

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET VETERINAIRES
DEPARTEMENT D'AGRONOMIE

MEMOIRE DE MAGISTER

SPECIALITE : PROTECTION DES VEGETAUX

CONNAISSANCES SUR LES *PHYTOPLASMES* DES AGRUMES
CARACTERISATION IMMUNOENZYMATIQUE ACP-ELISA DU STUBBORN
(*SPIROPLASMA CITRI*) EN ALGERIE

PAR

Kenza BENZAOUZ

Devant le jury composé de :

Z. HOUMANI	Professeur, USD. Blida	Président
H. HACENE	Professeur, USTH. Bab-Ezzouar	Examineur
A. EI-FERRAN	Chargée de cours, USD. Blida	Examineur
H. BELKAHLA	Professeur, USD. Blida	Promotrice

Blida, Mars 2007

RESUME

Le stubborn des agrumes [*Citrus stubborn disease (CSD)*] causé par le *Mollicute Spiroplasma citri* est une maladie de quarantaine, elle est classée deuxième après la tristeza des agrumes. Le stubborn est présent dans la majorité des aires agrumicoles semi-arides et dans tous les pays du bassin méditerranéen, et rare dans les pays à climat froid. En plus de sa propagation par greffage elle se transmet par cicadelles selon le mode persistant. L'objectif de notre étude était de vérifier la présence de cette maladie au niveau de la région de la Mitidja. Des prospections ont été effectuées au niveau de 6 stations (Station de Chebli, EURL de Hadjout, station d'agronomie de Blida, Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik, station de Benkhellil et pépinière privée de Guerrouaou (Soumaa)). Les symptômes associés à cette maladie étaient très caractéristiques (Chloroses, balai de sorcière, feuilles arrondies, en cuillère et en forme de cœur). Nous avons effectué 2 tests de diagnostic: test sérologique et test de transmission mécanique par inoculation et indexage. Le test sérologique DAS-ELISA a donné des résultats positifs pour les différentes stations prospectées avec une incidence de 27,19% ce qui confirme la présence du stubborn en Algérie. L'incidence calculée pour les différentes stations (Station de Benkhellil, station d'agronomie de Blida, pépinière privée de Guerrouaou, EURL de Hadjout, station de Chebli et Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik) étaient respectivement (33,33%, 33,33%, 27,77%, 25%, 28,88%, et 15,79%). Des symptômes caractéristiques du stubborn ont été extériorisés par les plants d'agrumes indexés et les pervenches inoculées (*Catharanthus roseus*). Le test DAS-ELISA a été réalisé sur l'ensemble des plants inoculés et a révélé des résultats positifs avec une incidence de 32,55%.

Mots clés : Agrumes, Indexage, *Phytoplasmas*, *Spiroplasma citri*, *Citrus stubborn disease*, *Circulifer tenellus*, *Neoliturus haematoceps*.

SUMMARY

The stubborn of the *Citrus* fruit [*Citrus stubborn diseases (CSD)*] caused by the *Mollicute Spiroplasma citri* is a quarantine disease, it is in the second position after the tristeza. The stubborn is present in the most semi-arid *Citrus* fruit areas and in the entire mediterranean basin and sparse in countries with cold weather. In addition of its spreading through grafting, it is transmitted by the cicadelles through the persistent way. The goal of our study was to check the presence of this disease at the Mitidja region level. Prospecting were carried out through 6 pilot farms (Chebli's farm, Hadjout EURL, Blida agricultural farm, wood park of ITAFV-Boufarik, Benkhellil's farm and private tree-nursery of Guerrouaou at Soumaa). The symptoms linked to this disease were very characteristics (witch sweeper, chlorosis, and rounded leaves, in spoon and heart shape). We carried out 2 diagnostic tests: Serological test and mechanical transmission test through inoculation and grafting. The serological test DAS-ELISA caused positive results in the different prospected farms with an incidence of 27,19% confirming the stubborn presence in Algeria. The calculated incidence in the different pilot farms (Benkhellil farm, Blida agricultural farm, private tree-nursery of Guerrouaou, Hadjout EURL, Chebli's farm and wood park of ITAFV-Boufarik) was respectively: 33,33%, 33,33%, 27,77%, 25%, 28,88%, 15,79%. Characteristical symptoms of the stubborn have been showed by the indexed seedlings and the inoculated periwinkles (*Catharanthus roseus*). The DAS-ELISA test has been carried out on the whole inoculated seedlings and revealed positive results with an incidence of 32,55%.

Key-words: *Citrus*, indexing, *Phytoplasmas*, *Spiroplasma citri*, *Citrus stubborn disease*, *Circulifer tenellus*, *Neoliturus haematoceps*.

ملخص

مرض العنناد [*Citrus stubborn disease (CSD)*] المتسبب عن *Mollicute Spiroplasma citri* هو مرض خطير جدا على الحمضيات، يأتي في المرتبة الثانية بعد مرض Tristeza. هذا المرض متواجد في معظم المناطق الشبه جافة و جميع بلدان البحر الأبيض المتوسط و نادر في البلدان ذات الطقس البارد. زيادة عن انتقاله عبر عيون التطعيم فإنه ينتقل عن طريق حشرات نطاطات السيكاڤال عبر الطريق الدائم. هدفنا من هذه الدراسة كان التأكد من وجود هذا المرض في منطقة المتيجة. فحوصات قد أجريت في 6 محطات (محطة الشبلي، المحطة التجريبية للفلاحة بالبلدية، محطة بن خليل، المحطة التجريبية للمعهد التقني للأشجار المثمرة و الكروم التابعة لتسالة المرجة (بوفاريك)، مشتل تابع لقطاع خاص بقرواوا (الصومعة)، و مؤسسة ذات مهام محدودة بحجوط). الأعراض المنسوبة لهذا المرض كانت متميزة جدا (تبرقش، مكنسة الساحرة، أوراق دائرية، أوراق بشكل قلب). لقد أجرينا نوعين من الفحوصات التشخيصية: فحص مصلي و فحص للنقل الميكانيكي عن طريق التطعيم. أعطى الفحص عن طريق المراقبة المصلية نتائج إيجابية في مختلف المحطات المفحوصة بنسبة 27,19 %، و هذا يؤكد لنا وجود مرض العنناد في الجزائر. سجلت نسبة الإصابة في مختلف المحطات (محطة بن خليل، المحطة التجريبية للفلاحة بالبلدية، مشتل قرواوا، المؤسسة ذات مهام محدودة بحجوط، محطة شبلي، المحطة التجريبية للمعهد التقني للأشجار المثمرة و الكروم ببوفاريك) على الترتيب بـ (33,33 %، 33,33 %، 27,77 %، 25 %، 28,88 %، 15,79 %). أعراض متميزة جدا لمرض العنناد ظهرت على أشجار الحمضيات المطعمة و البرفونش (*Catharanthus roseus*) الفحص المصلي داز إليزا قد أجري على النباتات المطعمة و على نباتات البرفونش أعطى نتائج إيجابية و هذا بنسبة 32,55 %.

الكلمات الدالة: الحمضيات، التطعيم، *Phytoplasmes*، *Spiroplasma citri*، مرض العنناد على الحمضيات، *Neoliturus haematoceps*، *Circulifer tenellus*

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Dr. BELKAHLA. H. pour avoir accepté de diriger ce mémoire en dépit de son volume de travail chargé, ses directives et ses connaissances profondes m'ont permis d'acquiescer le maximum de savoir qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Tous mes remerciements vont au professeur HOUMANI Z. qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury.

Je remercie également professeur Hacene H et M^{me} El-Ferran A. pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail de recherche.

Mes vifs remerciements s'adressent également à M^r Chorfi N. de l'ITAFV de Boufarik pour son aide et ses conseils précieux, à M^r El-Houari de Benkhellil et Melle Saker F-Z. pour son aide particulière.

Il m'est agréable de remercier chaleureusement tous les membres de ma famille en particulier mes parents pour leurs sacrifices, leur affection et leur compréhension.

Enfin un profond respect à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Kenza

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	13
1. APERÇU GENERAL SUR LES AGRUMES	
1.1. Historique	15
1.2. Généralités sur les agrumes	16
1.3. L'agrumiculture dans l'économie algérienne	16
1.4. Production d'agrumes dans le monde	17
1.5. Commerce international	18
1.6. Résistance des porte-greffes conventionaux aux maladies	19
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA MALADIE DU STUBBORN	
2.1. Historique	22
2.2. Synonymes	22
2.3. Répartition géographique	23
2.4. Incidence économique	24
2.5. Classification des <i>Phytoplasmes</i>	25
2.6. Caractéristiques des <i>Phytoplasmes</i>	27
2.7. Transmission des <i>Phytoplasmes</i>	28
2.8. Conservation des <i>Phytoplasmes</i>	28
2.9. Généralités sur les <i>Spiroplasmataceae</i>	29
2.10. <i>Spiroplasma citri</i>	31
3. MATERIEL ET METHODES	
3.1. Stations prospectées	63
3.2. Méthodes d'échantillonnage	65
3.3. Conservation de la source d'inoculum	65
3.4. Sérodétection de <i>Spiroplasma citri</i>	65
3.5. Transmission mécanique	71
4. RESULTATS ET DISCUSSION	

4.1. Distribution des symptômes et impact de la maladie du stubborn sur les différentes stations prospectées	81
4.2. Résultats de la sérodétection	103
4.3. Résultats de la transmission mécanique de <i>Spiroplasma citri</i>	110
4.4. Résultats de la séro-détection des échantillons du test de transmission mécanique par inoculation et indexage	128
5. MESURES DE QUARANTAINE ET METHODES DE LUTTE CONVENTIONNELLES	
5.1. Mesures de quarantaine concernant les échanges de matériel végétal entre différents pays	132
5.2. Méthodes de lutte conventionnelles	132
5.3. Recherche de variétés résistantes ou tolérantes par sélection classique	134
5.4. Génétique et physiopathologie	135
5.5. Rôle des métabolites secondaires dans l'interaction entre plantes et <i>Spiroplasma</i>	135
5.6. Interactions entre <i>Spiroplasm</i> es et hôtes	135
5.7. Gènes intervenants dans la pathogenecité ou la transmissibilité	135
5.8. Protéine membranaire majeure des <i>Mollicutes</i> et gènes régulateurs	135
5.9. Connaissance du génome entier des <i>Spiroplasm</i> es	136
5.10. Introduction des gènes de résistance par manipulation génétique	136
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	138
APPENDICES	140
REFERENCES	159

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Répartition des superficies entre les différentes espèces d'agrumes en Algérie [4]	17
Figure 1.2	Répartition géographique de la production d'agrumes destinés au marché du frais dans le monde [5]	18
Figure 1.3	Répartition géographique des exportations d'agrumes frais [5]	19
Figure 2.1	Répartition géographique de la maladie du stubborn dans le monde [8]	23
Figure 2.2	Répartition géographique de <i>Spiroplasma citri</i> [150]	24
Figure 2.3	Ultra structure des <i>Phytoplasmes</i> [43]	28
Figure 2.4	Particule de <i>Spiroplasma citri</i> l'agent causal du stubborn observée au microscope électronique (photo: E.C.Calavan) [21]	34
Figure 2.5	e, f, g, h: Exemples des agrégats de la souche marocaine de <i>Spiroplasma citri</i> dans des cultures plus anciennes ((x 4.400) fixés sur Glutaraldehyde; (x 2.800) non fixés; (x 4.400) fixés; (x 4.400) fixés respectivement 1,0 µm) [63]	35
Figure 2.6	<i>Neoliturus tenellus</i> (Mulsant et Rey), (Riverside, Californie) [8]	38
Figure 2.7	<i>Neoliturus haematoceps</i> (Baker) (INRA, Bordeaux) [8]	38
Figure 2.8	Stylet de l'insecte et tubes criblés en cours de différenciation (<i>Spiroplasma</i> figurés en vert) [43]	40
Figure 2.9	Passage des <i>Spiroplasma</i> de la plante à l'insecte et inversement [113]	41
Figure 2.10	Parcours des <i>Spiroplasma</i> à l'intérieur d'un insecte-vecteur au cours des semaines suivant le repas d'acquisition [118,119]	42
Figure 2.11	Représentation schématique de l'interaction des <i>Spiroplasma</i> , cicadelles et des plantes hôtes [133]	45
Figure 2.12	Taches chlorotiques sur feuilles d'oranger doux [21]	46
Figure 2.13	Feuilles d'oranger doux infecté par le stubborn ; présentent diverses chloroses [139]	47
Figure 2.14	A droite : Feuilles pointu avec des taches chlorotiques translucides sur jeunes feuilles de <i>Madam vinous</i> , à gauche : Feuille non infectée [21]	47
Figure 2.15	Chloroses marginales des jeunes pousses et feuilles pointues sur oranger doux <i>Madam vinous</i> (Turkey) [21]	48
Figure 2.16	Feuilles de <i>Valencia late</i> d'oranger doux montrant à droite : la forme en cœur, à gauche : Feuille à forme en cuillères et dissymétrie de la nervure principale avec la couleur de gris pale à jaune (Courtesy de C.N., Riverside California) [21]	48
Figure 2.17	Feuilles d'arbres de Valencia late d'oranger doux greffé sur <i>Poncirus trifoliata</i> infectées par le stubborn montrant des jaunissements marginaux [8]	49
Figure 2.18	Feuille d'oranger présentant la différence entre le symptôme de carence en Zinc et celui du stubborn [8]	49

Figure 2.19	Prolifération anormale des bourgeons axillaires, en forme de balai de sorcière (Californie) [21]	50
Figure 2.20	Fruit produit par des arbres infecté de stubborn devient petit et lopsidé avec columelle courbée [142]	51
Figure 2.21	Inversion de la coloration ; couleur orangée à l'extrémité pédonculaire et verte à la partie stylaire (Algérie) [8]	51
Figure 2.22	Epaississement de la partie pédonculaire et amincissement de la partie stylaire (Maroc) [8]	52
Figure 2.23	Fruit lopsidé, l'albédo est bleu avec columelle courbée sur Grapfruit [8]	52
Figure 2.24	A droite : Arbre rabougris, à gauche: Arbre sain (Californie) [21]	53
Figure 2.25	Arbre d'oranger doux âgé de 6 ans greffé sur la lime acide montrant des symptômes sévères du stubborn : nanisme avec un aspect arrondi, absence de jeunes rameaux, feuillage dense, rameaux avec entre-nœuds courts, feuilles petits en cuillères, marbrures foliaires, et réduction de la production (Iran) [8]	54
Figure 2.26	A droits : plants infectés par <i>Spiroplasma Citri</i> , A gauche plant sain de <i>Catharanthus roseus</i> , (INRA Bordeaux) [8]	55
Figure 2.27	<i>Catharanthus roseus</i> naturellement infectée par <i>S. Citri</i> , le plant a donné un résultat positif par le test ELISA [8]	55
Figure 2.28	À droite : Plante de <i>Catharanthus roseus</i> infecté avec des feuilles enroulés et flétris, à gauche: Plante non infectée avec des fleurs (INRA Bordeaux) [8]	56
Figure 2.29	À droite : Plante de la pervenche non infecté, à gauche : Plante infectée et rabougris [21]	56
Figure 2.30	<i>Salsola kali</i> , principale plante hôte des cicadelles vecteurs de <i>Spiroplasma citri</i> (El Annadeh, Syrie) [8]	56
Figure 2.31	Répartition géographique de <i>Circulifer tenellus</i> [150]	58
Figure 2.32	Répartition géographique de <i>Neotalitrus haematoceps</i> [150]	59
Figure 2.33	<i>Spiropalsma citri</i> dans la sève des tubes criblés des plants de la pervenche inoculée par greffage (<i>Catharanthus roséus</i>) (INRA, Bordeaux) x 8000 [8]	61
Figure 2.34	<i>Spiroplasma citri</i> dans le phloème de <i>Catharanthus roseus</i> naturellement infectée (Maroc) x 16 000 [8]	62
Figure 2.35	<i>Spiroplasma citri</i> dans le phloème de <i>Catharanthus roseus</i> naturellement infectée (El Annadeh, Syrie) x 24000 [8]	62
Protocole 3.1	Réalisation du test ELISA (selon CLARK ET ADAMS [161])	67
Figure 3.2	Dépôt des anticorps dans les puits des plaques ELISA	67
Figure 3.3	La plaque ELISA après dépôt	67
Figure 3.4	La plaque mise à incubation à 37°C	68
Figure 3.5	Lavage avec PBS-T	68
Figure 3.6	La plaque ELISA après dépôt des échantillons	68
Figure 3.7	Dépôt des anticorps conjugués	69
Figure 3.8	La plaque ELISA après dépôt des anticorps conjugués	69
Figure 3.9	Préparation du substrat	69
Figure 3.10	Dépôt du substrat de l'enzyme	70
Figure 3.11	Début de la réaction sérologique	70
Figure 3.12	(a,b) Evolution de la réaction sérologique	70
Figure 3.13	(c,d) Fin de la réaction sérologique	71
Figure 3.14	Plants d'agrumes destinés à l'inoculation par indexage	72

