sont utilisés pour empêcher l'introduction et la propagation de plantes infectées dans de nouveaux domaines. Des programmes d'éradication ont également été utilisés, où les niveaux d'infection sont faibles ou localisés pour supprimer la dissémination naturelle du *CTV*. Dans les zones où le *CTV* est endémique et les risques d'infection naturelle sont élevés, l'approche est de contrôler les pertes de production

8.1. Prévention des dégâts ou l'incidence de la maladie est faible

- **L'exclusion et la quarantaine :** les mesures préventives sont nécessaires par l'application de mesures strictes de quarantaine dans les pays où la tristeza est absente pour éviter son introduction, ou présente d'une manière localisée sous forme de foyers faciles à contrôler, la quarantaine peut également stopper l'introduction de souches sévères dans les zones caractérisées par la présence de souches faibles (Navarro et al, 1984;. Frison et Taher, 1991). Les pays producteurs d'agrumes doivent interdire l'importation de plantes hôtes des pays où le *CTV* est présent, des programmes de certification officiels virus-free sont recommandés pour les pays où le *CTV* n'est pas présent. Les sources d'inoculum en provenance de pays infectés tels que les pédoncules et feuilles sur fruits doivent être absents et ces derniers doivent être lavés et cirés, ou avoir subi des fumigations (EPPO, 1990).
- **Les programmes de certification :** les programmes de certification peuvent être plus efficaces dans les zones ayant une faible incidence de la maladie et dans les régions où le vecteur efficace *T. citicida* est absent. Le contrôle adéquat de multiplication des

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

agrumes reste le seul outil important pour éviter une dissémination rapide et des épidémies du virus de la tristeza (Navarro ,1993) in (yokomi, 2009).

- **Eradication et répression:** l'éradication de foyers isolés dans les zones où le CTV est absent et la présence de vecteurs est faible peut être maîtrisée par la suppression des arbres malades et l'augmentation de la vigilance. Selon Yokomi (2009), l'éradication devient difficile et rarement efficace avec la dissémination de la maladie en présence de conditions favorables pour les vecteurs.
- **Les porte-greffes résistants ou tolérants:** des combinaisons tolérantes au CTV, sont considérées comme l'association entre porte-greffe et greffon, et non pas le porte greffe seul. La lutte contre la tristeza a donc consisté, et consiste toujours, à remplacer le bigaradier par des porte-greffes compatibles avec le CTV. De nombreuses recherches ont été effectuées partout dans le monde pour trouver de tels porte-greffe. Parmi ceux-ci, *P. trifoliata*, mérite une mention particulière. Il est plus que tolérant, il est résistant au CTV. Le virus ne peut pas s'y répliquer. C'est l'une des très rares espèces d'agrumes résistantes au CTV (Bové et Duran-Vila, 2013). Selon Yokomi (2009), nombreux sont les porte-greffes tolérants ou résistants au dépérissement induit par le virus de la tristeza et l'utilisation de ces porte-greffes est très essentielle pour maintenir une production des agrumes dans plusieurs zones. Actuellement, une gamme de porte greffe tels que (le mandarinier Cléopâtre, rough lemon, Rangpur lime, oranger trifolié, Citrange carrizo, Citrange troyer et le Citrumelo swingle), s'avère intéressante pour minimiser les dégâts de la tristeza. Cependant l'inconvénient réside dans la sensibilité de ces porte-greffe à d'autres maladies, par conséquent, le choix des porte-greffe dépend des caractéristiques de la zone agrumicole (Climat et sol) ainsi que le cultivar, chaque pays doit étudier le comportement de plusieurs porte-greffe vis-à-vis des conditions pédologiques (PH, salinité, calcaire etc.) et en fonction de l'association avec différents cultivars pour en déduire lesquels sont intéressants pour sauver les agrumes du virus de la tristeza qui demeure le pathogène le plus redoutable pour cette espèce (Loussert, 1987).
- **La tolérance des cultivars (greffons) :** la tristeza est une maladie d'association car Citrus greffés sur le porte-greffe bigaradier, sauf pour le cas du citronnier greffé sur bigaradier qui est une association tolérante à la maladie. Le bigaradier seul est tolérant (Loussert, 1987). La plus part des mandariniers sont tolérants vis-à-vis du virus de la

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

tristeza. En Asie, où le *CTV* est présent sous des formes sévères, l'utilisation du mandarinier est dominante à cause de sa tolérance au Stempitting. Tous les pamplemoussiers sont sensibles à la souche grape fruit stempitting, les orangiers doux varient vis-à-vis de la sensibilité à la souche stempitting. L'orangier Pera du Brésil est très sensible tandis que Valencia est l'un des plus tolérants cultivars, le rough lemon et l'orangier doux sont parmi les espèces tolérantes au virus de la tristeza, d'autres espèces sont sensibles à certaines souches et pas à d'autres (Yokomi, 2009).

8.2. Contrôle de la maladie où le *CTV* est très répandue

Dans de nombreuses régions d'agrumes où le *CTV* est déjà endémique ou trop répandue pour supprimer l'infection, en particulier lorsque le puceron brun est endémique, les arbres sont généralement greffés sur des porte-greffes tolérants et la principale préoccupation est de prévenir ou de réduire les pertes causées par des souches sévères du bois strié. L'accent principal sera mis sur utilisation de cultivars tolérants ou résistants, une protection croisée de souche bénigne et la gestion de la maladie.

- **La protection croisée :** selon Gonsalves et Garnsey (1989), la protection croisée est basée sur l'utilisation de souches atténuées qui protègent l'arbre contre l'infection ou l'apparition de symptômes de souches plus virulentes. Dans les zones endémiques, où sévit la maladie en présence de souches virulentes avec la présence du puceron brun *T. citricida*, c'est la stratégie pour le contrôle du stem pitting. Selon Roistacher et Dotts (1993), la protection est souvent efficace seulement entre certaines souches et beaucoup de souches atténuées montrent une moindre protection. Une protection croisée à long terme avec des souches de dépérissement d'arbres greffés sur le bigaradier n'a pas été démontrée (Yokomi et al. 1991). Les observations sur le champ indiquent que la protection croisée n'est généralement pas permanente et que l'effet protecteur peut s'atténuer avec le temps, spécialement quand la pression de la souche virulente est importante. Du point de vue commercial, la protection croisée, est un moyen de prolonger la productivité des plantations confrontés aux problèmes du stem pitting, mais ne garanti pas la résolution des problèmes du stempitting (Rocha-Peña et al, 1995).
- **Le contrôle des vecteurs :** depuis que la propagation naturelle du *CTV* est attribuée aux pucerons, la lutte contre les pucerons est parfois suggérée comme une approche

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

pour réduire les problèmes du CTV. La suppression de puceron vecteur n'a pas été pratiquée dans les agrumes commerciaux, et n'est pas considéré comme une stratégie efficace à l'exception, peut-être, dans une pépinière d'agrumes. La lutte efficace contre les pucerons peut être obtenue si l'organisme nuisible cible, en particulier, les formes (aillées) sont maintenues à des niveaux bas. Cela est difficile lorsque le puceron du melon et le puceron *spiraecola* sont les principaux vecteurs de CTV parce que les deux pucerons ont une large gamme d'hôtes et leur migration peut provenir des autres hôtes. Le contrôle de *T. citricida* peut être relativement facile à réaliser car il se limite aux agrumes (Garnsey et al. 1998).

- **La gestion intégrée de contrôle de la tristeza:** selon Garnsey et al., (1996_a), l'incidence et la dissémination du CTV est un procédé complexe qui fait intervenir le plant, le pathogène et le vecteur. Une stratégie de gestion de cette maladie doit faire intervenir et incorporer plusieurs éléments, si possible, basés sur les connaissances fondamentales de la maladie. Yokomi (2005), propose l'utilisation de porte greffe tolérant ou résistant au virus de la tristeza (Troyer, Carrizo, Swingle, Flying Dragon). L'établissement de la certification des pépinières pour la production de plants certifiés et la prospection et l'éradication des plants positifs au CTV surtout si l'incidence de la maladie est basse et que le vecteur potentiel n'est pas encore présent. En revanche, la protection croisée est établie quand le vecteur potentiel *T. citricida* est abondant, le CTV est endémique et les souches sont sévères (i.e., stem pitting) et que les souches atténuées ou faibles ont été identifiées ou bien développées.

CHAPITRE II
MATERIELS ET
METHODES

Chapitre II : Matériels et méthodes

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1. Sources du virus

Les plantes sources de virus proviennent des échantillons de différentes prospections effectuées, sur les agrumes durant les campagnes agrumicoles 2009-2010, 2010-2011 et 2011-2012, et ce sur différents vergers agrumicoles privés et étatiques, jeunes et vieilles plantations.

II.1.1. Origine du matériel utilisé pour l'indexage biologique

Le matériel végétal utilisé incluait des plants infectés par le virus de la tristeza provenant de deux sites différents (Boufarik2 et Guerouaw). Dans ce contexte, cinq variétés appartenant à deux espèces (oranger et mandarinier), récoltés dans deux sites différents ont été inclus dans cette caractérisation (Tab.5).

Tableau 5. Sources positives au CTV utilisées en indexage biologique

Espèces	Origine	Echantillons (No)
Oranger Navel	BFK2/ parc à bois	08
Oranger Jaffa	BFK2/ parc à bois	06
Mandarinier Tarocco	BFK2 parc à bois	10
Mandarinier Satsuma	BFK2/ parc à bois	07
Clémentinier	G.Blida/ verger privé	08
Total		39

BFK: Boufarik; G: Gerouaw Blida

II.1.2. Matériel végétal utilisé pour la transmission par les pucerons

II.1.2.1. Matériel végétal herbacé : Les plantules de pois variété Kelvedon ont été élevées sous serre du laboratoire de virologie du département d'agronomie de l'Université de Blida. Les semences de pois sont semées à raison de 3 grains par alvéole contenant la tourbe, des arrosages réguliers et des désherbages manuels sont effectués régulièrement. Ces plantules ont

Chapitre II : Matériels et méthodes

été utilisées comme plantes indicatrices pour la transmission du virus par des pucerons-vecteurs récoltés lors des différentes prospections.

II.1.2.2. Matériel végétal ligneux : des plants de bigaradier et de la lime mexicaine issus de semis maintenus dans la serre de virologie (Univ.Blida), ont fait l'objet d'étude biologique du virus, les deux espèces ont reçu des irrigations et des traitements contre les pucerons (aphicide).

II.2. Sites prospectées

Les prospections ont eu lieu dans la région de la Mitidja qui constitue la plus importante aire de distribution des agrumes en Algérie. Plusieurs exploitations privées et étatiques ont fait l'objet de nos prospections, contrôle et échantillonnage (Fig.40).



Figure 40: Situation géographique de la Mitidja (Google earth, 2016)

Les prospections ont été menées sur des vergers choisis, d'abord par rapport, à leur âge de plantation (de 7 à plus de 70 ans), leur vocation, leur entretien ainsi que les différentes variétés d'agrumes les constituant, et également, par la présence de multiples symptômes associés à la maladie de la Tristeza.

Les sites prospectés ont concerné : La station expérimentale du Département des biotechnologies végétales ex: Agronomie de l'Université de Blida₁, EAC Tayeb Slimane 4 fermes de Guerouaou (Blida), EURL Reguiegue (Boufarik₂), Exploitation de Bouinan

Chapitre II : Matériels et méthodes

(Boufarik1), Exploitation de Chebli, l'exploitation de Belhadeb Brahim (Mouzaia), ITAFV (Birtouta Alger), et enfin l'EURL Semiani de Hajout (Tipaza).

- **Station Expérimentale du Département de Biotechnologies végétales ex: Agronomie (Fig.41) :** la superficie de ce verger d'agrumes est de 0,25 ha comportant des orangiers de la variété Thomson (119 plants). Les plants sont âgés de 9 ans, greffés sur le bigaradier.



Figure 41. Image satellite de la station expérimentale du Département de biotechnologie ex : Agronomie de l'Université de Blida₁ (Google earth, 2010)

- **EAC Tayeb Slimane 4 fermes de Guerouaou (Blida) :** cette plantation présente une diversité arboricole intéressante d'une superficie totale de 11 ha, dont 6 ha d'agrumes. Les plants d'agrumes âgés de 7 ans, greffés sur bigaradier sont composés de deux variétés (Thomson et Washington navel) (Fig.42)..



Figure 42. Image satellite de l'EAC Tayeb Slimane 04 fermes de Guerouaou (Blida) (Google earth, 2010)

Chapitre II : Matériels et méthodes

- **Exploitation de Bouinan (Boufarik₁)** : cette exploitation est représentée par une plantation datant de la période coloniale, les plants sont greffés sur bigaradier, composée d'un verger de 5 hectares, composé de plusieurs variétés de Mandarinier avec quelques plants de citronniers et d'oranger variété Thomson (Fig.43).

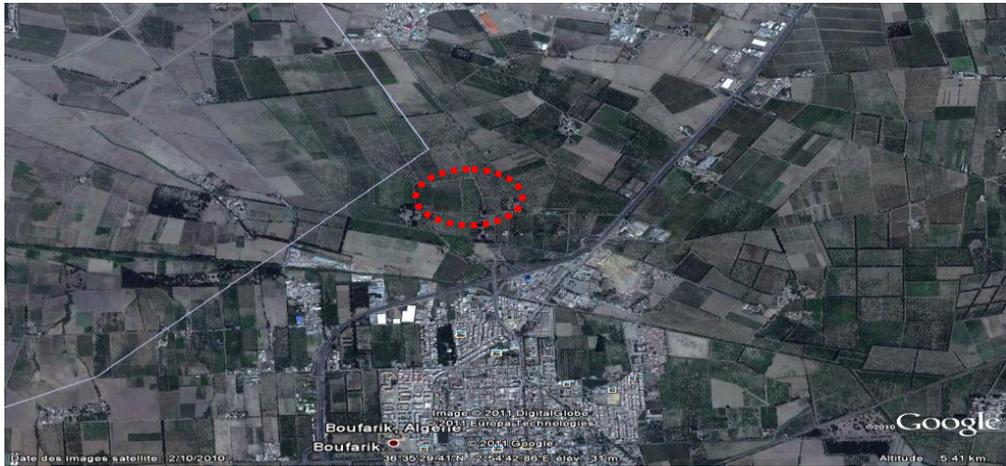


Figure 43. Image satellite de l'Exploitation Bouinan (Boufarik₁) (Googleearth, 2010)

- **Exploitation : E.U.R.L Regueyegue parc à bois (Boufarik₂)** : le site est situé dans la région de Boufarik, et est constitué des superficies et variétés suivantes : 3 ha de Pamplemousse, 5 ha de Tarocco, 1 ha de Satsuma, 3 ha de Salustiana. tous les arbres ont été plantés en 1988 (Fig.44).



Figure 44. Image satellite E.U.R.L Regueyegue parc à bois (Boufarik 02) (Google earth, 2010)

- **Exploitation de Chebli** : c'est une plantation agrumicole de 7 ha constituée de variétés de Clémentiniers. Au niveau de cette plantation datant de la période coloniale, tous les plants sont greffés sur le bigaradier (Fig.45).

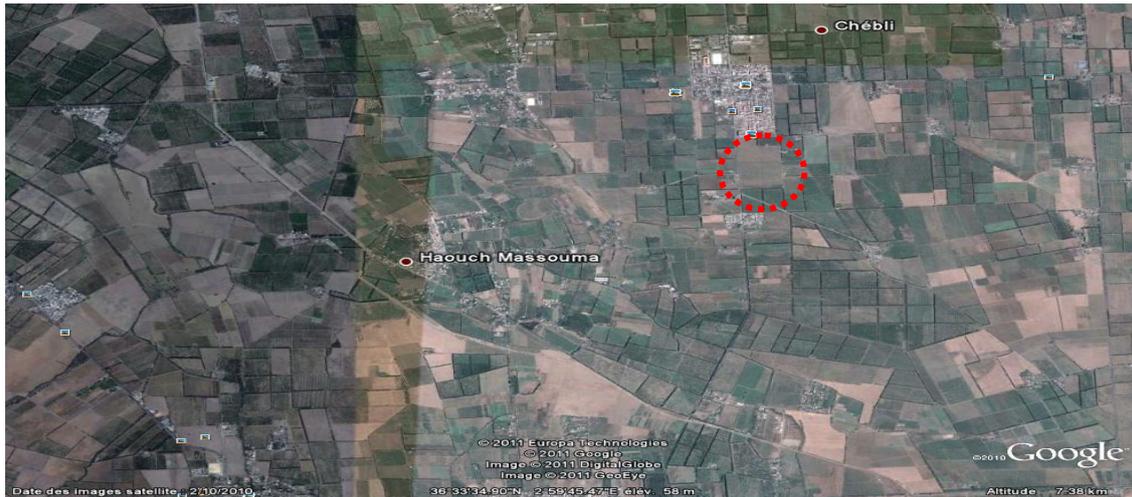


Figure 45. Image satellite de l'Exploitation de Chebli (Google earth, 2010)

- **Exploitation de Mouzaia :** le verger est localisé à la sortie de la Chiffa (Blida), et est constitué de 4 ha d'orangeiers variété Thomson et Portugaise et de 5 ha variété Washington navel. La majorité des arbres sont âgés et greffés sur du bigaradier (Fig.46).

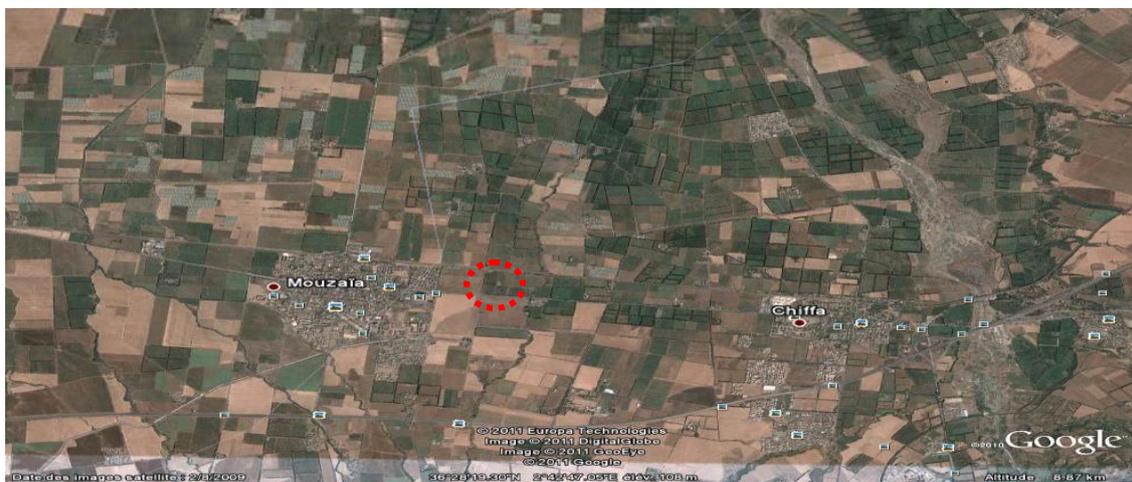


Figure 46. Image satellite de l'Exploitation de Mouzaia (Google earth, 2010)

Chapitre II : Matériels et méthodes

- **Exploitation EURL Semiani de Hadjout** : cette plantation est située à l'est de Hadjout (Tipaza). Le verger est constitué de différentes variétés d'agrumes, plantés en 2001 sur une superficie totale de 22 ha, réparti comme suit : Clémentiniers 1500 plants (5,45 ha), Citronniers 1500 plants (5,45 ha), Double fine de 416 plants (1,80 ha), Valencia late 2136 plants (7 ha) et Washington navel 634 plants (2,3ha). Toutes les variétés sont greffées sur le bigaradier (Fig.47).



Figure 47. Image satellite de l'Exploitation de l'EURL Semiani de Hadjout (Google earth, 2010)

- **ITAFV SIEGE Birtouta Alger** : cette station est constituée de matériel de multiplication « parc à bois » d'agrumes conduit sous serre (Fig.48).



Figure 48. Image satellite de l'ITAFV siège Birtouta Alger (Google MAPS, 2016)

II.3. Méthodes d'étude

II.3.1. Protocole d'échantillonnage

II.3.1.1. Echantillonnage de fleurs : Le prélèvement des échantillons a été effectué selon le protocole d'échantillonnage de Gottwald and Hughes (2000). Selon cette méthode d'échantillonnage, 25% des arbres au niveau d'un bloc sont systématiquement échantillonnés, incluant les plants extériorisant des symptômes pouvant être associés à ceux de la tristeza (Fig.49).

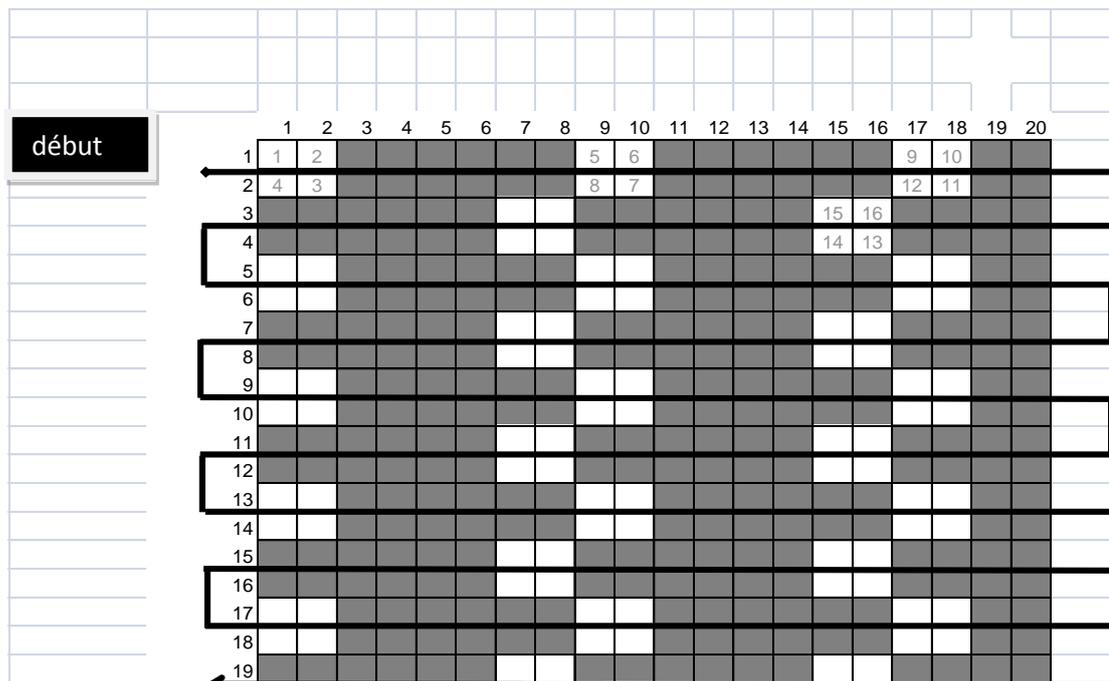


Figure 49. Schéma représentatif du protocole du monitoring (Gottwald et Hughes, 2000)

Les observations au niveau des vergers d'agrumes ont été effectuées pendant la période de printemps et automne, caractérisée par la forte montée de la sève à des températures allant de 22 à 30°C et permettant ainsi une bonne extériorisation des symptômes par la forte réplication du virus et par conséquent élévation de la charge virale.

Les symptômes qui ont été associés à la maladie de la Tristeza, concernaient, le dépérissement partiel ou total de l'arbre, le nanisme de différentes parties de l'arbre, le bois strié.

L'échantillonnage a été effectué particulièrement sur les fleurs ouvertes/fermées, les feuilles et les tiges de l'année pour la réalisation des tests sérologiques DTBIA et ELISA (Fig.50).

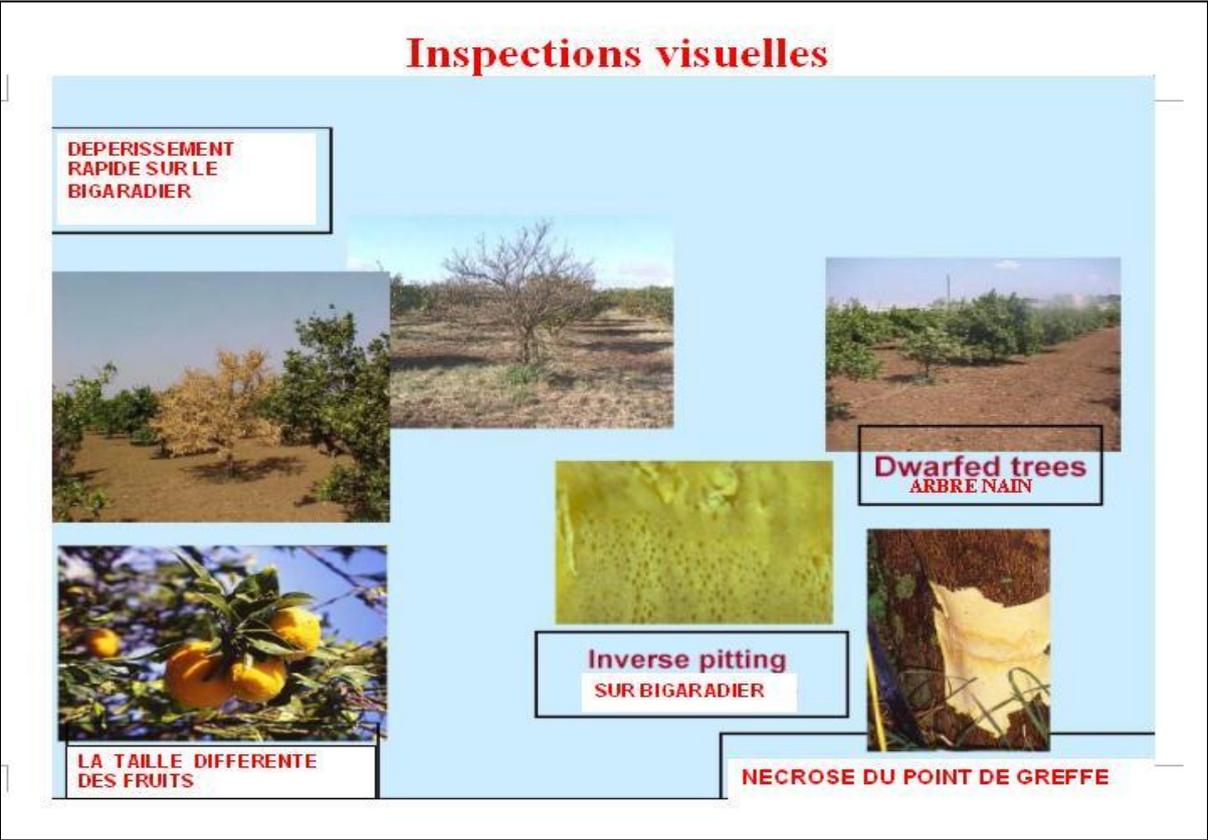


Figure 50. Observations visuelles d'arbres suspects porteurs du CTV

Chapitre II : Matériels et méthodes

Le nombre d'échantillons prélevés sur les trois campagnes était de 1324 orangiers+869 mandariniers d'où un total de 2193 échantillons (Tab. N°6).

Tableau 6. Echantillons récoltés durant les campagnes agrumicoles 2009-2010, 2010-2011 et 2011-2012

Espèce	Nombre d'échantillons testés
Vergers Etatiques et privés	
Groupe des orangers	
Navel	1149
Valencia late	140
Double fine	18
Jaffa	17
Tarocco	83
Total groupe oranger	1407
Vergers Etatiques et privés	
Groupe des mandariniers	
Satsuma	256
Clémentine	338
Mandarines	122
Citrons	70
Total groupe mandariniers	786
Grand total	2193

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.3.1.2 Echantillonnage des pucerons : Les échantillons de pucerons ont été récoltés à partir de plusieurs arbres infestés appartenant à plusieurs espèces et différents sites Environ 10 arbres/verger ont été sélectionnés aléatoirement sur une diagonale de la surface du verger et uniquement 5 tiges infestées par puceron/arbre ont été récoltées à partir de différentes parties de la frondaison de l'arbre. Les tiges infestées ont été mises dans des sacs en polyéthylène, gardées loin du soleil à température ambiante, permettant à la jeune population de pucerons de se nourrir du feuillage et de développer les formes larvaires et ailées pour leur étude au laboratoire.

II.3.1.3. Conservation des pucerons : au laboratoire, les tiges ont été examinées et les formes aptères et ailées des pucerons ont été prélevées, à l'aide d'un pinceau à partir des feuilles, et mis dans de l'alcool à 75 à 85%, afin d'éviter leur dessèchement et puis ont été maintenus dans du glycérol pour leur conservation en bon état.

II.3.1.4. Préparation des pucerons pour le montage : l'objectif principal des procédures de montage des pucerons est l'obtention des pucerons transparents bien visibles avec le moindre détail dans les deux faces ventrale et dorsale des surfaces des téguments, le montage a été réalisé selon le protocole (OEPP/EPPO, 2006), qui consiste d'abord à chauffer les échantillons de pucerons doucement, à 70°C, dans de l'éthanol à 70% pendant 5-10 minutes, ensuite les transférer à 10% de KOH. Pour faciliter la macération, le corps peut être pressé avec de fines spatules et le contenu peut être doucement travaillé à l'arrière du corps et pressé. Si cela s'avère difficile alors une incision peut être faite dans un côté du corps et le contenu pressé à travers cela. Il faut être prudent pour ne pas diviser le corps. Les pucerons sont alors transférés à froid dans de l'alcool 70% pendant au moins 10 min et 5 min à l'acide acétique glacial glacé. Remettez le bloc de chauffage à 80 C° et chauffer dans du chloral phénol. Rincer dans de l'acide acétique glacial. Transférer dans de l'acide acétique glacial frais pendant 5 min. Laisser dans l'huile de clou de girofle au moins 10 min. Montez les pucerons sur une lame de microscope.

II.3.1.5. Identification des pucerons : l'identification des pucerons a été effectuée en partie au niveau du laboratoire de zoologie de l'institut national d'agronomie El-Harrach (Alger) et du département des biotechnologies de l'université Blida₁, en utilisant la clé de détermination de Blackman et Eastop (1984) et (EPPO, 2006) (Annexe 1)

II.4. Détection biologique et Efficacité de la Transmissions par pucerons

II.4.1. Transmission sur plante-hôte herbacée

Les plantules de pois variété Kelvedon, ont été utilisées comme plantes indicatrices. Les semences ont été semées à raison de 3 graines par alvéole contenant de la tourbe comme substrat de semis. L'entretien des plantules se faisait par des arrosages réguliers. Cette étape s'est déroulée dans la serre de virologie de l'Université de Blida.

- **Méthode d'inoculation :** Les pucerons collectés ont été mis au contact des plantules de pois au stade 2 feuilles, à l'aide d'un pinceau humide, pendant 5 min d'inoculation IAP (Inoculation Access Period). Pour chaque espèce de puceron une série de 5 ou 10 plantules de pois a été utilisée. Puis, les pucerons ont été éliminés mécaniquement et par un traitement aphicide (Pirimor 0.75g/l). Les plantules ont été maintenues en serre à une température de 25°C.
- **La lecture des résultats:** la lecture des résultats a été réalisée au bout de 1 à 2 semaines lorsque les symptômes apparaissaient, la lecture a été effectuée par simple observation visuelle et interprétation des observations. La vérification de la transmission et de la présence du virus dans les plantes inoculées a été faite par la méthode sérologique ELI SA.

II.4.2 Transmission sur plantes hôtes ligneuses

Les pucerons aptères virulifères déjà identifiés présents sur feuilles échantillonnées sont mis en contact avec des plants d'environ un ans de Bigaradier et de lime mexicaine sains maintenus sous serre (Univ.Blida), en utilisant un pinceau légèrement humecté, les pucerons sont pris et déposés pour une période d'inoculation (IAP) pour quelques minutes (5minutes), par la suite les pucerons sont éliminés mécaniquement. Les témoins négatifs sont obtenus après passage de pucerons non virulifères élevés à partir de larves. Le travail s'est déroulé par partie pour les deux indicateurs. Après un mois de passage de puceron et l'inoculation du virus, les observations s'effectuaient sur le feuillage et le bois.

II.5 Indexage biologique sur indicateurs ligneux

La méthode d'indexage par greffage reste l'outil d'excellence pour faire extérioriser les symptômes de la tristeza sur l'indicateur universel la lime mexicaine. Cette technique

Chapitre II : Matériels et méthodes

demande beaucoup de temps pour l'apparition des symptômes allant de quelques mois jusqu'à une année. L'indexage sur le semis de la lime mexicaine reste l'outil le plus efficace dans la caractérisation et la détection des différentes souches du virus de la tristeza et constitue une étape importante dans le contrôle des parcs à bois (Roistacher, 1991).

Selon ChangYong (1996), d'autres espèces de citrus, dont (pamplemoussier Duncan, Citronnier Eureka, oranger Madame Vinous et le Bigaradier), sont incluses dans l'indexage biologique pour la détection et la caractérisation de souches du *CTV*.

Cette méthode consiste à inoculer une plante indicatrice par greffage d'une portion (écorce, écusson), sur la plante à tester. La plante indicatrice est sensible au pathogène recherché et permet l'extériorisation de symptômes caractéristiques de la maladie recherchée. Des conditions sont réunies pour la réalisation de cette technique (serre contrôlée, température et humidités contrôlées etc.), permettant l'expression des symptômes (Vernière, 2003). Il faut disposer de plants positifs et négatifs pour pouvoir lire les résultats. Les semis de la lime mexicaine sont préparés sous serre et repiqués dans des pots individuels, les inocula sont prélevés à partir de la plante à tester (écusson sans œil), et un greffage d'inoculation est effectué en faisant une incision sur la tige de l'indicateur. L'indicateur est ensuite pincé pour favoriser le départ d'autres ramifications permettant l'observation des premiers symptômes foliaires (Loussert, 1987).