Figure 3.15	Méthode du test d'indexage (selon BERTAUEAU [167])	73
Figure 3.16	Schéma montrant la réalisation de la greffe en écusson (selon BERTAUEAU [167])	74
Figure 3.17	Greffage en écusson des yeux de <i>Madam vinous</i>	75
Figure 3.18	Section rectangulaire d'une jeune feuille (candidat) coupée de la région de la nervure principale	76
Figure 3.19	Greffage en écusson des candidats de part et d'autre des yeux de <i>Madam vinous</i>	77
Figure 3.20	Transmission par inoculation mécanique de <i>Spiroplasma citri</i> sur <i>Catharanthus roseus</i>	80
Figure 4.1	Chloroses foliaires sur <i>Carvalho</i> (Parc à bois- ITAFV-Boufarik) (2003-2004)	83
Figure 4.2	Retard de croissance observée sur <i>Carvalho</i> du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2003-2004)	84
Figure 4.3	Nanisme sur <i>Carvalho</i> du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2003-2004)	84
Figure 4.4	A droite : Feuille saine, à gauche : Feuilles petits arrondies sur <i>Citronnier</i> de la station de l'ITAFV-Boufarik (2003-2004)	85
Figure 4.5	Nanisme sur <i>Washington navel</i> du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2003- 2004)	85
Figure 4.6	Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur <i>Citronnier</i> De la station expérimentale de Blida (2003-2004)	86
Figure 4.7	Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcier) sur <i>Citronnier</i> (Station expérimentale de Blida) (2003-2004)	86
Figure 4.8	Croissance de type verticale sur <i>Citronnier</i> (Station expérimentale de Blida) (2003-2004)	87
Figure 4.9	A droite : Feuille saine, à gauche : Feuilles en cuillère sur <i>Double fine</i> (EURL de Hadjout) (2004-2005)	90
Figure 4.10	A droite : feuille saine, à gauche : Feuilles en cuillère sur <i>Double fine</i> (EURL de Hadjout) (2004-2005)	91
Figure 4.11	A droite : Feuille saine, à gauche : En haut : Chloroses foliaires, en bas : Feuilles en cuillères avec dissymétrie de la nervure principale sur <i>Valencia late</i> (EURL de Hadjout) (2004-2005)	91
Figure 4.12	A droite : Feuille saine, à gauche : Feuilles en cuillère avec dissymétrie de la nervure principale sur <i>Washington navel</i> (EURL de Hadjout) (2004-2005)	92
Figure 4.13	A droite : Feuilles sains, à gauche : En haut : Chloroses foliaires, en bas : Feuilles en cuillère avec dissymétrie de la nervure principale sur <i>Citronnier</i> (EURL de Hadjout) (2004-2005)	92
Figure 4.14	Adroite feuille saine, à gauche : Chloroses sévères sur <i>Clémentine</i> (EURL de Hadjout) (2004-2005)	93
Figure 4.15	Balai de sorcière sur <i>Valencia late</i> de l'EURL de Hadjout (2004-2005)	93
Figure 4.16	A droite : Feuille saine, à gauche : En haut : Chloroses sévères des feuilles, en bas : Feuilles en cuillères avec dissymétrie de la nervure principale sur <i>Thomson</i> (Station de Chebli) (2004-2005)	94
Figure 4.17	A droite : feuille saine, à gauche : feuilles petits en forme de cœur sur <i>Thomson</i> de la station de Chebli (2004-2005)	94
Figure 4.18	Adroite : arbre sain, à gauche: Arbre nain du <i>Thomson</i> (Station de Chebli) (2004-2005)	95
Figure 4.19	Balai de sorcière observé sur <i>Thomson</i> (station de Chebli) (2004-2005)	95
Figure 4.20	Chloroses sévères sur feuilles de <i>Carvalho</i> du Parc à bois de l'ITAFV-	96

	Boufarik (2004-2005)	
Figure 4.21	Chloroses sévères sur feuilles de <i>Carvalho</i> du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)	96
Figure 4.22	Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur <i>Carvalho</i> du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)	97
Figure 4.23	Croissance de type buissonnante verticale sur <i>Carvalho</i> de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)	97
Figure 4.24	A droite feuille pointue avec rétrécissement du limbe, à gauche : Feuille arrondie avec rétrécissement du limbe observée sur <i>Carvalho</i> de la station de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)	98
Figure 4.25	Balai de sorcière avec raccourcissement des entre-nœuds et feuilles opposées sur <i>Citronnier</i> du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)	98
Figure 4.26	Raccourcissement des entre-nœuds et feuilles opposées sur un balai de sorcière du <i>Citronnier</i> de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)	99
Figure 4.27 _a	Feuilles saines observées sur <i>Thomson</i> de la station de Benkhellil (2004-2005)	99
Figure 4.27 _b	Feuilles petits et arrondies observées sur <i>Thomson</i> de la station de Benkhellil (2004-2005)	100
Figure 4.28	Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur <i>Thomson</i> de la station de Benkhellil (2004-2005)	100
Figure 4.29	Fruit en gland observé sur <i>Thomson</i> de la station de Benkhellil (2004-2005)	101
Figure 4.30	Fruit déformé asymétrique avec columelle courbée sur <i>Thomson</i> de la station de Benkhellil (2004-2005)	101
Figure 4.31	Inversion de la coloration ; couleur orangée à l'extrémité pédonculaire et verte à la partie styloïde observé sur <i>Thomson</i> de la station de Benkhellil (2004-2005)	102
Figure 4.32	Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur <i>Citronnier</i> de la station expérimentale de Blida (2004-2005)	102
Figure 4.33	Incidence de la maladie dans la pépinière privée de Guerouaou	104
Figure 4.34	Incidence de la maladie dans la station de Benkhellil	105
Figure 4.35	Incidence de la maladie dans la station de Chebli	105
Figure 4.36	Incidence de la maladie à l'ITAFV-Boufarik	105
Figure 4.37	Incidence de la maladie dans la station de Blida	106
Figure 4.38	Incidence de la maladie à l'EURL de Hadjout	106
Figure 4.39	Incidence de la maladie par variété	107
Figure 4.40	Incidence de la maladie par Stations	107
Figure 4.41	Incidence de la maladie par régions	108
Figure 4.42	Taux de transmission par indexage et inoculation	112
Figure 4.43	Jaunissement des feuilles (Résultat de l'inoculation par <i>Citronnier</i>)	113
Figure 4.44	À droite: Feuille saine, à gauche: Feuille à forme pointue et dissymétrie de la nervure principale (résultat de l'inoculation par <i>Citronnier</i>)	114
Figure 4.45	Feuille arrondie (résultat de l'inoculation par <i>Citronnier</i>)	114
Figure 4.46	A droite: Feuilles en cuillères (résultat de l'inoculation par le <i>Citronnier</i>). Au centre: Feuille arrondie (résultat de l'inoculation par le <i>Citronnier</i>), à gauche : Chloroses sur feuille (inoculé par le <i>Citronnier</i>)	115
Figure 4.47	Chloroses foliaires (Résultat de l'inoculation par <i>Washington navel</i>)	115

Figure 4.48	A droite : Feuille saines, à gauche : Dissymétrie de la nervure principale et rétrécissement du limbe (résultat de l'inoculation par <i>Washington navel</i>)	116
Figure 4.49	A droite : Feuille saines, à gauche: Feuille à forme pointue (Résultat de l'inoculation par <i>Washington navel</i>)	116
Figure 4.50	Feuille en forme de cœur (Résultat de l'inoculation par <i>Washington navel</i>)	117
Figure 4.51	A. Chloroses foliaires (inoculé par la <i>Washington navel</i>), B. Feuilles arrondies avec chloroses (inoculé par la <i>Washington navel</i> c. Feuille à forme pointue avec chloroses (inoculé par la <i>Washington navel</i>)	117
Figure 4.52	Jaunissements des feuilles (Résultat de l'inoculation par la <i>Double fine</i>)	118
Figure 4.53	A droite : Feuilles arrondies (résultat de l'inoculation par la <i>Double fine</i>) A gauche : Feuilles en forme de cœur (résultat de l'inoculation par la <i>Double fine</i>)	118
Figure 4.54	Jaunissement des feuilles (Résultat de l'inoculation par la <i>Valencia late</i>)	119
Figure 4.55	Feuille arrondie (Résultat de l'inoculation par la <i>Valencia Late</i>)	119
Figure 4.56	Chloroses foliaires avec raccourcissement des entre-nœuds (Résultat de l'inoculation par la <i>Clementine</i>)	120
Figure 4.57	A droite : Feuille saine, à gauche: Feuille à forme pointue avec chloroses (Résultat de l'inoculation par la <i>Clémentine</i>)	120
Figure 4.58	Feuille en forme de cœur (Résultat de l'inoculation par la <i>Clémentine</i>)	121
Figure 4.59	Chloroses sévères (Résultat de l'inoculation par la <i>Carvalhal</i>)	121
Figure 4.60	Chloroses sévères (Résultat de l'inoculation par la <i>Carvalhal</i>)	122
Figure 4.61	A droite : Chloroses sur feuilles de <i>Madam vinous</i> (résultat de l'inoculation par la <i>Carvalhal</i>), à gauche : Feuilles en forme de cœur (résultat de l'inoculation par la <i>Carvalhal</i>)	122
Figure 4.62	A droite : Feuille saine, à gauche : Feuille petite arrondie (Inoculé par <i>Thomson</i>)	123
Figure 4.63	Raccourcissement des entre-noeuds (Résultat de l'inoculation par <i>Thomson</i>)	123
Figure 4.64	Prolifération des bourgeons axillaires avec raccourcissement des entre-noeuds (Résultat de l'inoculation par <i>Madam vinous</i>)	124
Figure 4.65	Feuilles petits en cuillères (Résultats de l'inoculation par <i>Citronnier</i>)	125
Figure 4.66	Feuille déformée (Résultat de l'inoculation par le <i>Citronnier</i>)	125
Figure 4.67	Jaunissement sévère (Résultat de l'inoculation par le <i>Citronnier</i>)	125
Figure 4.68	Chloroses apicales sévères (inoculé par la <i>Carvalhal</i>)	126
Figure 4.69	Feuilles petits en cuillères (Résultats de l'inoculation par la <i>Carvalhal</i>)	126
Figure 4.70	Jaunissement apical (Résultat de l'inoculation par la <i>Washington navel</i>)	127
Figure 4.71	Chloroses foliaires (Résultat de l'inoculation par <i>Thomson</i>)	127
Figure 4.72	A droite : Jaunissement, à gauche : Feuilles petits en cuillères (Résultats de l'inoculation par <i>Thomson</i>)	128
Figure 4.73	A droite : Témoin sain, à gauche : Chloroses sévères (Résultat de l'inoculation par la <i>Clémentine</i>)	128
Figure 4.74	Feuilles petits en cuillères (Résultats de l'inoculation par la <i>Clémentine</i>)	128
Figure 4.75	Incidence de la maladie sur les échantillons de la transmission par inoculation mécanique et indexage	130
Figure 4.76	Incidence de la maladie sur les échantillons du test d'indexage	130
Figure 4.77	Incidence de la maladie sur les échantillons du test d'inoculation	131

	mécanique sur la pervenche	
Tableau 1.1	Superficie et production des principales espèces d'agrumes cultivés en Algérie [4]	17
Tableau 2.1	Caractères comparés des bactéries classiques, des <i>Mollicutes</i> et des virus des plantes [43]	26
Tableau 2.2	Taxinomie et caractéristiques des membres de la classe des <i>Mollicutes</i> [52] [54] [49] [51]	30
Tableau 4.1	Sévérité des symptômes du stubborn observés sur les variétés d'agrumes durant la campagne 2003-2004	83
Tableau 4.2	Sévérité des symptômes du stubborn sur les différentes variétés durant la campagne 2004-2005	90

INTRODUCTION

Les agrumes sont originaires des régions tropicales et sub-tropicales du sud-est Asiatique, et c'est à partir du bassin méditerranéen que cette culture s'est diffusée dans le monde [1]. Ils constituent la première production fruitière au monde, dans une aire de culture comprise entre les quarantièmes parallèles nord et sud parmi les zones de culture les plus importantes. Le bassin méditerranéen se situe au second rang et présente une grande diversité de conditions pédoclimatiques [2]. Les agrumes sont constitués par tous les groupes de *Citrus*: les Orangers, Clémentiniers, Mandariniers, Citronniers et les Pomelos, avec une dominance des variétés précoces du groupe oranger tel que *Washington navel* et la *Thomson navel*. Ces dernières occupent 50 % de la superficie du groupe oranger.

La production agrumicole a enregistré une progression appréciable passant de 4 180 000 millions de quintaux en 1998 à 4 536 000 en 1999. Cependant le niveau de consommation se trouve en régression drastique passant de plus de 25 kg/an par tête d'habitant en 1970 à 12 kg en 2000 [3]. En Algérie, elle présente une place primordiale occupant une superficie estimée à 52 710 ha [4], avec une production enregistrée durant la période (2003-2004) de l'ordre de 2 097 461 quintaux [5]. La production méditerranéenne d'agrumes est très majoritairement dédiée au marché du frais. L'aspect sanitaire des fruits a donc un impact important sur le devenir de la production. Le bassin méditerranéen est encore indemne de la plupart des maladies importantes, mais les agrumes y sont confrontés à des pathogènes endémiques et à d'autres qui émergent [6].

Parmi les pathogènes existants, certains peuvent avoir des conséquences graves et leur transmission par insectes vecteurs rend leur contrôle difficile c'est le cas du *Spiroplasma* [6]. Le stubborn des agrumes causé par le *Spiroplasma citri*, représente l'une des plus importantes maladies dans le bassin méditerranéen oriental et au Proche-Orient [7]. Cette maladie préoccupe vivement les producteurs car en plus de sa transmission par greffage elle est répandue dans le monde par un ou plusieurs vecteurs ce qui signifie que

les arbres obtenus à partir de bois de greffe sain risquent d'être réinfectés s'ils se trouvent dans des zones où l'agent pathogène et ses vecteurs sont simultanément présents [7].

Plusieurs tentatives ont été faites pour prévenir l'étendue supplémentaire de maladies dans de nouveaux vergers. Cependant, les maladies infectieuses continuent à se produire dans les plantations et sont un facteurs majeur qui retient des récoltes de haut rendement [8]. En Algérie peu d'études ont été réalisées sur les *Spiroplasma* en général et sur le stubborn en particulier. Pour cela nous avons entrepris un travail ayant pour but d'étudier l'état sanitaire des vergers d'agrumes de la Mitidja en se basant sur :

- Prospections au niveau de la station expérimentale (ITAFV) de Tessala EL Merdja de Boufarik, station expérimentale d'agronomie de Blida, station de Chebli, pépinière privée de Guerrouaou (Soumaa), verger privé de Benkhellil, et l'EURL de Hadjout.
- Description des symptômes pour 9 variétés : (une variété de *Citronnier eureka* et 4 variétés d'oranger ; *Valencia Late*, *Thomson navel*, *Washington navel* et *Double fine*), et 2 variétés de mandarinier (*Clémentine* et *Carvalhal*) suspectés d'être induits par le stubborn.
- Prélèvement d'échantillons (feuilles) en fonction des symptômes de type : chloroses, formes en cuillères, réduction de la surface du limbe, présence du balai de sorcière.
- Indexage par greffage en écusson des yeux de l'indicateur d'oranger doux variété *Madam vinous* et des candidats au niveau des porte-greffes.
- Transmission par inoculation mécanique.
- Détection sérologique de *Spiroplasma citri* du stubborn sur différents variétés d'agrumes par le test DAS-ELISA

CHAPITRE 1

APERÇU GENERAL SUR LES AGRUMES

1.1. Historique :

Selon LOUSSERT [9] et ALLAYA et al [1], les agrumes sont originaires des régions tropicales et subtropicales du sud-est asiatique où leur culture se confond avec l'histoire des civilisations chinoises, car ces derniers furent attirés par le parfum et la couleur des huiles essentielles des feuilles, des fleurs et des fruits, c'est avec le rayonnement des civilisations chinoises et Indous, que la culture d'agrumes commença à se propager dans l'ensemble des pays du sud-est asiatique, le sud du Japon et l'archipel de Malaisie.

Les Portugais introduisaient l'oranger en méditerranée aux environs de l'an 1400 bien après le voyage de Marco Polo en Chine en 1287 [10], et c'est à partir du bassin méditerranéen et grâce aux grandes découvertes que les agrumes furent diffusés dans le monde [10][1]. Les navigations arabes, les propagent sur la côte orientale de l'Afrique jusqu'au Mozambique. Christophe Colomb en 1493 les introduit à Haïti, l'île des mères des Caraïbes à partir de laquelle la diffusion s'est faite vers le Mexique en 1518, puis les Etats-Unis d'Amérique entre 1560 et 1890 [10]. Enfin ce sont les Anglo-Hollandais qui en 1654 introduisent les premiers agrumes dans la province du Cap en Afrique du Sud [11] [10].

Au début du 20^{ème} siècle, l'agrumiculture évolua peu, en raison des difficultés économiques liées aux deux guerres mondiales. Dès le milieu des années 40, l'agrumiculture mondiale prit un véritable essor, grâce à l'utilisation du bigaradier comme porte-greffe, ce choix permit, entre autres, de mieux maîtriser les pertes causées par *Phytophthora* [12].

1.2. Généralités sur les agrumes :

Le mot "agrumes" est d'origine Italienne, désignant les fruits comestibles, et par extension les arbres qui les portent, appartenant au genre *Citrus* [9]. Selon DEROCCA SERRA et OLLITRAULT [13], les agrumes appartiennent à la classe des *Dicotyledone*, à l'ordre des *Geraniales*, à la famille des *Rutaceae*, et sous famille des *Aurantioidae*. La famille des *Rutaceae* se compose de 3 genres : *Poncirus*, *Fortunella*, et *Citrus* [14] [15]. Le genre *Poncirus* est essentiellement utilisé comme porte-greffe, ses fruits ne sont pas comestibles. Le genre *Fortunella* comprend 6 espèces dont 2 seulement font l'objet de quelques cultures, les fruits sont appelés Kumquats, par contre le genre *Citrus* constitue lui seul avec ses 145 espèces le genre le plus important et est cultivé pour la production des fruits soit: les orangers, mandariniers, clémentiniers, citronniers et les pomelos (dont le nom commercial est les pamplemousses [14] [15]).

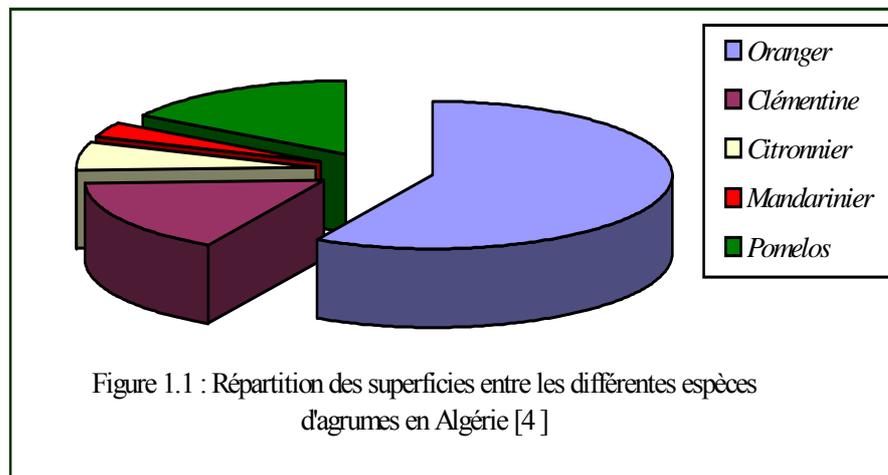
1.3. L'agrumiculture dans l'économie algérienne :

Les vergers d'agrumes en Algérie, sont distribués le long de la région côtière, à une altitude en dessous de 400 m, où le climat est doux, et les gels sont rares [8]. La moyenne de la superficie réservée à la culture des agrumes est de 52.710 ha. Les superficies en production représentent 80,16% de la superficie complantée durant la campagne 2001-2002 [16]. La répartition des superficies entre les différentes espèces est comme suit 69,11% des oranges, 19,20% des clémentiniers, 7,36% de citronnier, 4,14% des mandariniers et 0,19% des pomelos [4] (figure 1.1).

La production moyenne réalisée au cours de la décennie 1990-2002 est estimée à un peu plus de 5.19 millions de quintaux, celle des oranges domine avec 69,78% suivie par la clémentine avec 18,27%, le reste soit 11,56% est reparti entre la mandarine, le citron et pomelos [4] (Tableau 1.1).

Tableau 1.1 : Superficie et production des principales espèces d'agrumes cultivées en Algérie [4].

Espèces	Superficies complantées	Production (Qx)
Orangers	36430	3624900
Clémentiniers	10120	949330
Mandariniers	2180	215360
Citronniers	3880	389660
Pomelos	100	15340
Total	52710	5194590

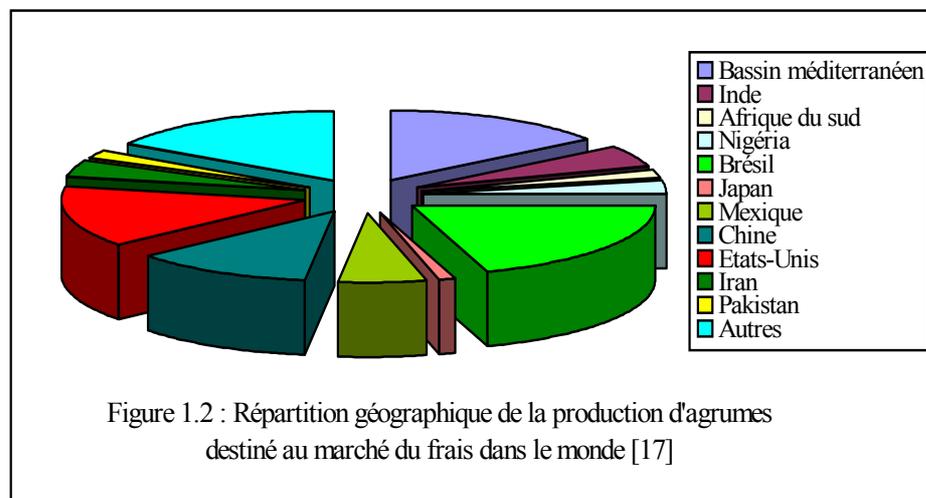


1.4. Production d'agrumes dans le monde :

La croissance de la production mondiale des agrumes a été relativement linéaire au cours des dernières décennies du XX^{ème} siècle. La production annuelle totale d'agrumes s'est élevée à plus de 105 millions de tonnes sur la période 2000-2004. Les oranges constituent la majeure partie de la production d'agrumes avec plus de la moitié (58%) pendant l'année 2004. L'amélioration de la production est principalement due à la croissance des terres cultivées consacrées aux agrumes, mais également à un changement de comportement de la part des consommateurs dont le revenu progresse et dont les préférences s'orientent de plus en plus vers des produits sains et pratiques [17].

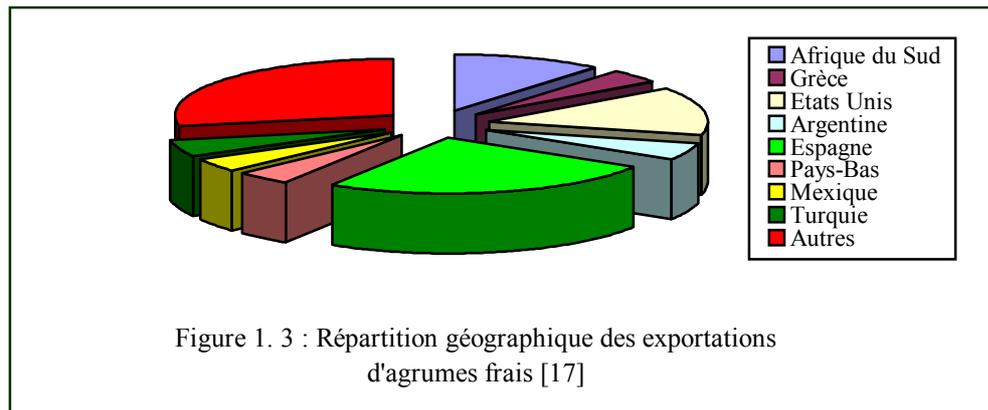
La production d'agrumes est très répandue autour du globe. Selon les données

statistiques de la FAO en 2004 plus de 140 pays produisaient des agrumes. Cependant, la majeure partie de la production se concentre dans certaines zones géographiques. La plupart sont cultivée dans l'hémisphère nord, comptant pour environ 70% de la production totale. Les principaux pays producteurs d'agrumes sont le Brésil, les pays du bassin méditerranéen, la Chine et les États-Unis (où les agrumes principalement cultivés pour leur commercialisation sur le marché frais sont produits en Californie, en Arizona et au Texas, alors que ceux destinés à la fabrication de jus d'orange sont produits en Floride). Ces États comptent pour plus des deux tiers de la production totale d'agrumes [17] (figure 1.2).



1.5. Commerce international :

Les exportations d'agrumes frais représentent environ 8% de la production mondiale d'agrumes. La majeure partie des exportations d'agrumes frais se situe dans l'hémisphère nord qui représente environ 62% des exportations mondiales d'agrumes frais en 2003. La région méditerranéenne joue un rôle prédominant en tant qu'exportateur d'agrumes frais, avec 60% du volume global (figure 1.3) [17].



1.6. Résistance des porte-greffes conventionnelles aux maladies :

Les agrumes présentent une très grande diversité, mais le matériel végétal destiné à être utilisé comme porte-greffe d'agrumes doit être le plus adéquat sur le plan production et résistance aux maladies [18].

1.6.1. *Citrus aurantium* :

Connu sous le nom du bigaradier ou oranger amer. Le bigaradier est sensible au mal secco, une maladie du système vasculaire due à *Phoma tracheiphilla*. Il donne des associations sensibles au virus de la tristeza, notamment avec le mandarinier, l'oranger et ses hybrides ou pomelo, mais pas avec le citronnier ou bergamotier [19]. En contre partie, il donne des associations tolérantes à la rouille (Bligh). Il est tolérant à la cachexie-xyloporose et à l'exocortis, résistant à la gommose à *Phytophthora*, mais sensible à la maladie du stubborn [20] et aux nématodes surtout du type *Tylenchulus semi-pénétrans* [19].

1.6.2. *Poncirus trifoliata* :

Ce porte-greffe résiste très bien à la gommose à *Phytophthora*, il est tolérant à la cachexie-xyloporose, ainsi qu'aux nématodes, notamment ceux du type *Tylenchulus semi-pénétrans*. Il forme des associations tolérantes à la tristeza [19]. Les *P. trifoliata* et ses hybrides paraissent très tolérants au stubborn [21], mais ils sont sensibles à l'exocortis et à la rouille [19].

1.6.3. *Citrus reticulata* Blanco :

Appelé aussi mandarine cléopâtre. 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 [22] [19] et bien qu'à un moindre degré, à la rouille [19]. Il est sensible à la gommose et à *Phytophthora* [19] et aux nématodes [22]. Les plantules sont sensibles à la fonte du semis [19].

1.6.4. *Citrangle troyer* :

Issu du croisement entre *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*. Ce porte-greffe est assez résistant à la gommose à *Phytophthora*, mais associé au clémentinier, il extériorise parfois de petites craquelures sur le bourrelet de greffe, les quelles peuvent être colonisées par du *phytophthora sp* et former des poches de gomme juste au-dessus de la ligne de greffe. Jusqu'ici cette anomalie a plutôt été observée dans les régions sahéliennes [19]. Le *Citrangle troyer* forme des associations tolérantes à la tristeza, à la cachexie-xyloporose, mais sensibles à l'exocortis [22] [19], à la rouille et aux nématodes [19].

1.6.5. *Citrangle carrizo* :

Issu du croisement entre *Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*. Le *Citrangle carrizo* donne des associations tolérantes à la tristeza et sa résistance aux nématodes est meilleur qu'avec le *Citrangle troyer* [19]. Il est résistant aussi à la cachexie-xyloporose mais sensible à l'exocortis [22]. Il semble moins sensible à certains viroïdes [19].

1.6.6. *Citrus volkameriana* :

Ce porte-greffe résiste correctement à la gommose à *Phytophthora* et donne des associations tolérantes à la tristeza, exocortis, cachexie [19] et au cristacortis [23], mais sensible à la rouille [19] et au malsecco [23].

1.6.7. *Citrus macrophylla* :

Ce porte-greffe est tolérant à la gommose à *Phytophthora* et réagit bien aux autres attaques racinaires, de *Diaprepes abbreviatus* en particulier, en raison de son aptitude à régénérer rapidement les racines lésées, il est tolérant à l'exocortis mais sensible à la tristeza ainsi qu'à la cachexie-xyloporose [19].

1.6.8. *Poncirus flying-dragon* :

Le *flying-dragon* est résistant à la gommose, à *Phytophthora* et à la tristeza. Il est sensible à l'exocortis mais tolérant aux nématodes [19].

CHAPITRE 2

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA MALADIE DU STUBBORN

2.1. Historique :

La maladie du stubborn des agrumes a été observée pour la première fois en Californie au début des années 1900 et nommé stubborn par Waite [24]. Ce terme a été appliqué dès 1921 aux arbres d'orangers navel non productifs en Californie [25]. Les épidémies de la maladie du stubborn ont été connues dans les régions méditerranéennes de production d'agrumes dès 1928 [26]. FAWCETT et *al* [24], ont décrit la maladie pour la première fois en 1944. Une maladie similaire appelée maladie de feuilles petites (Little leaf disease) a été décrite en Palestine par REICHERT en 1930 [27].

Avant les années 1970, la cause du stubborn était attribuée à un seul virus ou à un complexe de virus, nommé *Citriovirus pertinaciae* Fawcett ou *Rimocortius pertinaciae* Holmes [28]. Cependant un *Mycoplasma-like-organism* présenté dans les tissus des tubes cribles des agrumes infectés par le stubborn a été découvert indépendamment par IGEWEGBE et CALAVAN en 1970 [29] en Californie et par LAFLECHE et BOVE en 1970 [30] en France [21]. Les deux groupes de chercheurs ont conclu que le *Mycoplasma* et non un virus qui était probablement la cause [31] [21]. En 1972 l'organisme a été complètement caractérisé comme étant un *Mollicute* [32] [33] avec une mobilité et morphologie hélicoïdale, et il a été nommé *Spiroplasma citri* (*S. citri*) [34] [32] [31] [21].

2.2. Synonymes :

Les noms communément utilisés en Californie incluent la maladie du gland d'oranger [35], stylar end greening, bleue albédo de grappe fruit, et little leaf disease [36].

2.3. Répartition géographique :

Le stubborn des *Citrus* est présent dans la majorité des aires agrumicoles sèches ou semi-arides et est largement distribué dans les régions méditerranéennes, Afrique du Nord, Asie occidentale, Proche-Orient, et le Sud-Ouest d'Etats-Unis d'Amérique [8]. *S. citri* est présent dans au moins les pays ou régions suivantes : Algérie [37], Chypre, Egypte, Jordanie, France (Corse), Jamahiria arabe Libyen, Maroc [37], Oman, Arabie saoudite, Turquie [37] [21], Tunisie [38] [39], Soudan [40], La république arabe syrienne [26], les Emirats arabes unis et les Etats-Unis d'Amériques (Arizona et Californie). Cette maladie a été trouvée également en Grèce, Italie, Mexique, Espagne et Pakistan [21]. En Iran la présence du stubborn est en corrélation avec la présence de *Neoliturus haematoceps* (*N. haematoceps*) et *Neoliturus (Circulifer) tenellus* (*N. (C). tenellus*) [8]. La maladie du stubborn est rare dans les pays à climat plus frais puisque le vecteur et l'organisme préfèrent les hautes températures [21] [8], aussi on ne le trouve pas dans les régions subtropicales chaudes en raison de l'absence des vecteurs potentiels [21] (figure 2.1 ; 2.2).



Figure 2.1: Répartition géographique de la maladie du stubborn dans le monde [8]

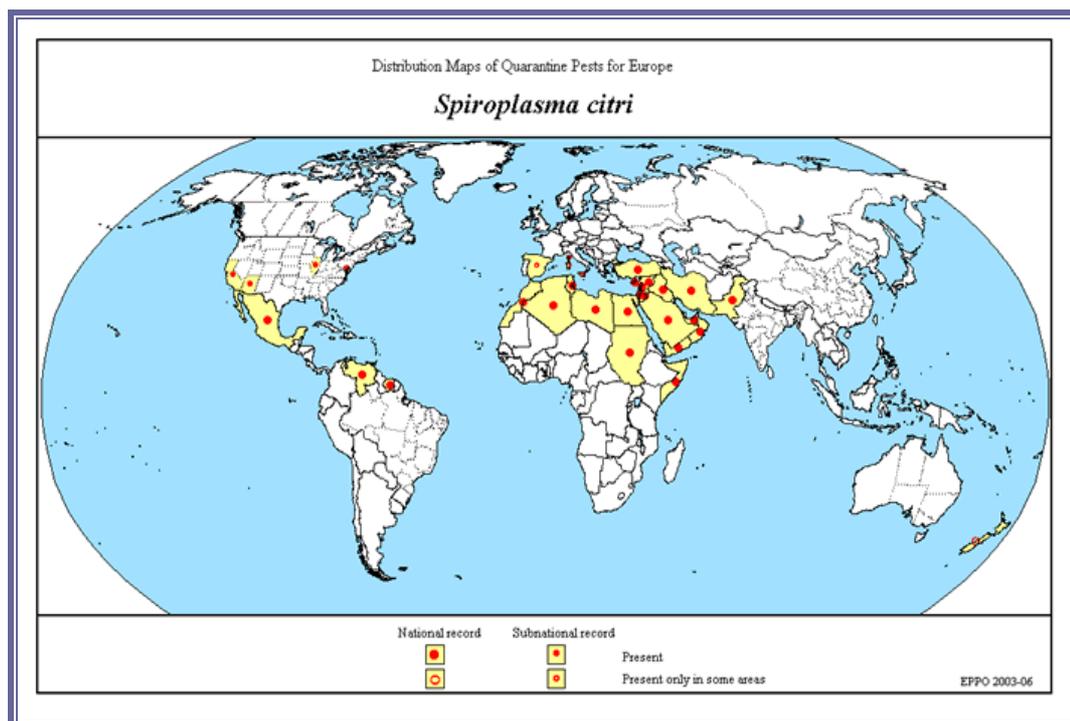


Figure 2.2 : Répartition géographique de *Spiroplasma citri* [41]

2.4. Incidence économique :

La maladie du stubborn est la maladie la plus destructive dans la plupart des pays où les *Citrus* se développent sous conditions (chauds, sèches) ou conditions (arides ou semi-arides). Il est considéré comme une maladie endémique dans les pays à climat doux du pourtour méditerranéen et ceux de l'Asie Occidentale (Turquie, Irak, et Iran) [8]. Cette maladie induit des effets néfastes en compromettant la production et en diminuant la longévité de l'arbre occasionnant ainsi une réduction de la production allant de 50% à 100% [6]. Le fait qu'elle est transmise par vecteur contrairement à la plus part d'autres greffes infectés transmissibles de *Citrus*, le rend plus difficile de contrôler par l'usage de matériel de plantation sain [42]. La maladie est importante en Arizona et Californie. En Arizona le stubborn est particulièrement décelé sur *Washington navel* [31]. En Californie, les principaux hôtes économiques sont : L'orangers, grappe fruits, et les tangelos des quels 5 à 10 % d'arbres sont estimés d'être affectés. Dans la région méditerranéenne le stubborn est très sévère dans quelques pays surtout en Syrie où le vecteur *N. haematoceps* est commun et le matériel de multiplication qui a été introduit sain mais était rapidement réinfecté [42]. L'Irak et la Turquie sont deux autres pays où la maladie est rapportée pour être répandu et importante. Dans les autres pays méditerranéens (Chypre, Egypte, Jordanie,

Maroc) la maladie est présente mais rarement sur certains cultivars. Dans d'autres (Algérie, Libye, Tunisie) le stubborn était rapporté d'être commun dans le passé mais les prospections et les études trouvent peu ou pas d'arbres avec des symptômes caractéristiques [41].