II.5.1 Amélioration de l'indexage biologique de la tristeza

Vu le faible pouvoir rhizogène de la lime mexicaine (indicateur universel du *CTV*), une technique a été mise au point pour la détection de la tristeza basée sur l'inoculation des plants de la lime mexicaine greffés sur le citronnier *volkameriana* et le cedratier. Elle permet d'obtenir des résultats plus rapides comparés à l'indexage biologique traditionnel (D'Onghia et al, 2009).

II.5.2. Méthode d'indexage par greffage d'inoculation

L'identification par procédé classique du *CTV* est l'inoculation par greffage ou l'indexage qui a été effectué sur différents indicateurs ligneux dont la lime Mexicaine [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.] indicateur universel (Roistacher, 1991), le bigaradier, l'oranger doux, et Pamplemoussier Duncan, pour l'extériorisation et l'observation de symptômes induits par différentes souches du *CTV*. Après inoculation et ligature des greffes à l'aide de parafilm, les plants inoculés par chaque souche ont été étiquetés. Ces derniers ainsi que l'ensemble des plants positifs et négatifs ont été maintenus sous serre d'indexage du laboratoire (IPM de

Chapitre II : Matériels et méthodes

l'IAM de Bari), à température allant de 24 à 26°C e 16 heures de photopériode. Les plantes indicatrices ont été observées chaque semaine, afin d'observer les symptômes extériorisés (Roistacher, 1991).

II.6 Conservation du virus

Les fleurs, les feuilles et les tiges prélevées ont été placées dans des sacs en plastique numérotés. Le matériel végétal ainsi récolté, a été conservé au froid dans des glacières à température basse allant de 4° et 6°C avant leur analyse au laboratoire, afin d'éviter l'oxydation des tissus végétaux par les températures un peu élevées sur le terrain pouvant générer des problèmes lors de l'extraction des particules virales. Il est à signaler, que les fleurs fermées peuvent être bien conservées à long terme à -20°C permettant ainsi leur utilisation pour analyse durant des périodes diverses de l'année. Par contre, le matériel végétal destiné à être analysé est temporairement conservé à 4° C au réfrigérateur (Fig.51).



Figure. 51 Conservation des échantillons (fleurs et tiges)

II.7 Méthode d'extraction

II.7.1 Extraction de l'antigène (feuilles et de fleurs) pour la technique ELISA

Les échantillons de feuilles fraîches et /ou de fleurs (Fig.52), ont été préalablement déposés dans des sacs individuels de broyage menus de filtre puis broyés à l'aide d'un broyeur manuel dans un tampon d'extraction à une concentration de 1g de tissu frais dans 10 ml tampon

Chapitre II : Matériels et méthodes

d'extraction (1/10). Après broyage les jus de plantes ainsi obtenus ont été filtrés et conservés dans des tubes en plastique fermés à 4°C. (Solutions et tampons pour ELISA) (Annexe 3).



Figure 52. Echantillons de fleurs et de feuilles pour le test ELISA (Lab.virologie Univ.Blida)

II.7.2 Extraction des ARN totaux pour les tests moléculaires

Les ARN totaux ont été extraits à partir de feuilles et tiges (Fig.53) selon le protocole de Foissac *et al.* (2001) (Fig.54), cette méthode conventionnelle est moins coûteuse, l'extraction a également été réalisée en utilisant le kit (RNeasy^R Plant, Qiagen USA), pour ce dernier protocole 0,2 g de tissu ont été broyés dans de l'azote liquide dans des conditions aseptiques. Après broyage dans 1 ml de tampon relatif (annexe 3), un volume de 500 µl de l'extrait a été transféré dans des microtubes contenant 100 µl de Sodium Lauryl Sarcosyl (SLS) 10% et incubés à 70°C pendant 10 min. avec agitation intermédiaire, puis refroidi brièvement sur de la glace pendant 5 min. Après 10 min. de centrifugation à pleine vitesse, 300 µl du surnageant recueilli a été mélangé avec une solution contenant un mélange de 150 µl d'éthanol absolu, 35 µl de silice et 300 µl de solution 6 M sodium iode (NaI). Le mélange a été remis en suspension. Ce dernier a ensuite été incubé à température ambiante pendant au moins 10 min. avec agitation puis centrifugé à 6000 rpm pendant 1 min. Le culot a été récupéré et lavé 2-3 fois dans 500 µl de tampon de lavage (Annexe 3). À la fin, le culot obtenu a été remis en suspension dans 150 µl d'eau millipore (sans RNase). Ensuite, les acides nucléiques totaux (RNA) isolés ont été récupérés après une incubation de 4 min. à 70 ° C et à une centrifugation à pleine vitesse pendant 3 min. et enfin stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Le même résultat est obtenu par le protocole de Foissac *et al.*(2001).

Chapitre II : Matériels et méthodes



Figure 53 .Extraction des ARN totaux à partir des tiges et feuilles (Lab.IAMB-Italie).

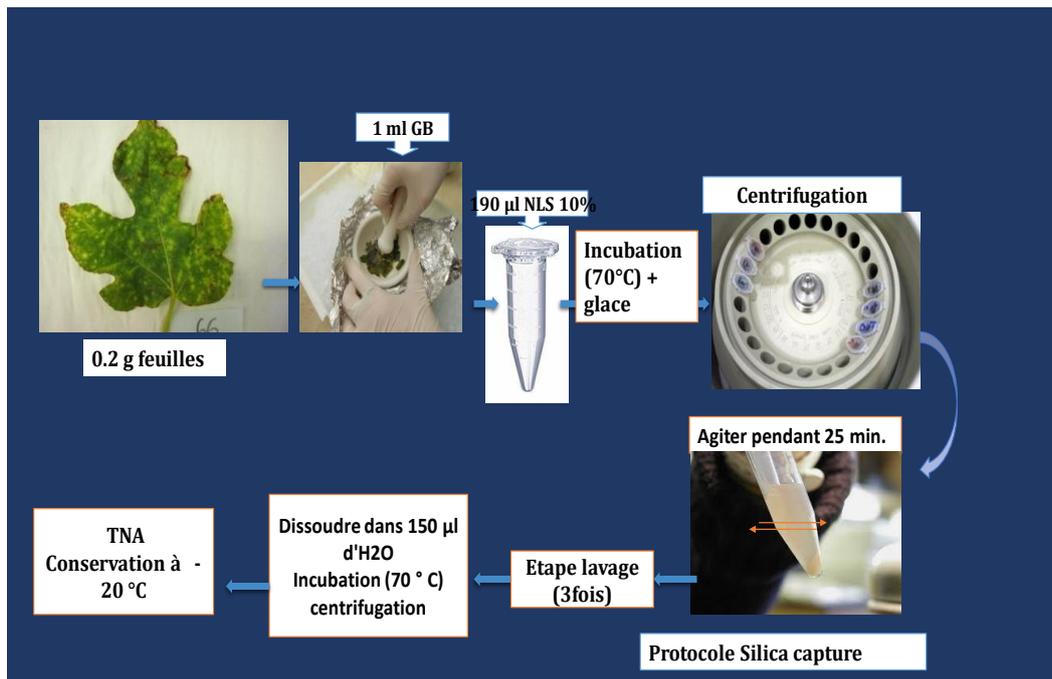


Figure 54. Extraction des ANT selon le protocole de Foissac et al. (200)

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.8 Tests immuno-enzymatiques

La variante ELISA utilisée dans notre étude est le Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-ELISA), à travers l'utilisation d'un kit commercial (Bioreba France). Tandis que, la technique DTBIA a été effectuée à travers l'utilisation du kit commercial Plantprint-Espagne (Garnsey et al.1993 ; Cambra et al., 2000b ; Djelouah et al., 2002).

II.8.1 Test DAS-ELISA

Cette technique consiste à détecter le virus par piégeage entre un anticorps polyclonal (AcPc) et un anticorps polyclonal (AcPc) couplé à une enzyme phosphatase alcaline (PAL) (Clark et Adams, 1977). Des anticorps polyclonaux ont été utilisés (1978 et 1983) pour la détection du CTV par ELISA. La production d'anticorps monoclonaux spécifiques au CTV (Vela et al.1986 ; Permar et al. 1990), ont résolu le problème de spécificité et ont augmenté la sensibilité de ce test. La mixture de deux anticorps monoclonaux (3DF1+3CA5) ou leurs recombinants (Terrada et al.2000), reconnaissent tous les isolats testés de plusieurs collections internationales (Cambra et al. 2000).

Dans cette technique, le virus est mis en évidence par une réaction immuno-enzymatique par l'apparition d'une couleur jaune sur les puits d'une plaque de microtitration par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 405 nm (Fig.55).

Les plaques de microtitration ont été sensibilisées avec des AcPx dilués à 1/250^{ième} dans du tampon de sensibilisation et incubées pendant 2 h à 37° C. Après 3 lavages avec du tampon de lavage PBS-T , des plaques de microtitration, les extraits d'échantillons prélevés du terrain ainsi que ceux des témoins positifs et négatifs ont été déposés dans la plaque de microtitration à raison de 100 µl / puits. Les plaques de microtitration ont été ensuite incubées pendant une nuit à 4°C. Après 3 lavages au PBS-T, 100 µl d'AcPcx couplés à la phosphatase alcaline dilués 1/250^{ième} dans le tampon du conjugué, ont été déposés / puits et incubées pendant 2 h à 37° C. Après séchage des plaques de microtitration et dépôt de 100 µl de substrat/puits de pNPP (p-Nitro Phényl Phosphate) dilué à 1 mg/1ml dans du tampon de substrat (Annexe 2), les plaques ont été incubées à température ambiante jusqu'à l'apparition de la couleur jaune et la première lecture à l'œil nu, ensuite une lecture a été faite après 2h de temps dans un lecteur de plaque ELISA classique à 405 nm d'absorbance (Titertek Multiskan plus MKIL). Un

Chapitre II : Matériels et méthodes

échantillon a été considéré positif au CTV si la valeur de sa densité optique (DO) est deux fois et demi supérieures à la valeur de la (DO) de l'extrait sain.

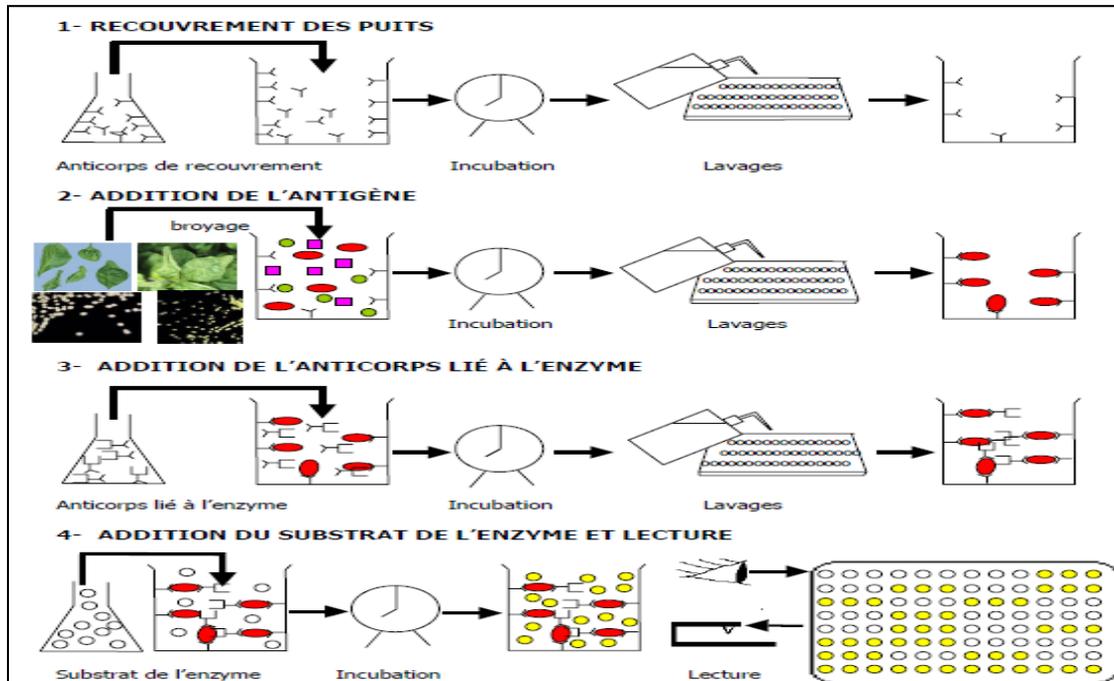


Figure 55. DAS-ELISA (Vézina et Lacroix, 2016).

II.8.2. Technique DTBIA (Direct Tissue Blot Immuno Assay)

Le protocole DTBIA utilisé est celui mis au point par D'Onghia et al., (2001) et Djelouah *et al.*, (2002) pour la détection du CPsV et le CTV. La présente technique, a été appliquée en utilisant un anticorps monoclonal (AcMc) produit par Agritest, Italie contre le CTV. Les empreintes ont été réalisées en utilisant une coupe des ovaires, sur les membranes de nitrocellulose, qui ont été laissés à sécher à température ambiante pendant quelques heures à quelques jours. La deuxième étape correspondant au blocage de la membrane, dans une solution BSA (Bovin Serum Albumin) à 1% et son incubation pendant une nuit à 4°C avec agitation pendant une heure à température ambiante (Fig. 56). Après un lavage au tampon Phosphate contenant du Tween (PBS-T) (Annexe 2), répété 3 fois pendant 5 min, la membrane a été immergée dans une solution contenant l'anticorps monoclonal conjugué à la phosphatase alcaline diluée à 1/250^{ième} (Agritest). Après 3h d'incubation à température ambiante, la membrane a été lavée 3 fois pendant 5 min au PBS-T. Le développement de la

Chapitre II : Matériels et méthodes

membrane a été réalisé en diluant une pastille de (BCIP-NBT (Sigma fast tablets) dans 10 ml d'eau distillée ; puis incubée 5 à 10 min par agitation jusqu'à apparition de la coloration violette comme signe de réaction positive. La réaction a été bloquée en rinçant la membrane à l'eau courante. Cette dernière a été ensuite séchée soigneusement avec du papier et sa lecture a été effectuée par observation à la loupe binoculaire à un grossissement de 10x et 20x. La présence de la couleur pourpre-violette dans les aires des coupes des ovaires ou tissu du phloème révèle la présence de l'antigène viral (Fig.54).

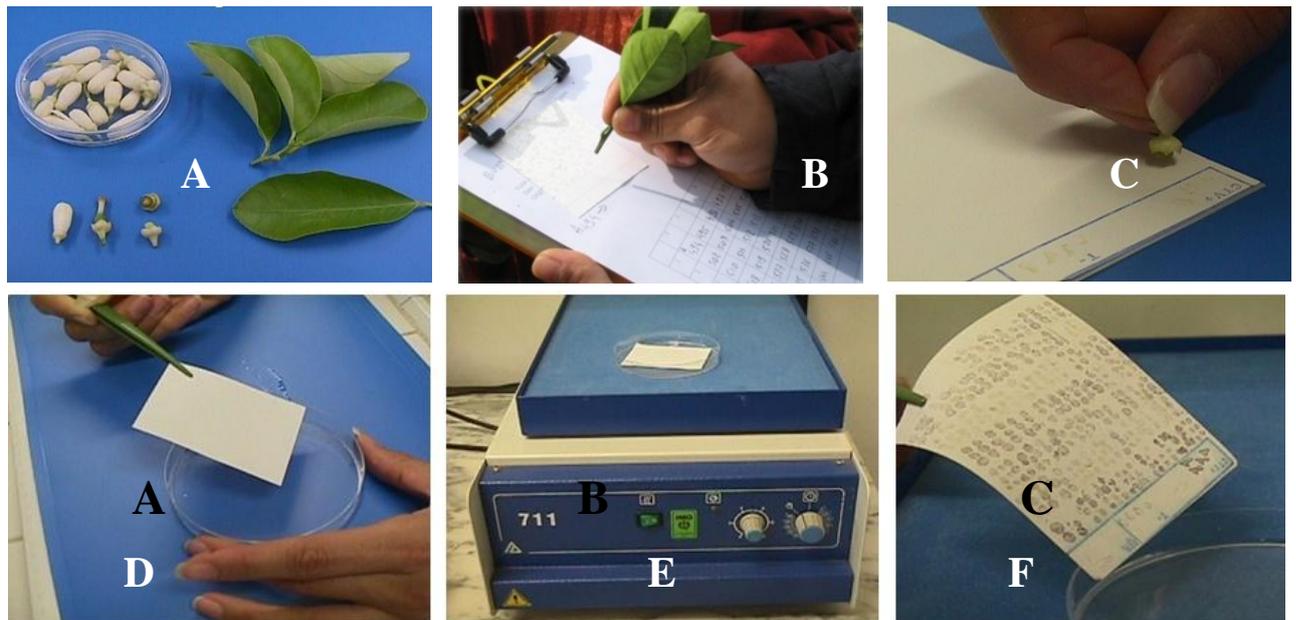


Figure 56. Protocole du test DTBIA (photo, Larbi 2012)

- A : Echantillons de fleurs et de feuilles.
- B : Empreintes d'un pétiole de feuille sur la membrane de nitrocellulose
- C : Empreinte d'une coupe d'ovaire de fleur sur la membrane de nitrocellulose.
- D : Blocage de la membrane dans une solution de BSA.
- E : Réaction avec l'anticorps monoclonal spécifique au CTV (Plantprint)
- F : Réalisation du développement de la membrane BCIP-NBT(Sigmafast)

II.9. Caractérisation moléculaire

II.9.1. Transcription inverse RT-PCR

La transcription inverse ou bidirectionnelle reverse transcription polymérase chaîne réaction (Cevik, 1996) constitue une des procédures développée pour le diagnostic du virus de la tristezza. Quatre µl de TNA obtenus ont été ajoutés à 46 µl de mixture RT-PCR, contenant 10mM Tris (pH :8.8), 50mM KCL, 3mM MgCL₂, 4U RNA (Guard Ribonuclease inhibitor), 7.5U MuLV transcriptase inverse (Applied Biosystems, Roche), 1U Taq polymérase, 0.2 mM

Chapitre II : Matériels et méthodes

dATP, dTTP, dGTP et dCTP chacun, 200nM forward primer ; CT 42 et 200 nM amorces inverses; *CTV* 43 (Tab.7), ont été ajoutées dans chaque tube (Nolasco et al., 2002). La synthèse de l'ADNc a été réalisée à 38°C pendant 45 min. suivi par une étape de dénaturation et une inactivation de la transcriptase inverse à 94°C pour 2min. Le procédé d'amplification consistait en un programme de 30 cycles de 92°C pendant 30s, 52°C pendant 30 s et 72°C pendant 30s, suivi par un cycle d'élongation pendant 10min à 72°C.

Tableau 7. Les amorces utilisées pour la RT-PCR

Amorces	Séquences des amorces	Position sur le gène de la CP
<i>CTV</i> 42	CTCAAATTGCGRTTCTGTCT	454
<i>CTV</i> 43	ATGTTGTTGCNGCNGAGTC	59

Les produits de la RT-PCR sont séparés par migration sur un gel d'électrophorèse (agarose à 1%) (Annexe 4), dans un tampon TAE et observés sous les UV après passage au bromure d'ethidium

II.9.2. Analyse de conformation du polymorphisme simple brin (SSCP)

Avant le clonage et le séquençage, l'analyse de conformation simple brin SSCP est utilisée pour la différenciation entre les souches. 2 µl du produit de la RT-PCR ont été prélevés pour chaque échantillon, et 8µl de tampon de dénaturation sont ajoutés (950 µl de 95% formamide et 40 µl de 500mM EDTA). Les échantillons ont été chauffés à 95°C pendant 5min. et rapidement transférés au froid pendant 5 min. Les produits dénaturés ont été mis dans le réfrigérateur à 4°C pendant 3h à 200V sur un gel polyacrylamide non dénaturant pour électrophorèse en utilisant un tampon TBE (Annexe 4).Le gel a été coloré par une solution de nitrate d'argent jusqu'à l'apparition de bandes et fixé par une solution d'acide acétique (10% environ 20min), Par la suite, le gel est rincé à l'eau distillée (3 fois pendant 1min).Le gel est incubé à 1 % d'acide nitrique pendant 3min. un rinçage encore à l'eau distillée trois fois pendant 1minute a été réalisé (Rubio et al. 1996) (Fig.57).

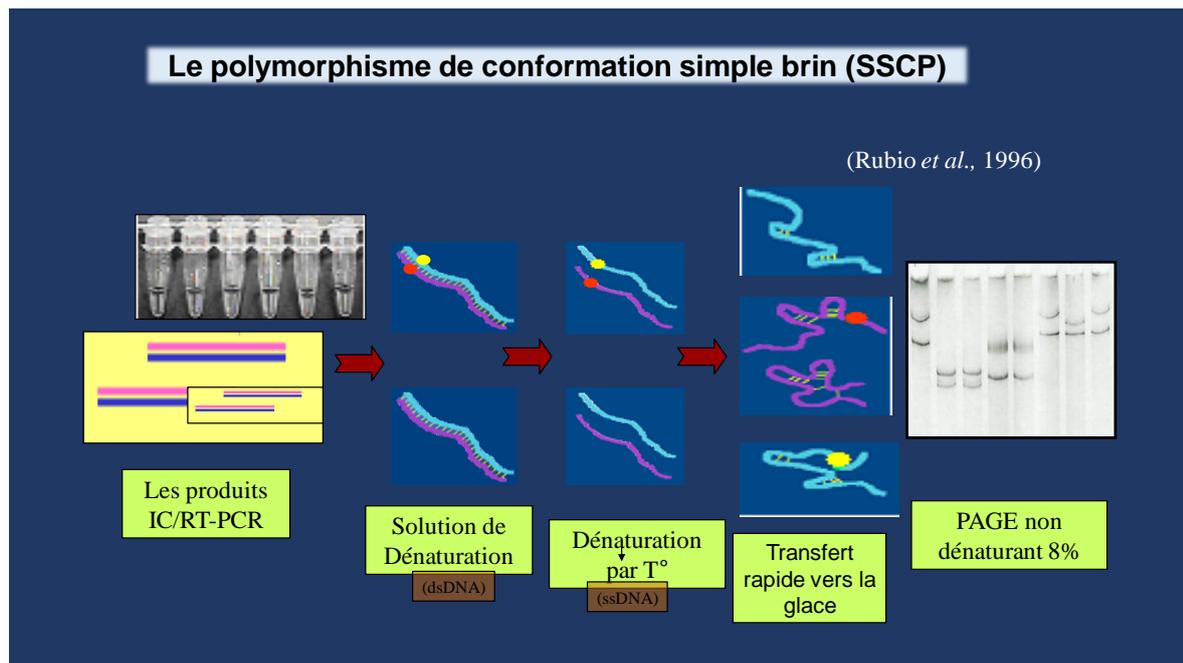


Figure 57. Protocole SSCP (Rubio *et al.* 1996)

II.9.3. Immunocapture-Transcription inverse-PCR (IC/RT-PCR)

L'amplification du gène de la protéine capsidique CP à partir des sources de *CTV* sélectionnées, a été effectuée par une IC/RT-PCR en utilisant l'écorce des tiges/rameaux infectés. La sensibilisation des tubes de la machine PCR a été effectuée avec 50 μ l AcPc *CTV*, avec le même principe DAS ELISA (1:250 dilution) et incubées 4h à 37°C. Les tubes ont été lavés avec du PBS-Tween trois fois pendant 3 min, puis ils ont été vidés par agitation manuelle. L'extraction a été effectuée par broyage de 0.2 g de tissus de tiges/d'écorce des échantillons, à l'aide de mortier et un pilon, du carborundum et 5 volumes (W/V) de tampon d'extraction (Annexe 2), selon le protocole de (Nolasco *et al.*, 1993), puis clarifiée par centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min, et maintenue sur de la glace jusqu'à utilisation. 50 μ l d'extrait de plantes ont été ajoutés aux tubes sensibilisés, puis incubées 4 h à température ambiante pour une immunocapture et ensuite lavés deux fois avec du PBS-Tween et une fois avec de l'eau distillée stérile. 50 μ l de mélange RT-PCR contenant 10 mM Tris (pH: 8,8), 50 mM de KCl, 3 mM MgCl₂, 4U RNA Guard ribonucléase inhibitor, 7.5U MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems, Roche), 1U Taq polymérase, 0.2 mM de nucléotides dATP, dTTP, dGTP and dCTP, 200nM forward primer; *CTV1* et 200nM reverse primer; *CTV10* (Tab.8) ont été ajoutés pour chaque tube (Nolasco *et al.*, 2002). L'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé à 38°C pendant 45 min, suivie par une étape de dénaturation et inactivation de la

Chapitre II : Matériels et méthodes

transcriptase inverse à 94°C pendant 2 min. Le processus d'amplification est composé de 30 cycles de 92°C pendant 30 s 52°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s, suivi par un cycle d'élongation de 10 min à 72°C.

Tableau 8. Les amorces utilisées pour l'IC-RT-PCR

Amorces	Séquences des amorces	Position sur le gène de la CP
CTV 1	ATGGACGACGAAACAAAGAA	1
CTV 10	ATCAACGTGTGTTGAATTTCC	653

La lecture des résultats s'est effectuée après séparation des produits de l'IC-RT-PCR par migration sur gel d'électrophorèse à 1% d'agarose dans un tampon TAE, et visualisés sous lumière UV après coloration avec du bromure d'éthidium (B.E).

II.9.4. Isolation, clonage et séquençage du gène de la capsid

Selon Sambrook *et al*, (1989), les produits amplifiés à partir de IC/ RT-PCR sont ligaturés dans un système de vecteur plasmidique et transformé dans des cellules *E. coli* compétentes en utilisant les protocoles et les procédures standards (Fig.58).

Les colonies bactériennes blanches transformées abritant le plasmide recombiné ont été sélectionnées sur la boîte de Pétri contenant de l' X-gal et de l'ampicilline; choisies et utilisées directement dans les réactions de PCR avec les mêmes amorces utilisées pour l'étape l'IC/ RT-PCR, pour confirmer la présence de l'insert spécifique, puis ont été analysées par SSCP pour le choix des clones pour le séquençage.

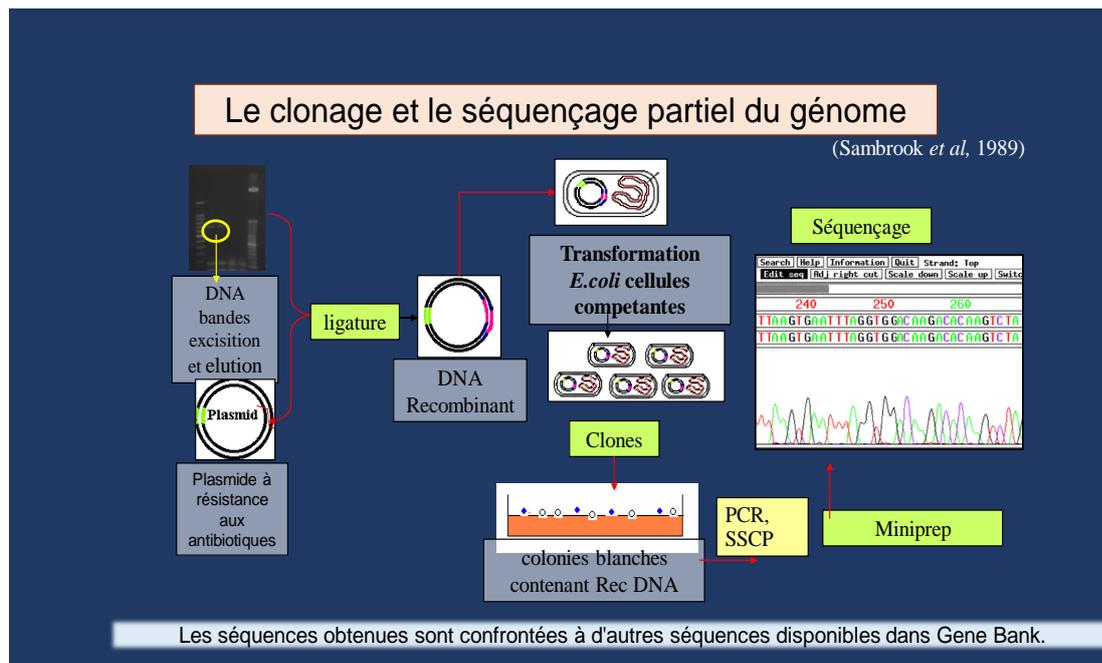


Figure 58. Clonage et séquençage (Sambrook et al., 1989)

II.9.4.1. Ligature du produit de la IC-RT-PCR avec pGEM-T easy vector

Les bandes d'ADN des produits de l'IC/RT-PCR récupérées après migration par électrophorèse (d'agarose à 1%), ont été excisées, et la tranche de gel a été ensuite dissoute, attachée à la mini colonne, lavée et éluée avec de l'eau stérile à l'aide de Wizard SV Gel et PCR système Clean-Up (Promega, USA). Deux μl de produits d'éluion ont été insérés dans le vecteur plasmidique commercial, pGEM-T Easy Vector System en utilisant l'original TA Cloning Kit (Promega, USA) (Fig.59), par une réaction de ligature; 5 μl de 2x tampon de ligature (Promega) ont été mélangés avec le vecteur pGEM-T (50ng/ μl), 0,3 unités de T4 ADN ligase (Promega) et 1 μl d'eau stérile. L'incubation du mélange de ligature a été effectuée à 4°C pendant une nuit.

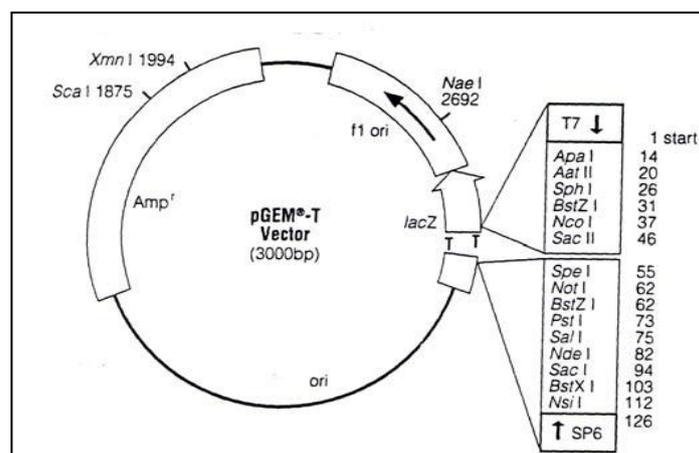


Figure 59. Site du vecteur de clonage pGEM-T

Chapitre II : Matériels et méthodes

I.9.4.2. Préparation des cellules compétentes

Des cellules d'Escherichia coli INVaF (Invitrogen, USA), ont été ensemencées en stries à travers la surface du milieu Luria Bertani (LB) solide et incubées à 37°C pendant 16 h (Annexe 5). Après purification, une seule colonie a ensuite été incubée dans 2 ml de milieu LB liquide et incubée pendant une nuit à 37°C avec agitation à 250 rpm. Une multiplication supplémentaire par croissance des cellules bactériennes a été réalisée par inoculation de 50 µl de la culture bactérienne dans 10 ml de LB liquide et en les incubant à 37 °C pendant 3 h sous agitation à 250 rpm. Pour arrêter la croissance bactérienne, la culture a été refroidie dans un bain de glace pendant 10 min et ensuite récoltée et centrifugée à 6000 rpm pendant 10 min. à 4°C. Le culot bactérien a été doucement remis en suspension dans 0,6 ml de 0,1 M CaCl₂, puis maintenu dans la glace pendant au moins 2h avant transformation. Des aliquotes ont été préparés, stockés et conservés à -80°C.

II.9.4.3. Transformation de cellules compétentes

10 µl de mélange de ligature ont été ajoutés à (100µl) de cellules compétentes dans un tube à centrifuger stérile et ont été conservés dans de la glace pendant 30 min. Les tubes ont été incubés dans un bain mari à 42°C pendant 2 min, puis refroidies immédiatement dans un bain de glace pendant encore 2 min. Les cellules ont été mélangées avec 600 µl de LB liquide, puis mise à incuber pendant 30 min à 37°C. Une autre incubation dans le même milieu à 37°C avec une agitation à 150rpm.

II.9.4.4. Dépistage des colonies

La suspension bactérienne a été étalée sur des boîtes Pétri contenant un milieu agarisé LB (annexe 5), fourni avec X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (Sigma) et de l'ampicilline (50 mg / L), et ce, après centrifugation pendant 2 min. et l'élimination de la majeure partie de liquide restant. Les boîtes petri ont été incubées pendant une nuit à 37°C. Des colonies blanches hébergeant le plasmide recombinant ont été sélectionnées puis ré-inoculées sur une autre plaque afin de favoriser la multiplication et le clonage par conjugaison du plasmide indépendamment de la cellule bactérienne.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.9.4.5. Identification des colonies bactériennes portant l'ADN recombinant

Selon Sambrook et al.,(1989), les plasmides ont été extraits de cellules bactériennes en utilisant la «méthode d'ébullition ». Les colonies transformées ont été "repiquées et inoculées dans 2 ml de LB liquide (annexe 5), contenant de l'ampicilline et incubées une nuit à 37° C après centrifugation à 250 rpm, les culots bactériens ont été récupérés et versés dans des microtubes après centrifugation à 13000 rpm pendant 1 min, ensuite resuspendus dans 350 µl de STET (Annexe 5) et 15 µl de lysozyme (20 mg / ml), agités par tourbillonnement et ensuite incubés à 90°C pendant 40 secondes et immédiatement refroidis dans la glace pendant 2 min. Après une centrifugation à 14000 rpm pendant 20 min, et l'élimination du culot, l'ADN plasmidique soluble a été extrait avec de l'addition de 175 µl de phénol et 175ul d' alcool isomilic suivi par agitation au vortex puis centrifugation à 13 000 rpm pendant 10 min, 300 µl tensioactif ont été transférés ensuite dans des tubes contenant 200 µl d'acétate d'ammonium (NH₄OAC) et 1 ml d'éthanol absolu froid et centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min. Le culot a été lavé avec 500 ul d'éthanol froid à 70%, centrifugé à 13 000 rpm pendant 10 min , après élimination de l'agent tensio-actif et d'un séchage pendant 1 heure, le culot a été remis en suspension dans 50 µl de tampon TE (Annexe 5) contenant 1µl de RNase A (10 µg/µl), puis agité au vortex et conservé dans de la glace.

II.9.4.6. Digestion enzymatique du plasmide

Les plasmides extraits contenant l'insert d'ADN appropriée ont été vérifiés par une digestion avec l'enzyme de restriction Eco RI (Amersham) ; 10-15 µg d'ADN plasmidique ont été incubées avec 1 µl tampon 10X H (Roche), 2 U EcoRI, (10 µl, le volume final de la digestion) à 37°C pendant 1h30. La taille d'ADN restreinte a été déterminée par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1% de TAE. Le gel a été ensuite coloré par du bromure d'éthidium (10 mg / ml). Les bandes ADN ont été observées sous un transilluminateur UV.

Les tubes qui contenaient des plasmides portant l'insert de la protéine d'enveloppe du CTV, confirmé par digestion enzymatique, ont été transférés dans de la glace à 37 ° C pendant 30min, puis 30 µl de PEG-NaCl (Annexe 5) a été ajouté, mis sur la glace pendant 1 h, centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 min, lavées par 100 µl de 70% d'éthanol froid après élimination de la phase liquide, puis centrifugé a 14000 rpm pendant 5 min, et séchés pendant 1 h dans la pompe à vide, le culot a été dissous dans 30 µl d'eau stérile.

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.9.4.7. Amplification de l'ADN et la séquence du gène CP recombinant par PCR

Pour l'amplification de l'ADN recombinant et en utilisant les mêmes amorces CTV1, CTV 10 avant l'analyse par SSCP, et ce, afin de vérifier les propriétés génétiques des isolats de CTV sélectionnés. Les colonies blanches ont été prélevées et ajoutées au mélange PCR, Les clones des isolats étaient choisis et des séquences d'ADNc du plasmide recombinant sont sélectionnées par séquençage automatique (Primm Société, Italie).

L'analyse des séquences et l'alignement ont été effectués en utilisant le logiciel BioEdit (Hall, 1999). L'homologie avec d'autres séquences de CTV connues ont été déterminées avec le programme BLAST (Altschul et al. 1990).

Les séquences ont été comparées à des séquences déjà publiées sur le gène CP et présentes dans la banque de gènes GenBank: T30 (AF26065), M2 (AY190048), SY568 (AF01623), ArgC269 (AY750771), Cal81 (AY995567), VT (U56902), la Jordanie (AY550252), Arg C257 (AY750757), Por 28C (AF184118), Qaha (AY340974), T36 (AY170468), 19-121 AF184114).

L'analyse génétique moléculaire évolutive version du logiciel MEGA 2.1 (Kumar et al. 2001), a permis le calcul des distances nucléotidiques entre les séquences.

CHAPITRE 3
RESULTATS ET
DISCUSSION

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Description des symptômes associés au virus de la Tristeza

Les symptômes associés à la présence du *CTV* ont été observés dans la totalité des stations visitées, avec une variation d'intensité, de type mais aussi de la dispersion, selon les sites. Les symptômes les plus fréquents observés sur les vergers prospectés, se caractérisaient par des dépérissements partiels ou complets observés à Boufarik1 Fig.60 , des symptômes de nanisme associés à plusieurs maladies virales et de type viral observés sur certains arbres âgés (Fig.61) , des problèmes de décoloration du feuillage, feuilles en forme de cuillère, feuilles desséchées et enroulées (Fig.62). La présence de pousses et des tiges en forme de balais de sorcière était très fréquent sur certains vergers (Fig.63) Enfin, lors de la récolte, une réduction des calibres des fruits a été notée sur beaucoup d'arbres. Les symptômes sur le bois associés à certaines souches du *CTV* n'ont pas été retrouvés, notamment le bois strié.

La sévérité des symptômes observés peut varier selon plusieurs facteurs : la densité de la population de pucerons, le facteur climat, la nature de la souche virale ainsi que le porte-greffe et le cultivar. En effet, plus les pucerons sont présents en masse, plus le *CTV*, est plus propagé, causant ainsi d'importants dommages, liés à la fois, à la présence du virus mais aussi aux dégâts causés par les pucerons. Le climat demeure un facteur majeur dans la dissémination de la Tristeza : la température favorable et des précipitations irrégulières favorisant la pullulation des pucerons et ainsi la propagation du virus.



Figure 60 : Dépérissement partiel et complet observé à Boufarik 1 (Larbi, 2009)



A/Enroulement des jeunes pousses ; B/ Feuilles en forme de cuillère, C/Taches chlorotiques

Figure 61 : Symptômes sur feuilles observés à Hadjout et Boufarik₂ (Larbi, 2012)



Figure 62. Nanisme observé sur certains arbres à Boufarik (Larbi, 2012).



Figure 63. Tiges en forme de balais de sorcière observées à Hadjout (Larbi, 2012)

Discussion

Le diagnostic symptomatologique nous a permis de constater un état sanitaire qui mérite d'être pris en charge, étant peu connu et peu maîtrisé en matière de connaissances de toutes les maladies sévissant sur nos agrumes, et ce, malgré que beaucoup de maladies ont été

Chapitre III : Résultats et discussion

signalées par Bové (1995), il y a plus de 50 ans, l'incidence et la présence de certaines maladies restent peu connues également pour les ravageurs connus sur les agrumes.

La tristeza qui constitue actuellement un problème majeur pour l'agrumiculture Algérienne reste peu connue vu les taux d'infections enregistrés depuis les années 2000 et jusqu'à ce jour au niveau de la Mitidja (travaux de recherches du département d'agronomie de l'université de Blida, et à travers des prospections effectuées par (ITAFV, INPV et le CNCC), cependant le manque de moyens pour la réalisation de prospections à grande échelle (est, ouest et centre) sur la totalité des agrumes de l'Algérie pour situer la présence de cette maladie ainsi que l'étude des populations de pucerons vecteurs et du virus *CTV* reste à ces débuts. Malheureusement la situation actuelle est délicate, malgré la présence de certification dans la production de plants d'agrumes, mais il reste beaucoup de choses à faire pour prévenir les problèmes plus sérieux car tous les ingrédients sont présents pour l'apparition des épidémies et l'introduction de souches sévères vu la présence du *T. citricida* dans le pourtour méditerranéen.

Les résultats des prospections effectuées dans le cadre de recherche de symptômes associés au virus de la tristeza, ont permis de soulever de nombreuses anomalies observées sur le feuillage, les branches ainsi que l'aspect général de l'arbre sans oublier le calibre des fruits.

Des arbres nains produisant des fruits de calibre réduit avec une faible production, des arbres complètement dépéris et parfois des dessèchements partiels suite à des chloroses sur les tiges et le feuillage, sont parmi les symptômes observés au champ qui peuvent être associés à la présence de virus de la tristeza (Guerra et al 1990 ; Bar-joseph et al., 2010), et sont similaires avec ceux déjà observés dans les travaux de Alloune, (2010), Bouafia, (2011) et Moudoud (2012) dans la région de la Mitidja. Rappelant que les taux d'arbres affectés par la tristeza est en hausse d'une année à l'autre.

III.2. Résultats de la collecte des populations de pucerons durant les trois campagnes agrumicoles

Durant la collecte des pucerons, trois espèces vectrices du *CTV* ont été observées sur presque la totalité des vergers prospectés, mais avec un pourcentage d'infestation variable d'un verger à une autre. Il s'agit d'*A. spiraeicola*, *A. gossypii* et *T. aurantii*.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.2.1. Distribution des populations de pucerons dans les sites prospectés

Les résultats obtenus concernant la fréquence des pucerons rencontrés sur l'ensemble des exploitations ont montré une présence massive du puceron *A. gossypii* dans l'ensemble des vergers dont les fréquences ont atteint 85%, les deux autres pucerons ont également présenté des fréquences importantes qui dépassent les 50% pour atteindre les 70% pour l'espèce *A. spiraecola* et 40% jusqu'à 82% pour l'espèce *T. aurantii* (Fig.64).

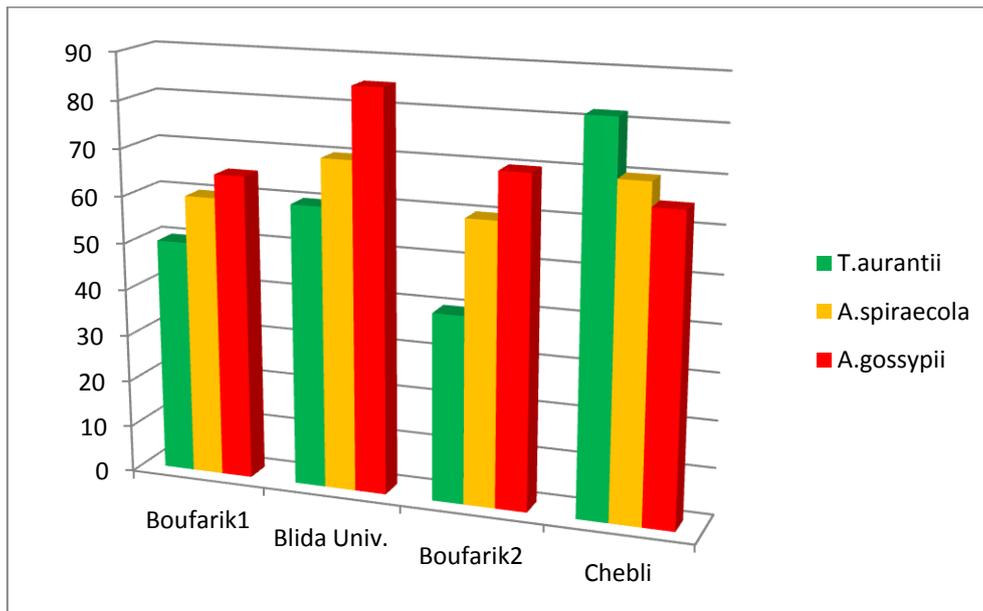


Figure 64. Distribution des populations de pucerons à travers les principaux sites prospectés

Discussion

À partir des prospections effectuées durant les trois campagnes agrumicoles sur différents sites (exploitations privés et étatiques), en vue de connaître la présence et la distribution de populations de pucerons, et à la suite des résultats obtenus. Il s'est avéré que trois espèces de pucerons présentes sur nos agrumes ont été identifiées à savoir *A. spiraecola*, *A. gossypii* et *T. aurantii*, seulement il faut souligner qu'il y a une certaine disparité dans la distribution des populations de pucerons. L'étude des résultats montre une dominance de l'espèce *A.gossypii* dans tous les sites prospectés sauf pour l'exploitation de Chebli où l'espèce *T.aurantii* a été la plus dominante avec 82%. Les symptômes dominants dans les vergers ont été le jaunissement, le dessèchement et l'enroulement des feuilles, qui sont liés à la présence massive de populations de pucerons, d'autres symptômes associés à la présence du virus de la tristezza ont été observés et concernaient l'aspect chlorotique des arbres, le rabougrissement des arbres, des dépérissements et la réduction du calibre des fruits. Parmi les causes de cette présence

Chapitre III : Résultats et discussion

importante des pucerons, le mauvais entretien des vergers et l'absence de contrôle réguliers des vergers. Cette présence affecte les agrumes d'abord d'une manière directe sur les jeunes feuilles des pousses d'été et d'automne avec dégâts importants induisant des enroulements et crispation des jeunes feuilles allant parfois jusqu'à la déformation des rameaux. Le développement de la fumagine (*Capnodium oleaginum*) est souvent observé avec les sécrétions du miellat, ces problèmes peuvent contribuer à l'affaiblissement de l'arbre. Tous les pucerons sont des vecteurs potentiels du virus de la tristezza chez les agrumes. Certains vergers privés visités durant les prospections étaient bien entretenus, la présence de pucerons a été quasi nulle, l'entretien des vergers avec la diminution des populations de pucerons contribue à maintenir un état sanitaire satisfaisant qui assure une longévité des arbres. Dans l'ensemble les vergers sont mal entretenus, il y a présence abondante de mauvaises herbes dans la majorité des vergers prospectés, selon les agrumiculteurs, l'absence de main d'œuvre, et le non respect de l'itinéraire technique, sont parmi les causes, d'un mauvais état sanitaire, par conséquent les arbres sont sujets aux attaques de différentes maladies et ravageurs.

III.2.2. Distribution des populations de pucerons par site prospecté

- **Station expérimentale de l'institut d'agronomie de Blida :** Au niveau de cette station, sur 120 échantillons de feuilles collectés, les fréquences des trois espèces ont été les suivantes : *T.aurantii* 60%, *A.spiraecola* 70% et *A.gossypii* 85% (Fig.65).

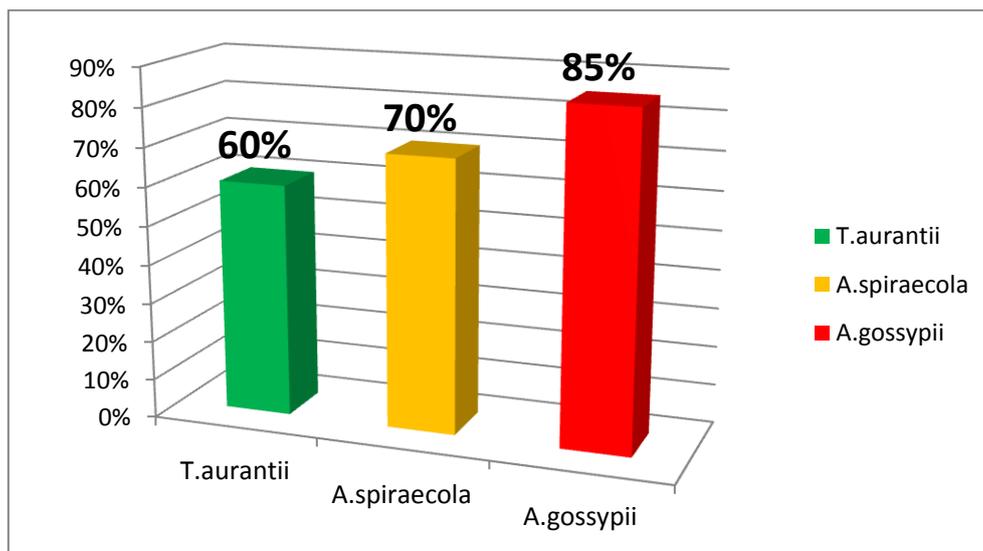


Figure 65. Taux d'infestation des pucerons (Station expérimentale Univ.Blida)

Chapitre III : Résultats et discussion

- **Exploitation Boufarik 2 (parc à bois)** : les symptômes observés sur le parc à bois se manifestaient par des crispations et enroulements des jeunes feuilles, parfois déformations des rameaux quand l'attaque est importante. La population aphidienne dominante a été *A. gossypii* 70%, *A. spiraecola* (60%) suivi de *T. aurantii* (40%) (Fig.66)

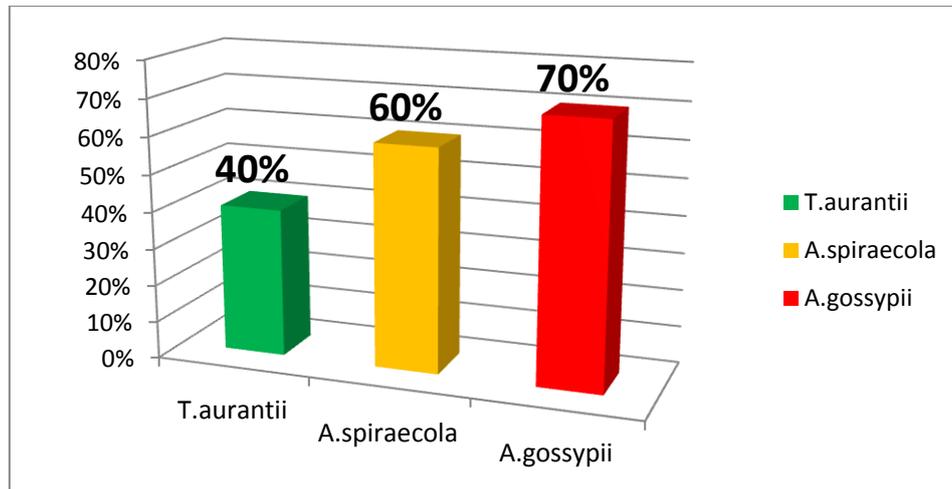


Figure 66. Taux d'infestation des pucerons (Boufarik2)

- **L'exploitation de Boufarik₁** : les symptômes observés se sont les conséquences de présence de pucerons tels que l'enroulement et crispation des feuilles, l'aspect de feuilles en forme de cuillère parfois des dessèchements de branches ont été observés. Les populations de pucerons observées ont concerné : *A. spiraecola* 60%, *A. gossypii* 65% et *T. aurantii* 50% (Fig.67)

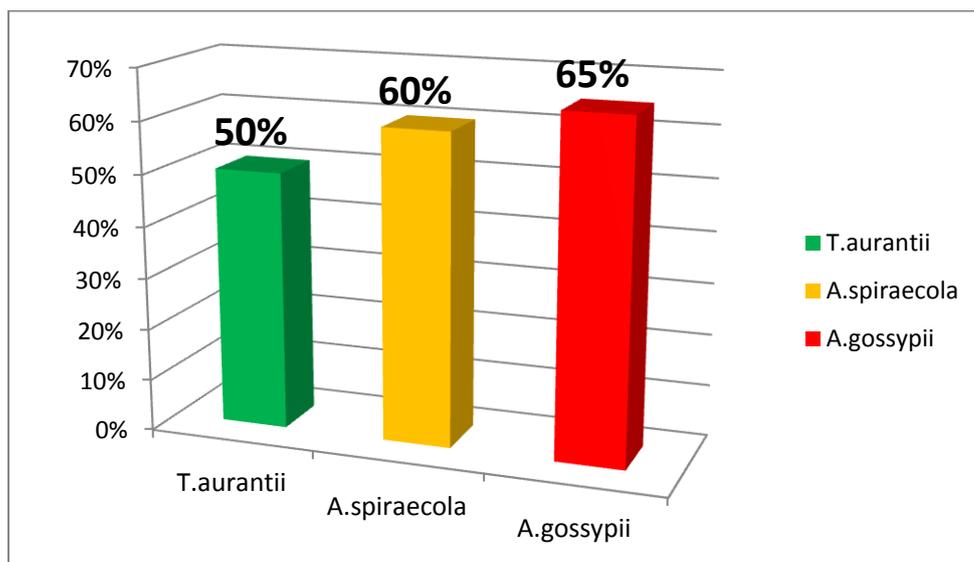


Figure 67. Taux d'infestation des pucerons (Boufarik₁)

Chapitre III : Résultats et discussion

- **L'exploitation de Chebli :** Durant la prospection, il a été observé des symptômes similaires à ceux décrits au niveau de l'exploitation de Bainame de Boufarik 1 avec une présence considérable des trois pucerons vecteurs : *T.aurantii* 82%, *A. spiraecola* 70% et *A.gossypii* 65% (Fig.68).

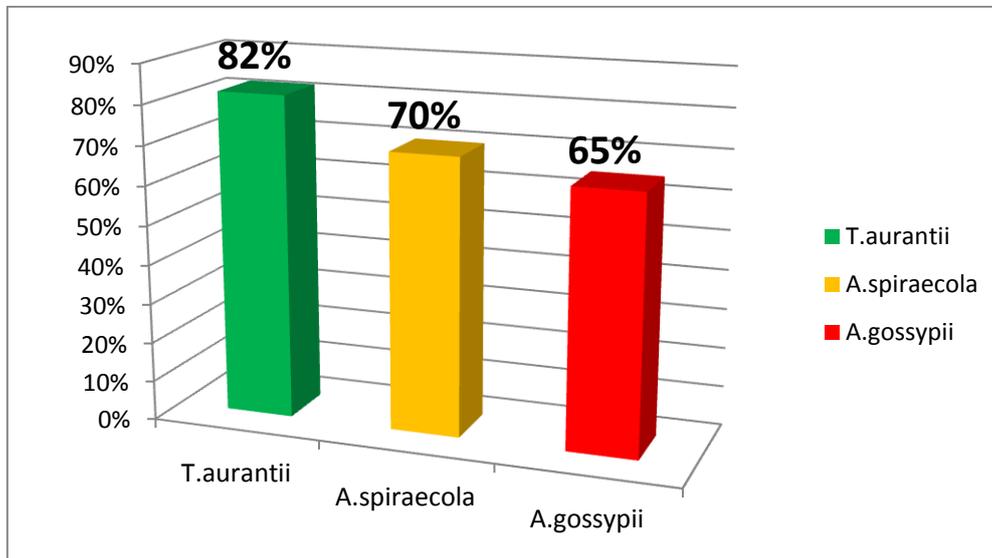


Figure 68. Taux d'infestation des pucerons (Chebli)

- **L'exploitation de Mouzaia :** les symptômes dominants dans ce verger concernaient les dessèchements des branches, la forme en cuillère des feuilles, ces symptômes pourraient être associés au virus de la tristezza, par contre la présence de l'enroulement, des déformations et des crispations foliaires étaient dus à la présence massive des populations de pucerons avec les fréquences suivantes : 80% *A.gossypii*, 70% *T.aurantii* et 65 *A.spireacola* (Fig. 69).

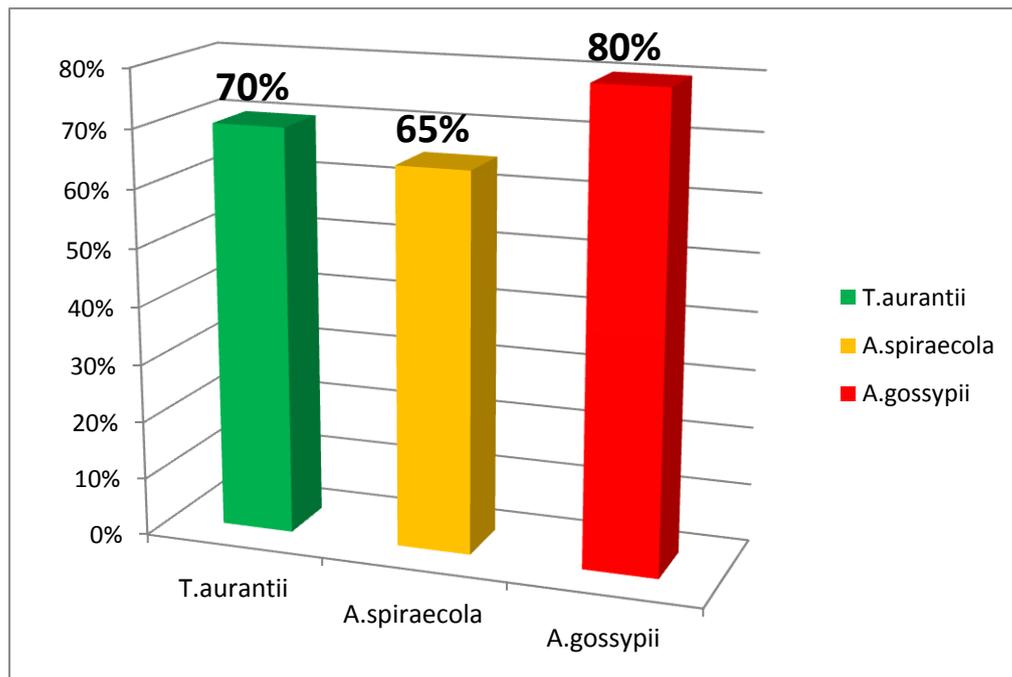


Figure 69. Taux d'infestation des pucerons (Mouzaia)

Discussion finale

La tristezza figure parmi les maladies les plus redoutables sur les agrumes disséminée par différents pucerons connus sur les agrumes, entre autres, *T. aurantii*, *A. spiraeicola*, *T.citricida* etc. Considérant que certains pucerons vecteurs du CTV ont déjà été répertoriés en Algérie (El Ferran, 2003), (Bouafia, 2011), (Moudoud, 2012). La présente étude vise surtout à quantifier la présence et l'incidence ainsi que les dégâts engendrés par les pucerons identifiés sur les agrumes. Il est à noter que *T. aurantii*, *A. spiraeicola* et *A. gossypii*, vecteurs du virus de la tristezza retrouvés sur nos agrumes, peuvent devenir des parasites clés et peuvent disséminer le virus de la tristezza, comme ce fut le cas des épidémies de tristezza survenues en Espagne par l'espèce *A. gossypii* (Cambra *et al.*, 2000).

III.3. Résultats de l'analyse sérologique (DTBIA, ELISA) pour les trois campagnes.

Les résultats des taux d'infections par le CTV des différents échantillons récoltés durant les trois campagnes agrumicoles 2009/2012 par les deux techniques sérologiques (ELISA et DTBIA) sont représentés dans le (Tab.9).

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 9. Taux d'infections par le CTV des différents échantillons récoltés durant les trois campagnes agrumicoles 2009/2012 (ELISA et DTBIA)

Espèces/variétés	Sites prospectés		
	Nbre d'échantillons testés	Nbre éch.infectés	% d'infection
Vergers Etatiques et privés			
Groupe des orangiers			
Navel	1149	190	16.53
Valencia late	140	00	
Double fine	18	04	22.2
Jaffa	17	10	58.8
Tarocco	83	44	53.01
Total	1407	248	17.6
Parcs à bois et vergers privés			
Groupe des mandariniers			
Satsuma	256	59	23.04
Clémentines	338	28	8.2
Mandarines	122	88	72.1
Citrons	70	4	5.7
Total	786	176	22.7
Grand total	2193	427	25.6

III.3.1. Résultats des analyses par DTBIA (campagne agrumicole 2009/2010).

Sur une totalité d'environ 902 échantillons collectés sur 7 sites prospectés. Un nombre de 707 échantillons a été analysés par le test (DTBIA), selon le protocole établi par Garnsey et al. (1993), pour la détection sérologique du CTV, 173 se sont révélés positifs avec des taux d'infection variable pour chaque site échantillonné (Fig. 70). Le taux d'infection global était de 25,18%.

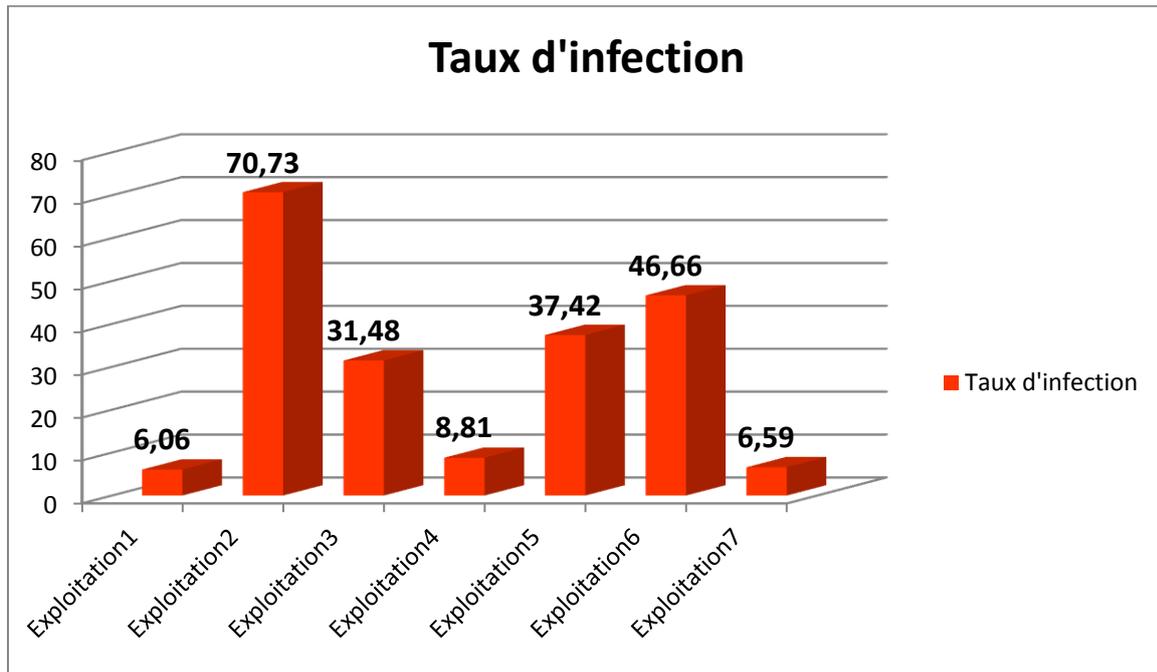


Figure 70. Taux d'infection par le CTV dans les différents sites échantillonnés

Discussion

L'analyse du taux d'infection par le virus de la tristezza sur différents sites nous a permis de confirmer une large distribution de la maladie sur les sites prospectés et la présence de l'agent causal à un taux élevé dans certains cas. Ces taux d'infection par le virus étaient différents d'un site à un autre, c'est ainsi que l'exploitation 2 (Boufarik1) a enregistré le taux le plus élevé, (70,73%), suivie par l'exploitation 6 (Mouzaia) (46.66%), l'exploitation 5 et 3 (Boufarik 2 et Chebli), qui ont enregistré presque le même taux d'infection (plus de 30%), et enfin l'exploitation 1 et 7 (Blida et Hadjout) qui ont enregistré le plus faible taux d'infection dépassant les 6%.

D'après la distribution de la maladie dans les sites prospectés il y a lieu de souligner que toutes les exploitations sont situées dans une zone très proche l'une de l'autre (entre 5 et 20 km) dans la zone de la Mitidja (wilaya de Blida), dont Université de Blida, Guerouaw, Chiffa, Boufarik différentes localités et une exploitation (Mouzaia) dans la wilaya de Tipaza .

Vu l'importance des symptômes observés sur l'ensemble des vergers échantillonnés et vu l'ampleur des taux d'infections enregistrés dans les différentes exploitations, certaines

Chapitre III : Résultats et discussion

exploitations ont été étudiées individuellement afin de connaître le taux d'infection relatif aux espèces et variétés (Fig. 67 et Fig.68).

■ Exemples sur certaines exploitations (taux d'infestation par espèces)

- **Exploitation 1 (Station expérimentale de l'institut d'agronomie de Blida) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 33 échantillons (variété Thomson navel) collectés, 2 échantillons se sont révélés positifs, atteignant un taux d'infection de 6,06%. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes associés à la tristeza sur certains arbres de cette exploitation.
- **L'exploitation 2 (Boufarik₁):** le test de DTBIA a été réalisé sur 82 échantillons collectés (variété mandarine), 58 échantillons ont réagi positivement, le taux d'infection a été de 70,73%. Ce qui confirme les symptômes observés sur terrain (feuille en cuillère, dessèchement des branches et mort totale de l'arbre).
- **L'exploitation 3 (Chebli) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 54 échantillons récoltés (variété Clémentine), 17 échantillons se sont révélés positifs, avec un taux d'infection de 31,48%, ce qui confirme les symptômes observés sur terrain. .
- **L'exploitation 4 Guerouaw (Soumaa) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 68 échantillons récoltés, 6 échantillons se sont révélés positifs (Thomson et W. navel), avec un taux d'infection de 8,82%.
- **L'exploitation 5 de Boufarik 2 (parc à bois):** le test de DTBIA a été réalisé sur 171 échantillons récoltés avec différentes espèces (W. navel, Satsuma, Salustiana, Pamplémoussier, Tarocco), 64 échantillons se sont révélés positifs, avec un taux d'infection de 37,42% (Fig. 71). Cinq variétés sont représentées dans les résultats du test DTBIA avec des taux différents.

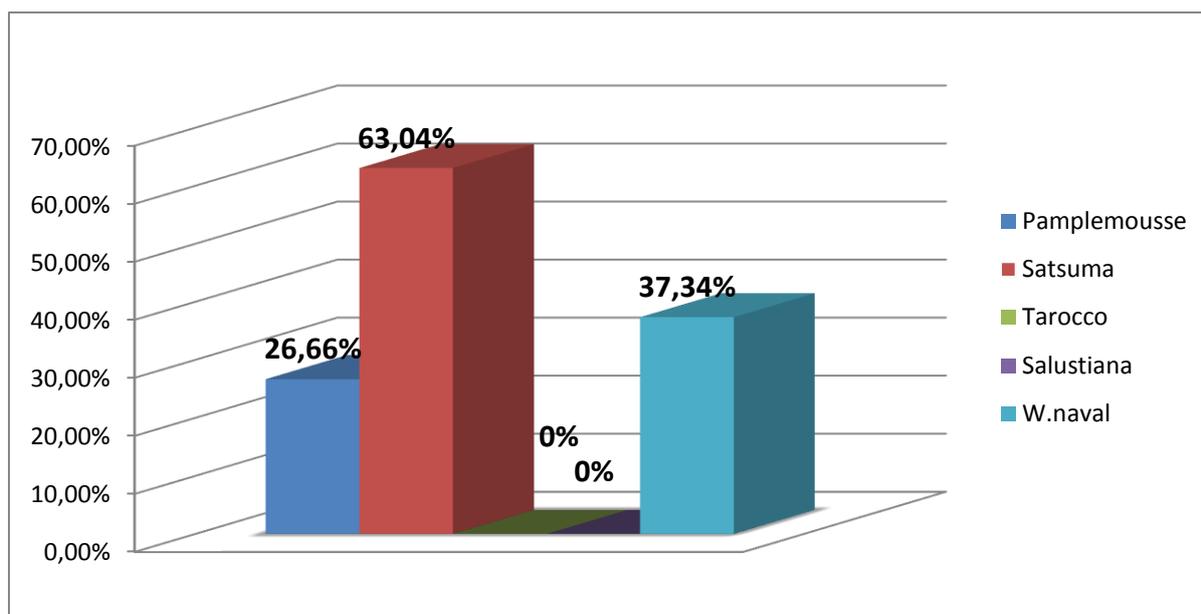


Figure 71. Taux d'infection par le CTV de différentes espèces Boufarik₂ (Exploitation 5)

Discussion

L'exploitation de Boufarik₂ a enregistré un taux d'infection élevé avec le mandarinier Satsuma (63.04%), suivie par W.naval et le pamplemoussier avec 37.34% et 26.66 % respectivement. Par contre, les deux variétés de mandarinier (Tarocco et Salustiana) ont été négatives.