2.5. Classification des *Phytoplasmes* :

Les *Phytoplasmes* furent désignés tout d'abord sous l'appellation *Mycoplasma-Like-Organisms (MLO)* en raison de leur similitude d'aspect en microscopie électronique avec les *Mycoplasmes* animaux appartenant à la Classe des *Mollicutes*. Cependant, contrairement aux *Mycoplasmes* stricto sensu, la culture des (*MLO*) en milieu acellulaire n'a pu être réalisée, certains sont communs à l'ensemble des *Mollicutes*, d'autres leur sont spécifiques. L'étude de l'ADN ribosomique (gène de l'ARNr) (fraction 16S et espaceur situé entre les fractions 16S et 23S), montre son caractère unique, l'espaceur contenant un seul ARNt isoleucine contrairement aux *Mycoplasmes* stricto sensu qui en sont dépourvus ou aux *Spiroplasma*s et aux bactéries à paroi où l'on observe une diversité de l'ARNt dans 2 ou 3 espaceurs différents. En raison de ces particularités, le comité international de la taxinomie des *Mollicutes* décida, en 1994, de remplacer l'appellation (*MLO*) qui avait été utilisée pendant plus de 20 ans par *Phytoplasmes* car, bien qu'ils se multiplient à la fois chez la plante et chez l'insecte vecteur, ils sont essentiellement Phytopathogènes [43] (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Caractères comparés des bactéries classiques, des *Mollicutes* et des virus des plantes [43]

Caractères comparés des bactéries classiques, des mollicutes et des virus des plantes					
	Bactéries à l'exception des mollicutes		Mollicutes		Virus
Paroi	oui (à l'exception des formes L)		non		
Sensibilité aux antibiotiques	Antibiotiques actifs sur les synthèses pariétale et protéique		Antibiotiques actifs sur la synthèse protéique (tétracycline)		non
Visibilité au microscope photonique	oui		oui (limite)		non
Acides nucléiques	ADN + ARN		ADN + ARN		ADN ou ARN
	Bactéries classiques	Bactéries du phloème	Spiroplasma	Phytoplasmes	Virus
Croissance sur milieu acellulaire	oui	non	oui	non	non
Localisation	extracellulaire (parenchyme et xylème)	intracellulaire (phloème)	intra- et extracellulaire (phloème et surface des fleurs)	intracellulaires (phloème)	intracellulaire (parenchyme et phloème)
Taille du génome	3 000 à 5 000 kpb		1 500 kpb	1 200 kpb (aster yellows) 600 kpb (déperissement des ligneux)	4 à 50 kpb
Teneur en G + C	50 à 78%		25 à 31%	23 à 26%	
tRNA situé dans l'espaceur 16S/23S	Diversité des ARNt		Diversité des ARNt	un seul ARNt isoleucine	
Fonctionnement du codon UGA	codon d'arrêt		codon tryptophane	codon d'arrêt	

2.6. Caractéristiques des *Phytoplasmes* :

Jusqu'en 1967, les maladies de végétaux de type (jaunisse) étaient reliées aux maladies virales. Les agents pathogènes responsables de ces maladies partagent en effet certaines de leurs propriétés avec les virus du phloème : transmissibilité par greffage et par insectes vecteurs, multiplication à la fois chez la plante et l'insectes- vecteurs, absence de transmission mécanique. Cependant, les méthodes utilisées jusqu'alors pour la purification des virus avaient échoué, tandis que la présence d'ADN anormal dans les tubes criblés suggérait une localisation phloémique des agents en cause [44].

L'observation de coupes ultrafines de plantes infectées révèle la présence, dans le phloème, de micro-organismes dépourvus de paroi contrairement aux bactéries classiques. Ils sont limités par une membrane à trois feuillettes (deux feuillettes denses aux électrons entourant un feuillet clair), à l'intérieur de la quelle on distingue des filaments d'ADN ainsi que des ribosomes de taille différente de ceux de la plante hôte. Ces *Phytoplasmes* sont polymorphes et capables de franchir les cribles des tubes criblés [43]. Ce sont des parasites cellulaires obligatoires. Ils se multiplient dans les vaisseaux criblés. Ils sont véhiculés par la sève [45]. Leur taille varie de 100 nm à plus d'un micron ; leur forme ovoïde, filamenteuse en Y, en haltères, mais jamais spiralée (figure 2.3). Ce polymorphisme est particulièrement visible sur coupes épaisses, atteignant un micron d'épaisseur, observées en microscopie électronique par transmission ou en balayage. La plupart des *Phytoplasmes* sont localisés dans les tubes criblés, par fois dans le parenchyme libérien, exceptionnellement dans le parenchyme cortical chez la féverole et la cuscute [43]. L'absence de paroi explique que ces microorganismes seraient sensibles à la chaleur et aux antibiotiques du groupe des tétracyclines qui agissent sur la synthèse protéique, mais résistants aux pénicillines qui agissent sur la paroi bactérienne. Elle leur confère aussi une forte sensibilité aux variations de pression osmotique, d'où leur localisation presque exclusive dans la sève des tubes criblés, dont la pression osmotique atteint 10 à 12 atmosphères. Les tubes criblés peuvent aussi contenir un autre groupe de *Mollicutes*, à morphologie spiralée, les (*Spiroplasma*), cultivables en milieu acellulaire. Tous les *Phytoplasmes* actuellement connus sont phytopathogènes et intracellulaires [43].

Chez les *Phytoplasmes*, le codon UGA fonctionne comme codon d'arrêt, comme chez les bactéries à paroi et les *Acholeplasma*, contrairement aux *Spiroplasma* qui ont un codon UGA correspondant au tryptophane [46]. La position phylogénétique des

Phytoplasmes au sein des bactéries est essentiellement basée sur l'étude de l'ADN ribosomique (fraction 16S et espaceur 16S/23S). Selon MOREAU et al [47], les *Phytoplasmes* dérivent de *Bacillus subtilis* (Bactérie gramme-positif) et d'après COUSIN et BOUDON-PADIEU [43], les *Phytoplasmes* sont plus proches phylogénétiquement des *Acholeplasma* (*Mollicutes* saprophytes) et des *Anaeroplasma* (*Mollicutes* anaerobies), que des *Mycoplasmes* animaux et des *Spiroplasma*. Tous possèdent *Bacillus subtilis* comme ancêtre commun.

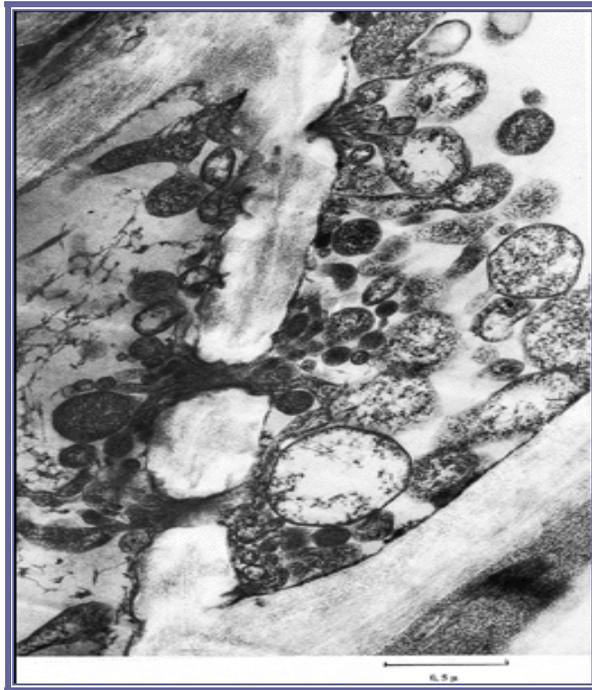


Figure 2.3 : Ultra structure des *Phytoplasmes* [43]

2.7. Transmission des *Phytoplasmes* :

Les *Phytoplasmes* sont transmis par insectes et ont une croissance dans les glandes salivaires, tractus intestinal, hémolymphe, intracellulaire, leurs latence avant transmission est de (10 à 45 jours suivant la température), l'acquisition est plus efficace par les larves, et il n'y a pas de transmission à la descendance [48].

2.8. Conservation des *Phytoplasmes* :

Afin de conserver les agents des phytoplasmoses en l'absence du vecteur, il convient de disposer d'une espèce végétale où la maladie n'évolue ni vers la guérison ni vers la mort de la plante. Il est difficile de conserver durablement la plupart des

Phytoplasmes en serre sur leur plante hôte d'origine. Cependant ils peuvent être maintenues indéfiniment sur la pervenche de Madagascar *Catharanthus roseus* (*C. roseus*) [43].

2.9. Généralités sur les *Spiroplasmataceae* :

Les *Spiroplasmataceae* ont un génome de taille de 1,6 Mpb avec un contenu de (G+C) de 25-31 (Mol%). Ils utilisent le glucose et l'arginine, ont une exigence en cholestérol pour leur développement et peuvent se trouver chez les insectes et plantes [43, 49,50,51,52]. Au sein de l'ordre des *Entomoplasmatales*, les bactéries de la famille des *Spiroplasmataceae* se caractérisent par leur morphologie hélicoïdale (au moins lors de la phase exponentielle de croissance), leur mobilité par flexion et translation et par leur température optimale de croissance comprise entre 30 et 37°C [53] (Tableau 2.2).

Tableau 2.2: Taxinomie et caractéristiques des membres de la classe des *Mollicutes* [52] [54] [49] [51].

	Nombre d'espèces reconnus	Taille du génome	Contenu en [G+C] mol%	Exigences en cholestérol	Glucose/ Arginine	Particularités	Habitat	Autres caractéristiques de distinction
Ordre <i>Entomoplasmatales</i>		940-1140 [kpb]	27-29	+			Insectes/ plantes	
Famille <i>Spiroplasmataceae</i>	11	1,6Mpb	25-31	+		hélicoïdale	Insectes/ plantes	
Genre : <i>Spiroplasma</i>	33	940-2400 (kpb)	25-30	+		hélicoïdale	Insectes/ plantes	Filaments hélicoïdaux optimum de croissance 30 à 37°C
Groupe I-1 Espèce: <i>Spiroplasmacitri</i> (Saglio et al [32])								
Souche représentative : [ATCC] Maroc-R8A2T [27556]			26		+/+	hélicoïdale	Phloème/ cicadelle s/ Dicots	Filaments hélicoïdaux optimum de croissance 30 à 37°C

Légende :

+ : oui,
Mol % : pourcentage de la masse moléculaire
Kpb : kilo paire de bases,
(G+C) : guanine+cytosine

2.10. *Spiroplasma citri* :

2.10.1. Historique :

Les *Mollicutes* phytopathogènes sont des *Eubactéries* (gramme positifs) associés avec plusieurs centaines de maladies des plantes qui affectent une large gamme de variétés des plantes y compris les arbres fruitiers, vigne, légumes et plantes ornementales [55] [56] [57]. Les *Mollicutes* partagent des propriétés en commun avec les *Mycoplasmes* d'animaux tel que l'absence de paroi cellulaire, la taille réduite du génome et le contenu faible de (G+C) [43]. Les *Mollicutes* phytopathogènes contiennent 2 groupes : *Spiroplames* et *Phytoplasmes*. Les *Spiroplames* sont caractérisés par leur morphologie hélicoïdale. Ils ont été découverts et cultivés entre 1970-1971. Les *Phytoplasmes* (ex *MLO*) au contraire sont des pleimorphes découverts en 1967 mais résistant à la mise en culture [58].

La caractérisation de ces agents et les études de phylogénie ont montré que les *Mollicutes* ont dérivé d'ancêtres du *Clostridia* par évolution dégénérative, c'est par perte d'ADN ou réduction du génome. La quantité d'ADN dans la cellule d'un *Mollicute* est classée de 580 kb à 2200 kb. La réduction du génome a résulté en particulier de la perte des gènes nécessaire à la synthèse d'une paroi, propriété unique et caractéristique de cette classe bactérienne, (*Mollicute* vient du latin molli/cutis, peau molle) et dans la perte de nombreuses capacités métaboliques (synthèse des acides aminés, des acides gras etc....), c'est sans doute la conséquence de leur multiplication dans deux niches écologiques très spécifiques renfermant des milieux riches et complexe, la sève élaborée des plantes circulant dans les cellules du phloème et l'hémolymphe d'insectes arthropodes (cicadelles ou psylles) se nourrissant de cette sève, et assurant la transmission des *Mollicutes* de plante à plante de façon très spécifique [59].

La place phylogénétique du *Mollicute* a été réexaminée en utilisant les séquences de l'acide aminée phosphoglycérate kinase (*Pgk*) [60]. Les données de (*Pgk*) ont indiqué une origine monophylétique pour les *Mollicutes* dans *Firmicutes* [60]. *S. citri* est un *Mollicute* pathogène des plantes, évolué de bactérie a été montrée ces dernières années, plus précisément d'ancêtres du *Clostridia* qui sont des bactéries du type gramme-positif avec un bas pourcentage des bases du guanine+cytosine dans leur ADN [61][8] seulement 26% dans le cas de *S. citri* [8].

2.10.2. Données taxinomiques :

L'agent pathogène de stubborn de *Citrus* était le premier *Spiroplasma* obtenu en culture pure [62] et par la suite le premier être nommé dans le genre comme *S. citri* [32] [63]. En 1972, l'agent causal du rabougrissement du maïs (*Corn stunt*) était de forme hélicoïdale et mobile et représente donc entièrement un nouveau groupe de pathogènes, pour le quel le terme *Spiroplasma* a été inventé [64] [65]. Il appartient au domaine *Bacteria*, phylum des *Firmicutes* [49], classe des *Mollicutes* [49] [66] et à l'ordre des *Entomoplasmatales* [51] [67] [68]. Le genre *Spiroplasma* est l'unique genre de la famille des *Spiroplasmataceae* [53] [69].

2.10.3. Critères de la taxinomie pour la classification de *Spiroplasma* :

Plusieurs caractéristiques doivent être déterminées pour classer un microorganisme appartenant au genre *Spiroplasma* [70]. Les niveaux minima pour la description de nouvelle espèce cultivable de *Spiroplasma* incluent l'observation de caractéristiques morphologiques de base (mobilité, hélicité et l'absence de paroi cellulaire), aussi bien que la détermination de propriétés biologiques, moléculaires et sérologiques. Les propriétés biologiques incluent : Filtration à travers les membranes à 220nm, capacité de fermenter le glucose, résistance à 500µ de pénicilline/ml, utilisation d'arginine, incapacité d'hydrolyse de l'urée, température optimale de croissance, et exigence du cholestérol pour la croissance [71]. Les caractéristiques variables incluent la capacité à hydrolyser l'arginine et la température optimale de croissance. Les caractéristiques moléculaires incluent la détermination de la composition en base (G+C), détermination de la taille du génome et l'analyse de séquence (16SrDNA) [70]. La seule exigence pour la description de nouvelles espèces est la détermination de la composition en base (G+C) qui varie de 24 à 31% pour les *Spiroplasmas* [49]. Pour les caractéristiques sérologiques le test de difformité (DF) est utilisé universellement dans la caractérisation de *Spiroplasma* [72] [73]. Le test d'inhibition du métabolisme (MI) est la 2^{ème} technique sérologique habituellement utilisé [73] [74], il est plus sensible que le test (DF) et sont important pour montrer les sous-groupes [75].

2.10.4. Usage des analyses de la séquence 16SrDNA dans la taxinomie de *Spiroplasma* :

Le travail novateur par WOESE [76] [77], lequel a utilisé l'analyse de séquence 16SrDNA pour la caractérisation phylogénétique des procaryotes a fourni un bon point de

départ pour l'étude profonde de l'évolution des *Mollicutes*. Actuellement la plupart des microbiologistes se sont intéressés dans l'étude de la phylogénie de procaryote en utilisant les séquences 16SrDNA pour résoudre les rapports bactériens dans les divers groupes bactériens.