- **L'exploitation 6 Mouzaia :** le test de DTBIA a été réalisé sur 15 échantillons testés avec les variétés (Thomson, Portugaise, W .navel), 7 échantillons se sont révélés positifs au CTV. Cette exploitation a présenté un taux d'infection de 46 ,66%.
- **L'exploitation 7 Semiani (Hadjout) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 284 échantillons avec les espèces/variétés suivantes (Clémentinier, Citronnier, Double fine améliorée, Valencia late, W. navel) testés, 19 échantillons ont répondu positif au CTV. Cette exploitation a présenté un taux d'infection de 6,59% (Fig. 72).

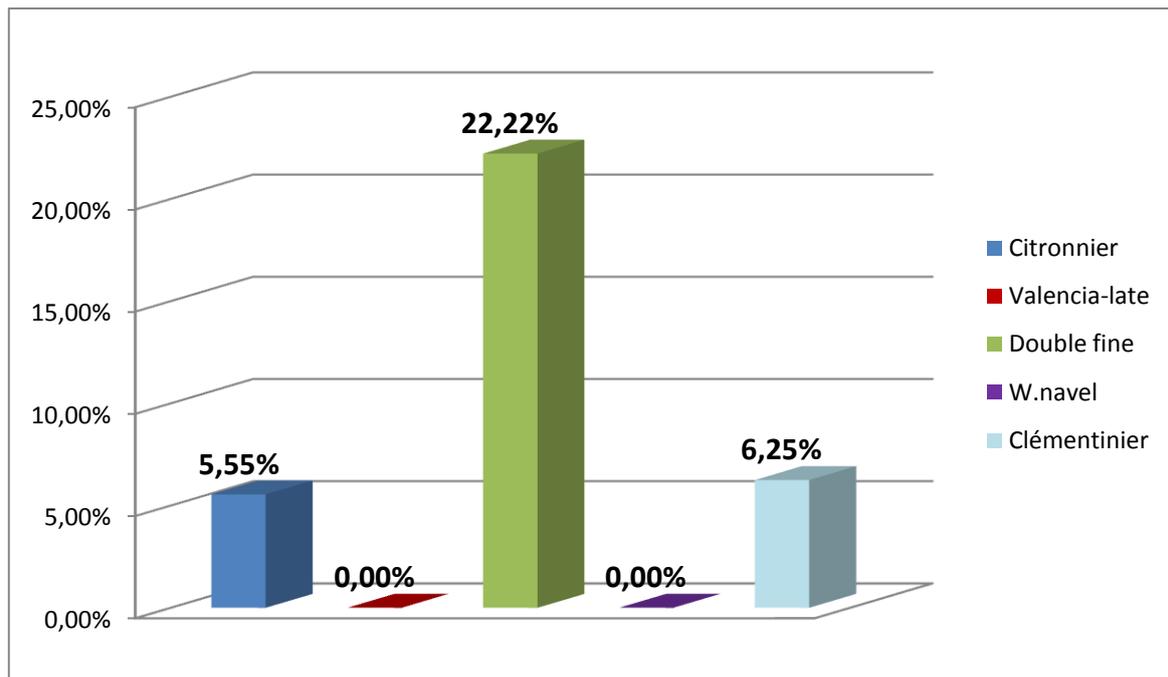


Figure 72. Taux d'infection par le CTV de différentes espèces Hadjout (Exploitation 7)

Discussion

L'analyse des taux d'infection des espèces et variétés de l'exploitation de Hadjout a montré un pourcentage élevé d'infection avec l'espèce d'oranger variété Double fine (30%), le clémentinier et le citronnier ont enregistré presque le même taux d'infection au environ du 6%, enfin les variétés Valencia late et W.navel ont été négatifs.

III.3.2. Résultats du test DTBIA (campagne agrumicole 2010-2011)

Pendant cette campagne 982 échantillons ont été prélevés et testés par la technique sérologique DTBIA, les échantillons ont été prélevés de deux sites (Boufarik 2 et Soumaa). Sur les 982 échantillons testés, 247 ont réagit positivement au CTV, avec un taux d'infection global de 25.15% (Fig.73). Les résultats de l'analyse ont révélé la présence du virus de la tristeza avec des taux d'infection élevés d'une espèce ou/variété à l'autre. Le taux le plus élevé a été obtenu, d'abord avec le groupe des mandariniers, ou le mandarinier commun a enregistré (75%), suivi par Tarocco (53.01%) et la satsuma avec un taux avoisinant les 20%. Le groupe des navels a également présenté des taux d'infection importants 23.18% pour

Chapitre III : Résultats et discussion

W.navel et 29.18% pour T.navel .Enfin le taux le plus bas a été obtenu avec le clémentinier (1.42%).

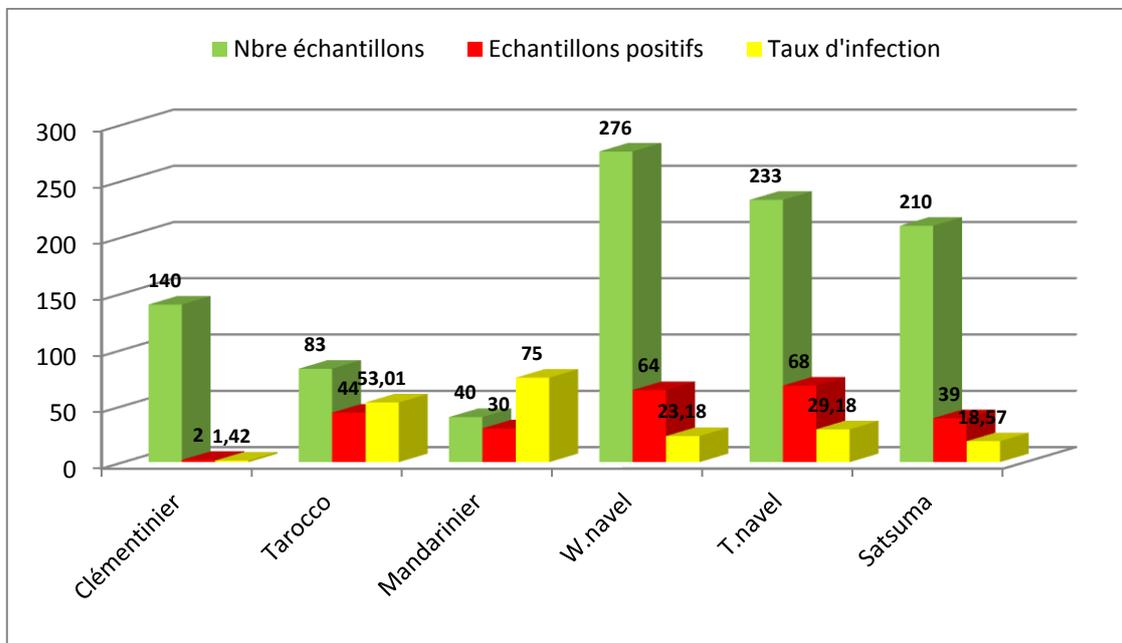


Figure 73. Taux d'infection par le CTV des espèces ou/variétés (Boufarik₂ et Soumaa).

III.3.3. Résultats du test DTBIA (campagne agrumicole 2011-2012)

Sur les 309 échantillons testés par DTBIA, 57 ont réagi positivement au CTV, avec un taux d'infection global de 21.59% (Fig.74).

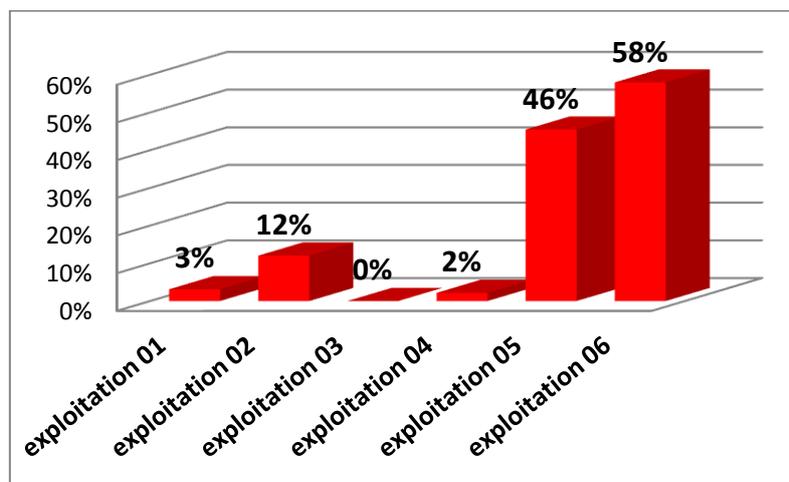


Figure 74. Taux d'infection par le CTV dans les différents sites prospectés

Chapitre III : Résultats et discussion

Discussion

L'analyse du taux d'infection par le virus de la tristeza sur les différents sites prospectés et échantillonnés durant la campagne agrumicole 2011-2012, nous a permis de confirmer une large distribution de la maladie avec des taux élevés dans certaines exploitations et sur certaines variétés, sauf pour le matériel analysé au niveau de l'exploitation 03, où les tests ont été négatifs, s'agissant de matériel de base conservé sous serre à l'ITAFV. L'exploitation 06 et 05, ont montré des taux d'infection les plus élevés avec les variétés (T. navel et Jaffa), avec 58% et 48% respectivement, cela confirme les résultats d'analyses effectués dans les années précédentes sur les mêmes sites (El Ferran,2003), (Moudoud,2012), également pour les exploitations 01, 02 et 04, les taux sont faibles, mais c'est toujours relatif vu le nombre d'échantillons prélevés.

■ Exemples d'infection du *CTV* par espèces dans les sites prospectés

- **Exploitation 01 (Univ.agronomie) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 32 échantillons variété (Thomson navel) collectés, 1 échantillon s'est révélé positif, atteignant un taux d'infection de 3%.(Fig.75). Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes associés à la tristeza sur certains arbres de cette exploitation.
- **Exploitation 02 (Guerouaw) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 83 échantillons variété (W. navel) collectés, 10 échantillons se sont révélés positifs, atteignant un taux d'infection de 12% (Fig.75). Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes associés à la tristeza sur certains arbres de cette exploitation.
- **Exploitation 03 (ITAFVsiège) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 5 échantillons différentes variétés collectés, aucun échantillon n'a réagi au test DTBIA. Les résultats de ce test ont confirmé l'absence d'infection sur le matériel échantillonné s'agissant de matériel de base conservé sous serre (Fig. 75).
- **Exploitation 04 (Semiani Hadjout) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 46 échantillons variété (W. navel) collectés, 1 échantillon s'est révélé positif, atteignant un taux d'infection de 2,17% (Fig.75).Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes associés à la tristeza sur certains arbres de cette exploitation.

Chapitre III : Résultats et discussion

- **Exploitation 05 (Mouzaia) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 126 échantillons variété (T. navel), 57 échantillons se sont révélés positifs, atteignant un taux d'infection de 45.5%. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes associés à la tristeza sur certains arbres de cette exploitation (Fig.75).
- **Exploitation 06 (Boufarik₂) :** le test de DTBIA a été réalisé sur 17 échantillons variété (Jaffa), 10 échantillons se sont révélés positifs, atteignant un taux d'infection de 58%. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes associés à la tristeza sur certains arbres de cette exploitation (Fig. 75).

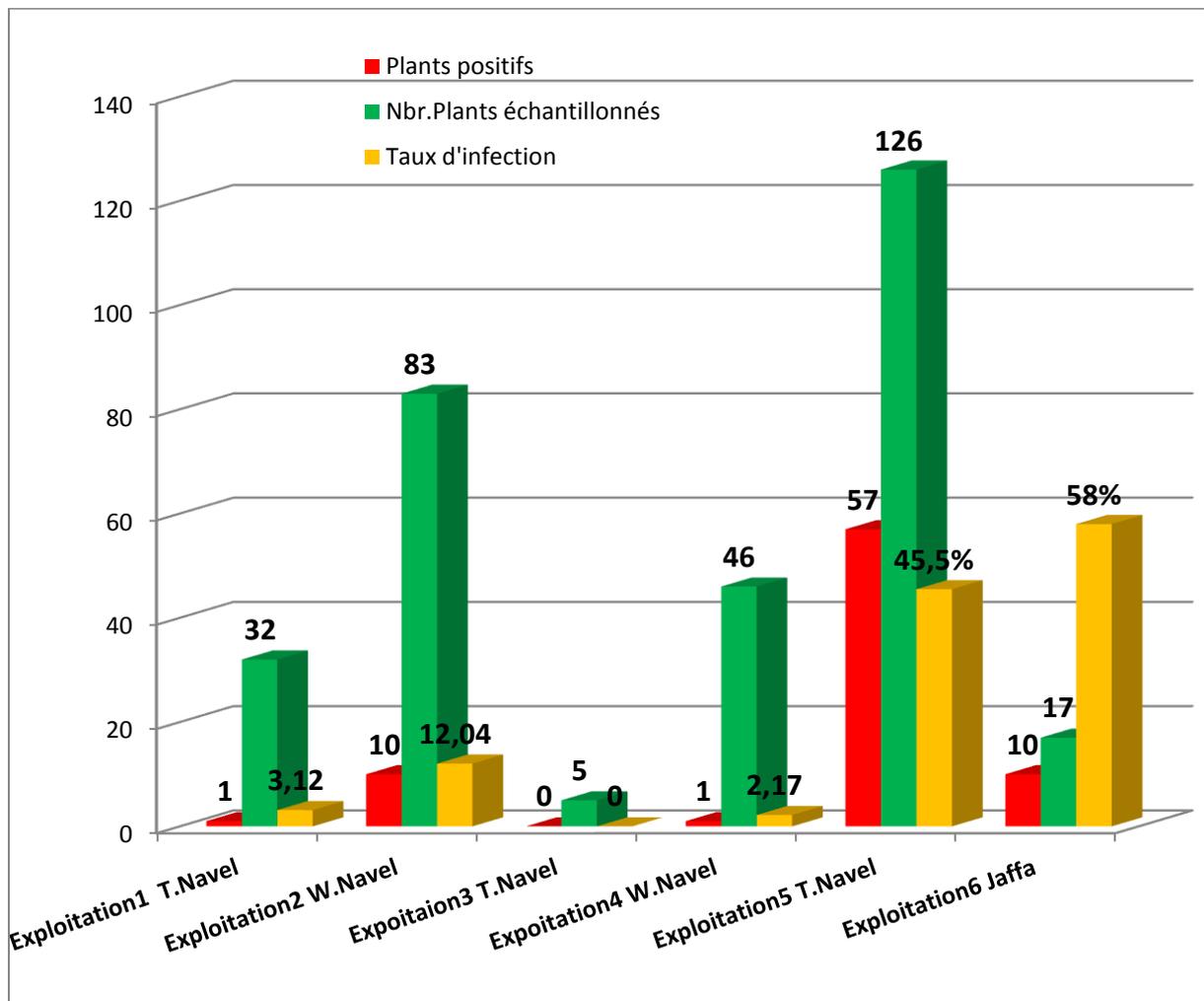


Figure 75. Taux d'infection par le CTV et par espèces dans les sites prospectés

Chapitre III : Résultats et discussion

Discussion

Le virus du *CTV* a été détecté dans la plupart des vergers prospectés pendant la campagne agrumicole 2012, à l'exception (parc à bois ITAFV siège) s'agissant d'un matériel végétal catégorie base. L'incidence de la maladie est représentée par des taux d'infection compris entre 2% et 58%. Les exploitations les plus infectées, sont les exploitations (5 et 6) Mouzaia et Boufarik 2, qui ont enregistré respectivement des taux d'infections de 46% et 58%, pour les variété T. navel avec la variété Jaffa. Les résultats d'analyse par le test DTBIA ont confirmé les observations symptomatologiques.

Discussion générale sur la détection sérologique par DTBIA durant les trois campagnes

Les résultats du test sérologique DTBIA effectués durant les trois campagnes sur toutes les exploitations révèlent des taux d'infection élevés par le virus du *CTV*, et ce, pour la majorité des espèces et des cultivars, certaines espèces sont très touchées par cette maladie notamment le mandarinier, le clémentinier et l'oranger avec toutes les variétés.

Durant l'année (2009/2010) l'exploitation Boufarik1 a été la plus touchée par le *CTV* avec un taux d'infection est de 70,73% obtenu avec le (mandarinier), suivi par l'exploitation Boufarik 2 (parc à bois), qui a enregistré un taux d'infection élevé avec le mandarinier Satsuma (63.04%), suivie par W. navel et le pamplemoussier avec 37.34% et 26.66 % respectivement. Par contre les deux variétés de mandarinier Tarocco et Salustiana ont été négatifs. Au niveau de l'exploitation Mouzaia, l'oranger Washington navel a enregistré un taux d'infection de 46,66%, suivi par la variété Clémentine de l'exploitation de Chebli qui a enregistré un taux d'infection de 31,48%. Concernant les autres exploitations Blida (Univ.), Hadjout et Soumaa , le taux d'infection a été relativement faible allant de 6.06, 6, 59, et 8,82 respectivement. Pour la campagne 2010/2011, et sur plus de 900 échantillons toutes espèces ou/variété confondues récoltées à partir de deux sites dans la même zone (Boufarik), les résultats sont toujours positifs au virus de la tristezza et les taux d'infection sont élevés pour l'ensemble d'espèces et de variétés, le groupe des mandariniers vient en tête avec (75%, 53.01% et 18.57%), suivi par le groupe des navels avec plus de 20%.

Durant 2012, les résultats ont révélé des taux toujours élevés avec l'exploitation (Boufarik 2 parc à bois) où l'oranger Jaffa a enregistré 58%, suivi par un autre taux d'infection important 45.5%, obtenu avec la variété Thomson navel au niveau de l'exploitation de Mouzaia. Concernant l'aspect variétal, toutes les variétés testées ont montré une certaine sensibilité au

Chapitre III : Résultats et discussion

virus de la tristeza. Cette sensibilité est accentuée à travers l'association des cultivars avec le porte-greffe *Citrus aurantium* (bigaradier) et probablement l'efficacité dans la transmission du virus par les pucerons.

D'autres aspects ont été pris en considération pour analyser cette situation, ces aspects sont en relation avec le matériel végétal, son origine, l'âge de plantation, le porte-greffe, la conduite des vergers à travers l'entretien et la vigilance vis-à-vis de cette maladie avec la présence de vecteurs du *CTV*. Suite aux informations obtenues durant les prospections et l'échantillonnage effectués sur des nouvelles plantations ainsi que sur des vergers âgés dans la zone de la Mitidja (Blida, Tipaza), l'analyse a montré que dans l'ensemble l'entretien des vergers n'est pas rigoureusement bien appliqué.

Le bigaradier est malheureusement le seul porte greffe sur lequel sont greffées les arbres dans l'ensemble des plantations, quant à l'origine du matériel végétal, c'est toujours la même origine (matériel de propagation de Boufarik). Cependant, la dissémination de la maladie laisse soupçonner l'implication de toutes ces données, des plantations âgées et de nouvelles plantations conduites sur le bigaradier sont toutes touchées par la tristeza, l'origine du matériel est le même, la présence des pucerons vecteurs et le manque de contrôle ont contribué sans doute à cette situation.

III.3.4. Résultats du test DAS-ELISA

Disposant d'un kit Elisa pour le contrôle du *CTV*, plus de 400 échantillons ont été analysés au laboratoire de virologie du département d'agronomie (Univ.Blida) par la technique sérologique DAS-ELISA. Les résultats du test ont révélé 97 échantillons positifs au virus de la tristeza, enregistrant ainsi un taux d'infection global de 24,25%. Les taux d'infection étaient variables dans chaque site (Fig.76).

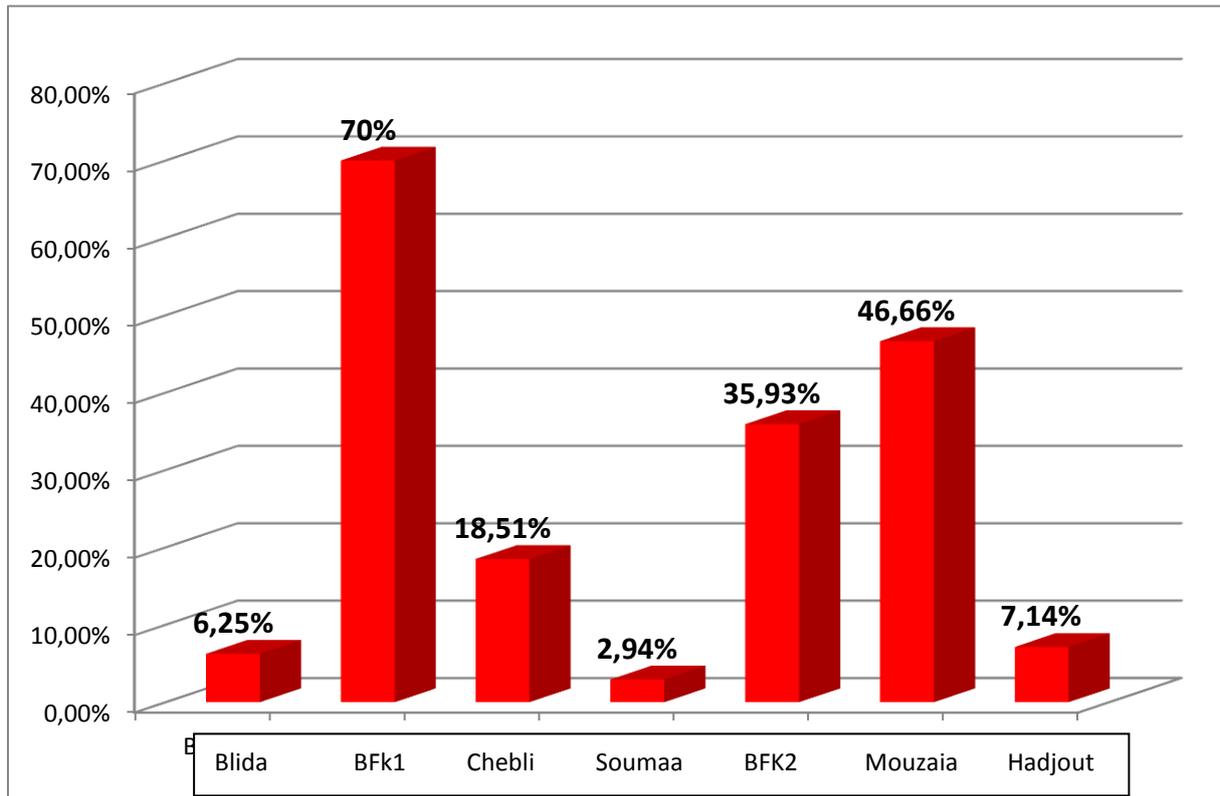


Figure 76. Taux d'infection (*CTV*) par ELISA dans les différents sites échantillonnés

Discussion

Les résultats ont montré que le *CTV* est détecté dans la plupart des exploitations prospectées et échantillonnées. L'incidence du *CTV* varie entre 2,94% à 70%.

Des taux sont différents d'une espèce ou/variété à l'autre. La maladie est présente cela confirme encore les résultats obtenus par la technique sérologique DTBIA. Vu l'importance des symptômes observés sur l'ensemble des vergers échantillonnés et vu l'ampleur des taux d'infections enregistrés dans les différentes exploitations, certaines stations ont été étudiées pour illustrer les taux d'infection relatifs aux espèces et variétés (Boufarik2 et Hadjout).

Chapitre III : Résultats et discussion

■ Résultats du test ELISA (Exemples exploitations)

- **La station expérimentale de l'institut d'agronomie de Blida** : le test de DAS-ELISA a été effectué sur 16 échantillons collectés, 1 échantillon s'est révélé positif. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes et le taux d'infection est de 6,25%.
- **L'exploitation 01 (Boufarik₁)** : le test de DAS-ELISA a été effectué sur 40 échantillons collectés, 28 échantillons ont été positifs. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes et le taux d'infection est de 70%.
- **L'exploitation 02 (Chebli)** : le test de DAS-ELISA a été effectué sur 27 échantillons collectés, 05 échantillons ont été positifs. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes et le taux d'infection est de 18.51%.
- **L'exploitation 03 (Soumaa)** : le test de DAS-ELISA a été effectué sur 34 échantillons collectés, 01 échantillon a été positif avec un taux d'infection est de 2.94%
- **L'exploitation 04 (Boufarik₂)** : le test de DAS-ELISA a été effectué sur 128 échantillons collectés, 46 échantillons ont été positifs. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes et le taux d'infection est de 35.93% (Fig.77).

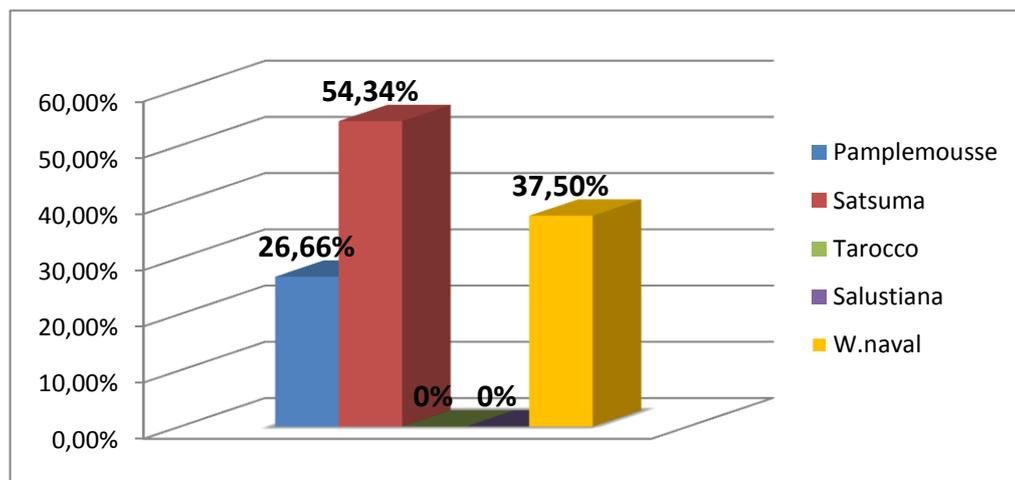


Figure 77. Taux d'infection (CTV) par ELISA de différentes espèces (Boufarik₂)

Chapitre III : Résultats et discussion

L'analyse des résultats sur l'exploitation de Boufarik₂, montre que trois espèces ont affiché des taux d'infection élevés, d'abord avec la Satsuma avec plus de 54%, suivie par l'espèce W.navel 37.50% et le Pamplemoussier avec plus de 26%. Des résultats négatifs ont été obtenus avec Salustiana et Tarocco.

- **L'exploitation 05 (Mouzaia) :** le test de DAS-ELISA a été effectué sur 15 échantillons collectés, 07 échantillons ont été positifs. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes et le taux d'infection est de 46.66%
- **L'exploitation 06 (Hadjout) :** le test de DAS-ELISA a été effectué sur 140 échantillons collectés, 10 échantillons ont été positifs. Les résultats de ce test ont confirmé les observations des symptômes et le taux d'infection est de 7.14% (Fig.78).

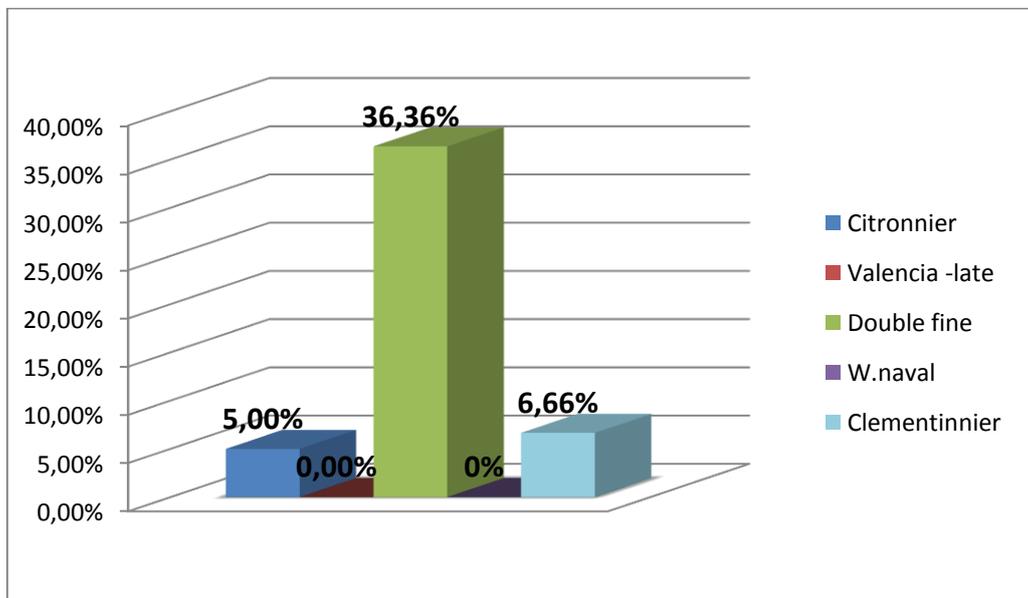


Figure 78. Taux d'infection (CTV) par ELISA de différentes espèces (Hadjout)

L'analyse des résultats des pourcentages d'infection de la station de Hadjout a montré un taux très élevé pour l'espèce oranger Double fine (36.36%), le clémentinier et le citronnier ont affiché des taux similaires entre 5 et plus de 6%. L'oranger Valencia late et W.navel ont été négatifs.

Chapitre III : Résultats et discussion

Discussion

Les résultats du test ELISA ont montré que l'exploitation de Boufarik₁ est la plus touchée par cette maladie avec un taux d'infection de 70% sur mandarinier, ensuite le parc à bois de Boufarik₂ où la variété Satsuma est la plus atteinte par le *CTV* par rapport aux autres variétés testées dans cette exploitation avec un taux d'infection de 54,34%, suivi par l'exploitation de Mouzaia où l'oranger *W. navel* a enregistré un taux d'infection de 46,66%, suivi par la variété double fine de l'exploitation de Hadjout avec un taux d'infection de 36,36% et enfin la variété Clémentine avec un taux d'infection de 18,51% au niveau de l'exploitation de Chebli. Les autres exploitations ont présenté un taux d'infection relativement faible par rapport aux autres exploitations Soumaa (2,94%) et station expérimentale de l'institut d'agronomie de Blida (6,25%).

Discussion finale sur la détection sérologique ELISA /DTBIA

Le *CTV* est constitué d'une mixture de souches biologiquement et génétiquement diverse et peut causer différentes anomalies comme il peut ne pas manifester des symptômes. Cet aspect dépend de plusieurs facteurs tels que la virulence des souches, (sévères et atténuées), le cultivar et le porte greffe, le vecteur et les conditions environnementales. Il est intéressant de signaler que la maladie était diffuse dans la zone prospectée, que ce soit dans les vergers commerciaux, ou ceux gérés par les structures étatiques, mais le plus grave reste la présence de quelques cas détectés sur les vergers où est collecté le matériel de propagation (parc à bois Boufarik₂).

La prospection effectuée sur plus de 2000 échantillons a montré un taux d'infection de 25.6%. La majeure partie des espèces/variétés testées se sont avérées infectées par le virus avec des taux d'infection qui diffèrent d'une variété/clone à l'autre.

Le taux d'infection élevé par le virus de la tristezza enregistré dans la région de la Mitidja serait dû probablement à l'utilisation de matériel de propagation déjà infecté à l'origine, considérant que la majorité des pépinières d'agrumes se trouvent dans cette zone et également à la présence de plusieurs espèces de pucerons-vecteurs. D'autre part, les symptômes évidents de dépérissement qui sont associés à la maladie seraient dus aux arbres greffés sur le porte greffe bigaradier, sensibles au *CTV*. L'incidence réelle de la Tristezza dans la région de la Mitidja n'a jamais été définie avec précision, mais ce taux d'infection enregistré dans

Chapitre III : Résultats et discussion

plusieurs exploitations et la rapidité dans la dissémination de cette maladie depuis le début des années 2000, confirme la présence de vecteurs efficaces du virus de la tristeza.

III.4. Efficacité de diagnostic entre le test DTBIA et DAS-ELISA

Les méthodes sérologiques sont largement utilisées pour la détection du virus de la Tristeza (*CTV*). De nombreux fabricants proposent des sérums et kits de détection du *CTV*. La plupart d'entre eux sont des sérums polyclonaux. Il existe aussi des sérums monoclonaux, notamment celui produit par Ingenasa qui a valeur de référence. L'immunoempreinte ou DTBIA est une technique dérivée de l'ELISA qui permet de révéler sur membrane des empreintes de tissus végétaux réalisées directement au champ. Une des conditions de sa réussite est la bonne répartition du virus dans la plante. Sa rapidité et sa simplicité de mise en œuvre font qu'elle est très largement utilisée dans les programmes de surveillance du *CTV* (Ribouchon et Thermozy (2009)). Les résultats obtenus par la technique sérologique Elisa confirme ceux obtenus par la technique sérologique DTBIA, seulement l'objectif était de vérifier l'efficacité des deux techniques. Suite aux résultats mentionnés dans le tableau ci-dessous (Tab.10) , certains échantillons qui n'ont pas réagi à la DAS-ELISA, se sont montrés positifs avec la technique DTBIA (annexe 6), par conséquent, les résultats d'analyse montrent que la technique DTBIA est plus sensible et rapide dans l'exécution de l'analyse, en plus, elle présente d'autres avantages, elle ne nécessite aucune préparation ou extraction de l'échantillon, la préparation des échantillons peut se faire directement en plein champ (Garnsey et al., 1993 ;Cambra et al., 2000b).La méthode DTBIA est effectuée par plusieurs empreintes faites singulièrement sur la membrane alors que pour ELISA on extrait un échantillon mixte qui pourrait avoir un effet de dilution ,surtout que, le virus n'est pas distribué en homogénéité sur l'arbre.La DTBIA constitue un outil de detection massale du virus de la tristeza (*CTV*) avec des couts de réalisation qui sont inférieurs à ceux de l'ELISA.

Chapitre III : Résultats et discussion

Tableau 10. Résultats de comparaison entre DTBIA et DAS-ELISA

Sites prospectés	Nbre Espèces/variétés	ELISA	DTBIA
Hadjout	Citronnier E39	Négatif	positif
BFK 1	Mandarinier E25 E26 E32 E33	Négatif	Positif
Chebli	Clémentinier E2 E22	Négatif	Positif
BFK 2	W. navel E36 E37	Négatif	Positif

III.5. Identification biologique et efficacité de la transmission par pucerons vecteurs (plantes herbacés et ligneuses).

III.5.1. Transmission par pucerons sur plantes herbacés

Les feuilles des plantules de pois variété Kelvedon inoculées par les pucerons (Fig.79), ont extériorisé des symptômes d'enroulement des feuilles, des taches foncées et un nanisme (Tab.11).

Tableau 11. Résultats de la transmission par pucerons sur les plantules de pois.

Vergers	Variétés	Espèces aphides	Symptômes sur pois	Réaction DAS-ELISA
(Univ.Blida) Station d'agronomie	T. navel	<i>A. citricola</i>	Elt F., T. F., N	+
		<i>T. aurantii</i>	Elt F., T. F., N	-
		<i>Aphis gosstpii</i>	Elt F.; T.F., N	+
Boufarik ₂	Satsuma	<i>A.citricola</i> <i>T.aurantii</i>	Elt F., T.F., N Elt F.; T.F., N	- +
	Pamplemousse	<i>A. gossypii</i>	Elt F.; T.F., N	+
Boufarik ₁	Mandarine	<i>A.citricola</i> <i>T.aurantii</i> <i>A. gossypii</i>	Elt F., T.F., N Elt F.; T.F., N Elt F.; T.F., N	- + +
Mouzaia	Thomson	<i>A. citricola</i> <i>T. aurantii</i> <i>A. gossypii</i>	Elt f., T. F., N Elt F.; T.F., N Elt F.; T.F., N	+ + +

Elt F. : enroulement foliaire, T. F. : taches foncées sur feuilles, N : Nanisme, + : Présence



Figure 79. Inoculation par pucerons sur plantules de pois (serre du lab.de virol.Univ.Blida)

Discussion

La transmission du virus de la tristezza sur plantes herbacées a été étudiée par (Muller et al., 1974). L'espèce *Passiflora gracilis* pourrait contenir le virus de la tristezza des citrus et induire des symptômes frappants. La *CTV* a été transmis par *T. citricida* d'agrumes infectés à *P. gracilis*. Les chercheurs ont essayé la transmission vectorielle de *CTV* à de nombreuses mauvaises herbes, mais ont constaté que seul *Passiflora* pourrait être infecté. Ils ont également constaté que les isolats sévères de *CTV* tuent habituellement des plantes de *Passiflora gracilis*. Peu de travaux ont été réalisés sur la transmission du virus sur plantes herbacées.

Les résultats de la transmission biologique du *CTV* de différentes espèces et variétés d'agrumes par les pucerons-vecteurs sur les plantules de pois au niveau de la serre de virologie (Univ.Blida), ont montré une sensibilité de la plante indicatrice à la transmission du virus par les pucerons. Les résultats de DAS-ELISA obtenus sur les échantillons de feuilles de ces plantules permettent de conclure que les trois espèces de pucerons sont toutes efficaces dans la transmission des particules virales du *CTV* et cela confirme encore les résultats de la détection du virus par les tests sérologiques DTBIA et ELISA. Ces résultats méritent d'être

Chapitre III : Résultats et discussion

exploités pour une étude plus profonde mettant en comparaison les résultats d'autres chercheurs dans ce domaine.

III.5.2. Transmission par pucerons sur plantes ligneuses

Environ 200 plants de lime mexicaine et de bigaradier ont été inoculés par des pucerons (*A.gossypii*, *T.aurantii* et *A.spiraecola*).Après quelques mois depuis l'inoculation, certains symptômes ont été observés sur les deux espèces, entre dessèchement et l'éclaircissement des nervures observés sur quelques plants de la lime mexicaine. Les plants inoculés ont été analysés par la DAS-ELISA, 35% des échantillons ont été positifs au virus de la tristeza. La comparaison de l'efficacité de transmission entre les trois espèces de pucerons sur deux espèces d'agrumes inoculées, montre que la lime mexicaine présente des taux d'infection plus élevés avec *A. gossypii* par rapport aux deux autres espèces de puceron (*A.gossypii* 68 %, *A.spiraecola* 35%, *T.aurantii* 55%), les mêmes observations ont été faites sur le bigaradier qui montre des taux d'infection un peu moins élevés que ceux obtenus chez la lime mexicaine, mais c'est toujours *A. gossypii* qui montre des résultats de transmission plus élevés (*A.gossypii* 65%, *A.spiraecola* 30%, *T.aurantii* 50%) (Fig.80). Les résultats obtenus confirment ceux obtenus dans les travaux (El-Ferran, 2003).

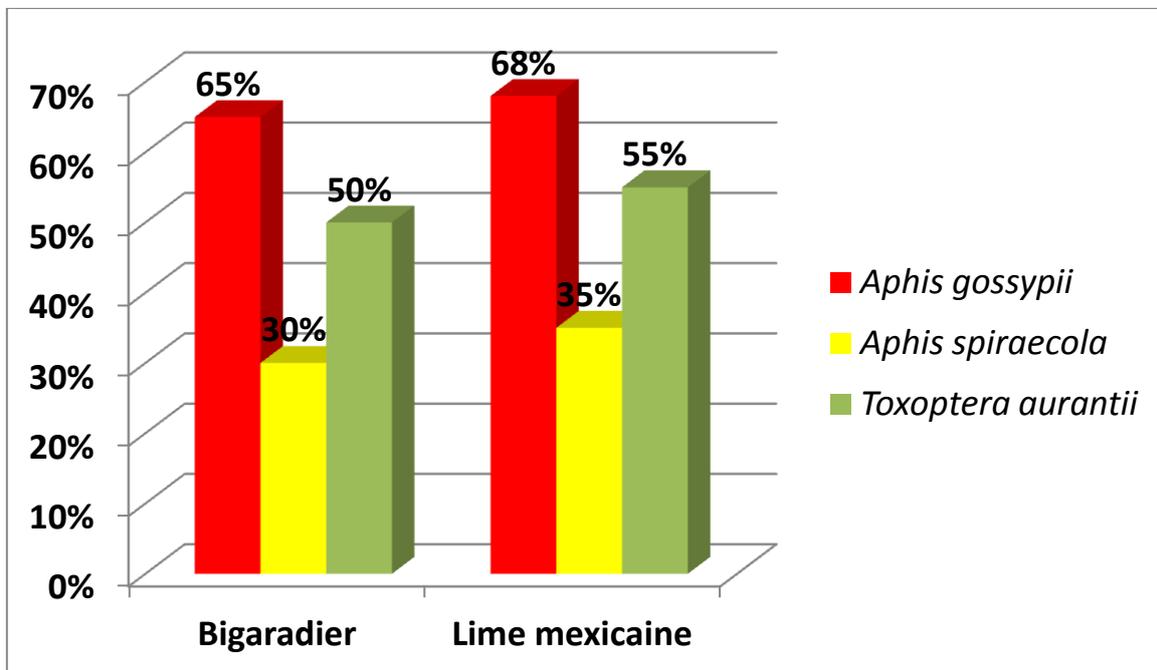


Figure 80. Efficacité de la transmission des pucerons sur le bigaradier et la lime mexicaine

Chapitre III : Résultats et discussion

III.6. Caractérisation biologique

Les sources sélectionnées pour l'indexage biologique au nombre de 39, sont représentées au niveau du tableau (Tab.12), deux mois après inoculation, l'observation des symptômes a été effectuée à partir de la troisième semaine après inoculation. Les symptômes potentiels à observer étaient l'éclaircissement de nervures, la forme en cuillère des feuilles, le bois strié et le nanisme, spécifiques au virus de la Tristeza.

Les observations faites, ont montré un éclaircissement des nervures et une forme de cuillère sur les feuilles des plantules de la lime mexicaine (Fig.81et Fig.82). Cependant aucun symptôme de bois strié ou autres symptômes de formes sévères n'ont été observé après plus de 6 mois de l'inoculation sur les autres indicateurs ligneux spécifiques pour la souche du bois strié (Tab.12).

Tableau 12. Résultats de la caractérisation biologique de 39 sources sélectionnées

Sources	Lime mexicaine (semis)	Oranger Mme Vinous (semis)	Bigaradier (semis)	Ducan grape fruit (Semis)
Orangier doux -Oranger navel -Oranger Jaffa -Oranger Tarocco	E N+ F C E N+ F C	Négatif	Négatif	Négatif
Mandarinier -Satsuma -Clementine	E N+ F C E N+ F C E N+ F C	Négatif	Négatif	Négatif

E N : éclaircissement des nervures ; FC : Forme en cuillère



Figure 81. Plants de lime mexicaine indexés sous serre IAM Bari (Larbi, 2012).



Figure 82. Eclaircissement de nervures et feuilles en forme en cuillère IAM Bari (Larbi, 2012)

II.7. Répartition spatiale de la Tristeza sur certains vergers prospectés

Durant nos prospections sur l'ensemble des vergers échantillonnés et suite aux résultats d'analyses sérologiques obtenues avec des taux d'infection élevés par le *CTV*, des représentations montrant la localisation des sujets positifs dans le verger, ont été réalisées sur certains vergers échantillonnés durant la campagne 2010, permettant d'analyser la dissémination de la maladie sur certains vergers prospectés.

Chapitre III : Résultats et discussion

En se basant sur les travaux de (Yokomi,2005) sur la transmissibilité du virus de la tristeza par les deux vecteurs connus dans la dissémination de la maladie dans le monde à savoir *T. citricida* et *A. gossypii* (Fig.83), ces résultats pourront aider d'apporter une analyse préliminaire sur le mode de dissémination de la tristeza dans les vergers prospectés.

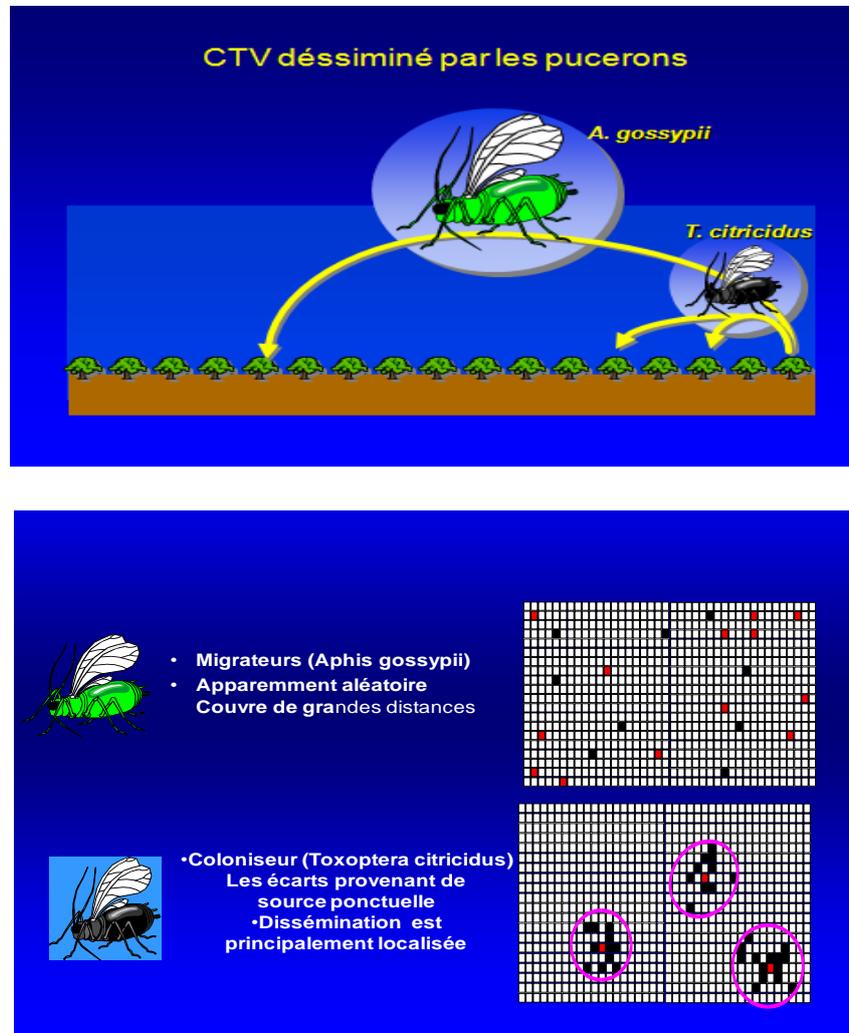


Figure 83. Incidence spatiale de vecteurs migrateurs et colonisateurs (Yokomi, 2005).

L'interprétation de ces deux figures permettra d'étudier la répartition de la maladie (localisée ou diffuse) sur la totalité du verger prospecté et de déduire le type de puceron qui sévit dans la région à travers l'étude de son vol dans l'espace. Ces informations permettront de connaître l'efficacité du vecteur dans la transmission du CTV à travers le calcul des taux d'infections d'une année à l'autre et de déduire la progression de la maladie dans le verger étudié ainsi qu'au niveau des vergers avoisinants. Cette étude permettra de cerner le problème de la tristeza et de prendre les mesures nécessaires pour stopper et éradiquer la maladie. La

Chapitre III : Résultats et discussion

répartition de la maladie dans quelques vergers prospectés est représentée par figures (84-85-86-87-88-89-90-91).



Figure 84. Répartition spatiale de la maladie sur le verger de Boufarik

NB. La légende de l'ensemble des figures de la répartition spatiale de la maladie

	Les plants échantillonnés et testés
	Les plants non échantillonnés
	Les plants testés positifs
	Les arbres de bigaradier
	Les arbres manquent

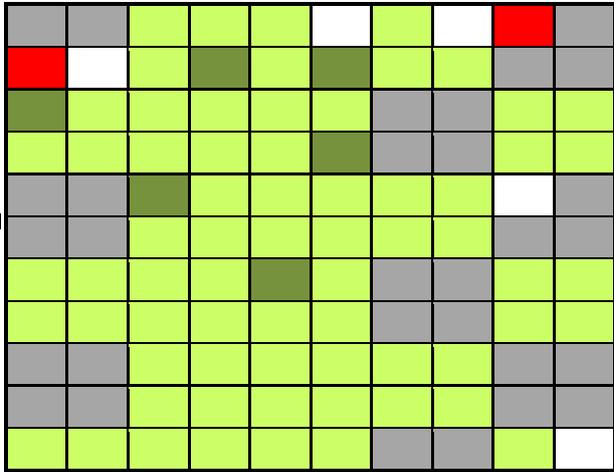


Figure 85. Répartition spatiale de la maladie sur le verger d'agronomie (Thomson)

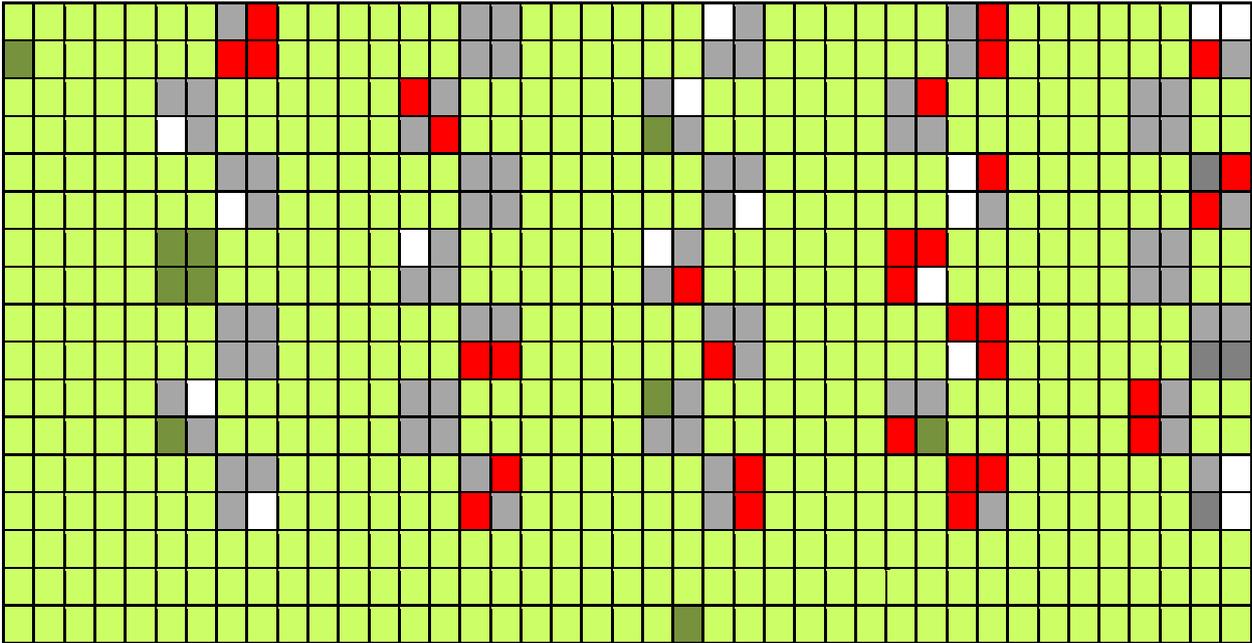


Figure 86. Répartition de la maladie sur le verger Parc à bois (Boufarik 2) W.navel

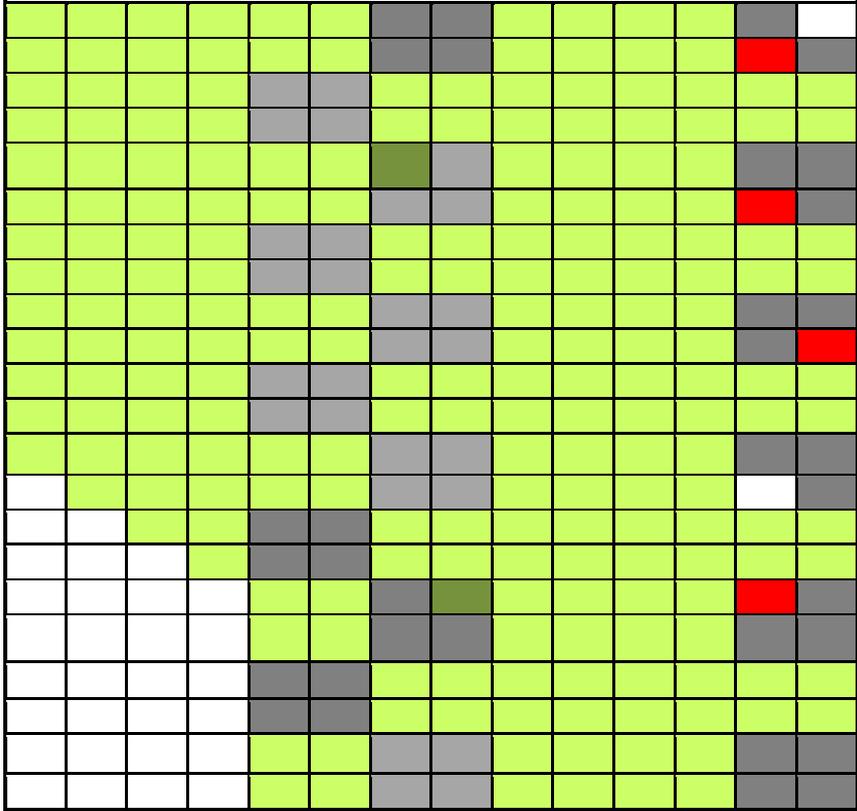


Figure 87. Répartition de la maladie sur le verger de Hadjout (Double fine)

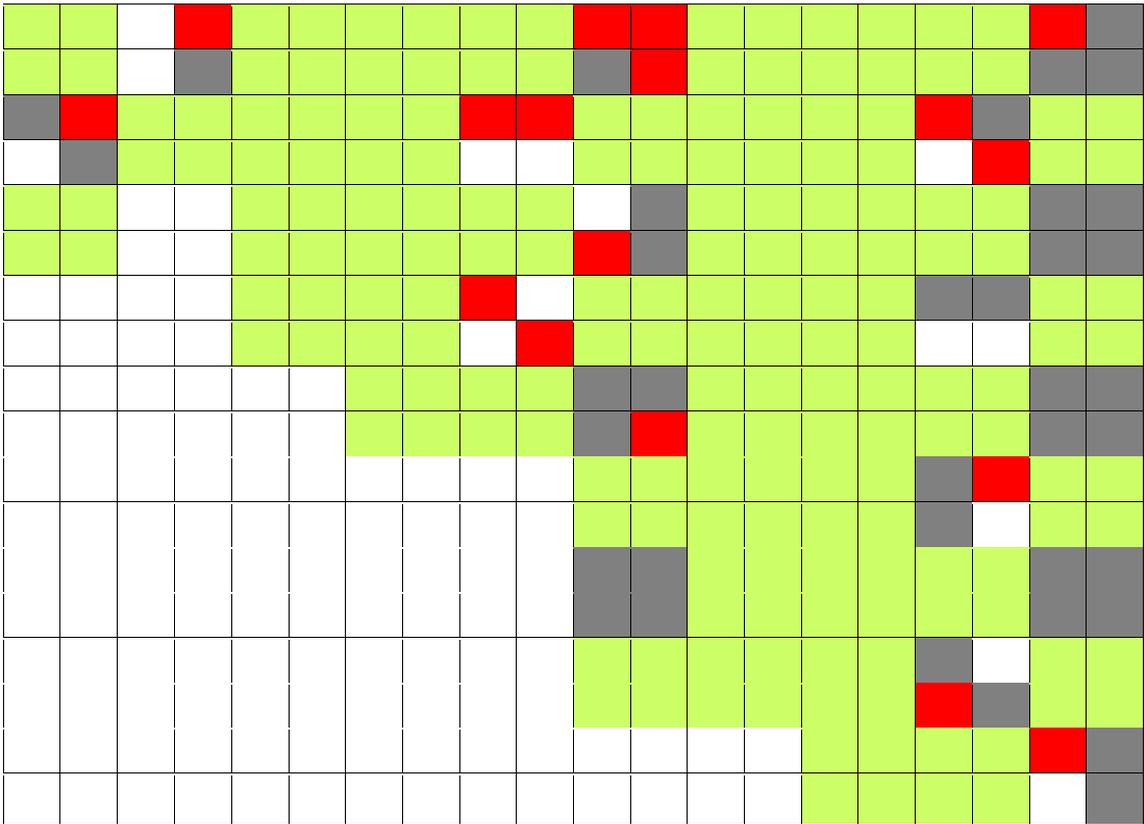


Figure 90. Répartition de la maladie sur le verger de Chebli

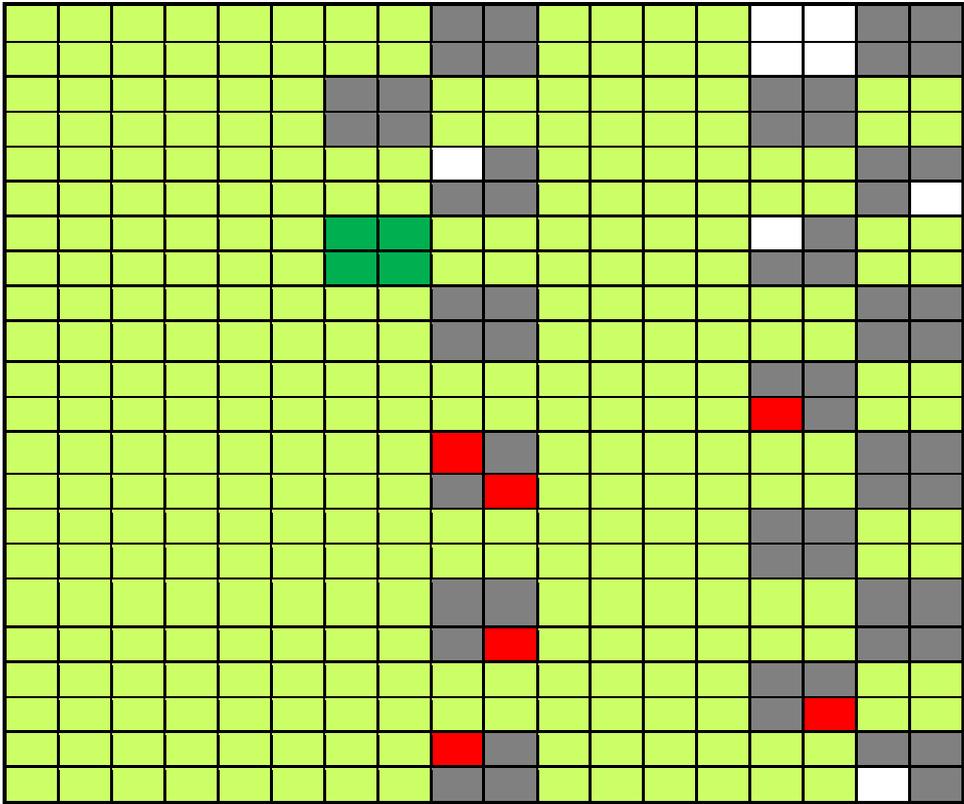


Figure 91. Répartition de la maladie sur le verger de Soumaa

Chapitre III : Résultats et discussion

Discussion sur la répartition spatiale de la tristeza sur certains vergers prospectés

Selon la répartition de la maladie sur les différents vergers prospectés et en se basant sur la méthode d'échantillonnage suivie et la localisation des plants positifs sur le dispositif, il s'avère que la maladie est présente sur l'ensemble des vergers avec toutes les espèces et variétés d'agrumes, cela confirme les travaux (El-Ferran 2003), (Bouafia, 2011), (Moudoud 2010), (Guetouche, 2012), (Belkahla et al. 2013), qui avaient déjà signalé une présence plus ou moins importante d'arbres infectés par le CTV, dans divers sites agrumicoles dans la zone de la Mitidja. Le taux d'infection par le virus de la tristeza oscillait entre 20 et 39% sur les différents sites échantillonnés. Concernant les pucerons *M. persicae*, *T. aurantii*, *A. spiraecola*, *A. gossypii*, *A. craccivora*, ont été identifiés et cités dans plusieurs travaux entre autres, ceux de Bouafia (2011). Les résultats obtenus sur la présence du virus de la tristeza et l'augmentation de l'infection durant ces dernières années expliquent la gravité du problème accentué par les vecteurs pucerons.

Concernant la répartition spatiale de la maladie, cette distribution est grégaire autour des arbres, mais des études plus poussées en analysant 100% des arbres pourront éclaircir les choses concernant le vol des pucerons et la dissémination de la maladie.

III.8. Caractérisation moléculaire

III.8.1. Transcription inverse-polymérase chaîne réaction RT-PCR

Les acides nucléiques totaux ont été analysés pour les 25 échantillons sélectionnés, à travers l'utilisation du Kit RNeasy^R Plant, Qiagen. La migration des produits amplifiés par l'utilisation de l'amorce T36 CP mise en évidence sur un gel de d'agarose1% a montré clairement des fragments approximativement de 672 bp correspondant au gène de la protéine capsidiale du virus de la Tristeza (Fig.92).

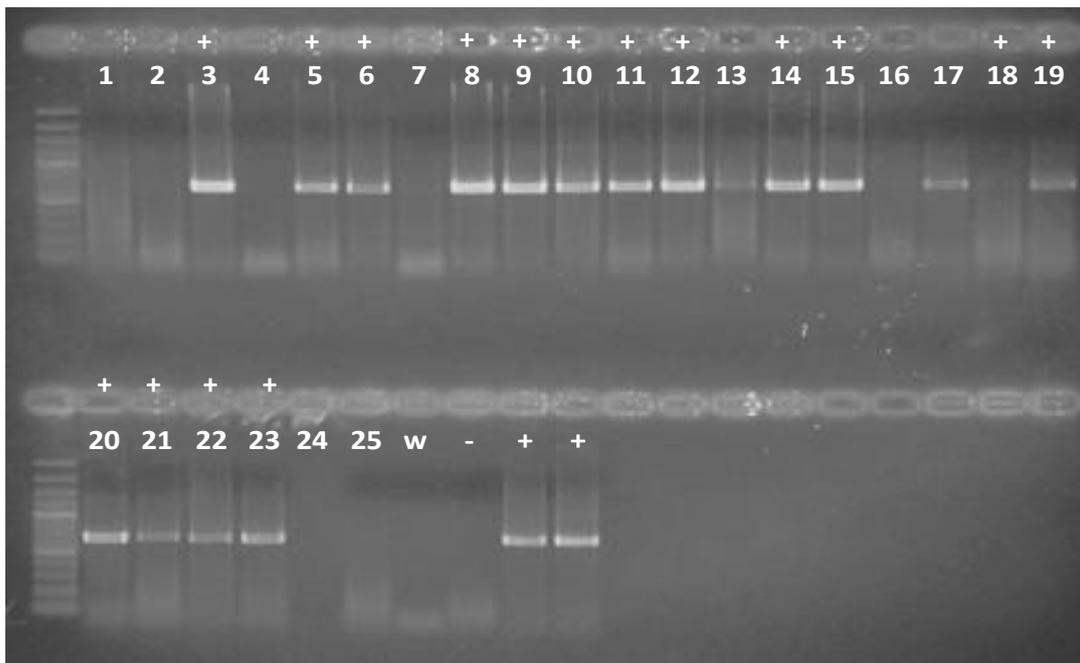


Figure 92. Gel de l'électrophorèse du produit RT-PCR des isolats du CTV

Discussion :

Les échantillons positifs de la RT-PCR (3,5,6,8,9,10,11,12,14,15,17,19,20,21,22,23) sur le gel d'électrophorèse sont représentés par une seule variété W. navel de l'exploitation (Eurl Reguiegue Boufarik 2) parc à bois. Les échantillons négatifs (1, 2, 4, 7, 16,18, 24,25), appartiennent à la variété T. navel et W.navel (Exploitation Univ.Blida et Boufarik2). Les résultats de la RT-PCR vérifient bien et confirment les résultats positifs du test DTBIA, DAS-ELISA, la transmission mécanique, et par greffage d'inoculation.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.8.2. Résultats de l'analyse du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP)

Une évaluation préliminaire de la variabilité de la séquence du gène de la protéine capsidiale a été effectuée par l'analyse SSCP. Les produits de la RT-PCR amplifiés à partir de la protéine capsidiale du gène des 17 isolats sélectionnés provenant du même site exploitation Boufarik2 représentés par l'espèce oranger variété W. navel, ont été dénaturés et analysés par SSCP sur un gel non dénaturant de polyacrylamide. Des bandes similaires ont été observées pour les 17 isolats testés (Fig.93).



Figure 93. SSCP Migration sur gel polyacrylamide non dénaturant 8%

III.8.3. La reverse transcription polymérase chaîne réaction RT-PCR

Les acides nucléiques totaux ont été analysés pour les 30 échantillons sélectionnés (Fig.94) à travers l'utilisation du Kit RNeasy^R Plant, Qiagen. La migration des produits amplifiés par l'utilisation de l'amorce T36 CP mise en évidence sur un gel de d'agarose1% a montré clairement des fragments approximativement de 672 bp correspondant au gène de la protéine capsidiale du virus de la Tristeza (Fig.82). Les positifs RT-PCR (1, 3, 9, 11, 14, 26, 27,30) sur le gel d'électrophorèse sont représentés par les espèces /variétés suivantes : 1 Satsuma, 3 Tarocco, 9 Satsuma, 11 Satsuma, 14 Clementinier, 26 clementinier, 27 Tarocco, 30 T.navel (Univ.Blida).

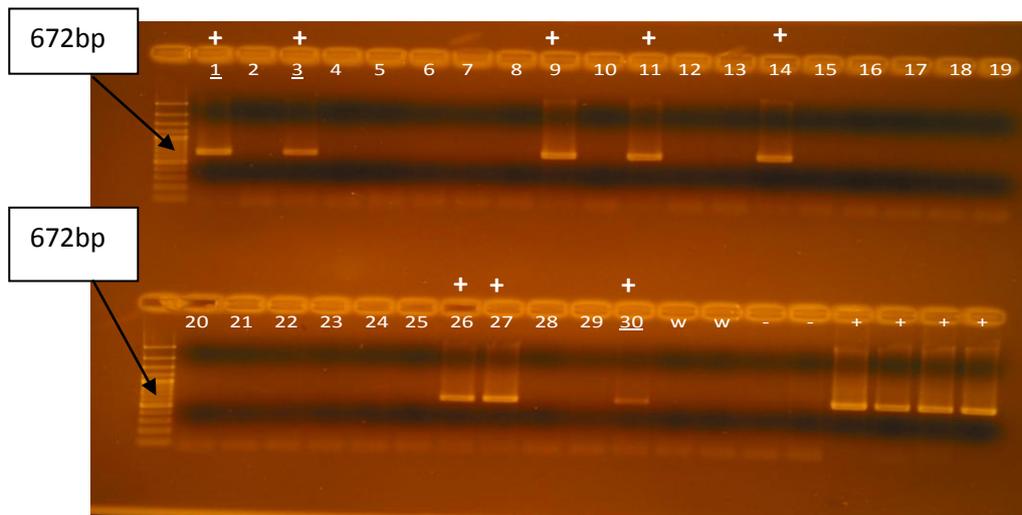


Figure 94. Gel de l'électrophorèse du produit RT-PCR des isolats du *CTV*

III.8.4. Résultats de l'analyse du polymorphisme de conformation simple brin (SSCP)

Une évaluation de la variabilité de la séquence du gène de la protéine capsidiale a été effectuée par l'analyse SSCP. Les produits de la RT-PCR amplifiés à partir de la protéine capsidiale du gène des 08 isolats sélectionnés provenant de deux sites différents dont 06 isolats représentés par les variétés suivantes (3 Satsuma, 2 Tarocco, 2 Clémentinier) de l'exploitation de Boufarik2 (parc à bois) et un isolat représenté par une seule variété T. navel de l'exploitation de l'Université de Blida, ont été dénaturés et analysés par SSCP sur un gel non dénaturant de polyacrylamide. Des bandes similaires ont été observées pour les 8 isolats testés.