L'analyse de la séquence 16SrDNA a été utilisé avec succès pour distinguer les nouvelles souches du genre *Spiroplasma* [78] [79]. Les *Phytoplasmes* ont été extensivement étudiés en utilisant les analyses de cette séquence pour la détermination appropriée des groupements systématiques [80] [81]. Les résultats de ces études ont indiqué la capacité de l'analyse de la séquence 16SrDNA d'être utilisé dans tous les niveaux de classification y compris les espèces. Les problèmes surviennent avec les organismes très attentivement apparentés, du fait que le gène de 16SrDNA est très conservé [82] donc il a été proposé qu'à des niveaux d'homologie au-dessus de 97% pour la comparaison de la séquence 16SrDNA, l'analyse d'hybridation d'ADN devrait être exécutée [49].

2.10.5. Désignation du groupe :

Les critères proposés des désignations du séro groupe de statut du groupe ont aussi modifié légèrement les critères utilisés pour la classification du *Spiroplasma* [83]. La nouvelle désignation du séro groupe a exigé le suivant:

- L'organisme devrait être triplement multiplié par clone
- L'organisme devrait être démonstrativement insensible à la pénicilline
- Une section mince d'électron micrographe devrait montrer que l'organisme est lié par seulement une membrane cellulaire et complètement dépourvus d'une paroi cellulaire (quand ces 3 critères sont rencontrés l'organisme est dit pour appartenir à la classe des *Mollicutes*.
- Pour appartenir à la famille des *Spiroplasmataceae*, l'organisme devrait être caractérisé par l'hélicité et la mobilité.
- L'organisme peu être résolu au niveau du genre par démonstration de sa capacité d'utiliser le glucose, incapacité d'utiliser l'urée et capacité ou incapacité pour utiliser l'arginine comme une seule source de carbone (membre du genre *Spiroplasma*).
- Les statuts des espèces peuvent être déterminés par les analyses sérologiques qui exige

le teste de déformation [72], inhibition de la Croissance [84], inhibition métabolique [74] ou l'essai d'ELISA [85].

- Détermination de la teneur de guanine-cytosine d'ADN est hautement recommandée.
- Les isolats doivent être déposés dans une collection de culture nationale (ex, souche marocaine). Actuellement il y a 34 groupes reconnus et 14 sous-groupes.

2.10.6. Caractéristiques générales de *Spiroplasma citri* :

2.10.6.1. Caractéristiques morphologiques :

Les cellules sont de forme pleimorphiques sans paroi avec une morphologie caractéristique en spirale [86] [87]. Le genre *Spiroplasma* rassemble des microorganismes de 100 à 200 nm de diamètre sur 3 à 5 µm de longueur, de forme hélicoïdale durant la phase exponentielle de croissance et parfois durant la phase stationnaire, il est ramifiés, mobile grâce à des fibrilles intracellulaires [69] (figure 2.4).

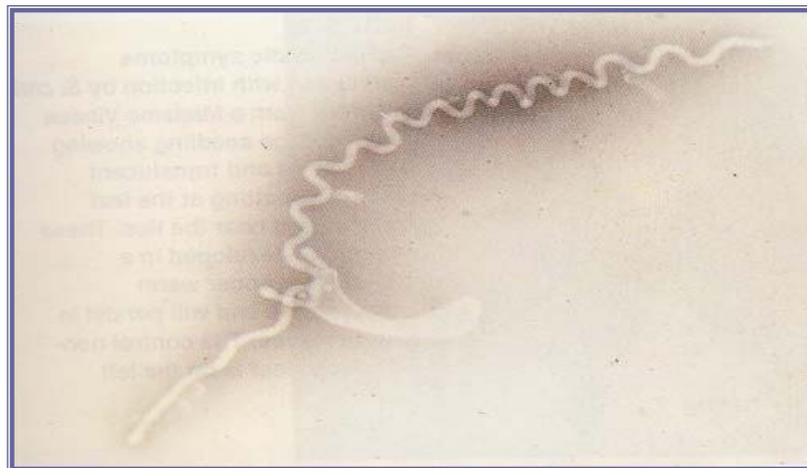


Figure 2.4: Particule de *Spiroplasma citri* observée au microscope électronique (photo: E.C.Calavan) [21]

2.10.6. 2. Caractéristiques physico- chimiques :

S. citri était le premier *Spiroplasma* vu sous microscope électronique en 1970 [88] [89] et mis en culture pure en 1971 [62], est le premier *Spiroplasma* caractérisé en 1973 [90] [32] et où le Postulat du Koch a été accompli en 1974 [91] [8]. *S. citri* peuvent être mis en culture dans un milieu relativement simple [92]. Dans le milieu de culture, il se

développe avec un optimum thermique de 20 à 37°C. En milieu gélosé, les colonies sont de 0,1 à 4 mm de diamètre (par fois de taille moindre lorsque les conditions optimales ne sont pas réunies), sont généralement diffuses, avec présence de colonies satellites. Cet aspect des cultures reflète la mobilité des bactéries lors de la croissance. Des colonies en « oeuf sur plat » ne sont pas observées que lorsque la culture est effectuée sur un milieu fortement gélosé (2,5 % d'Agar Noble) [53] (figure 2.5).

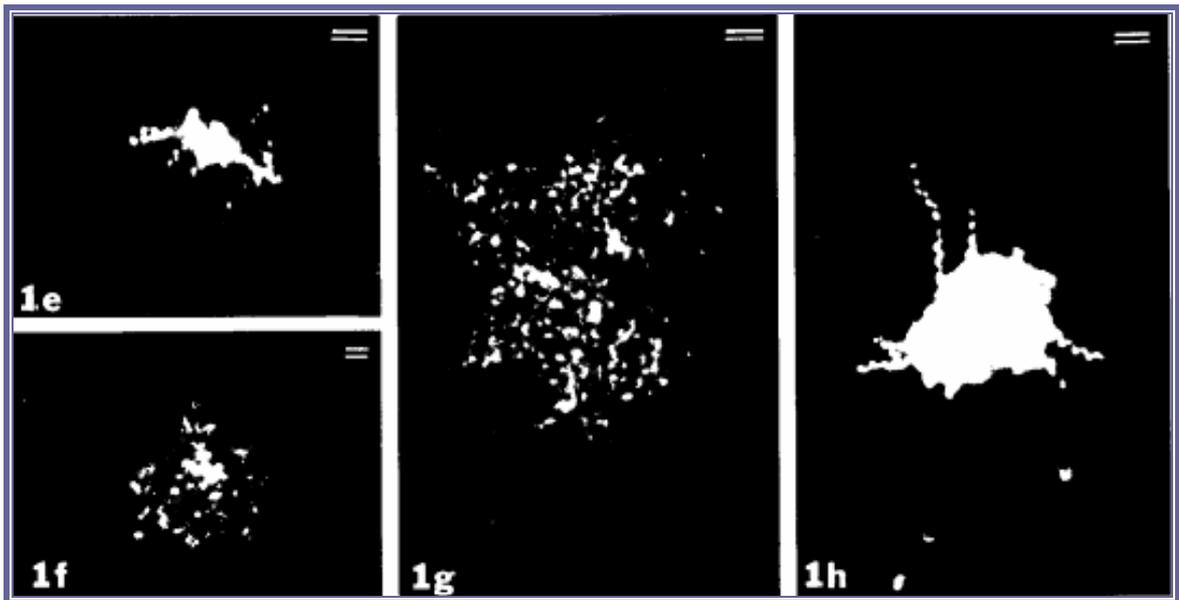


Figure 2.5: e, f, g, h: Exemples des agrégats de la souche marocaine de *Spiroplasma citri* dans des cultures plus anciennes ((x 4.400) fixés sur Glutaraldehyde; (x 2.800) non fixés; (x 4.400) fixés; (x 4.400) fixés respectivement 1,0 μm) [63]

S. citri était l'un des premiers agents que GARNIER (1949-2003) [90], a étudié par microscopie électronique. Il a été démontré que les *Spiroplasma* divisent par resserrement, et que la plus petite cellule viable du *Spiroplasma* est une hélice avec deux tours (hélices élémentaires), et ces hélices élémentaires grandissent dans l'hélice parentale avec quatre tours ou plus, lesquelles se divisent pour céder les nouvelles hélices élémentaires [90] [93]. Les membranes isolées ont montré la forme caractéristique trilaminaire. Les protéines et les lipides forment plus de 80% du poids sec total de la membrane qui avait une densité d'environ 1,180 g/cm³. Le cholestérol constitue plus de 20% du lipide total de la membrane. Le phosphatidyl glycérol synthétisé par les organismes était le phospholipide principal. Des quantités significatives de μg/mg de l'hexosamine (15 à 35 μg/mg de protéines de la membrane) pourraient être trouvés dans la membrane [94].

Les *Spiroplasma*s sont les seuls *Mollicutes* qui montrent la mobilité et la morphologie hélicoïdale apparemment servi de médiateur par un cytosquelette fibrillaire contractile. Les gènes MreB qui sont impliqués dans la détermination de la forme de la cellule ont été identifiés dans *S. citri* [95]. La chimiotaxie et la mobilité sont effectuées par un moteur linéaire, contractile, arrangé comme un ruban du cytosquelette plat attaché au coté intérieur de la membrane le long de la ligne hélicoïdale. L'unité structurelle paraît être un fibrille, approximativement 5 nm de large, composé de dimers d'une protéine de 59 kda, (chaque ruban s'est assemblé de 7 paires de fibrille) [96]. En moyenne, les rubans isolés et purifiés contiennent 14 fibrilles ou 7 paires de fibrilles bien alignées qui ont la même structure observée dans la cellule intacte. En utilisant les analyses par transmission de masse de microscope électronique et sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel électrophoresis, des cytockeletettes purifiés indiquent que la protéine de 59 kda est la seule composante des rubans [96].

Les *Spiroplasma*s sont aero-anaerobies facultatifs, chimio-organotrophes, acidifiant le glucose, possédant le plus souvent une arginine di-hydrolase, n'hydrolysant ni l'urée ni l'esculine, résistants à 10 000 UI de pénicilline [53], et autres antibiotiques qui perturbent la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne [8], exigeants en cholestérol, sensibles à la digitonine [53] et à des concentrations moins de 0,1 µg/ml d'actinomycine D, carbomycine, demethylchlortetracycline, doxycycline, erythromycine, methacycline, minicycline et tylosine [32] [97] [33]. Comme pour la plus part d'autres *Phytoplasma*s, le *S. citri* a été montré pour être incapable de synthétiser les acides gras ou estérifier le cholestérol, une exigence du stérol pour la croissance de *S. citri* a été confirmée. Il se multiplie mieux sur cholestérol et Beta-sitosterol et était capable de se développer sur stigma stérol et ergostérol a faible degré. *S. citri* est capable aussi de se développer quand l'acide palmitique est remplacé avec l'acide oléique, l'acide linoléique ou l'acide linoléique [98]. Les altérations dans la composition de lipides du milieu de croissance et d'où dans la composition de lipides de *S. citri* a induit des changements dans les caractéristiques hélicoïdales de la morphologie des cellules, avec perte de la viabilité. La culture, l'âge, et le pH sont aussi des facteurs déterminants de la morphologie et la viabilité cellulaire [98].

2.10.6.3. Caractéristiques sérologiques :

Parmi les *Mollicutes* des plantes seulement les *Spiroplasma*s ont été mises en culture in vitro avec succès, en permettant la production d'antisérum très spécifique pour

leur découverte sérologique et identification. Depuis la découverte de *S. citri* plus de 30 autres *Spiroplasma* ont été identifiés [8]. Les espèces de *Spiroplasma* (*Mollicutes* : *Spiroplasmataceae*) sont associées à un bon nombre d'insectes, et la sérologie a classifié ce genre en 34 groupes dont 3 ayant des sous-groupes [99], et à présent il y a 23 serogroupe définis. *S. citri* fait partie du serogroupe I, ce groupe est subdivisé à huit sous-groupes [8]. *S. citri* représente le sous-groupe I-1 [100]. Comme d'autres membres du groupe I, *S. citri* a ADN avec (26%) de guanine-cytosine et la taille du génome est de 10^9 Dalton. *S. citri* est sérologiquement relié seulement au *Spiroplasma* du groupe I, et spécifiquement à ceux du sous-groupes I-2 (*honey bee Spiroplasma* ou *Spiroplasma melliferum*) et I-3 (*Corn stunt spiroplasma* ou *spiroplasma Kunkelii*). La technique d'hybridation d'ADN a montrée des relations non seulement à ces *Spiroplasma* mais aussi à ceux du sous-groupe I-8 (*Spiroplasma P40* ou *Spiroplasma phoeniceum*) [8]. *S. citri*, *S. Kunkelii* [101], et *S. phoeniceum* [102] sont seulement les 3 *Spiroplasma* intraphloémique [8].

La spiraline est une protéine principale de la membrane et spécifique pour *S. citri*. Elle constitue jusqu'à 20 à 30 % de la masse totale des protéines [103], c'est une lipoprotéine de 26.10^5 Dalton qui est conservée dans les *Spiroplasma* [104,105]. En effet l'antispiraline est une protéine immunoglobuline mono spécifique (IgGs), elle ne reconnaît pas les protéines d'un autre *Spiroplasma*, alors que les spiralin-like-protéines sont probablement présent chez tout les autres *Spiroplasma* [106].

2.10.7. Biologie moléculaire de *Spiroplasma. Citri* :

Le chromosome de *S. citri* est obtenu à partir de la multiplication du microorganisme en culture. Le séquençage complet du génome de ce *Mollicute* (1800 kpb) a débuté en suivant une stratégie ordonnée qui a permis le séquençage d'environ 30 % du génome. A ce jour 81,5 % du génome de *S.citri* a été déterminée dont 74,3% sont assemblés en contigs [106]. Le *S. citri* comme les eubactéries contient 3 ADN polymérase, mais différent aux eubactéries [107].

La séquence du nucléotide de 6863pb du fragment d'ADN de *S. citri* qui comprend le gène du spiralin a été déterminé. L'analyse de la séquence a révélé 8 cadres ouverts de lecture (*ORFs*) [108]. Les produits de transcription de 5 de ces *ORFs* ont été identifiés par leurs homologues d'ordre d'acide aminé avec les protéines connues qui code pour la protéine ribosomale S2, facteur d'élongation Ts, spiralin, 6-phosphofructokinase, pyruvate

kinase, respectivement codée par les gènes *rpsB*, le *tsf*, gène de spiralin, le *pfk*, et le *pyk* [109] et 3 protéines non identifiées (A, B, et X). L'analyse par Northern Blot B, indique que les gènes *tsf* et X sont organisés dans une seule unité transcriptionnelle operon [108].

2.10.8. Transmission de *Spiroplasma citri* :

La transmission naturelle de *S. citri* s'effectue à travers le bois de greffage infecté dans un pourcentage hautement varié [62], et sont aussi transmis par des insectes appartenant à l'ordre des *homoptères* (cicadelles) selon le mode persistant circulant propagatif non multipliant [110] [43]. Ces cicadelles sont: *C. tenellus* (Baker) (figure 2.6), *Scaphytopius nitridus* (Delongi) (*S. nitridus*), *Scaphytopius acutus* (Delongi) (*S. acutus*) [111] [8] et *N. haematoceps* (Mulsant et Rey) [41] (figure 2.7).



Figure 2.6: *Neoliturus (Circulifer) tenellus* (Mulsant et Rey), (Courtesy of OLDFIELD, Riverside, Californie) [8]



Figure 2.7: *Neoliturus haematoceps* (Baker) (INRA, Bordeaux) [8]

Les *Spiroplasma*s pathogènes des plantes transmises par insectes ne sont pas transmissibles par semences, mais les parties végétatives contaminées peuvent les propager au cours des pratiques culturales (bouturages et greffages), particulièrement dans le cas de la production des plantes ligneuses, et ils ne sont pas transmissibles de génération en génération de cicadelles. Par conséquent ils ne peuvent pas survivre en dehors de leurs hôtes et sont dépendants de la transmission pour leur survie et leur propagation. Pour se maintenir dans leurs organismes hôtes, les *Spiroplasma*s doivent avoir la capacité de se lier aux cellules épithéliales de l'insecte pour éviter d'être expulsés à travers le tractus digestif. Dans plusieurs des cas c'est l'ampleur d'attachement, mais dans l'ordre pour devenir pathogène les *Spiroplasma*s doivent être capables d'envahir l'hémolymphe. Dans quelques cas extrême, par exemple dans les cicadelles hôtes qui transmettent les maladies des plantes, les *Spiroplasma*s doivent passer dans d'autres tissus pour atteindre spécifiquement les glandes salivaires (cas de *S. citri*) [49].

Les cellules des *Spiroplasma*s ont un gène qui code pour une protéine de membrane de 58 kda qui a quelques ressemblance de la séquence à adhésines du *Phytoplasma*, cette protéine P58 et autres protéines sont évaluées pour la participation dans l'attachement de *Spiroplasma* à l'intestin et aux glandes salivaires de l'insecte. Le génome possède 3 copies du gène P58 [112].