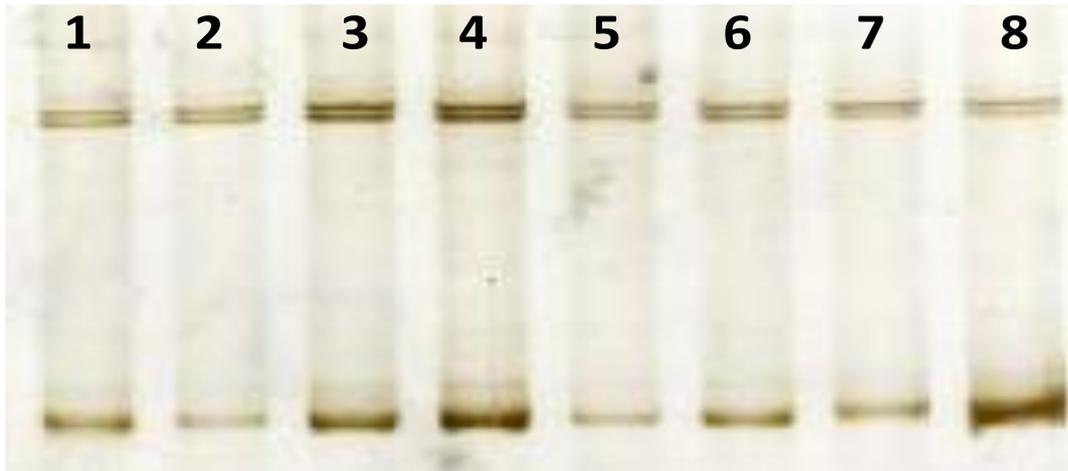


Figure 95. SSCP Migration sur gel polyacrylamide non dénaturant 8%

L'analyse du polymorphisme de conformation simple brin des souches isolées du *CTV* a montré que les distances de migration dans le gel sont identiques, cela explique la similitude dans les séquences du gène de la capsid (Fig.95).

La comparaison des résultats des différents positifs avec la migration sur le gel polyacrylamide non dénaturant (SSCP) Fig.93 et Fig.95 des deux périodes (Janvier 2012 et Juin 2012), a montré des distances de migration identiques avec l'ensemble des souches sélectionnées pour l'analyse.

Discussion

Toutes les souches algériennes du *CTV* ont présenté le même profil de migration. Ce résultat vérifie bien qu'elles sont identiques et qu'il s'agit de la présence d'une seule et unique souche du *CTV* sur les échantillons analysés, à ce propos, afin de confirmer les résultats obtenus et avoir plus d'informations un séquençage du gène de la capsid été réalisé.

III.8.5. Résultats du clonage et du séquençage du gène capsid (Cp gene) des souches

Une analyse de séquence a été effectuée sur les isolats choisis ou sélectionnés, représentant des bandes identiques avec la SSCP. Différents clones de chaque isolat ont été séquencés et comparés avec d'autres séquences d'isolats de tristezza déjà identifiés comme la T36 (Quik decline isolate), T30 (Mild isolate from Floride), VT (decline and stem pitting isolate Palestine), T385 et T318 (DQ 151548) Espagne, SY 568 (Californie), Nuaga (Japon), Qaha

Chapitre III : Résultats et discussion

(AY 340974) Egypte, isolat du Mexique (DQ 272579). Hill et al. (2005), et catalogués dans la banque mondiale de gènes. L'utilisation du programme informatique BLAST a révélé que le gène de la protéine capsidiale des isolats Algériens a une identité nucléotidique élevée (99%) avec un isolat atténué du type T385 du *CTV*, particulièrement présent en Espagne et certains pays du bassin Méditerranéen.

Discussion

Par le résultat du séquençage on conclue que le *CTV* présent en Algérie est actuellement représenté par une seule souche atténuée, proche de la souche T 385, qui a cependant provoqué des épidémies de tristeza en Espagne et qui est transmise efficacement par certains pucerons vecteurs présents en Algérie, donc il serait urgent de prendre des décisions draconiennes afin de protéger l'agrumiculture Algérienne , ceci à travers le contrôle de la progression de la maladie par le renforcement des contrôles aux frontières, un monitoring de la situation et une vulgarisation du problème.

CHAPITRE IV

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives

En Algérie et jusqu'aux années 90, la tristeza n'avait jamais constitué un problème pour l'agrumiculture Algérienne, probablement cette situation est liée, au type de la souche existante, qui n'extériorisait pas de symptômes sévères de la maladie, et des conditions climatiques et écologiques non adéquates à une diffusion rapide de la maladie.

Malheureusement, la situation est devenue délicate depuis la signalisation de foyers importants de la tristeza dans la Mitidja pendant les années 2000 (Bayoud, 2001, ITAFV, 2002), depuis cette période la tendance a été vers une diffusion plus rapide de la maladie avec extériorisation des symptômes de la maladie et avec une augmentation des taux d'infection d'une année à une autre au niveau de la zone citée, prédisant une dissémination rapide du virus par des pucerons-vecteurs. Suite à cette situation, une sonnette d'alarme a été tirée par les institutions spécialisées dans le domaine (MADRP, DPVCT, ITAFV, INPV, CNCC) et la profession, représentée par, les pépiniéristes et les producteurs d'agrumes afin de sauver l'industrie agrumicole algérienne à tous ces niveaux.

Dans ce contexte, notre recherche et étude se sont orientées vers une étude globale de la distribution du virus de la tristeza au niveau de certains vergers privés et étatiques d'agrumes dans la région de la Mitidja dont l'objectif est de connaître l'incidence de la maladie et également de caractériser les souches virales locales à travers des tests biologiques et moléculaires afin d'évaluer leur potentiel pathogène.

Les résultats de prospection effectués à travers des tests sérologiques sur plus de 2000 échantillons durant trois campagnes agrumicoles (2009-2010, 2010-2011, 2011-2012), ont permis de relever des taux d'infections très importants par le virus de la tristeza (plus de 20% dans certains cas), avec une distribution homogène sur les vergers d'agrumes prospectés. D'autre part, il semble que toutes les espèces et variétés soient infectées par le virus.

La détection biologique à travers la transmission par pucerons sur des indicateurs herbacés (pois) et ligneux (bigaradier et lime mexicaine), a révélé des résultats intéressants, d'abord la plante indicatrice (pois) a manifesté des symptômes sur feuillage sur la plus part des plantules inoculées après passage des trois pucerons, et les résultats du test ELISA des feuilles de pois ont été positifs au virus du CTV. Egalement l'efficacité de la transmission du virus de la tristeza par les trois espèces de pucerons sur le bigaradier et la lime mexicaine, a montré la

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives

transmission du *CTV* au niveau des deux indicateurs mais l'efficacité de la transmission a été beaucoup plus marquée avec l'espèce *A.gossypii* par rapport aux deux autres espèces.

Considérant et constatant que la dissémination de la maladie est rapide au niveau de la Mitidja, avec l'aide d'un potentiel vecteur, une prospection sur les pucerons a été initiée lors de notre recherche en vue d'évaluer leur présence au niveau des vergers prospectés. Les résultats de recherche et d'identification ont aboutit à l'identification de trois espèces très répandues sur les agrumes (*A.gossypii*, *A.spiraecola* et *T.aurantii*) avec une prédominance de l'espèce *Aphis gossypii* dans tous les sites prospectés sauf pour l'exploitation de Chebli où l'espèce *T.aurantii* a été la plus dominante avec 82%.

Vu les populations de pucerons importantes dans les sites prospectés et considérant l'efficacité de la transmission du *CTV* par ces trois espèces de pucerons connues sur les agrumes, des taux d'infections élevés ont été obtenus dans l'ensemble des vergers prospectés durant les trois campagnes agrumicoles et touchant presque toutes les espèces ou/varietés échantillonnées.

La caractérisation biologique du *CTV* sur des plantes indicatrices d'agrumes et l'évaluation de sa sévérité, particulièrement sur l'indicateur universel la Limette mexicaine, a permis d'observer des symptômes spécifiques de la maladie tels que les éclaircissements des nervures et la forme en cuillère des feuilles sur l'indicateur limette mexicaine, alors qu'aucun symptôme de bois strié synonyme de souches sévères n'a été observé sur le bigaradier, l'oranger Mme Vinous ou le pamplemoussier Ducan.

Concernant la caractérisation moléculaire, plus de 30 échantillons représentant différentes espèces et variétés ont fait l'objet d'une étude approfondie, le séquençage de certaines souches locales du virus de la tristezza a montré une similitude des séquences obtenues, prédisant une présence homogène d'une même souche. Les séquences ciblant le gène de la protéine capsidiale des souches algériennes, a été classée dans un groupe de souches atténuées incluant la souche Espagnole T385.

Suite aux résultats de caractérisation de souches locales algériennes du *CTV* dans la région de la Mitidja et bien que la souche soit considérée comme atténuée, il est très important de mettre en place un système de surveillance du virus, pour pouvoir contrôler l'introduction ou la diffusion des souches sévères exotiques comme la souche du bois strié, déjà présente dans le bassin Méditerranéen. Cette souche pourrait causer des dégâts beaucoup plus importants et mettre en péril l'industrie agrumicole Algérienne. D'autres part, considérant qu'une très

Chapitre IV : Conclusion générale et perspectives

grande proportion de vergers d'agrumes est encore greffée sur le bigaradier, un porte-greffe très sensible à la tristeza, et la présence de vecteurs secondaires comme *A. gossypii* et *T. aurantii*, pourrait faciliter la diffusion de la maladie comme, ce fut le cas en Espagne, où la tristeza a détruit plus de 50 millions d'arbres pendant les années 50.

Une telle situation peut donner lieu à un effondrement rapide de la majeure partie de l'industrie des agrumes en Algérie, avec des conséquences socio-économiques dramatiques.

La stratégie qui pourrait être mise en place en Algérie pourrait comprendre :

- Le renforcement des mesures de contrôle et mise à jour de la réglementation phytosanitaires (quarantaine et certification)
- le contrôle rigoureux des pépiniéristes
- Le suivi du *CTV* et l'éradication des arbres infectés
- Le suivi des populations de pucerons et la mise en œuvre des mesures de lutte efficaces
- La sensibilisation au niveau de la profession
- Le renforcement de la recherche harmonisée et du savoir-faire;
- Le transfert de technologie et l'échange d'expériences et d'informations.

Si des actions coordonnées ne sont pas prises immédiatement, les plus importantes souches sévères seront rapidement introduites et disséminées par le vecteur le plus efficace *T. citricida*, déjà présent dans le bassin Méditerranéen et de ce fait, on assistera à une destruction de cette industrie dans plusieurs régions du pays.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aguiar A.M., Fermands A. and Illarco F.A. 1994.** On the sudden appearance and spread of *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy); (Homoptera Aphidoidea) on the island of Madeira. *Bacogiana Museum Minicipal do Funchal. Historia Natural.* 168:1-7.
- Ahlawat Y.S., Varma A., Pant R.P., Shukla A. et Lokhart B.E.L., 1996.** Partial characterization of a badnavirus associated with citrus yellow mosaic disease in India. In: Proc. 13th Conf. of IOCV, Fuzhou–China 1995: 208-217
- Alioto D., Gangemi M., Deaglio S., Sposato P., Noris E., Luisoni E. et Milne R.G., 1999.** Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathology* 48: 735-741.
- Alloune A., 2011.** Etude du virus de la tristezza des agrumes (Citrus tristezza Virus) dans la plaine de la Mitidja : identification sérologique et inventaire des vecteurs. Mém. Ing.Univ.Blida, 120P.
- Altschul S. F., Gish, W., Miller W., Myers E. W. and Lipman D. J. 1990.** Basic local alignment search tool. *Jour. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Amizet L., 1954.** Contribution à l'étude des moyens pratiques de lutte contre certaines maladies virusiformes en Algérie. *Fruits et Primeurs*, 24 (255): 165-68.
- Anonyme, 1971.** Plan de rénovation du verger agrumicole algérien COFROR. Ministère de l'agriculture et de la réforme Agraire. Mission COFROR, IRFA, Paris (France).
- Anonyme, 2014.** Interview réalisé avec le Directeur général de l'ITAFV Alger sur la Situation des Agrumes en Algérie à la Radio Chaîne 3. Article rédigé par Lakhdar A.
- Anonyme, 2016.** Schutz.Croué C. www.deco.fr/.../maladie-plante-parasite/la-tristezza...
- Aubert B. et Vullin G., 1997.** Pépinières et plantations d'agrumes. Montpellier: CIRAD ,184 P.
- Ayllón M. A., Lopez C., Navas-Castillo J., Mawassi M., Dawson W. O., Guerri J., Flores R. and Moreno P., 1999.** New defective RNAs from Citrus tristezza virus: evidence for replicase-driven template switching mechanism in their generation. *Jour. Gen. Virol.* 80: 817-821.
- Ayllón M.A., Satyanarayana T., Gowda S., Dawson W.O., 2005.** An atypical 3-controller element mediates low-level transcription of the p6 subgenomic mRNA of *Citrus tristezza virus*. *Mol. Plant Pathol.* 6:165–176.
- Bar Joseph M., Garnsey S.M., Gonslaves D., Moskovitz M., Purifull D.E., Clark M.F. et Loe Benstein G., 1979.** The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristezza virus. *Phytopathology* 69: 190-194.
- Bar-Joseph M., Batuman O., Roistacher C. N., 2010.** The history to Citrus tristezza virus – revisited,” in *Citrus Tristezza Virus Complex and Tristezza Diseases* eds A Karasev V., Hilf M. E., editors. St. Paul, MN: Amer. Phytopathol. Soc.: 3-26.

- Bar-Joseph M., Che, X., Mawassi M., Gowda S., Satyanarayana T., Ayllón M. A., Albiach-Martí M. R., Garnsey S. M. and Dawson W. O., 2002.** Citrus tristeza virus .The Continuous Challenge of *Citrus tristeza virus* Molecular Research, 15th IOCV Conf., *Citrus Tristeza Virus*, 7P.
- Bar-Joseph M., Gumpf D. J., Dodds J. A., Rosner A. and Ginzburg I., 1985.** A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. *Phytopathology* 75: 195-198.
- Bar-Joseph M., Lee R.F., 1989.** Citrus tristeza virus. In: CMI/AAB description of Plant Viruses. 353 (N°.33 revised). Assoc. Appl. Biol., Wellesbourne, Warwick, UK.
- Bar-Joseph M., Loebenstein G., Cohen J., 1972.** Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease. *Virology* 50:821-828.
- Bar-Joseph M., Marcus R. and Lee R.F., 1989.** The continuous challenge of *citrus tristeza virus* control. *Ann.Rev.Phytopathol.* 27: 291-316.
- Bayoud H.2001.** Serodétection du virus de la tristeza des Citrus et du Phytoplasme dans les parcs à bois et les cages d'isolement des agrumes de l'ITAFV. Mem. Ing. Agro Blida.89P.
- Belkahla H., Felkai K., Khabil M., 2016.** Identification of citrus psorosis Ophiovirus (CPsV) By DAS-ELISA in Algeria: The 2st International conference in modern advances in the field of biotechnology and genetic engineering in Jordan (Dead Sea).
- Belkahla H., Larbi Dj., Bouafia L., Moudoud R., Guettouche F. and Bouzidi S., 2013.** Serodetection of Citrus Tristeza Closterovirus (CTV) In Algeria. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 7(1): 10-13, 2013
- Bellabas A., 2010.** Rapport de mission Etude de base sur les Agrumes en Algérie, GTFS/REM/070/ITA .Programme régional de gestion intégrée des ravageurs pour le Proche-Orient.45P.
- Benazouz K. Belkahla H., 2010.** Connaissances sur les phytoplasmes des agrumes : Caractérisation immunoenzymatique ACP-ELISA du Stubborn (*Spiroplasma citri*) en Algérie.25-26 Mai Khémis Méliana. 1^{ier} Séminaire national sur la protection des plantes cultivées.
- Benazouz K., 2006.** Etude du stubborn sur agrumes en régions agrumicoles : Caractérisation bio et sérologique. Mem. Mag. Blida 88P.
- Bénédicté A. et Bachès M., 2001.** la culture des agrumes, Homme et plantes (revue de conversation des collections végétales spécialisés, 37 : 30-34. *Citrus Diseases*, 2nd ed. APS Press: 92P.
- Benton R. J., Bowman F.T, Fraser L., Kebby R.G., 1949.** Selection of citrus budwood to control scaly butt in trifoliata rootstock. *Agr. Gaz. N.S. Wales* 60: 31-34.
- Benzohra M., 2016.** Identification et caractérisation de la flore fongique associée au dépérissement des agrumes dans la région de la Mitidja. Mém. Mag.Univ.Blida₁, 118 P.

Berger C., 2013. Lutter contre les pucerons Christophe Twitter : @plantes du sud.

Blackman R.L. and Eastop V.F., 1984. Aphids on the world's crops. An identification and information guide. 2nd ed. Wiley eds, Chichester: 466 P

Blackman R.L. and Eastop V.F., 2007. Aphids as crop pests: Taxonomic issues. In "Aphids as Crop pests" (van Emden, H.F. and Harrington, R. Eds). CAB International 2007, Cromwell Press, and Trowbridge (UK): 1-30.

Blackman R.L. and Eastop V.P., 2000. Aphids on the world's crops. An identification and information guide. 2nd Edition. Wiley, Chichester: 466p.

Blondel L., 1953. Influence de la hauteur du point de greffe sur le comportement des agrumes greffés sur *Poncirus trifoliata*. Ann. Inst. Agric. Algérie, 7(8): 1-12.

Blondel L., 1959. La culture des agrumes en Algérie. Station expérimentale d'arboriculture de Boufarik. Bull. 142. 20P.

Bouafia L.F., 2011. Etude du virus de la tristezza des agrumes (CTV). Détection sérologique, indexage biologique et Efficacité de la transmission par différents vecteurs inventoriés. Mém. Mag. Univ. Blida. 98P.

Bové J.M. and Vogel R., 1981. Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus. (A collection of color slides) IOCV Project, Setco- IRFA, Paris, France

Bové J.M. et Duran-Villa N., 2013. Quelques maladies infectieuses des agrumes transmises par greffage d'inoculation. In « Les clémentiniers et autres petits agrumes. C. Jacquemond et al., 2013. Edts. Quae. France. P 350.

Bové J.M. et Vogel R., 1964. Stem pitting sur bigaradier et sur orangier Tarocco en Corse : Une maladie à virus. Fruits 19: 269-140.

Bové J.M. et Vogel R., 1975. Slides, description and illustration of virus and virus like diseases of citrus: an IOCV project. IFRFOM. Paris, Editions SETCO.

Bové J.M., 1967. Maladies à virus des citrus dans les pays du Bassin Méditerranéen. Fruits, 22(3) : 125-140.

Bové J.M., 1995. Virus and virus like diseases in the Near East region. FAO Rome Eds: 518P.

Bové M.C., Elsner J.B., Landsea C.W., Niu X. and O'Brien J.J., 1998. Effects of El Niño on U.S. landfalling hurricanes, revisited. Bul. Amer. Meteorol. Soc. **79**, 2477-2482.

Brichet J., 1944. Une maladie redoutable qui se répand dans nos orangeries: la psorose « *Scaly bark* » des Américains. Fruits et Primeurs, 14(158): 228-230.

Brlansky R.H., 1988. Inclusion bodies produced in citrus by citrus tristezza virus. Phytophylactica 19: 211-213.

- Brown B.L., 1992.** Stubborn disease of Citrus. *Plant Pathology*. *Plant Pathol. Circul.* : 351.
- Brown L. G., Denmark H. A. and Yokomi R. K., 1988.** Citrus tristeza virus and its vectors in florida. *Plant Pathol. Circul.* 11.
- Bustin S.A., 2000.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Jour. Mol. Endocrinol.* 25:169-193.
- Bustin S.A., 2002.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29:23-39.
- Calavan E.C., Christiansen D.W., Roistacher C. N., 1963.** Symptoms associated with tatter-leaf virus infection of Troyer citrange rootstocks. *Plant Dis. Report.* 47:971-975.
- Cambra M, Gorris M.T., Marroquín C., Román M.P., Olmos A., Martínez M.C., Hermoso de Mendoza A., López A & Navarro L., 2000_a.** Phytopathology. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Res.* 71:85-95.
- Cambra M. and Moreno P., 2000.** Tristeza. In: *Enfermedades de los cítricos*. N. Duran-Vila and P. Moreno (eds.), Ed. Mundi-Prensa, Madrid: 77-81.
- Cambra M., Garnsey S.M., Permar T.A., Henderson C.T., Gumph D. and Vela C., 1990.** Detection of citrus tristeza virus (*CTV*) with a mixture of monoclonal antibodies (Abstract). 80: 103.
- Cambra M., Gorris M. T., Roman M. P., Terrada E., Garnsey S. M., Camarasa E., Olmos, A. and Colomer M., 2000_b.** Routine detection of Citrus Tristeza Virus by direct immunoprinting ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. *Proc. 14th Conf. Inter. Org. Citrus Virologists.* (Brazil-1998): 34-41.
- Cambra M., Hermoso de Mendosa A., Moreno P., Navarro L., 1981.** Use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of citrus tristeza virus (*CTV*) in different aphid species. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 1: 444-448.
- Cambra M., Serra J., Villalba D & Moreno P., 1988.** Present situation of the citrus tristeza virus in the Valencian Community. *Proc. 10th Int. Conf. Org. Citrus Virologists:* 1-7 Riverside (USA).
- Catara A. et Scaramuzzi G., 1975.** Impietratura. In J.M. Bové et R. Vogel, Eds. Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus: an IOCV project. IFRFOM. Paris, *SETCO Eds.*
- Cevik B., Pappu S.S., Lee R.F. and Niblett C.L., 1996.** Detection and differentiation of Citrus Tristeza Virus closterovirus using a point mutation and minor sequence differences in their coat protein genes. *Phytopathology* 86: 101.
- Chang-yong Z., Xue-yuan Z. and Yuan-hui J., 1996.** Characterization of Citrus tristeza viurs isolates infecting pummelo and sweet orange in Sichuan Province, China [A]. *Proc. 13th Conf. Inter. Org. Citrus Virologists,* (China-1995): 78-82.

- Chapot H., 1959.** First studies on stubborn diseases in citrus in some Mediterranean countries. *In J.M. Wallace, Eds. Virus Dis. University of California: 109-117.*
- Clark M.F. et Adams A.N., 1977.** Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant virus, *Journ. General Virol. 34: 475-483.*
- Dartigues D, 1991.** Répartition spatio-temporelle des aphides et influence des fourmis, sur orangers en Kabylie. *Fruits, Paris, 46(4):461-469.*
- D'Onghia A.M. et Lacirignola C., 1998.** Major virus and virus like disease of citrus in the Mediterranean. *Proc. Med. Net. Certif. of citrus 1995-1997, CIHEAM publication, Option Méditerranéennes. B21:5-10.*
- D'Onghia A.M., 2009.** The CIHEAM-Mediterranean Network on Certification of citrus (MNCC): the regional programme for the control of Citrus Tristeza Virus and major vector *Toxoptera citricida* in the Mediterranean. *In: Option Méditerranéennes: Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricida: a serious threat to the Mediterranean citrus industry: B65: 221-229.*
- D'Onghia A.M., Djelouah K., Alioto D., Castellano M.A., Savino V., 1998.** Elisa correlates with biological indexing for the detection of citrus psorosis-associated virus. *Jour. Plant Pathol. 80(2): 157-164.*
- D'Onghia A.M., Djelouah K., Frasheri D. and Potere O., 2001.** Detection of citrus psorosis virus by direct tissue blot immunoassay. *Jour. Plant Pathol. 83(2): 139-142.*
- D'Onghia A.M., El-Sayed T., Djelouah K., Brandonisio R., 2009.** Improved biological indexing of Citrus tristeza virus (CTV). *Options Méditerranéennes: Citrus tristeza Virus and Toxoptera citricida: a serious threat to the Mediterranean citrus industry. B65:143-146*
- Davies F.S. et Albrigo L.G., 1994.** Citrus crop protection science *In: Hortic. 2, CAB Inter. Redwood Boole, Trowbridge, Wiltshire, UK, 254P.*
- Davino N. et La Rosa R., 1984.** Indagini sulla diffusione del virus della variegatura infettiva degli agrumi in Italia. *Atti Gior. Fitopatol. 3: 257-264.*
- De Ravel d'esclapen G., 1984.** Les agrumes : oranges, mandarines, clémentines, pamplemousses, citrons etc. Comment les planter, les cultiver, les soigner. 256P.
- Derrick K.S., Brlansky R.H., Da Graça J.V., Lee R.F., Timmer L.W. et Nguyen T.K., 1988.** Partial characterisation of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology 78: 1293-1310.*
- Djelouah K. and D'Onghia A.M. 2000.** Occurrence and spread of citrus tristeza in the Mediterranean area. *In: Production and Exchange of Virus-free Plant Propagating Material in the Mediterranean Region A. Myrta, B. Di Terlizzi, V. Savino eds, Options Méditerranéennes, CIHEAM-IAMB, Italy, Serie B35: 43-50.*
- Djelouah K. and D'Onghia A.M., 2001.** Detection of citrus psorosis virus (CPsV) and *citrus tristeza virus (CTV)* by direct tissue blot immunoassay. *In: Proc. Med. Net. Certif. Citrus, D'Onghia A. M., Menini U. and Martelli G. P., Eds, Options Méditerranéennes, CIHEAM-IAMB: Series B33: 109-114.*

- Djelouah K., Frasher D. et D'Onghia A.M., 2002_a.** Improvement of serological diagnosis of citrus psorosis virus (CPSV) and Citrus tristeza virus (CTV). In: Proc 15th conf. IOCV, Cyprus 2001.
- Djelouah K., Frasher D., and D'Onghia A. M., 2002_b.** Serological Diagnosis of Citrus psorosis virus and Citrus tristeza virus Using Flower Parts, Proc.15th IOCV conf., Short Com.: 363-365.
- Djelouah K., Potere O., Boscia D., D'Onghia A.M. et Savino V., 2000.** Production of monoclonal antibodies to citrus psorosis associated virus. Proc.14th Conf. of IOCV, Brazil 1998: 152-158.
- Dodds J. A., Jordan R.J., Roistacher C.N. and Jarupat T., 1987.** Diversity of citrus tristeza virus isolates indicated by dsRNA analysis. Intervirolog.27: 177-188.
- Edwardson J.R., and Christie R.G., 1978.**Use of virus-induced inclusions in classification, and diagnosis. Ann.Rev.Phytopathl.16:31-55.
- El -Ferran A. Belkahla H., 2006.**La resistance des portes greffes des agrumes au virus de la tristeza : Etude du CTV dans la Mitidja. X^{ièmes} Journ. Sci.-AU-F Constantine 203-204
- El Ferran A., 2003.**Etude du virus de la tristeza des agrumes (*Citrus Tristeza Virus*) en Algérie : Séro et Bio-détection, Efficacité de la transmission par différents vecteurs inventoriés.Mém. Mag. Univ. Blida.55P.
- EPPO, 1990.** Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents.1008.
- Eppo, 2003.** Eppo reporting service 2003-072. EPPO 5 Paris.
- FAO, 2004.** Food and Agriculture Organization of the United Nations, Agrumes, statistiques: agrumes frais et transformés.
- Fauque C., et Thouvene J.C., 1984.** Transmission par insectes des maladies virales de plantes en Afrique tropicale Bul.Soc. entomol. France, (89):71-76.
- Fawcett H. S. and Klotz L. J. 1948_a.** Diseases and their control. In The Citrus industry, Ed. Batchelor, L. D. and Webber, H. J. 2: 495-596. Berkeley: Univ.California Press.
- Fawcett H.S. et Wallace J.M., 1946.** Evidence of virus nature of citrus quick decline, California Citrograph, 32:88-89.
- Fawcett H.S., 1936.** Citrus diseases and their control. McGraw-Hill Brook Co., Inc. New York & London. 656P.
- Fawcett H.S., Klotz L.J., 1948_b.**Exocortis on trifoliolate orange.Citrus Leaves, 28: 8.
- Febres V.J., Ashoulin L., Mawassi M., Frank A., Bar-Joseph M., Manjunath K.L., Lee R.F. and Niblett C.L., 1996.** The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. Phytopathology 86: 1331-1335.
- Felkai K.2008** : Etude du virus de la psorose : identification biologique et immunoenzymatique DAS-ELISA du citrus psorosis ophiovirus (CPSV) sur agrumes : Mem. Mag. Blida 68P.

Ferhat M.A., Meklati B. Y. et Chemat F., 2010. Citrus d'Algérie les Huiles Essentielles et leurs procédés d'extraction. O.P.U.157P.

Ferrag S.N. et Omar M.A., 1969. The present status of citrus virus diseases in Algeria Agriculture. Res. Rev. Dokhi, (47) 5.

Foissac X., Svanella-Dumas M.J., Candresse T. and Gentit P. 2001. Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested-PCR using degenerated and inosine containing primers. Acta Hort. 550: 37-44.

Fos A., Bové J.M., Lallemand J., Saillard C., Vignault J.C., Ali Y., Brun P., & Vogel R., 1986. La cicadelle *Neoliturus haematoceps* (Mulsant & Rey) est vectrice de *Spiroplasma citri* en Méditerranée. Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 137A: 97-107.

Franquinho Aguiar A.M., Fernandes A. and Ilharco F. A., 1994. On the appearance and the spread of the black citrus aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphidoidea) on the island of Madeira. Bocagiana, 168: 1-7.

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

Frazer B.D., 1959. The relation of seedling yellows to tristeza. In: JM Wallace (ed). Citrus Virus Dis. Univ. California. Div. Agr. Berkeley: 57-62.

Frazer B.D., 1988. Predators. In World Crop Pests, Aphids-Their Biology, Natural Enemies and control, (Minks A.K. and Harrewijn P., eds) Elsevier. Amsterdam, Vol. 2B: 217-230.

Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E., 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotech. 26, 112-125.

Frezal M., 1949. L'Agrumiculture Algérienne. Réglementation de contrôle de la psorose dans les plantations d'arbres étalons et les pépinières. Rev. Fr. Oranger, 19(22): 154.

Frezal M., 1957. Rapport sur la présence en Algérie de la tristeza et de la xylophoreuse des citrus. C.R. Acad. Agric. France, 43: 190-193.

Frison E.A. and Taher M.M., 1991. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm. FAO Rome Eds, Italy.

Garnier M., Chang C.J., Zreik L., Rosseti V. et Bové J.M., 1993. Citrus variegated chlorosis, serological detection of *Xylella fastidiosa*, the bacterium associated with the disease. In: Proc. 12th Conf. IOCV, India 199 Riverside: 301-305.

Garnier M., Zreik L., Bové J.M., 1991. Witche's broom, a lethal mycoplasmal disease of limes trees in the Sultanate of Oman and the United Arab Emirates. Plant Dis. 75 : 546-551

Garnsey S.M. and Muller G.W., 1988. Efficiency of mechanical transmission of citrus tristeza virus. In: Proc. 10th Conf. Inter. Org. Citrus Virologists. Spain-1986: 46-54

Garnsey S.M., 1975. Algerian navel orange virus, two mechanically transmissible viruses in navel orange selections introduced from Algeria. Plant Dis. Rep. 59: 689-693.

Garnsey S.M., Cambra M., 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens, In: CN Roistacher (eds). Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome eds.:193-216.

Garnsey S.M., Christie R.G., Derrick K.S., Bar-Joseph M., 1980. Detection of citrus tristeza virus. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles, In: EC Calavan, SM Garnsey, LW Timmer (eds.). Proc. 8th Conf. Int. Org. Citrus Virologists, Riverside: 9-16.

Garnsey S.M., Gonsalves D. and Purcifull D.E., 1977. Mechanical transmission of *citrus* tristeza virus. *Phytopathology* 67: 965-968.

Garnsey S.M., Gonsalves D. and Purcifull D.E., 1979. Rapid diagnosis of *citrus* tristeza virus infections by sodium dodecyl sulphate immunodiffusion procedures. *Phytopathology* 69: 88-95.

Garnsey S.M., Gottwald T.R. and Yokomi R.K., 1998. Control strategies for citrus tristeza virus. In: A. Hadidi, R. Khetarpal, and H. Kozanezawa (eds.) *Plant Virus Dis. Control. APS. S¹ Paul MN:* 639-658.

Garnsey S.M., Gottwald T.R., Borton J.C., 1996_b. Rapid diffusion of mild isolates of citrus tristeza virus following introduction of *Toxoptera citricida* in the Dominican Republic, In: JV Da Graça, P Moreno, RK Yokomi (eds). Proc. 13th Conf. Int. Org. Citrus Virol., Riverside: 92-103.

Garnsey S.M., Gottwald T.R., Yokomi R.K., 1996_a. Control strategies for the citrus tristeza virus, In: A. Hadidi, R.K. Khetarpal, and H. Koganezawa (eds). *Plant Viral Dis. Control: Principles and Practices.* APS Press. ST. Paul, MN. 639-658.