Les *Spiroplasma*s sont transportés de l'insecte à la plante par le canal salivaire quand les cicadelles se nourrissent du phloème de la plante, et de la plante à l'insecte par le canal alimentaire (figure 2.8 ; 2.9). Ils sont toujours « intracellulaires » car localisés à l'intérieur des parois de la cellule-hôte mais alternativement « extra cytoplasmique », dans la sève des tubes criblés adultes dont le cytoplasme a disparu, et « intra cytoplasmiques » dans les cellules des jeunes tubes criblés non différenciés (figure 2.9). De même, chez l'insecte, ils sont « extra cytoplasmiques » dans l'hémolymphe, la lumière de l'intestin moyen et la salive et « intra cytoplasmiques » dans les cellules du tube digestif, des glandes salivaires et d'autres cellules de l'insecte [43]. Les cellules de *S. citri* sont restreintes aux tubes criblés du phloème où se développent sur glucose et fructose, alors que dans l'hémolymphe de la cicadelle les *Spiroplasma*s doivent se développer sur le tréhalose, qui est le sucre principal et le plus important dans les insectes [61]. La capacité de *S. citri* d'être transmises par sa cicadelle vecteur compte sur l'adhésion aux récepteurs

sur le plasmalème apical de la cicadelle et l'invasion des cellules de l'insecte hôte. L'adhésion de *S. citri* est reliée à la protéine P89 (*SARPI*) [114] [115], et aussi sur sa capacité de se multiplier dans les tissus de l'insecte et traverser les barrières physiques tel que l'épithélium intestinal et les membranes des glandes salivaires [110].

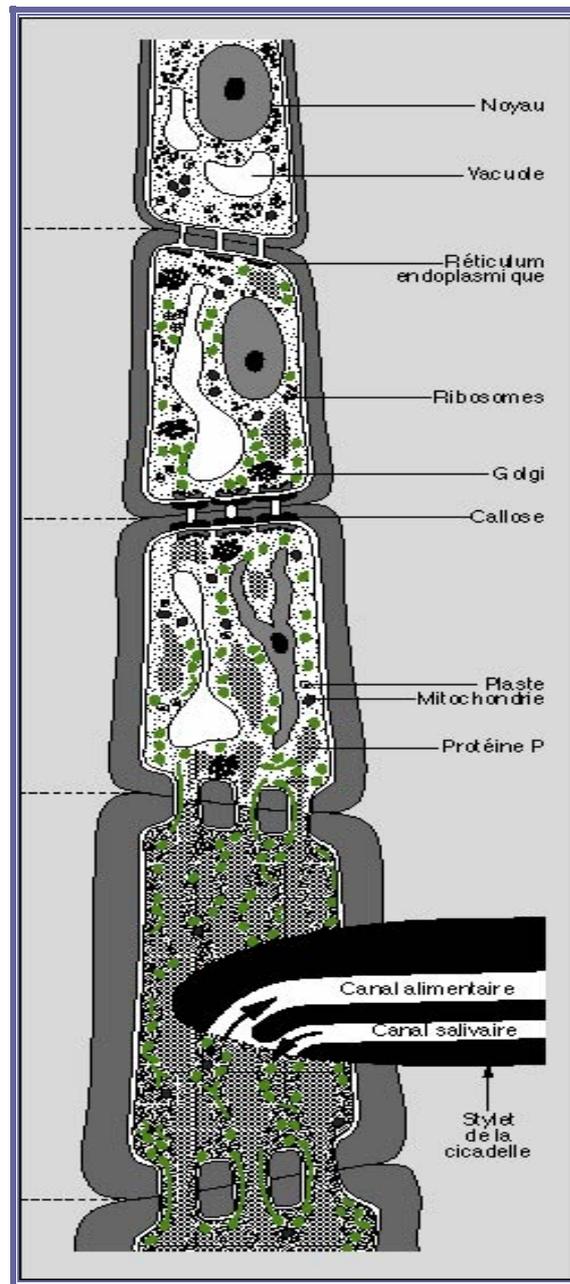


Figure 2.8: Stylet de l'insecte et tubes criblés en cours de différenciation (*Spiroplasma*s figurés en vert) [43]

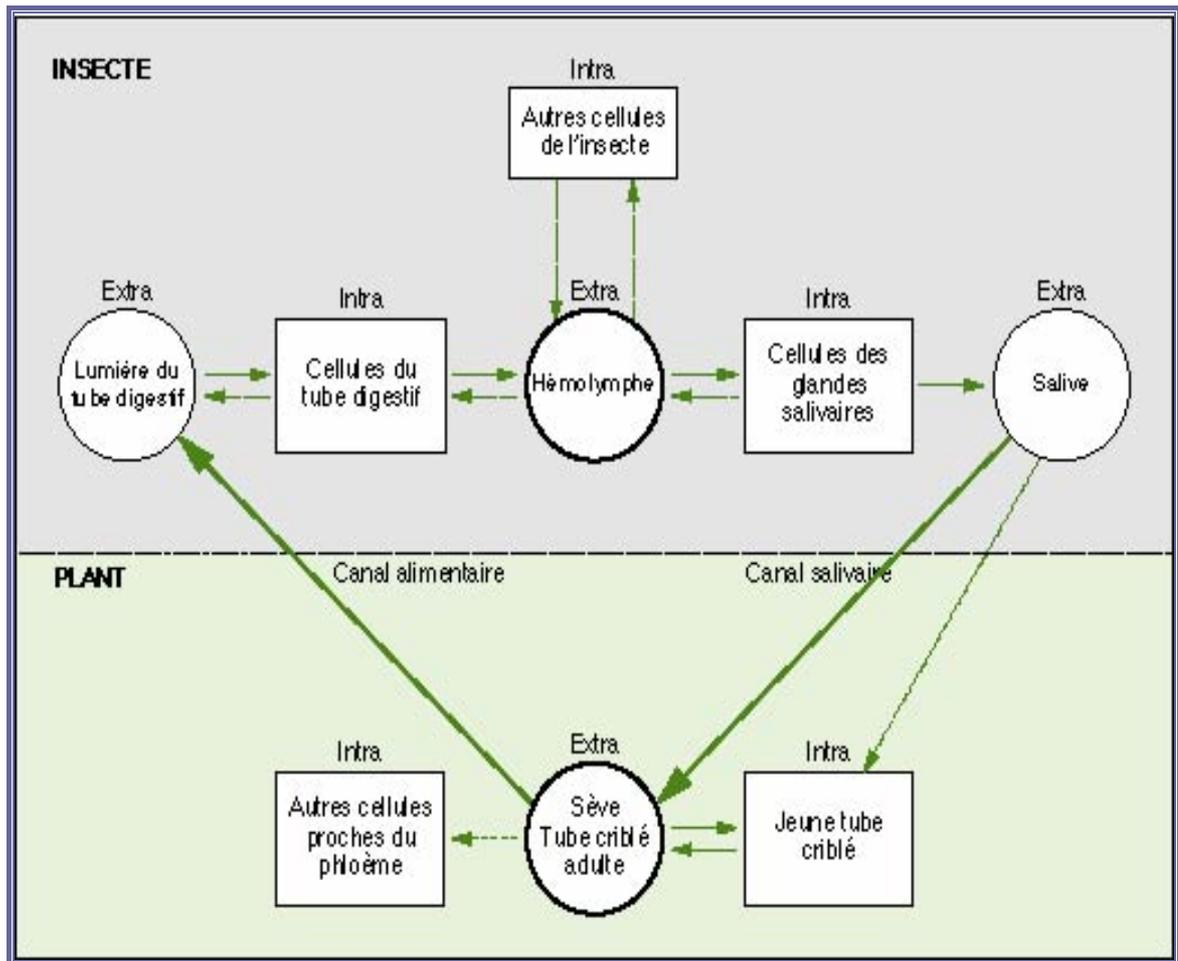


Figure 2.9: Passage des *Spiroplasma* de la plante à l'insecte et inversement [113]

Légende :

* Les flèches en trait plein indiquent les passages obligatoires. Les flèches en pointillé indiquent les passages possibles.

* « Intra » : *Spiroplasma* intracytoplasmiques.

* « Extra » : *Spiroplasma* extracytoplasmiques localisés dans des sites dépourvus de cytoplasme (lumière du tube digestif, hémolymphe et salive chez l'insecte, tube criblé adulte chez la plante), mais intracellulaires car localisés à l'intérieur des parois de la cellule-hôte

2.10.9. Parcours de *Spiroplasma citri* dans l'insecte vecteur :

Les *Spiroplasma* phytopathogènes ont un cycle infectieux, c'est-à-dire leur acquisition à partir d'une plante infectée par des insectes piqueurs-suceurs, leur multiplication dans l'insecte vecteur et leur transmission à une plante saine lors d'un nouveau repas de l'insecte contaminé, ceci demande une adaptation à des milieux aussi

différents de l'hémolymphe de l'insecte ou la sève élaborée de la plante. En outre, pour que la transmission se produise, plusieurs barrières doivent être franchies par le pathogène [116]. Les *Spiroplasma*s ingérés doivent infecter les cellules épithéliales de l'intestin où ils se multiplient avant de traverser dans l'hémolymphe pour se reproduire, l'entrée du *Spiroplasma* dans les cellules de l'insecte se fait par endocytose en présence de récepteur servi de médiateur [117]. Les *Spiroplasma*s continuent à se multiplier dans l'hémolymphe et alors envahir d'autres organes, y compris les glandes salivaires à partir desquels sont injectés dans le phloème de la plante par sécrétions salivaires pendant l'alimentation de l'insecte où sa présence se traduit par l'apparition de symptômes [110] (figure 2.10).

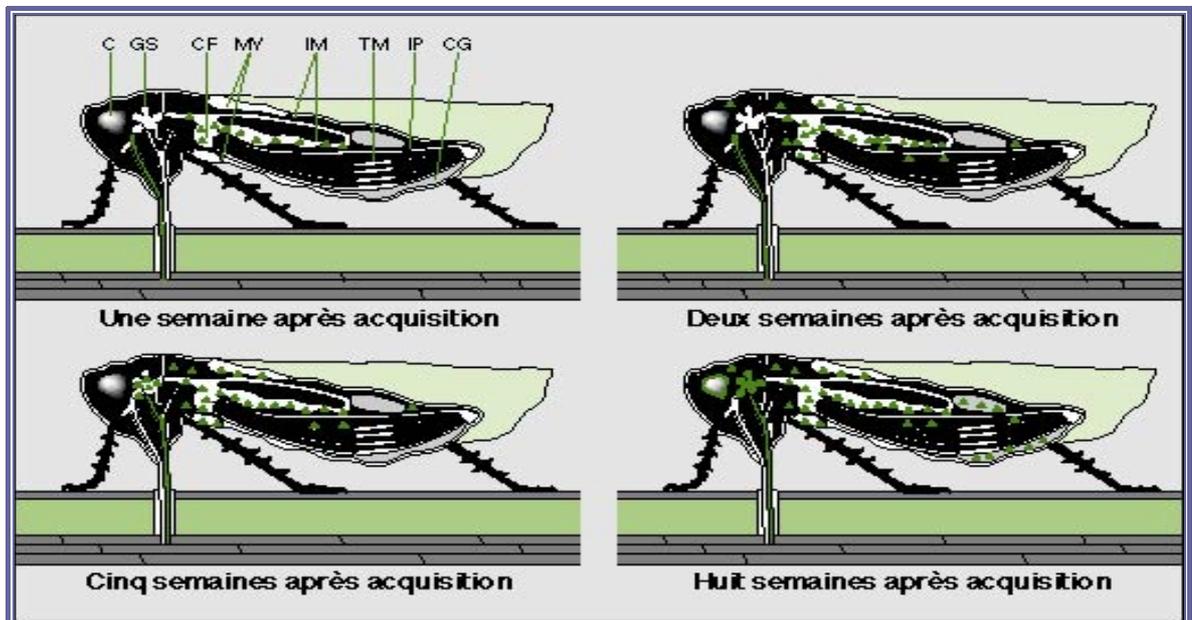


Figure 2.10: Parcours des *Spiroplasma*s à l'intérieur d'un insecte-vecteur au cours des semaines suivant le repas d'acquisition [118] [119].

Légende :

C : cerveau ; **GS** : glandes salivaires ; **CF** : chambre filtrante ; **MY** : mycétome ; **IM** : intestin moyen ; **TM** : tubes de Malpighi ; **IP** : intestin postérieur ; **CG** : corps gras. (*Spiroplasma*s figurés en vert).

Tous les types cellulaires des glandes salivaires principales aussi bien que les cellules des muscles adjacents et les cellules des glandes salivaires accessoires sont colonisées par les *Spiroplasma*s [117]. Dans plusieurs cellules des glandes salivaires, les *Spiroplasma*s ont été aussi observés à l'intérieur des poches membranaires apparemment formées par invagination du plasmalemme sous le lamina basal [117]. Dès la première

semaine, les *Spiroplasma*s aspirés au niveau du canal alimentaire atteignent la chambre filtrante et l'intestin moyen où ils se multiplient. Entre la 2^{ème} et la 5^{ème} semaine, ils pénètrent dans le mycétome, atteignent les glandes salivaires et leur canal. Enfin, lors de la 8^{ème} semaine, la multiplication s'intensifie fortement au niveau des glandes salivaires. Les *Spiroplasma*s ont colonisé d'autres organes comme les corps gras et le cerveau. Cependant, ni les organes génitaux, ni les tubes de Malpighi ne sont atteints. Il existe une spécificité au niveau des glandes salivaires dont certains contiennent des *Spiroplasma*s [43]. *S. citri* se multiplie dans ses insectes vecteurs qui deviennent infectieux après quelques jours d'acquisition par alimentation (10 à 20) jours [120]. La période de latence dans l'insecte est au moins de 2 semaines. L'insecte peut demeurer infectieux tout au long de sa vie, mais il n'y a aucune transmission ovarienne [86]. D'autres homoptères peuvent acquérir le *Spiroplasma*, mais ne le transmet pas [121,122].

2.10.10. Impact de la persistance du *Spiroplasma citri* dans la cicadelle :

Les effets cytopathologiques de l'infection par *S. citri* dans les cellules des glandes salivaires incluent la perte de la membrane et l'intégrité de la lamina basal, la présence dans quelques cellules des structures irrégulières comme les inclusions qui contiennent des matrices denses de matériel filamenteux et désorganisation apparente du réticulum endoplasmique. Comparé aux paquets des fibres serrées et alignées dans les cellules des muscles sains, les paquets dans les cellules des muscles contenant *S. citri* appaurent fragmentés et vaguement désorganisés (desserrés). De tels symptômes pourraient contribuer à la réduction de la longévité et la fécondité qui ont été démontrés au paravent pour *C. tenellus* infectée par *S. citri* [117].

2.10.11. Rôle de la morphologie hélicoïdale et la mobilité dans la phytopathogénie :

Chez les *Spiroplasma*s qui ne possèdent pas de paroi rigide, le cytosquelette contrôle à la fois la morphologie hélicoïdale et la motilité. Il est constitué de fibrilles ordonnées qui forment un ruban lié à la membrane suivant la plus courte ligne de l'hélice. Ce ruban est contractile, par changement de conformation de monomères constituant la fibrille, de circulaire à elliptique. Ceci se traduit par un allongement ou un raccourcissement de l'hélice (moteur linéaire). La protéine fibrillaire co-purifiée avec d'autres polypeptides dont la spiraline, mais aussi la protéine Scm1, et une protéine de type actine, produit de gène mreB1. L'inactivation de ces gènes a montré que le gène Scm1 était

indispensable aux mouvements de rotation du *Spiroplasma* autour de l'hélice et code pour une lipoprotéine membranaire. Quand les *Spiroplasm* mutants sont transmis à l'insecte vecteur, leur multiplication n'est pas altérée, et bien que leur transmission soit légèrement diminuée, les plantes inoculées développent des symptômes caractéristiques [116]. Selon DURET et al [123], la motilité ne semble donc pas intervenir dans la pathogénie, par contre les mutants « spiruline » ne sont pas affectés dans la motilité mais dans leur capacité à être transmis par l'insecte.

2.10.12. Rôle du métabolisme des sucres dans la phytopathogénie :

Il a été montré que l'utilisation du fructose par *S. citri* est un facteur clé de la pathogénicité de ce *Mollicute* [61] [124] [95]. Le sucre principal présent dans le phloème est le saccharose, seules des traces de fructose ou glucose y sont présents. Le chargement du saccharose dans le phloème par la cellule compagne nécessite l'utilisation de fructose et d'UDP-glucose. Il est vraisemblable que lorsque *S. citri* est présent dans les tubes criblés du phloème, il entre en compétition avec les cellules compagnes pour l'utilisation du fructose, et dès lors empêche ces dernières de réaliser le chargement du phloème au saccharose. Ceci se traduit par une accumulation du saccharose dans les organes sources (feuilles âgées), d'où le développement de jaunisses, et une carence en saccharose dans les organes puits (fruits, jeunes racines, feuilles) dont le développement est réduit [116].

2.10.13. Interaction *Spiroplasma citri* – vecteurs :

2.10.13.1. Interaction *Spiroplasma citri* – système immunitaire du vecteur :

Les protéines de surface sont sensées jouer un rôle clé dans les interactions des *Mollicutes* sans paroi cellulaire avec l'environnement et/ou les hôtes infectés. Ils ont une importance fondamentale dans l'adhésion, l'invasion, et l'interaction avec le système immunitaire de l'hôte, et elles peuvent montrer des fonctions structurales, transport ou enzymatiques [125] [126] [127] [128]. Dans la plupart des *Mollicutes* des plantes il y a une seule protéine de surface qui est immunodominante, elle forme la portion majeure des membranes cellulaires semi purifiées [129] [130] [131] [132]. Cette protéine joue un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance, d'invasion et de pathogénicité envers les cellules [43]. La présence d'épitopes à la surface des cellules de *Spiroplasm* spécifique de chaque espèce suggère que les protéines membranaires en cause jouent un rôle clé dans les interactions spécifiques du *Spiroplasma* avec son hôte. L'adhésion aux

cellules de l'hôte intervient dans le transfert à travers les barrières de l'insecte [43]. Dans la plupart des cas, les *Spiroplasma*s et leurs insectes vecteurs semblent partager une symbiose qui reflète une longue période d'évolution commune (figure 2.11) [43].

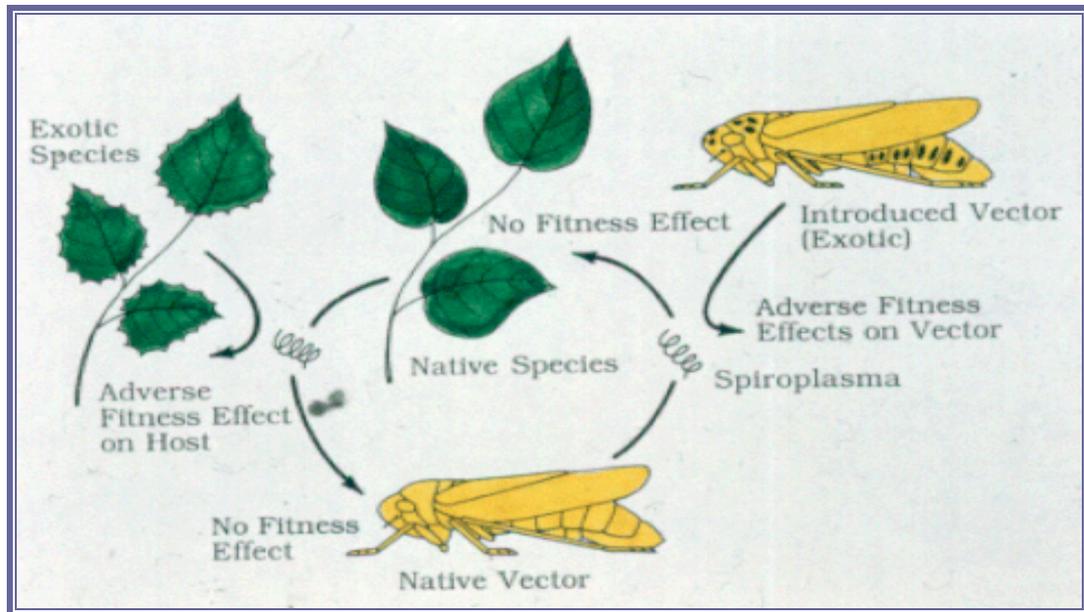


Figure 2.11: Représentation schématique de l'interaction des *Spiroplasma*s, cicadelles, et des plantes hôtes [133]

2.10.13.2. Interaction protéine spiruline- protéine des glandes salivaires :

Le gène du spiralin se trouve localisé sur la séquence nucléotidique du fragment d'ADN 6863 pb de *S. citri* [108] et il a été montré que 7 protéines dont la spiruline étaient capable d'interagir spécifiquement avec les protéines des glandes salivaires de l'insecte en permettant le passage à travers cette barrière [116].

2.10.14. Symptomatologie :

S. citri infecte les tubes criblés du phloème de leurs hôtes. Le pathogène persiste dans les arbres affectés jusqu'à leur mort, en pratique est un parasite obligatoire, en survivant dans les arbres d'agrumes ou dans les variétés d'autres plantes hôtes, sans phase saprophyte [86]. La maladie peut apparaître à n'importe quel stade de vie de l'arbre, et la sévérité des symptômes varie d'année en année [31].

Les différents types de symptômes induits par le stubborn sur les différents organes d'agrumes sont résumés comme suit :

•Feuilles :

* Raccourcissement des entre-nœuds, partie distale courbé a l'intérieur et de couleur vert jaunâtre, déformation des feuilles [116] [134] [135] [136] [137].

* Marbrures [8] [138].

* Chloroses marginales [31] [86] [138] [134] [135] [136] [137] (figure 2.12 ; 2.13 ; 2.14 ; 2.15).



Figure 2.12 : Taches chlorotiques sur feuilles d'oranger doux [21]

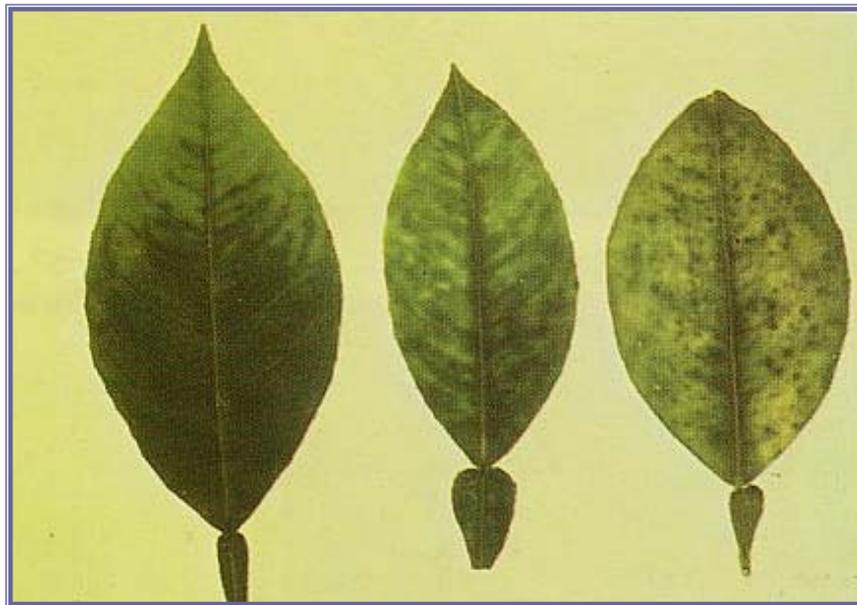


Figure 2.13 : Feuilles d'oranger doux infectées par le stubborn présentent diverses chloroses [139]



Figure 2.14 : A droite : Feuilles pointues avec des taches chlorotiques translucides sur jeunes feuilles de *Madam vinous*.

A gauche : Feuille non infectée [21]



Figure 2.15 : Chloroses marginales des jeunes pousses et feuilles pointues sur oranger doux *Madam vinous* [21]

* Feuilles en cuillères [11] et en forme de cœur [86] [134] [135] [136] [137] (figure 2.16)



Figure 2.16 : Feuilles de *Valencia late* d'oranger doux montrant à droite : la forme en cœur, à gauche : feuille à forme en cuillères et dissymétrie de la nervure principale avec la couleur de gris pale à jaune (Californie) [21]

* Jaunisse plus ou moins sévère [116] [110] [31] (figure 2.17)



Figure 2.17: Feuilles d'arbres de *Valencia late* d'oranger doux greffé sur *Poncirus trifoliata* infectées par stubborn montrant des jaunissements marginales [8]

* Symptômes ressemblant à une carence en Zinc ou Manganèse [8] [31] (figure 2.18)

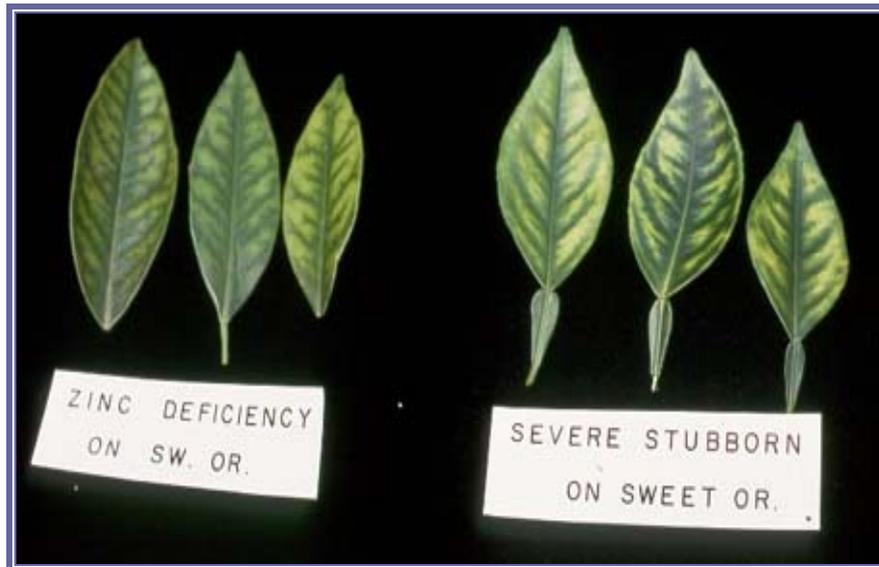


Figure 2.18 : Feuille d'oranger présentant la différence entre le symptôme de carence en Zinc et celui du stubborn [8]

- * Feuilles petites, rigides et pointues [31] [140] [8] [138] [134] [135] [136] [137]
- * Feuilles larges [86]
- * Défoliation prématurée [138]
- * Balai de sorcière (prolifération des bourgeons axillaires) [31] [86] [138] [141] [8] [134] [135] [136] [137] (figure 2.19)



Figure 2.19 : Prolifération anormale des bourgeons axillaires en forme de balai de sorcière (Californie) [21]

- **Fleurs :**

- * Floraison contre saison [140]

- * virescence et/ou phyllodies sur fleurs qui souvent sont stériles [116]

- * Echelonnement de la floraison [8] [140] [31]

- **Fruits :**

- * Fruit petit et/ou asymétrique (courbure de la columelle) (figure 2.20)

- [142,8,100,143,31,138,35,134,135,136,137]

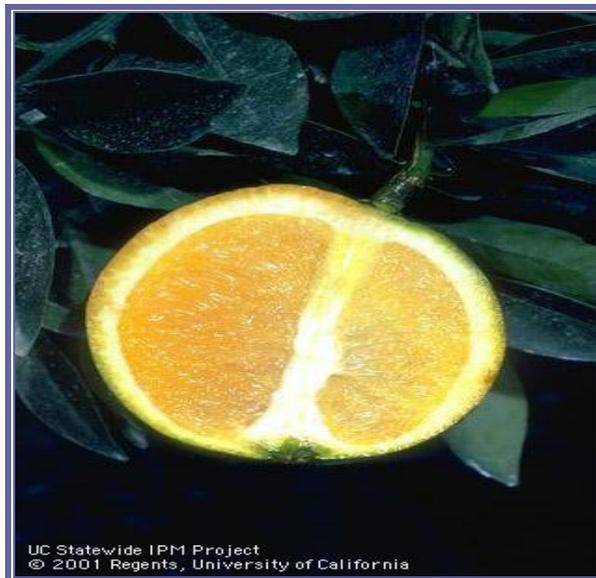


Figure 2.20 : Fruit produit par des arbres infectées de stubborn devient petit et lopsidé avec columelle courbée [142]

- * Inversion de la couleur (terminaison pédonculaire devient colorées alors que la terminaison styloïde reste [8] [134] [135] [136] [137] (figure 2.21)

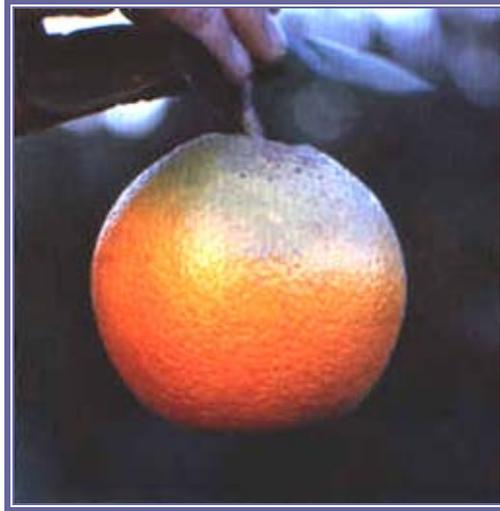


Figure 2.21: Inversion de la coloration ; couleur orangée à l'extrémité pédonculaire et verte à la partie styloïde (Algérie) [8]

- * Grains avortés [100] [143] [141] [138] [134] [135] [136] [137]
- * Fruit en gland [8] [31] [141] [134] [135] [136] [137]
- * Albedo épais et flavedo grossier à la terminaison pédonculaire alors que à la partie styloïde sont respectivement (albedo et flavedo) minces et lisses (figure 2.22) [8] [31].

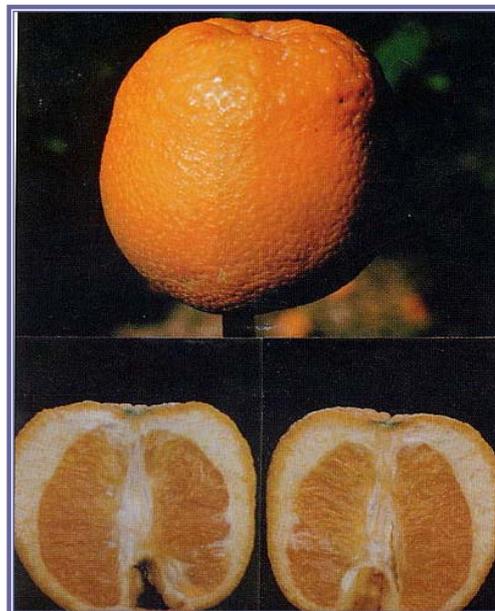


Figure 2.22: Epaissement de la partie pédonculaire et amincissement de la partie styloïde (Clifornie) [8]

* Réseau vasculaire dans l'albedo est quelques fois proéminent et les paquets vasculaires sont rouge- brunâtre ; quelques fois l'albedo bleue est observé [116] (figure 2.23)



Figure 2.23: Fruit lopsidé, l'albedo est bleu avec columelle courbée sur Grappe fruit [8]

* Fruits petits qui ont une saveur insipides ou amère [140] [134] [135] [136] [137].

* Fruit tend a être supprimé ou inexistant sur les arbres affectés [100] [143] [134] [135] [136] [137]

* Chute prématurée du fruit [141].

• **Tronc :**

* Criblage (Pinholing) sur le coté cambial de l'écorce en dessous de la ligne de point de greffage [8].

• **Racines :**

* Mauvais développement des racines, jaunissement des jeunes racines [116]

• **Aspect général des arbres :**

* Rabougrissement léger ou sévère [8] [86] [141] (figure 2.24)



Figure 2.24: A droite : Arbre rabougris, à gauche: Arbre sain (Californie) [21]

* Déformation de l'arbre [31] et production faible [140] (figure 2.25)

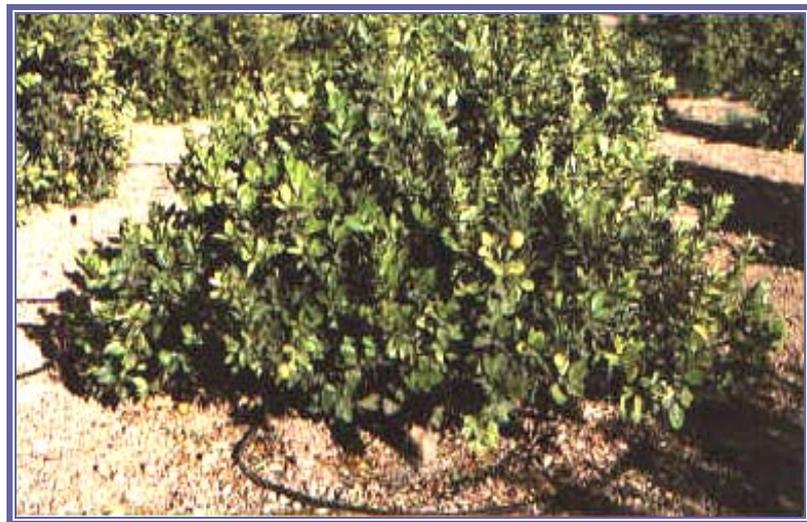


Figure 2.25: Arbre d'oranger doux âgé de 6 ans greffé sur la lime acide montrant des symptômes sévères du stubborn : nanisme avec un aspect arrondi, absence de jeune rameaux, feuillage dense, rameaux avec entre-nœuds courts, feuilles petits en cuillères, marbrures foliaires, et réduction de la production (Iran) [8]

* Aspect broussailleux de l'arbre et présence anormale de bois mort [11]

* Manque de vigueur des pousses [11]

* Souvent une seule partie de l'arbre présente des symptômes et que l'apparition de fruit

en gland peut ne pas se produire tous les ans sur un même arbre sur certains autres ils sont incomplets [8] [140] [31] [11]

* Croissance de type buissonnant vertical [141]

• *Catharanthus roseus* :

* Jaunissement des feuilles [8] (figure 2.26; 2.27)

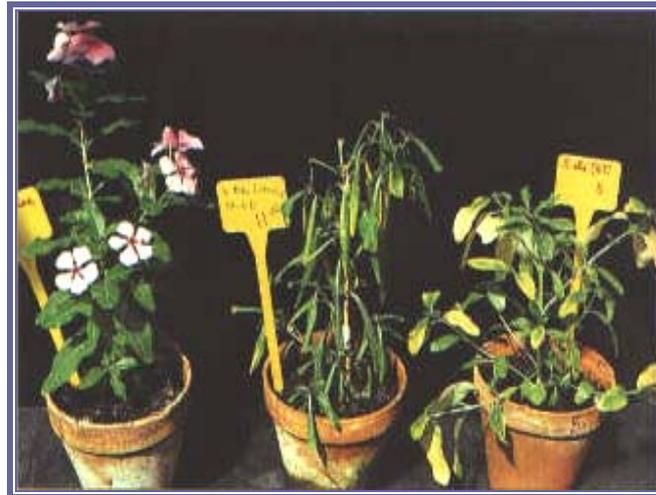


Figure 2.26 : A droite plants de *Catharanthus roseus* infectés par *Spiroplasma Citri*
A gauche plant sain (INRA Bordeaux) [8]