Garnsey S.M., Permar T.A., Cambra M. and Henderson C.T., 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: Proc. of the 12th Conf. IOCV, India 1992: 39-50.

Garnsey S.M., Su H.J., Tsai M., 1996_c. Differential susceptibility of pummelo and Swingle citrumelo to different isolates of citrus tristeza virus, In: JV Da Graça P. Moreno, R.K. Yokomi (eds). Proc. 13th Conf. Int. Org. Citrus virol. IOCV, Riverside: 138-146.

Gillings M., Broadbent P., Indsto J. and Lee R.F., 1993. Characterization of isolates and strains of *citrus* tristeza *closterovirus* using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journ. virol. Methods* 44: 305–317.

Gonsalves D. and Garnsey S., 1989. Cross protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. *Plant Dis.* 73: 592-597.

Google, 2017. Les agrumes d'Algérie, disponible sur le site internet : https://www.google.fr/search?q=les+agrumes+d%27algerie&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi1oqPBq_LWAhXLZiYKHWfnBmkQ_AUICigB&biw=1366&bih=637

Google earth, 2016. Situation géographique de la Mitidja [www.google earth maps](http://www.google-earth-maps.com).

Gottwald T.R., Garnsey S.M., Cambra M., Moreno P., Irej M. and Borbon J., 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits* 52 (6): 397-404.

- Gottwald T.R., Hughes G., 2000.** A new survey method for citrus tristeza virus disease assessment. Proc.14th Conf. Int.Org. Citrus Virologists: 77-87.
- Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Ireya, M. and Barbon, J.C. 1996_a.** Differential effects of *Toxoptera citricida* vs *Aphis gossypii* on temporal and spatial patterns of spread of citrus tristeza. In: Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virologists, 13th J.V. da Graca, P. Moreno and R.K.Yokomi, eds. IOCV, Riverside, CA.120-129
- Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Sediles-Jean, A. and Rojas-Solis, A. 1996_b.** Co-diffusion of Serologically distinct isolates of citrus tristeza virus vectored by *Toxoptera citricida* in northern Costa Rica.. In Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virologists, 13th J.V. da Graca, P. Moreno and R.K.Yokomi, eds. IOCV, Riverside, CA.112-119
- Guerri J., Moreno P., and Lee R.F. 1990.**Identification of citrus tristeza virus strains by peptide maps of virions coat protein.Phytopathology 80: 692-698.
- Guerri J.Moreno P., Munoz N., Martinez M.E., 1991.**Variability among Spanish citrus tristeza virus isolates revealed by double-stranded RNA analysis.Plant Pathol. 40: 38-44.
- Guetouche F. et Bouzidi S., 2012.**Etude du virus de la tristeza des agrumes (*Citrus tristza Virus*) dans la plaine de la Mitidja : Identification sérologique par DTBIA et biologique. Mém. Ing.Univ.Blida. 80P.
- Hadj Sahraoui K., 2007.**Mesures de développement des agrumes. Rev. Agricul. Dev. rural dur. 4 :19-24.
- Halbert S. E., Niblett C. L., Manjunath K. L., Lee R. F., Brown L. G., 2000.** Establishment of two new vectors of citrus pathogens in Florida, In Proc. 9th Congr. Inter. Soc. Citriculture Orlando, FL: 2:1016-1017.
- Hebb J.B. et Sonoda R., 1992.** For Florida grapefruit growers: Is gummosis becoming more of a problem? Citrus Industry, 73(7): 28-29.
- Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M., 1996.**Real time quantitative PCR.Genome Res.6, 986-994.
- Heie O.E., 1980.** The Aphidoides (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. 9: 236 pp.
- Heinze K., 1977.** *Aphis spiraeicola*. In: Kranz J, Schmutterer H., Koch W., eds. Diseases, Pests and Weeds of Tropical Crops. Berlin & Hamburg, Germany: Verlag Paul Parey, 330-331.
- Hermosa de Mendoza A., Ballester-Olmos J. F. and Pina-Lorca J. A., 1984.** Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (*Homoptera, Aphididae*) in Spain. In: 9th Conf. Int. Organ.Citrus Virologists, Riverside, and CA. 68-70.
- Hermoso de Mendoza A., Ballester-Olmos J.F. and Pina J.A., 1988.** Comparative aphid transmission of a common *citrus tristeza virus* isolate and a seedling yellows isolate recently introduced into Spain. Proc. 10th Conf. Int. Organ.Citrus Virologists
- Hilf M. E. and Garnsey S. M. 2000.** Characterization and classification of *Citrus tristeza virus* isolates by amplification of multiple molecular markers.In:14thConf. Int. Organ.,Riverside, CA. Citrus Virol.:18-27.

- Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L. and Garnsey, S.M., 1995.** Characterization of *citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology*, 208:576–582.
- Hoffmann M.P. and Frodsham A.C., 1993.** Natural Enemies of Vegetable Insect Pests. Cooperative Extension, Cornell University, Ithaca, NY. 63P.
- Holmes F.O., 1959.** Transmission of potato mottle virus to and from citrus plant by mechanical inoculation. *Phytopathology* 49: 729-731.
- Huang Z., Rundell P. A., Guan X., and Powell C. A., 2004.** Detection and isolate differentiation of Citrus tristeza virus in infected field trees based on reverse transcription–polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 88: 625-629.
- Hughes W.A. et Lister C.A., 1949.** Lime disease in the Gold Coast, *Nature* 164: 80P.
- Hullé M., Turpeau-ait Ighil E., Robert, Y. et Monnet Y., 1999.** Les pucerons des plantes maraichères: cycles biologiques et activités de vol, Ed. INRA-ACTA, 128P.
- Hung T.H., Wu M.L., Su H.J., 2000.** A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. *Journ. Phytopathol.* 148:469-475.
- Igwegbe E.C.K., Calavan E.C., 1970.** Occurrence of mycoplasma-like bodies in phloem of stubborn-infected seedlings. *Phytopathology*, 60:1525-1526.
- Ilharco F.A., Sousa-Silva C.R. and Alvarez A., 2005.** First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal (*Homoptera, Aphidoidea*). *Agronomia Lusitana* 51(1): 19-21.
- Imbert E., 2005.** Les agrumes de Méditerranée. *Fruitrop*. Le point sur les agrumes méditerranéens. 122 :6P
- Imbert E., 2013.** Production et marché des agrumes. In : les clémentiniers et autres petits agrumes. C. Jacquemond et al., 2013. Edts. Quae. France.
- Ing Ming Lee, Gartia G., Calavan E.C., Kaloostian G.H., 1993.** Citrus Stubborn disease organism cultured from beet leafhopper. *Calif. Agricul.* 27 (11): 14-15.
- Innal H. et Benhacine S., 2015.** Situation des agrumes en Algérie : Contraintes et Perspectives de développement. Rapport de Fin de Formation. ENS.El-Harrach-Alger. 50P
- INRA, 2013.** Encyclop'Aphid : l'encyclopédie des pucerons-inra.fr. Actualisé en 2016.
- ITAFV, 2002.** Rapport sur le dépistage du Citrus tristeza closterovirus (CTV) au niveau du parc à bois agrumicole. ITAF, CNCC, INPV. Ministère de l'Agriculture, Alger 2003, Algérie
- ITAFV, 2013.** La culture des agrumes. Institut technique d'arboriculture fruitière et de la vigne. DFRV 2013. 20P
- Jackson L.K., 1991.** Citrus growing in Florida. University of Florida press, Florida: 293p.

- Jacquemond C., Curk F. et Heuzet M., 2013.**Créer des plants pépinière et surgreffage. .in Les clémentiniers et autres petits agrumes.C. Jacquemond et al., 2013.Edts.Quae.France. 350P
- Jacquemond C., Tison G., Kreiter P., Bové J.M., Duran-Villa N., Curk F., 2013.**Protéger le verger : maladies et ravageurs.In : Les clémentiniers et autres Petits agrumes In : C. Jacquemond, F. Curk, M. Heuzet, coord.(eds) Quae.France.279-343.
- Jagoueix S., Bové J.M., Garnier M., 1994.**The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the proteobacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:379-386.
- Karasev A. V., Boyko V. P., Gowda S., Nikolaeva O. V., Hilf M. E., Koonin E. V., Niblett C. L., Cline K., Gumpf D. J., Lee R. F., Garnsey S. M., Lewandowski D. J. and Dawson W. O., 1995.** Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. Virology 208: 511-520.
- Kersting U., 1993:** Symptomatology, etiology and transmission of sesame phyllody in Turkey. J. Turk. Phytopathol.22:47-54.
- Kirkaldy G. W., 1907.** On some peregrine Aphidae in Oahu. Proc. Hawaiian Entomol. Soc. 1:99-102
- Kitajima E.W., Silva D.M., Oliveira A.R., Muller G.W. and Costa A.S., 1964.** Thread like particles associated with tristeza disease of citrus. Nature 201: 1011-1012.
- Komazaki S., 1994.** Ecology of Citrus Aphids and Their Importance to Virus Transmission. J.A.R.Q. 28:177-184.
- Kulhara S., Koizumi M. et Yamada S., 1982.** A nation wide campaign for certification of early satsuma “Myamoto wase” for citrus mosaic by ELISA. In: Proc. Soc. Citriculture: 441-444.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. and Nei M., 2001.** MEGA2 Molecular Evolutionary Genetic Analysis software. Bioinformatics 17: -1245.
- Lacirignola C., et D’Onghia A.M., 2009.**The Mediterranean citriculture: productions and perspectives.Option Méditerranéennes. Citrus Tristeza Virus and Toxoptera citricidus : a serious threat to the Mediterranean citrus industry. B65.2009
- Lafèche D., Bové J.M., 1970.** Structures de type mycoplasme dans les feuilles d’orangers atteints de la maladie du « greening ». C.R. Acad.Sci., 270 :1915-1917.
- Lamour R., 1950.** Viroses des agrumes en Afrique du Nord. Revue Fr. Orangier, 20(220): 381-384.
- Larbi Dj., 2016.**La psorose et la panachure infectieuse sur les agrumes en Algérie.Editions Universitaires Européennes.Schaltungsdienst lange O.H.G., Berlin.51P.
- Larbi Dj., Ghezli C., Djelouah K., 2009.**Historical review of Citrus Tristeza Virus (CTV) in Algeria.Options Méditerranéennes: *Citrus Tristeza* and *Toxoptera Citricidus*: a serious threat to the Mediterranean citrus industry. B65:107-110
- Leblanc F., Fournier P. et Etienne J. 1998.** *Aphis spiraecola*. Fiche actualisée en 2005 par F. Le Bellec (Cirad).

Lee R.F. and Garnsey S.M., 1996. Citrus Virus and Virus-like pathogens: A continuing evolution of progress and problems. In: Proc.13th Conf. IOCV, China 1995: 1-7.

Lee R.F., 2000. Citrus tristeza: Biology, Potentiel Impact, and control strategies. Arab J.PL.Orot:18:143-148.

Lee R.F., and Bar-Joseph M., 2000. Tristeza. In: Timmer L.W., Garnsey S.M. and Graham J.H. (eds). Compendium of Citrus diseases, 2nd edition. APS Press, Minnesota: 61-63.

Lee R.F., Baker P.S., and Rocha-Peña M.A., 1994. The *citrus tristeza virus (CTV)*: an introduction to current priorities, with special reference to the worsening situation in Central America and the Caribbean, (Ascot, Berks. UK: International Institute of Biological Control).197P.

Lee R.F., Bereta M.J.G., Derrick K.S. et Hooker M.S., 1992. Development of serological assays for citrus variegated chlorosis a new disease of citrus in Brazil. In: Proc Florida Sta. Hortic. Soc. Winter Haven 105: 32-35.

Lee R.F., Calvert A., Nagel J. and Hubbard J.D., 1988. Citrus tristeza virus: Characterization of coat protein. Phytopathology 78: 1221-1226.

Lee R.F., Derrick K.S., Beretta M.J.G., Chagas C.M. et Rossetti V., 1991. Citrus variegated chlorosis: a new destructive disease of citrus in Brazil. Citrus industry 72: 10-15.

Lee R.F., et Bar-Joseph M., 2000. Tristeza. In: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H. (Eds.), Compendium of Citrus Diseases. APS Press, St. Paul, MN, 61-63.

Lee R.F., Rocha-Peña, M.A., 1992. Citrus Tristeza Virus. In: Kumar J., Chaube H.S., Singh U.S., and Mukho- PDHYAY A.N. (eds.), *Diseases of Fruit Crops*. Plant Diseases of International Importance, III: 226-249.

Lin Y., Rundell P.A., Xie L., Powell C.A., 2000. In situ immunoassay for detection of citrus tristeza virus. Plant Dis.84:937-940.

Loussert R., 1987. Les agrumes. Techniques agricoles méditerranéennes. Paris : Tech. et Doc. Lavoisier.130P

Luro F., Jacquemond C., et Curk F., 2013. La clémentine dans la diversité génétique des agrumes. in Les clémentiniers et autres petits agrumes. C. Jacquemond et al., 2013. Ed. Quae. France.

Mabberley D.J., 1997. A classification for edible Citrus Telopea, 7:167-172.

Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A., 2002. Real time PCR in virology. Nucl. Acids Res.30, 1292-1305.

Malais M., Ravensberg W. J., 1992. Knowing and recognizing: the biology of glasshouse pests and their natural enemies (eds). Koppert Biological Systems.109P.

- Marais L.J. Marais M.L. and Rea M., 1996.** Effect of citrus tristeza stem pitting on fruit size and yield of Marsh grapefruit in southern Africa. In: Moreno P, da Grata JV, Yokomi RK, eds. Proceedings of the 13th Conf. Inter. Org. Citrus Virologists. 163-167
- Martelli G.P., Agranovsky A.A., Bar-Joseph M., Boscia D., Candresse T., Coutts R.A. H., Dolja V.V., Falk B.W., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A.V., Minafra A., Namba S., Vetten H.J., Wisler G.C. and Yoshikawa N., 2002.** The family *Closteroviridae* revised. Report of the *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, study group on closteroviruses and allied viruses. *Virology Division News* (147)10: 2039-2044.
- Martelli G.P., Candresse T., and Namba S., 1994.** *Trichovirus*, a new genus of plant viruses *Archives of Virology* 134: 451-455.
- Martelli G.P., Yilmaz M.A., Savino V., Baloglu S., Greco F., Guldur M.E., Greco N. et La Fortezza R., 1996.** Properties of a citrus isolate of olive latent virus 1, a new necrovirus. *Europ. Jour. Plant Pathol.* 102: 527-536.
- Mawassi M., Gafney R. and Bar-Joseph M., 1993.** Nucleotide sequences of the coat protein gene of *citrus tristeza virus*(7): 265-275.
- McClellan, A.P.D., 1957.** Tristeza virus of citrus: Evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis. Rep.* 41: 821.
- Meneghini M., 1946.** Sobre a natureza e transmisibilidade da doença "tristeza" dos citrus. *O Biológico*, 12: 285-287.
- Merouane K., 2013.** Etude du virus de la tristeza (Citrus Tristeza Virus) dans certains vergers d'agrumes dans la plaine de la Mitidja : identification sérologique par DTBIA et inventaire des pucerons vecteurs. *Mem. Ing. Agro Blida.* 69P.
- Milne R.G., Djelouah k., Garcia M.L., Dal BO E., Grau O., 1996.** Structure of Citrus ringspot-processor-associated virus particles: implication for diagnosis and taxonomy. In: Proc. 13th Conf. IOCV, Univ. of California, 189-197.
- Milne R.G., 1993.** Electron-microscopy of *in-vitro* preparation. In: R.E.F. Matthews eds, diagnosis of plant virus disease. CRC Press: 229-233.
- Minafra A., D'Onghia A.M. et Djelouah K., 2001.** Validazione della ibridazione molecolare per la diagnosi di viroidi degli agrumi in pieno campo. Atti progetto POM A32. Validazione e trasferimento alla pratica agricola di norme tecniche per l'accertamento dello stato sanitario di specie ortofrutticole per patogeni pregiudizievoli alla qualità delle produzioni vivaistiche. Locorotondo Italy 2001: 465-472.
- Moreno P., 2000.** Yellow ringspot. In: Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH, editors. Compendium of citrus diseases. St Paul (MN): APS Press: 65P.
- Moreno P., Piquer J., Juarez J. et Cambra M., 1988.** Spread of citrus tristeza virus in heavily infested area in Spain. In: Proc. 10th Conf. of IOCV, Spain 1986: IOCV Riverside: 71-76.

Moudoud R., 2012. Etude du virus de la tristeza des agrumes (CTV). Identification par ELISA et DTBIA. Mém. Mag. Univ. Bliba. 90P.

Müller G. W., Costa A. S., Kitajima E. W., Camargo I. J. B., 1974. Additional evidence that tristeza virus multiplies in *Passiflora* spp, In Proc. of the 6th Conf. Inter. Orga. Citrus Virologists, ed Weathers L. G., editor. (Berkeley, CA: University of California, Division of Agricultural Science: 75-78.

Müller G.W., Garnsey S.M., 1984. Susceptibility of citrus varieties, species, citrus relatives, and non rutaceous plants to slash-cut mechanical inoculation with citrus tristeza virus (CTV), In: Proc. 9th Conf. Int Org. Citrus Virol., IOCV, and Riverside: 33-40.

Navarro L., 1993. Citrus Sanitation, Quarantine and Certification Programs. in :P Moreno, JV da Graça, LW Timmer (eds.) Proc. 12th conf. Int. Org. Citrus Virol., IOCV, Riverside: 383-391

Navarro L., Juarez J., Pina J.A., Ballester J.F., 1984. The citrus quarantine station in Spain. In: *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Argentina, 1983): 365-370.

Nolasco G., De Blas C., Torre V. and Ponz, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *Jour. Virol. Meth.* 45: 201-218.

Nolasco G., Sequeira Z., Soares C., Mansinho A., Bailey A.M. and Niblett C.L., 2002. Asymmetric PCR ELISA: Increased Sensitivity and Reduced Costs for the detection of plant viruses. *Europ. Jour. Plant Pathol.* 108(4): 293-298.

Oberholzer P.C.J., Matthews I. et Stiemie S.F., 1949. The decline of grapefruit trees in South Africa. A preliminary report on so-called stem pitting. *Sci. Bul. Depart. Agric. South Africa* 297.

OEPP/EPPO 2006. EPPO Standard PM 1/2, A1 and A2 lists of Pests Recommended for Regulation as quarantine pests. Available at: <http://archives.eppo.org/EPPOStandards/general.htm>.

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T. and Hayashi K., 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms. *Genomics* 5: 874-879.

Palacio A., Foissac X. et Duran Villa N., 2000. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization: Comparison with other detection methods. In: Proc. 14th Conf. of IOCV, Brazil 1998: 294-301.

Pappu H.R., Pappu S.S., Manjunath K.L., Lee R.F. and Niblett C.L., 1993_a. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA* 90: 3641-3644.

Pappu H. R., Pappu S.S., Niblett C.L., Lee R.F. and Civerolo E., 1993_b. Comparative analysis of the coat proteins of biologically distinct citrus tristeza closterovirus isolates. *Virus Genes* 73: 255-264.

Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ, Pappu SS, Hilf ME, Febres VJ, Eckloff RM, McCaffery M, Boyko V, Gowda S, Dolja VV, Koonin EV, Gumpf DJ, Cline KC, Garnsey SM, Dawson WO, Lee R.F. and Niblett C.L., 1994. Nucleotide sequence and organization of eight-3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology*: 199, 35-46.

Permar T.A., Garnsey S.M., Gumpf D.J. and Lee R.F., 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytopathology* 80:224–228.

Potere O., Boscia D., Djelouah K., Elicio V. And Savino V., 1999. Use of monoclonal antibodies to citrus psorosis- associated virus for diagnosis. *Jour.Plant Pathol.*81: 209-212.

Powel C.A., Pelosi R.R., Sonoda R.M. and Lee R.F., 1998. A psorosis like agent prevalent in Florida's grapefruit groves and budwood sources. *Plant Dis.* 82(2): 208-209.

Praloran J.C., 1971.Les Agrumes, Maisonneuve et Larose. Paris.371P

Ribouchon J.L. Thermoz J.P. 2009. Comparaison de méthodes de détection du virus de la Tristeza des agrumes. Presented at 12^{èmes} Renc. Virol. Vég. Aussois, FRA (2009-01-18-2009-01-22). <http://prodinra.inra.fr/record/50905>

Roberts P.D., McGovern R.J., Lee R.F., et Nibelett C.L., 2001. Tristeza, *Plant Pathol. Fact Sheet.SP-155:5.+*

Rocha-Peña M. A., Lee R. F., Lastra R., Niblett C. L., Ochoa-Corona F. M., Garnsey S. M., and Yokomi R. K.,1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis.* (79)5:437-445.

Rocha-Peña M. A., Lee R. F., Niblett C. L., 1991_b. Development of a dot-immunobinding assay for detection of Citrus tristeza virus. *Journ. Virol. Meth.* 34:297–309. 10.1016/0166-0934(91)90108-C

Rocha-Peña M., Lee R. F., Permar T. A., Yokomi R. K. and Garnsey S. M., 1991_a. Use of enzyme-linked immunosorbent and dot-immunobinding assays to evaluate two mild strains cross protection experiments after challenge with a severe citrus tristeza virus isolate", In: Proc. 11th Conf. IOCV. , Riverside, 93-102.

Rocha-Peña M.A., and Lee R.F., 1991.Serological techniques for detection of citrus tristeza virus.*Journ.Virol. Meth.* 34: 311-331.

Roistacher C.N. and Moreno P., 1991. The worldwide threat from destructive isolates of *citrus tristeza virus*. A review. In: Proc. 11th Conf. Inter. Org. Citrus Virologists Florida, 1989: 7-19.

Roistacher C.N., 1991. Graft transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO Rome Eds, 286P.

Roistacher C.N., 1995.A historical review of the major graft-transmissible diseases of citrus.FAO Rome. (Eds.) 89P.

Roistacher C.N., 2002. Lectures given for the students at a course in citrus virus diseases and their control at the Instituto Agronomico Mediterraneo at Bari, Italy.

- Roistacher C.N., Bar-Joseph M., 1987** Transmission of citrus tristeza virus (CTV) by *Aphis gossypii* and by graft-inoculation to and from *Passiflora* species. *Phytophylactica* 19:179-182.
- Roistacher C.N., Dotts J.A., 1993.** Failure of 100 mild citrus tristeza isolates from California to cross protect against a challenge by severe sweet orange stem pitting isolates. In: P Moreno, JV da Graça, LW Timmer eds). *Proc. 12th Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, Riverside:100-107.
- Roistacher, C.N., Nauer, E.M., Kishaba, A. and Calavan, E.C., 1980.** Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* reflecting changes in virus transmissibility in California. In: *Proc. Conf. Int. Organ. Citrus Virologists. 8th Calavan, E.C., Garnsey, S.M. and Timmer L.W. eds. IOCV, Riverside, CA.*76-82.
- Rostner A, Shilboleth Y, Spiegel S, Krisbai L. and Kölber M., 1998.** Evaluating the use of immunocapture and sap-dilution PCR for the detection of *Prunus Necrotic Ringspot Virus*. *Acta Hortic.* 472:227-233.
- Rubio L, Ayllón MA, Guerri J, Pappu H, Niblett CL and Moreno P., 1996.** Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol.* 129, 479-489.
- Saglio P., Lhospital M., Lafèche D., Dupont G., Bové GM, Tully J.G., Freundt E.A., 1973.** *Spiroplasma citri* gen. and sp. nov.: a mycoplasma-like organism associated with stubborn disease of citrus. *Int. Journ. Syst. Bacteriol.*, 23:191-204.
- Saillard C., Garcia-Jurado O., Bové J.M., Vignault J.C., Moutous G., Fos A., Bonfils J., Nhami A., Vogel R. and Viennot B., 1980.** Application of ELISA to the detection of *Spiroplasma citri* in plants and insects. In: *Proc. 12th Conf. of IOCV, India 1992, and Riverside:* 467.
- Salehi M., Izadpanah K., Taghizadeh M., 1997.** Witche's broom disease of lime I Sistan-Baluchistan. *Iran Journ. Plant Pathol.* 33:76.
- Sambrook J., Fritsh E. and Maniatis T., 1989.** Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, NY.1885P.
- Saponari M., Manjunath K., Yokomi R.K., 2008.** Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journ. Virol. Meth.* Jan 2008, 147, (1), 43-53.
- Saraoui N., 2006.** *Agrumiculture. Contraintes et développement des agrumes. Revue 20 Green Algérie.*
- Satyanarayana T., Gowda S., Boyko V.P., Albiach-Marti M.R., Mawassi M., Navas-Castillo J., Karasev A.V., Dolja V., Hilf M.E., Lewandowski D.J., Moreno P., Bar-Joseph M., Garnsey S.M. and Dawson W.O., 1999.** An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc. Nat. Aca. Sci. USA* 96: 7433-7438.
- Sekiya M.E., Lawrence S.D., McCaffery M. and Cline K., 1991.** Molecular cloning and nucleotide sequencing of coat protein gene of *citrus tristeza virus*. *Journ. Gen. l Virol.* 72: 1013–1020.
- Semancik J.S., Roistacher C.N. and Duran-Vila N., 1988.** Viroid RNA associated with cachexia (xyloporosis) disease of citrus. In *Proc. 10th Conf. IOCV:* 125-135. Riverside.

- Skaria R. M., Kahlke C.J., Gracia S.N. and Prewett R., 1997.** Virus-free citrus Budwood production and Tristeza Management Program in Texas Through industry Partnership. Subtrop. Plant Sci. 49: 1-7.
- Soost R.K. et Cameron J.W., 1975.** Citrus. In: Janick J. and Moore J.N. (Eds), Advances in fruit breeding. *Purdue University Press*. West Lafayette, Indiana: 507-540.
- Spiegel-Roy P. et Goldschmidt E.E., 1996.** Biology of citrus. Cambridge University Press, New York USA: 230P.
- Stoetzel M.B., 1994.** Aphides (*Homoptera: Aphididae*) of potential importance on citrus in the united states with illustrated keys species. *Proc. Entomol. Soc. Wath*, 96(1): 74-90.
- Swingle W. T. and Webber H. J. 1896.** The principal diseases of citrus fruits in Florida. *Bull. Div. Veg. Physiol. Path. U. S. Dept. Agric.*: 42
- Swingle W. T. et Reece P. C., 1967.** The botany of *Citrus* and its wild relatives. In W. Reuther L.D. Batchelor & H. J. Webber: *The Citrus Industry*, V. I., University of California Berkeley, 190-130. 90-422.
- Tan B.H., Lim E.A., Liaw J.C., Seah S.G., Yap E.P., 2004.** Diagnostic value of real-time capillary thermal cyclers in virus detection. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 4:219-230.
- Tanaka T., 1954.** Species problems in citrus. *Japa. Soc. pro. Sci. Ueno, Tokyo, Japan*: 152P.
- Tanaka T., 1961.** Citrologia: semi centennial commemoration papers on citrus studies Citrologia supporting foundation, Osaka. Japan, 114 p.
- Thonberry H., 1966.** Index of plant virus diseases. *USDA Agriculture. Handbook*: 307-446.
- Timmer L. W., Garnsey S. M. and Graham J. H., 2000.** Compendium of Citrus Diseases, 2nd ed. *APS Press*: 92P.
- Trabut L. 1913.** Chlorose infectieuse des Citrus. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 156: 243-244.
- Ushiyawa K., Usugi T. et Hibidou H., 1984.** A new citrus virus disease, citrus yellow mottle. In: *Proc 9th Conf. of IOCV, Argentine 1983, and Riverside*: 204-210.
- Van Emden H.F., Eastop V.F., Hughes R.D., and Way M.J., 1969.** The ecology of *Myzus persicae*. *Ann. Rev. Entomol.* 14:197-270.
- Varma P.M., Rao D.G. and Capoor S. P., 1965.** Transmission of tristeza virus by *Aphis craccivora* (Koch) and *Dactynotus jaceae* (L.). *Indian J. Entomol.* 27: 67-71.
- Vela C., Cambra M., Cortes E., Moreno P., Miguet J., Perez de San Roman C. and Sanz A., 1986.** Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *Journ. Gen. Virol.* 67: 91-96.
- Vernière C., 2003.** Analyse du risque phytosanitaire (ARP) : Citrus Exocortis viroid (CEVd). *CIRAD. France*. 26P.
- Vézina L. et Lacroix M., 2016.** Laboratoire de diagnostic en phytoprotection – MAPAQ. www.agrireseau.qc.ca/.

Wallace J.M. and Drake R.J., 1962. Tatter leaf, a previously undescribed virus effect on citrus. Plant Dis. Rep. 46:211-212.

Wallace J.M., 1978. Virus and virus like diseases. Citrus Industry 4 (W. Reuther, E.C. Calavan and G.E. Carman eds). University of California, Berkeley: 362

Whelan J.A., Rusell N.B. Whelan M.A., 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. Journ.Immunol.Meth. 278:261-269.

Whiteside J.O., Garnsey S.M. and Timmer L.W., 1988. Compendium of citrus diseases.APS Press, USA, 80P.

Yahou Benrabah S., 2015.Le dépérissement des agrumes : étude éthologique et épidémiologique. Mém. Mag. Univ.Blida. 112P.

Yang G., Mawassi M., Gofman R., Gafny R. and Bar-Joseph M., 1997. Involvement of subgenomic mRNA in the generation of a variable population of defective *citrus tristeza virus* molecules. Journ. Virol. 71: 9800- 9802.

Yap E.P.H. and McGee J.O.D., 1994. Non-isotopic single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of PCR products. PCR Technology: Cur. Innov. CRC Press Inc: 165-177.

Yokomi R.K. and Garnsey S.M., 1987. Transmission of Citrus Tristeza Virus by *Aphis gossypii* and *Aphis Citricola* in Florida. Phytopathologica 19:169-172.

Yokomi R.K., 2005. Epidemiology of *Citrus tristeza virus* with *Toxoptera citricidus* as vector. Mediterranean Network on Certification of Citrus (MNCC): *Citrus tristeza and Toxoptera Citricida*: Developpement of Management and Control Stratégies in the Mediterranean Region..IAM/CIHEAM / EPPO / FAO / DRAALG. (Faro) Portugal.

Yokomi R.K., 2009.Citrus tristeza virus.United States Departement of Agriculture- Agrucultural Research Service (USDA-ARS) Parlier CA 93648, USA.Options Méditerranéennes SERIES B: Studies and Research 2009-Number 65.

Yokomi R.K., Garnsey S.M., Civerolo E.L., and Gumpf D.J., 1989.Transmission of exotic citrus tristeza virus isolates by a Florida colony o *Aphis gossypii*.Plant Dis. 73: 552-556.

Yokomi R.K., Lastra R., Stoetzel M.B., Damgsteet V.D., Lee R.F., Garnsey S.M., Rocha-Pena M.A. and Niblett C.L.,1994. Establishment of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (kirkaldy) (Homoptera: aphididae) in Central America and the Caribbean Basin, and its transmission of *citrus tristeza virus*. Journ. Econ. Entomol. 87: 1078-1085.

Yokomi R.K., Damstreegt V.C.1991. Comparaison of Citrus triseza virus transmmision efficacy by *Taxoptera citricidus* and *Aphis gossypii*. In: Peters D.C.J.A.Webster and Choubler, C.S. [eds.] Proc. Aphid Plant Intera.: Population to molecules. Stillwater, Oklahoma 75: 161-172.

Yot Dauthy D., Lafléche D. et Bové J.M., 1972. Citrus, a local lesions host of tobacco necrosis. In: Proc. 5th Conf of IOCV, Japan 1969, Univ. Florida: 212-216.

ANNEXES

ANNEXE1. Clé d'identification des pucerons d'agrumes dans le monde (Blackman and Eastop, 1984)

1	Antennal tubercles weakly developed	2
	Antennal tubercles well developed	10
2	Terminal process a little shorter than base of last antennal segment. Siphunculi much shorter	A
	Terminal process much longer than base of last antennal segment. Siphunculi shorter or	3
3	Cauda helmet-shaped in dorsal view, not longer than its width at base.	B
	Cauda tongue-shaped or triangular in dorsal view, longer than its basal width.	4
4	Dorsal abdomen with an extensive solid black patch.	C
	Dorsal abdomen without a black central patch.	5
5	Siphunculi much shorter than cauda.	D
	Siphunculi longer or at least as long as cauda.	6
6	Terminal process more than 3.5 times longer than base of last antennal segment. Cauda with	7
	Terminal process less than 3.5 times longer than base of last antennal segment. Cauda usually	9
7	Cauda with usually more than 20 hairs. Hairs on antennal segment III longer than the	E
	Cauda with usually less than 20 hairs. Hairs on antennal segment III often shorter than the diameter of this segment at base. Thoracic tergites usually unsclerotized.	8
8	Siphunculi less than 1.5 times longer than cauda. Stridulatory apparatus present.	F
	Siphunculi more than 1.5 times longer than cauda. Stridulatory apparatus absent.	G
9	Cauda paler than siphunculi, with 4-7 hairs. Femoral hairs all rather short, less than width of	H
	Cauda dark, with 6-12 hairs. Some femoral hairs long and fine, exceeding width of femur at base.	I
10	Inner face of antennal tubercles convergent.	J
	Inner face of antennal tubercles parallel or divergent.	11
11	Siphunculi a little shorter than the long dark cauda	K
	Siphunculi much longer than cauda.	12
12	Head, legs, and antennae mainly dark; femora basally pale but with distal one-half to three-quarters black. Siphunculi slightly swollen over distal two-thirds. Cauda with a constriction.	I
	Head, legs, and antennae mainly pale. Siphunculi tapering or parallel over most of length.	13
13	Inner faces of antennal tubercles parallel. Siphunculi without polygonal reticulation. Cauda only one-tenth to one-eighth of length of body.	M
	Inner faces of antennal tubercles divergent. Siphunculi with a subapical zone of polygonal reticulation. Cauda longer, one-seventh to one-fifth of length of body.	N

* The letters in the right column refer to the aphid species, whereas the letters in the same column refer to each step number of the first column.

A: *Brachyunguis harmalae*

B: *Brachycaudus helichrysi*

C: *Aphis craccivora*

D: *Toxoptera odinae*

E: *Toxoptera citricidus*

F: *Toxoptera aurantii*

G: *Aphis nerii*

H: *Aphis gossypii*

I: *Aphis spiraecola*

J: *Mysus persicae*

K: *Sinomegoura citricola*

L: *Aulacorthum magnoliae*

M: *Aulacorthum solani*

N: *Macrosiphum euphorbiae*

Casual aphid species: *Aphis arbuti*, *A. fabae*, *Brachycaudus cardui*, *Pterochloroides persicae* and *Rhapalosiphum maidis*

ANNEXE 2. Tampons et Solutions (DTBIA et ELISA)

(Clark and Bar-Joseph, 1984)

Solutions	Composants	Quantités	Notes
Solution (PBS) 1X pH 7.4	NaCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaN ₃ KCl	8,0 g 0,20 g 1,15 g 0,20 g 0,20 g	Dissolution dans 1 litre d'eau distillée.
Solution de lavage (W.B) pH 7.4	PBS (1X) Tween-20	1l 0,5 ml	
Solution Extraction (E.B) pH 7.4	Polyvinilpirolidine Tween-20	20. 0 g 0,5 ml	Dissolution dans 1L de PBS (1X).
Solution de Sensibilisation (C.B) pH 9.6	Na ₂ CO ₃ NaN ₃ NaHCO ₃	1,59 g 2,93 g 0,20 g	Dissolution dans 1 litre d'eau distillée.
Solution du Conjugué (C.B) pH 7.4	Polyvinilpirolidine Tween-20 Bovine serum albumin (BSA)	20,0 g 0,5 ml 2.0 g	Dissolution dans 1L de PBS (1X).
Solution de substrat(S.B) pH 9.8	Diethanolamine NaN ₃	97 ml 0,20 g	Dissolution dans 1 litre d'eau distillée.

ANNEXE3. Solutions pour l'extraction des Acides nucléiques totaux

Solutions	Composants	Quantités	Notes
Tampon de broyage (Grinding buffer) (pH 5.6 - 5.8)	Guanidine thiosianate	4M	- Ajustez pH avec CH ₃ COOH - Sterilisez par autoclavage - Conservez à 4°C - Ajoutez Sodium bisulphate - Avant l'utilisation
	NaOAc, pH 5.2	0.2 M	
	EDTA.	25 mM	
	KOAc	1.0 M	
	PVP-40	2.5%	
	Sodium bisulphate	2%	
NaI (6M)	Na ₂ SO ₃ NaI (Sigma S8379)	0.75 g 36 g	- Dissoudre in 40 ml distilled water - Sterilisez par autoclavage - Conservez à l'obscurité 4°C
Solution silicates (Silica particles solution) (pH 2.0)	Silica particles (Sigma 12% S5631)	12%	- Ajoutez 60 g silica to 500 ml H ₂ O - Mélanger et laisser reposer 24 hours - Eliminer 470 ml supernatant (90% o supernatant) - Ajoutez H ₂ O jusqu'à 500 ml et bien mélangez - Laissez reposez 5 h - Eliminez 440 ml (85% du supernatant) - Ajuster la suspension restante de 60 ml à un pH de 2,0 avec du HCl - Autoclave et stocker dans l'obscurité à température ambiante
Solution de lavage (Washing buffer)(1x)	Tris-HCl, pH7.5 (1 M) EDTA (5 M) NaCl (0.5 M) Ehanol	10.0 mM 0.5 mM 50 mM 50%	- Sterilize by autoclaving before adding ethanol. - Keep it at 4°C

ANNEXE 4. Tampons et Gels pour électrophorèse

Tampons	Composants	Quantité	Note
TAE 20x (solution mère: pH 7.2)	Tris Sodium acetate EDTA	0.4M 0.4M 0.02M	- Ajuster le pH en utilisant de l'acide acétique - Stériliser par autoclavage - Conserver à température ambiante
TBE 10x (solution mère: pH 8.3)	Tris Boric acid 99.5% EDTA	1M 61.3 g 0.01M	- Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée - Stériliser par autoclavage - Conserver à température ambiante
1%-Agarose-TBE gel	Distilled water TBE 10x Agarose	90 ml 10 ml 1 g	-Faire bouillir le mélange pendant quelques minutes.
5%Polyacrylamide-TBE gel	Distilled water Acryl-bis 40% TAE 3x APS 10% TEMED	3.86 ml 650 µl 500 ml 60 µl 6 µl	- Pour 5ml volume
10%- Polyacrylamide-TBE gel	Distilled water Acryl-bis 40% TAE 3x APS 10% TEMED	3.86 ml 1.3 ml 1 ml 120 µl 12 µl	- Pour 5ml volume
Solution de fixation	Acetic acid glacial	10 ml	- Ramener le volume à 100 ml en utilisant de l'eau désionisée
Solution d'acide Nitrique	Nitric acid pure	1ml	- Ramener le volume à 100 ml en utilisant de l'eau désionisée
Solution nitrates d'argent	AgNO ₃ Formaldehyde 37%	100 mg 150 µl	- Ramener le volume à 100 ml en utilisant de l'eau désionisée
Solution de développement	NaCO ₃ Formaldehyde 37% Sodium thiosulphate 200	3g 150 µl 4 µl	- Ramener le volume à 100 ml en utilisant de l'eau désionisée

ANNEXE 5. Milieux et solutions bactériennes utilisés pour le clonage et extraction du DNA du plasmide

Solutions	Composants	Quantités	Notes
STET (100 ml) pH 8.0	NaCl	0.1 M	
	Tris-HCl	2 mM	
	EDTA	50 Mm	
	Saccarose	8%	
	Triton X-100	0,5%	
Lysozyme		20 mg/ml	Conservez à -20°C
Acetate d'ammonium pH 5.5	CH ₃ CO ₂ NH ₄	5 M	Stérilisez par autoclavage
PEG-NaCl	PEG 8000	20%	Stérilisez par autoclavage
	NaCl	2,5%	
Luria-Bertani (LB) Liquide	Tryptone	1%	Stérilisez par autoclavage
	Yeast extract	0,5%	
	NaCl	0,5%	
Luria-Bertani (LB) Solide	Tryptone	1%	Stérilisez par autoclavage
	Yeast extract	0,5%	
	NaCl	0,5%	
	Agar	0,3%	
TamponTE (pH 8)	Tris	1 mM	Stérilisez par autoclavage
	EDTA	1 mM	

ANNEXE 6. Résultats (ELISA /DTBIA)

Tableau 1: Résultats de DAS-ELISA de la station de Hadjout

Code Échantillon		Espèce	Réaction ELISA densité optique	
			R1	R2
A1R1	E1	Valencia-late	-	0,005±0,166
A2R1	E2		-	0,024±0,205
A3R1	E3		-	0,035±0,197
A5R1	E4		-	0,002±0,231
A7R1	E5		-	0,028±0,141
A8R1	E6		-	0,035±0,197
A9R1	E7		-	0,002±0,231
A10R1	E8		-	0,028±0,141
A11R1	E9		-	0,035±0,197
A12R1	E10		-	0,012±0,221
A13R1	E11		-	0,024±0,190
A14R1	E12		-	0,015±0,182
A15R1	E13		-	0,018±0,215
A16R1	E14		-	0,004±0,212
A18R2	E15		-	0,017±0,218
A19R2	E16		-	0,008±0,395
A20R2	E17		-	0,004±0,212
A21R2	E18		-	0,017±0,218
A22R2	E19		-	0,015±0,182
A24R2	E20		-	0,215,018±0
A25R2	E21		-	0,024±0,198
A27R2	E22		-	0,005±0,166
A2R1	E1	Clémentine	-	0,012±0,221
A4R1	E2		-	0,024±0,190
A5R1	E3		-	0,015±0,182
A6R1	E4		-	0,018±0,215
A7R1	E5		-	0,024±0,198
A8R1	E6		-	0,004±0,212
A9R1	E7		-	0,017±0,218
A10R1	E8		-	0,008±0,395
A11R1	E9		-	0,004±0,212
A12R1	E10		-	0,017±0,218
A13R1	E11		-	0,215,018±0
A14R1	E12		-	0,024±0,198
A15R1	E13		-	0,005±0,166
A16R1	E14		-	0,012±0,221
A18R1	E15		-	0,018±0,215
A20R1	E16		-	0,024±0,198
A21R1	E17		-	0,004±0,212
A22R1	E18		-	0,012±0,221
A23R1	E19		-	0,018±0,215
A24R1	E20		-	0,018±0,215
A26R1	E21		-	0,024±0,198

A27R2	E22		+	0,026±0,365
A28R2	E23		-	0,002±0,231
A29R2	E24		-	0,028±0,141
A30R2	E25		-	0,035±0,197
A31R2	E26		-	0,035±0,197
A32R2	E27		-	0,024±0,198
A33R2	E28		-	0,005±0,166
A34R2	E29		-	0,012±0,221
A36R2	E30		-	0,012±0,221
A37R2	E31		-	0,018±0,215
A38R2	E32		-	0,018±0,215
A39R2	E33		-	0,005±0,166
A40R2	E34		-	0,012±0,221
A41R2	E35		-	0,012±0,221
A42R2	E36		-	0,012±0,221
A43R2	E37		-	0,012±0,221
A44R2	E38		-	0,018±0,215
A45R2	E39		-	0,018±0,215
A46R2	E40		-	0,005±0,166
A47R2	E41		-	0,024±0,205
A48R2	E42		-	0,035±0,197
A50R2	E43		-	0,002±0,231
A51R2	E44		-	0,028±0,141
A52R2	E45		-	0,018±0,215
A53R2	E46		-	0,018±0,215
A54R2	E47		-	0,005±0,166
A55R2	E48		-	0,012±0,221
A56R2	E49		-	0,012±0,221
A57R2	E50		-	0,012±0,221
A60R2	E51		-	0,012±0,221
A61R2	E52		-	0,018±0,215
A62R2	E53		-	0,018±0,215
A63R2	E54		-	0,005±0,166
A64R2	E55		+	0,016±0,401
A65R3	E56		-	0,008±0,395
A66R3	E57		-	0,004±0,212
A67R3	E58		-	0,012±0,221
A68R3	E59		+	0,022±0,274
A69R3	E60		+	0,032±0,289
A2R1	E1	Double fine	-	0,012±0,221
A3R1	E2		-	0,018±0,215
A4R1	E3		+	0,032±0,123
A5R1	E4		-	0,008±0,395
A6R1	E5		-	0,004±0,212
A7R1	E6		-	0,017±0,218
A8R1	E7		+	0,030±0,401
A9R1	E8		-	0,012±0,221
A10R1	E9		-	0,018±0,215
A11R1	E10		+	0,014±0,205
A41R3	E11		+	0,017±0,288
A1R1	E1	Citronnier	-	0,018±0,131
A2R1	E2		-	0,018±0,169

A3R1	E3		-	0,012±0,212
A4R1	E4		-	0,020±0,215
A5R1	E5		-	0,018±0,210
A6R1	E6		-	0,012±0,221
A8R1	E7		-	0,018±0,215
A9R1	E8		-	0,012±0,221
A11R1	E9		-	0,018±0,215
A12R1	E10		-	0,018±0,215
A13R1	E11		-	0,005±0,166
A14R1	E12		-	0,035±0,197
A15R1	E13		-	0,002±0,231
A16R1	E14		-	0,028±0,141
A17R1	E15		-	0,018±0,215
A18R1	E16		-	0,018±0,215
A19R1	E17		-	0,005±0,166
A20R1	E18		-	0,035±0,197
A21R1	E19		-	0,002±0,231
A22R1	E20		-	0,028±0,141
A23R1	E21		+	0,025±0,322
A24R1	E22		-	0,018±0,131
A25R1	E23		-	0,018±0,215
A27R1	E24		+	0,012±0,221
A28R1	E25		-	0,018±0,215
A29R2	E26		-	0,018±0,215
A30R2	E27		-	0,018±0,210
A31R2	E28		-	0,012±0,221
A33R2	E29		-	0,018±0,215
A34R2	E30		-	0,012±0,221
A35R2	E31		-	0,018±0,215
A36R2	E32		-	0,018±0,215
A37R2	E33		-	0,005±0,166
A38R2	E34		-	0,035±0,197
A39R2	E35		-	0,002±0,231
A40R2	E36		-	0,028±0,141
A41R2	E37		-	0,018±0,215
A42R2	E38		-	0,012±0,221
A43R2	E39		-	0,018±0,215
A44R2	E40		-	0,018±0,215
A2R1	E1	Washington naval	-	0,013±0,202
A5R1	E2		-	0,021±0,220
A6R1	E3		-	0,014±0,224
A4R2	E4		-	0,018±0,204
A7R1	E5		-	0,011±0,130
A3R3	E6		-	0,021±0,220
A13R3	E7		-	0,014±0,224
	Tampon de broyage	0,020±0,102	-	
	Témoin frais sain	0,021±0,201	-	
	Témoin frais malade	0,027±0,421	+	
	Témoin négatif 1	0,053±0,193	-	

	Témoin négatif 2	0,012±0,187	-	
	Témoin négatif 3	0,030±0,160	-	
	Témoin positif	0,611	+	
	Tampon de broyage	0,020±0,102	-	

Tableau 3 : Résultats DAS-ELISA de la station de Boufarik1

Code Échantillon		Espèce	Réaction DAS-ELISA	Densité optique
A1R1	E1	Mandarine	-	0,005±0,166
A2R1	E2		+	0,012±0,395
A3R1	E3		-	0,005±0,221
A4R1	E4		+	0,011±0,344
A5R1	E5		-	0,008±0,235
A6R1	E6		-	0,013±0,135
A7R1	E7		+	0,027±0,280
A8R1	E8		-	0,020±0,240
A10R1	E9		+	0,020±0,338
A11R1	E10		+	0,012±0,276
A14R1	E11		+	0,012±0,270
A15R1	E12		+	0,012±0,277
A18R1	E13		+	0,011±0,274
A19R1	E14		+	0,035±0,278
A20R1	E15		+	0,011±0,274
A21R1	E16		+	0,011±0,234
A22R1	E17		+	0,012±0,276
A23R1	E18		+	0,018±0,402
A24R1	E19		+	0,018±0,345
A25R1	E20		+	0,020±0,343
A26R1	E21		+	0,018±0,401
A27R2	E22		+	0,018±0,400
A29R2	E23		+	0,013±0,276
A30R2	E24		+	0,012±0,276
A31R2	E25		-	0,007±0,288
A32R2	E26		-	0,017±0,134
A33R2	E27		+	0,025±0,289
A34R2	E28		+	0,018±0,403
A37R2	E29		+	0,014±0,354
A40R2	E30		+	0,023±0,277
A41R2	E31		+	0,022±0,278
A42R2	E32		-	0,005±0,169
A43R2	E33		-	0,008±0,204
A44R2	E34		+	0,010±0,278

A45R2	E35		+	0,018±0,344
A46R2	E36		-	0,020±0,214
A47R2	E37		+	0,034±0,354
A48R2	E38		+	0,021±0,280
A49R2	E39		-	0,009±0,214
A52R2	E40		-	0,009±0,227

Tableau 4 : Résultats DAS-ELISA de la station de Chebli

Code Échantillon		Espèce	Réaction DTBIA	
			R1	R2
A1R1	E1	Clémentine	-	0,018±0,204
A2R1	E2		-	0,016±0,278
A3R1	E3		-	0,028±0,175
A4R1	E4		-	0,015±0,232
A5R1	E5		-	0,010±0,159
A6R1	E6		-	0,015±0,232
A7R1	E7		-	0,010±0,159
A8R1	E8		-	0,028±0,175
A9R1	E9		-	0,015±0,232
A10R1	E10		-	0,010±0,159
A11R1	E11		-	0,015±0,232
A12R1	E12		-	0,010±0,159
A13R1	E13		-	0,028±0,175
A14R1	E14		-	0,015±0,232
A15R1	E15		-	0,010±0,159
A16R1	E16		-	0,018±0,204
A17R1	E17		-	0,011±0,130
A18R1	E18		+	0,016±0,278
A19R1	E19		-	0,028±0,175
A21R2	E20		-	0,015±0,232
A22R2	E21		+	0,016±0,278
A23R2	E22		-	0,028±0,175
A25R2	E23		-	0,015±0,232
A26R2	E24		-	0,018±0,204
A29R2	E25		+	0,011±0,298
A30R2	E26		-	0,028±0,175
A32R2	E27		-	0,015±0,232

Tableau 6: Résultats DAS-ELISA de la station de Boufarik 2

Code Échantillon		Espèce	Réaction DAS-ELISA	
			R1	R2
R2A11	E1	Washington naval	-	0,021±0,220
R31A1	E2		-	0,033±0,240
R6A3	E3		+	0,035±0,392
R21A4	E4		-	0,021±0,220
R40R1	E5		-	0,021±0,220
R6A5	E6		+	0,034±0,344
R2A10	E7		-	0,015±0,232

R2R18	E8		-	0,010±0,159
R3A9	E9		-	0,015±0,232
R4A4	E10		-	0,011±0,130
R27A8	E11		-	0,021±0,220
R1A2	E12		+	0,035±0,392
R2A17	E13		-	0,032±0,176
R4A8	E14		+	0,035±0,392
R4A9	E15		+	0,035±0,392
R1A10	E16		-	0,015±0,232
R14A3	E17		-	0,010±0,159
R1A18	E18		-	0,015±0,232
R12A17	E19		+	0,035±0,392
R17A9	E20		-	0,011±0,130
R41A1	E21		-	0,021±0,220
R5A4	E22		+	0,035±0,392
R40A1	E23		+	0,035±0,392
R10A10	E24		+	0,035±0,392
R6AA1	E25		-	0,033±0,204
R41A2	E26		+	0,035±0,392
R16A9	E27		+	0,035±0,392
R32A1	E28		-	0,007±0,188
R6A9	E29		+	0,035±0,392
R7A2	E30		+	0,041±0,135
R6A7	E31		+	0,035±0,392
R2A7	E32		-	0,011±0,130
R23A2	E33		-	0,021±0,220
R27A16	E34		+	0,035±0,392
R6A13	E35		-	0,015±0,232
R18A1	E36		-	0,010±0,159
R4A13	E37		-	0,015±0,232
R2A7	E38		-	0,015±0,232
R30A18	E39		-	0,010±0,159
R1A11	E40		-	0,015±0,232
A2R2		Satsuma	-	0,023±0,209
A26R2			-	0,038±0,136
A16R2			+	0,011±0,385
A34R2			-	0,041±0,135
A9R2			+	0,035±0,392
A2R1			+	0,035±0,392
A9R1			+	0,022±0,360
A19R2			+	0,011±0,385
A20R2			+	0,044±0,344
A21R2			+	0,035±0,392
A22R2			+	0,019±0,399
A23R2			+	0,035±0,392
A17R2			+	0,035±0,392
A18R2			+	0,050±0,355
A24R2			-	0,011±0,130
A35R2			-	0,021±0,220
A36R2			-	0,018±0,204
A5R2			-	0,011±0,130
A3R2			-	0,021±0,220
A6R2			-	0,011±0,130

A8R2			-	0,021±0,220
A7R2			-	0,018±0,204
A2R1			-	0,011±0,130
A4R1			-	0,021±0,220
A5R1			-	0,011±0,130
A7R1			-	0,021±0,220
A3R1			-	0,018±0,204
A6R3			-	0,011±0,130
A16R3			+	0,054±0,393
A15R3			+	0,035±0,392
A18R3			+	0,035±0,392
A21R3			+	0,033±0,320
A17R3			+	0,035±0,392
A20R3			+	0,035±0,392
A22R3			+	0,011±0,385
A9R3			-	0,004±0,200
A10R3			-	0,020±0,186
A3R3			-	0,015±0,221
A2R3			-	0,005±0,207
A5R3			-	0,024±0,216
A4R3			-	0,015±0,221
A7R3			-	0,005±0,207
A1R3			-	0,024±0,216
A31R3			+	0,011±0,385
A30R3			+	0,011±0,385
A33R3			-	0,015±0,221
A1R1			-	0,004±0,200
A3R1			-	0,020±0,186
A9R1			-	0,015±0,221
A32R1		Salustiana	-	0,005±0,207
A41R1			-	0,024±0,216
A5R1			-	0,049±0,152
A2R1			-	0,015±0,214
A1R1			-	0,040±0,127
A3R1			-	0,014±0,126
A4R1			-	0,016±0,115
A6R1			-	0,015±0,221
A7R3			-	0,005±0,207
A9R1			-	0,024±0,216
A10R1			-	0,020±0,186
A8R1			-	0,017±0,225
A20R			-	0,009±0,239
A36R1			+	0,045±0,277
A37R1			+	0,023±0,370
A38R1			+	0,011±0,270
A39R1		Pamplermousse	+	0,015±0,272
A20R1			-	0,038±0,202
A1R1			-	0,012±0,166
A11R1			-	0,050±0,206
A6R1			-	0,034±0,201
A2R1			-	0,056±0,115
A3R2			-	0,017±0,225
A6R2		Tarocco	-	0,009±0,239

A5R1			-	0,022±0,209
A3R1			-	0,009±0,239
A7R1			-	0,022±0,209
A1R1			-	0,050±0,206
A2R2			-	0,034±0,201
A10R1			-	0,056±0,115
A4R1			-	0,021±0,232
A11R2			-	0,017±0,225
A14R1			-	0,009±0,239
A9R2			-	0,022±0,209
A36R1			-	0,009±0,239
A12R2			-	0,022±0,209
A5R1			-	0,022±0,216
A25R1			-	0,017±0,225
A26R1			-	0,009±0,239

Résultats de test DTBIA

Tableau 1 : Résultats de test DTBIA de la station de Hadjout

Code Échantillon		Espèce	Réaction DTBIA
		Valencia-late	
A1R1	E1		-
A2R1	E2		-
A3R1	E3		-
A5R1	E4		-
A7R1	E5		-
A8R1	E6		-
A9R1	E7		-
A10R1	E8		-
A11R1	E9		-
A12R1	E10		-
A13R1	E11		-
A14R1	E12		-
A15R1	E13		-
A16R1	E14		-
A18R2	E15		-
A19R2	E16		-
A20R2	E17		-
A21R2	E18		-
A22R2	E19		-
A24R2	E20		-
A25R2	E21		-
A27R2	E22		-
A28R2	E23		-
A 30R2	E24		-
A32R2	E25		-
A33R2	E26		-
A34R2	E27		-
A35R2	E28		-

A36R2	E29		-
A37R3	E30		-
A38R3	E31		-
A40R3	E32		-
A42R3	E33		-
A43R3	E34		-
A44R3	E35		-
A45R3	E36		-
A46R3	E37		-
A47R3	E38		-
A48R3	E39		-
A49R3	E40		-
A50R3	E41		-
A51R3	E42		-
A52R3	E43		-
A53R3	E44		-
A56R3	E45		-
A2R1	E1	Clémentine	-
A4R1	E2		-
A5R1	E3		-
A6R1	E4		-
A7R1	E5		-
A8R1	E6		-
A9R1	E7		-
A10R1	E8		-
A11R1	E9		-
A12R1	E10		-
A13R1	E11		-
A14R1	E12		-
A15R1	E13		-
A16R1	E14		-
A18R1	E15		-
A20R1	E16		-
A21R1	E17		-
A22R1	E18		-
A23R1	E19		-
A24R1	E20		-
A26R1	E21		-
A27R2	E22		+
A28R2	E23		-
A29R2	E24		-
A30R2	E25		-
A31R2	E26		-
A32R2	E27		-
A33R2	E28		-
A34R2	E29		-
A36R2	E30		-
A37R2	E31		-
A38R2	E32		-
A39R2	E33		-
A40R2	E34		-
A41R2	E35		-
A42R2	E36		-

A43R2	E37		-
A44R2	E38		-
A45R2	E39		-
A46R2	E40		-
A47R2	E41		-
A48R2	E42		-
A50R2	E43		-
A51R2	E44		-
A52R2	E45		-
A53R2	E46		-
A54R2	E47		-
A55R2	E48		-
A56R2	E49		-
A57R2	E50		-
A60R2	E51		-
A61R2	E52		-
A62R2	E53		-
A63R2	E54		-
A64R2	E55		+
A65R3	E56		-
A66R3	E57		-
A67R3	E58		-
A68R3	E59		+
A69R3	E60		+
A70R3	E61		-
A71R3	E62		-
A72R3	E63		+
A73R3	E64		-
A74R3	E65		-
A75R3	E66		-
A76R3	E67		-
A77R3	E68		-
A78R3	E69		-
A78R3	E70		-
A79R3	E71		-
A80R3	E72		-
A81R4	E73		-
A82R4	E74		-
A83R4	E75		-
A84R4	E76		-
A85R4	E77		-
A86R4	E78		-
A87R4	E79		-
A88R4	E80		-
A89R4	E81		-
A90R4	E82		-
A91R4	E83		-
A92R4	E84		-
A93R4	E85		-
A94R4	E86		-
A95R4	E87		-
A96R4	E88		-
A97R4	E89		-

A98R4	E90		-
A99R4	E91		-
A100R4	E92		-
A101R4	E93		-
A102R4	E94		-
A103R4	E95		-
A104R4	E96		-
A105R5	E97		-
A106R5	E98		-
A107R5	E99		-
A108R5	E100		-
A109R5	E101		-
A110R5	E102		-
A112R5	E103		-
A113R5	E104		-
A114R5	E105		-
A115R5	E106		-
A116R5	E107		-
A117R5	E108		-
A118R5	E109		-
A119R5	E110		-
A120R5	E111		-
A121R5	E112		-
A122R5	E113		-
A124R5	E114		-
A125R5	E115		-
A126R5	E116		-
A127R5	E117		-
A128R5	E118		-
A130R5	E119		-
A131R6	E120		-
A132R6	E121		-
A133R6	E122		-
A134R6	E123		-
A135R6	E124		-
A136R6	E125		-
A137R6	E126		-
A138R6	E127		-
A139R6	E128		-
A140R6	E129		+
A142R6	E130		-
A143R6	E131		-
A144R6	E132		-
A145R6	E133		-
A146R6	E134		+
A147R6	E135		+
A148R6	E136		-
A149R6	E137		-
A150R6	E138		-
A152R6	E139		-
A153R6	E140		-
A154R6	E141		-

A155R6	E142		-
A156R6	E143		-
A157R6	E144		+
A2R1	E1	Double fine	-
A3R1	E2		-
A4R1	E3		+
A5R1	E4		-
A6R1	E5		-
A7R1	E6		-
A8R1	E7		+
A9R1	E8		-
A10R1	E9		-
A11R1	E10		+
A12R1	E11		-
A13R1	E12		-
A14R1	E13		-
A15R1	E14		-
A17R1	E15		-
A18R1	E16		+
A19R1	E17		-
A20R1	E18		-
A1R1	E1	Citronnier	-
A2R1	E2		-
A3R1	E3		-
A4R1	E4		-
A5R1	E5		-
A6R1	E6		-
A8R1	E7		-
A9R1	E8		-
A11R1	E9		-
A12R1	E10		-
A13R1	E11		-
A14R1	E12		-
A15R1	E13		-
A16R1	E14		-
A17R1	E15		-
A18R1	E16		-
A19R1	E17		-
A20R1	E18		-
A21R1	E19		-
A22R1	E20		-
A23R1	E21		+
A24R1	E22		-
A25R1	E23		-
A27R1	E24		+
A28R1	E25		-
A29R2	E26		-
A30R2	E27		-
A31R2	E28		-
A33R2	E29		-
A34R2	E30		-
A35R2	E31		-
A36R2	E32		-

Tableau 3 : Résultats de test DTBIA de la station Boufarik 1

Code Échantillon		Espèce	Réaction DTBIA	
			R1	R2
A1R1	E1	Mandarine	-	
A2R1	E2		+	
A3R1	E3		-	
A4R1	E4		+	
A5R1	E5		-	
A6R1	E6		-	
A7R1	E7		-	
A8R1	E8		-	
A10R1	E9		+	
A11R1	E10		+	
A14R1	E11		+	
A15R1	E12		+	
A18R1	E13		+	
A19R1	E14		+	
A20R1	E15		+	
A21R1	E16		+	
A22R1	E17		+	
A23R1	E18		+	
A24R1	E19		+	
A25R1	E20		+	
A26R1	E21		+	
A27R2	E22		+	
A29R2	E23		+	
A30R2	E24		+	
A31R2	E25		+	
A32R2	E26		+	
A33R2	E27		+	
A34R2	E28		+	
A37R2	E29		+	
A40R2	E30		+	
A41R2	E31		+	
A42R2	E32		+	
A43R2	E33		+	
A44R2	E34		+	
A45R2	E35		+	
A46R2	E36		-	
A47R2	E37		+	
A48R2	E38		+	
A49R2	E39		-	
A52R2	E40		-	
A53R2	E41		-	
A54R3	E42		+	
A58R3	E43		-	
A60R3	E44		+	
A61R3	E45		+	
A62R3	E46		+	
A63R3	E47		+	

A64R3	E48	+	
A66R3	E49	+	
A67R3	E50	+	
A68R3	E51	+	
A69R3	E52	+	
A70R3	E53	+	
A71R3	E54	+	
A72R3	E55	+	
A73R3	E56	+	
A74R3	E57	+	
A75R3	E58	+	
A76R3	E59	-	
A77R3	E60	+	
A78R4	E61	-	
A80R4	E62	-	
A82R4	E63	+	
A86R4	E64	-	
A88R4	E65	-	
A89R4	E66	+	
A91R4	E67	-	
A92R4	E68	-	
A93R4	E69	+	
A94R4	E70	+	
A95R4	E71	-	
A96R4	E72	-	
A97R4	E73	+	
A98R4	E74	+	
A99R5	E75	+	
A100R5	E76	-	
A101R5	E77	+	
A102R5	E78	-	
A103R5	E79	+	
A105R5	E80	-	
A107R5	E81	+	
A108R5	E82	+	

Tableau 4: Résultats de test DTBIA de la station Chebli

Code Échantillon		Espèce	Réaction DTBIA	
			R1	R2
A1R1	E1	Clémentine	-	
A2R1	E2		+	
A3R1	E3		-	
A4R1	E4		-	
A5R1	E5		-	
A6R1	E6		-	
A7R1	E7		-	
A8R1	E8		-	
A9R1	E9		-	
A10R1	E10		-	
A11R1	E11		-	
A12R1	E12		-	

A13R1	E13		-	
A14R1	E14		-	
A15R1	E15		-	
A16R1	E16		-	
A17R1	E17		-	
A18R1	E18		+	
A19R1	E19		-	
A21R2	E20		-	
A22R2	E21		+	
A23R2	E22		+	
A25R2	E23		-	
A26R2	E24		-	
A29R2	E25		+	
A30R2	E26		-	
A32R2	E27		-	
A34R2	E28		-	
A35R2	E29		-	
A36R2	E30		+	
A37R3	E31		+	
A38R3	E32		+	
A39R3	E33		+	
A40R3	E34		-	
A41R3	E35		-	
A43R3	E36		-	
A44R3	E37		+	
A45R3	E38		-	
A46R3	E39		-	
A47R3	E40		+	
A48R3	E41		-	
A49R3	E42		-	
A50R3	E43		-	
A51R3	E44		-	
A52R3	E45		-	
A53R2	E46		+	
A54R4	E47		+	
A58R4	E48		+	
A59R5	E49		+	
A60R5	E50		+	
A62R6	E51		-	
A63R6	E52		+	
A64R6	E53		-	
A65R6	E54		-	

Tableau 6: Résultats de test DTBIA de la station Boufarik 2

Code Échantillon		Espèce	Réaction DTBIA	
			R1	R2
R2A11	E1	Washington naval	-	
R31A1	E2		-	
R6A3	E3		+	
R21A4	E4		-	
R40R1	E5		-	

R6A5	E6		+
R2A10	E7		-
R2R18	E8		-
R3A9	E9		-
R4A4	E10		-
R27A8	E11		-
R1A2	E12		+
R2A17	E13		-
R4A8	E14		+
R4A9	E15		+
R1A10	E16		-
R14A3	E17		-
R1A18	E18		-
R12A17	E19		+
R17A9	E20		-
R41A1	E21		-
R5A4	E22		+
R40A1	E23		+
R10A10	E24		+
R6AA1	E25		-
R41A2	E26		+
R16A9	E27		+
R32A1	E28		-
R6A9	E29		+
R7A2	E30		+
R6A7	E31		+
R2A7	E32		-
R23A2	E33		-
R27A16	E34		+
R6A13	E35		-
R18A1	E36		+
R4A13	E37		+
R2A7	E38		-
R30A18	E39		-
R1A11	E40		-
R2A6	E41		-
R6A18	E42		-
R1A6	E43		+
R1A7	E44		+
R7A14	E45		-
R25A5	E46		-
R13A10	E47		+
R10A18	E48		+
R6A15	E49		-
R1A10	E50		-
R2614	E51		+
R1A17	E52		-
R27A5	E53		-
R10A2	E54		-
R25A12	E55		-
R16A12	E56		+
R9A10	E57		-
R7A8	E58		+

R7A10	E59		-	
R6A17	E60		-	
R25A4	E61		+	
R28A8	E62		-	
R16A13	E63		-	
R7A1	E64		-	
R8A16	E65		-	
R29A18	E66		-	
R12A5	E67		-	
R10A17	E68		-	
R7A32	E69		-	
R9A17	E70		+	
R8A7	E71		-	
R8A1	E72		-	
R23A6	E73		-	
R8A7	E74		-	
R23A10	E75		+	
R28A16	E76		-	
R23A3	E77		+	
R24A10	E78		+	
R20A2	E79		+	
R24A8	E80		-	
R29A2	E		-	
R29A7			+	
R23A7			-	