Figure 2.27 : *Catharanthus roseus* naturellement infectée par
Spiroplasma Citri, le plant a donné un résultat positif par le test ELISA [8]

* Fanage [8] (Fig. 2.28 ; 2.26)



Figure 2.28: À droite: Plante de *Catharanthus roseus* infectée avec des feuilles enroulés et flétris, à gauche: Plante non infectée avec des fleurs (INRA Bordeaux) [21]

* Rabougrissement [110] (figure 2.29)



Figure 2.29: À droite: Plante de la pervenche non infecté
A gauche: Plante infectée et rabougris [21]

2.10.15. Plantes hôtes des cicadelles vecteurs *Circulifer tenellus* et *Neolaliturus haematoceps* :

Comme beaucoup d'autres cicadelles, les vecteurs méditerranéens de la maladie de stubborn s'alimente sur une large gamme d'hôtes (cultures au champ, arbres fruitiers, plantes ornementales, et mauvaises herbes) [86]. *C. tenellus* atterrit particulièrement sur la betterave (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) en Amérique du Nord parce qu'il agit comme vecteur du virus de l'enroulement apical de la betterave [*Beet curly top hybrigimivirus* (BCTV)] [86]. Cette espèce transmet aussi le *Phytoplasme* de virescence de la pervenche et la virescence de la betterave. Les adultes peuvent atterrit et s'alimenter sur plusieurs plantes différentes, mais généralement préfère pondre les oeufs sur les betteraves, les tomates et mauvaises herbes. *N. haematoceps* a été trouvés particulièrement sur la plante ornementale *Malthiola incana* [144]. En Syrie, cette espèce a été rencontrée sur les plantes ornementales réservoirs *Malthiola sinuata* R. et les plantes sauvages de *Salsola kali* (*S. kali*) (un Chenopodie sauvage des régions semi-arides de la région côtière) (figure 2.30) [144]. *Salsola kali* est la plante hôte principale préférée de cette espèce [8] [41] [145]. Elle est largement distribuée à travers la méditerranée et le Proche Orient. Sa présence proche ou dans les pépinières ou jeunes vergers peut fournir le centre d'épidémies de la maladie du stubborn [8]. *N. haematoceps* a été confirmée pour être le vecteur potentiel de *S. citri* [144] ce qui confirment les observations faites par FOS et al [144], en Syrie. De plus les chercheurs en Turquie ont montré que *Sesamum indicum* est non seulement un bon hôte pour *N. haematoceps* mais aussi pour *S. citri*. Elle joue un rôle épidémiologique très important dans cette région [8]. Selon SMITH et al [86], *C. roseus* et *S. kali*, sont des plantes réservoirs de *S. citri*.



Figure 2.30: *Salsola kali*, principale plante hôte des cicadelles vecteurs de *Spiroplasma citri* (Syrie) [8]

2.10.16. Distribution géographique de deux principaux vecteurs de *Spiroplasma citri*:

La large distribution de *S. kali*, de l'Atlantique au Himalaya favorise la présence de *N. tenellus* et *N. haematoceps*, vecteurs de *S. citri* dans les zones arides et semi-arides [26]. Ces deux cicadelles sont présentes au Maroc, Iran, Iraq, Arabie saoudite, Afghanistan, Turquie, Egypte, Corse, par contre en Syrie, France et en Chypre seule *N. haematoceps* a été identifiée [8]. Cette espèce est considérée comme un vecteur principal dans la région méditerranéenne [144] [8] [146]. En Californie le vecteur principal de *S. citri* est *N. tenellus*, *S. acutus* (Delongi) et *S. nitridus* (Delongi) [147] [148] [149]. Par contre en Amérique du Nord *N. tenellus* est le vecteur principal de *S. citri* [8]. En Iran bien que moins abondante que *N. haematoceps*, il pourrait jouer un rôle dans la transmission de *S. citri* [26] (figure 2.31; 2.32).

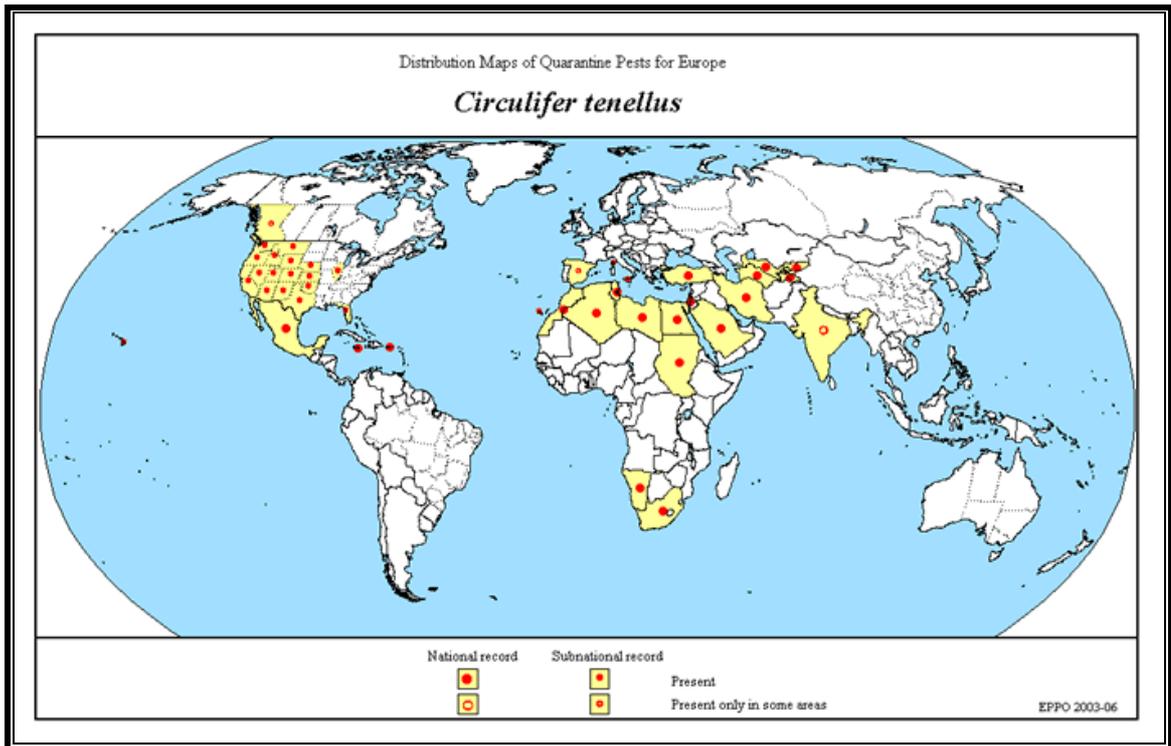


Figure 2.31: Répartition géographique de *Circulifer tenellus* [150]

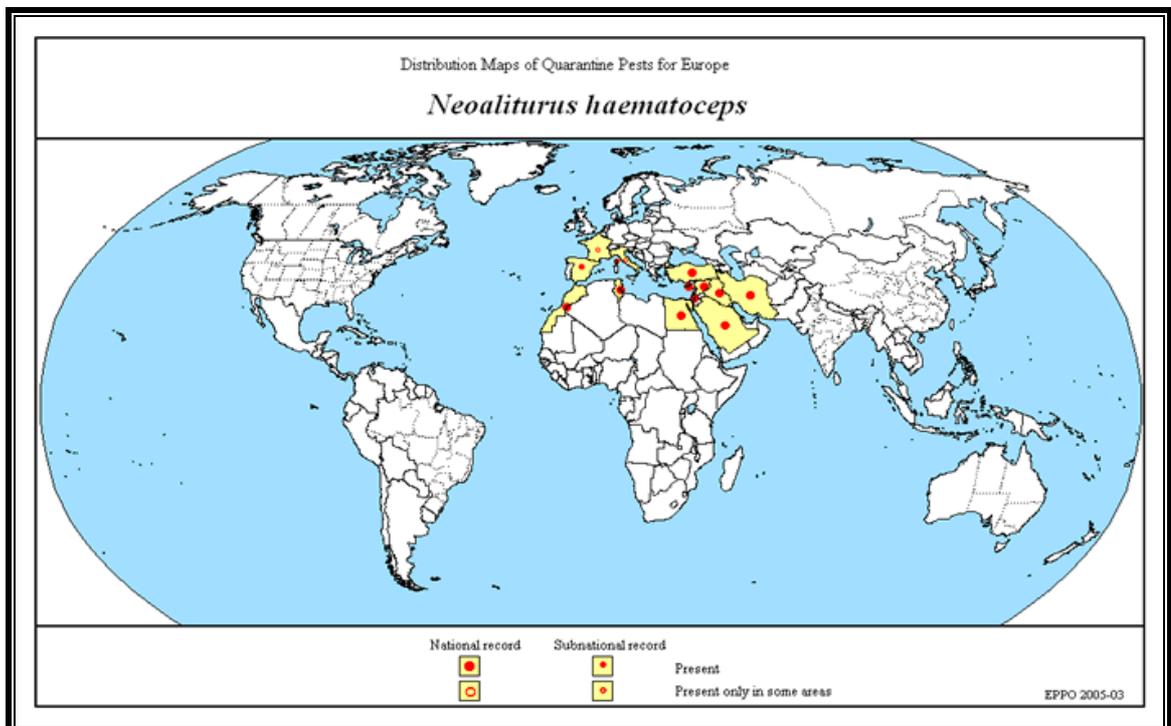


Figure 2.32: Répartition géographique de *Neoliturus haematoceps* [150]

2.10.17. Caractéristiques morphologiques des deux espèces de cicadelles vectrices:

Les espèces dans le genre *Neoliturus* peuvent être caractérisé comme des petites cicadelles, les mâles sont de 2,5 à 3,6mm et les femelles de 2,7 à 3,8 mm. La tête est légèrement plus large que le pronotum avec la marge antérieure arrondie. La couleur totale est brune avec des marquages ou taches variables plus sombre [86]. La différence entre *N. Haematoceps* et *N. tenellus* se trouve principalement dans les plaques subgénitales du mâle. Dans *N. haematoceps* les plaques subgénitales sont pointées dans l'ordre apical, alors que dans *N. tenellus* sont tronquées. Les adultes de *C. tenellus* se déplacent aux champs au début du printemps et les oeufs sont pondus sur les hôtes adaptés. Ces derniers éclosent et les nymphes se développent en adultes en 2 à 3 mois. Ils peuvent avoir de multiples générations [150].

2.10.18. Plantes hôtes de *Spiroplasma citri*:

Les principales plantes hôtes économiquement sensibles de *S. citri* sont *Citrus spp* y compris les espèces commerciales majeures dans la région méditerranéenne sont: Grappe fruits (*Citrus paradisi*), limons (*Citrus limon*), le clémentinier (*Citrus clementina*) mandarins (*Citrus reticulata*), l'oranger doux (*Citrus sinensis*), d'autres *Citrus* hôtes sont: le pamplemoussier (*Citrus grandis*), le limettier (*Citrus limettoides*), *Citrus limonia*, *Citrus madurensis*, rough lemons (*Citrus jambhiri*), satsumas (*Citrus unshiu*), et tangelos (*Citrus paradisi x.Citrus reticulata*) [138,21]. D'autres hôtes *rutaceae* incluent les kumquats (*Fortunella spp*) et les porte-greffes hybrides interspécifiques comme les citranges (*Citrus sinensis x Poncirus trifoliata*) [151]. L'oranger trifolié et les hybrides de cette espèce, les lemons, la lime et le citronnier, semblent être des plantes très tolérantes [21,6]. D'autres plantes cultivées ou plantes sauvages en particulier: *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Brassicaceae*, et *Plantaginaceae*, ont été trouvés naturellement infectés dans le sud-ouest des Etats-Unis d'Amérique. *S. citri* cause une maladie spécifique des racines fragiles (Brittle root) de Raifort (horse radish) (*Armoracia rusticana*) dans l'est des Etats-Unis d'Amérique [86]. Il infecte d'autres espèces de plantes autres que les agrumes y compris *C. roseus* présente dans de nombreux pays méditerranéens et est considérée comme plante piège (Fig. 2.33; 2.34; 2.35) sur la qu'elle induit le rabougrissement, jaunissement des feuilles et le fanage (Fig. 2.29; 2.27; 2.28) [110]. Dans la région Est de la méditerranée, deux crucifères sont particulièrement infectées, *Hirschfeldia incana* L et *Sisymbrium irio* L [152]. D'autres espèces ont été expérimentalement infectées par *S. citri* en Turquie,

Digitaria Sanguinalis L Scop., et *Sorghum helepense* L. Pres. 2 espèces *Xanthium sp* et *Zea mays* L ont montrés des réactions non spécifiques [153]. Egalement 3 nouvelles plantes hôtes de *S. citri* ont été détectés dans la Cukurova (Turquie): *Crepis echiodes* L. ALL., *Echium sp* et *Sesamum indicum* (*S. indicum*) L [32]. Le Sésame joue un rôle significatif, étant donné qu'il s'agit d'une culture importante dans la région. Le seul vecteur connu pour la méditerranée orientale, *Circulifer opacipennis* (Lithierry) (*Homoptera: Cicadellidae*) était le plus fréquent des cicadelles sur le sésame, qui dans la plupart des cas était infecté par *S. citri*. Les auteurs supposent que *S. indicum* avec sa population de *Circulifer opacipennis* joue un rôle épidémiologique important de la maladie du stubborn des agrumes [153]. En Arizona, des plantes autres que les agrumes ont été trouvés naturellement infectés par *S. citri* incluant : Navet sauvage (Wild zurnip) (*Brassica sp*), London rocket (*Sisymbrium irio*), *Zinnia sp*, Marigold (*Tagetes spp*), *Viola sp*, *C. roseus*, Oignon (*Allium cepa*), pastèque (*Cucurbita pepo*) et *Malva sp* [31].

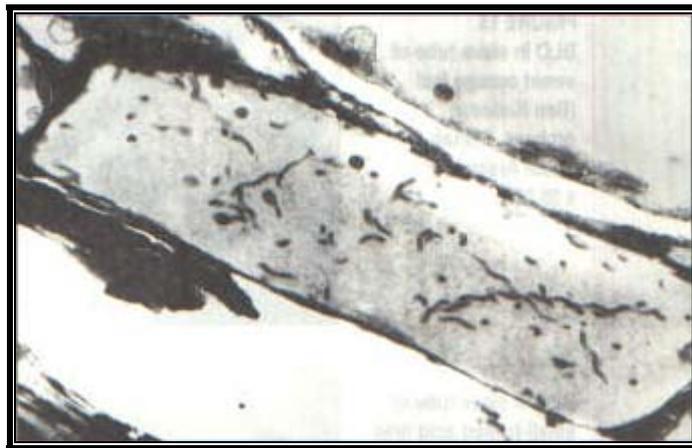


Figure 2.33: *Spiroplasma citri* dans la sève des tubes criblés des plants de la pervenche inoculées par greffage (*Catharanthus roseus*) (INRA, Bordeaux) (x 8000) [8]

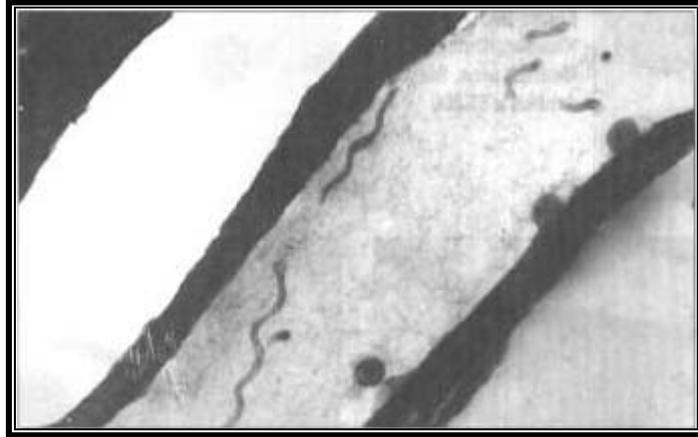


Figure 2.34: *Spiroplasma citri* dans le phloème de *Catharanthus roseus* naturellement infectée (Maroc) (x 16 000) [8]



Figure 2.35: *Spiroplasma citri* dans le phloème de *Catharanthus roseus* naturellement infectée (Syrie) (x 24000) [8]

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

3.1. Stations prospectées :

Les prospections sur terrain ont été effectuées sur différentes variétés d'agrumes durant les campagnes 2003-2004 et 2004-2005 où plusieurs prélèvements furent réalisés. Pendant la période 2003-2004, les prospections ont été réalisées seulement sur 2 stations : Parc à bois de l'ITAFV de Boufarik et la station expérimentale de département d'agronomie de Blida. Par contre durant la période 2004-2005, les stations prospectées étaient des parcelles d'agrumes dont 3 appartenant à des privés (pépinière privée de Guerrouaou, verger privé de Benkhellil, et station de Chebli) ; station expérimentale de département d'agronomie de Blida, Parc à bois de l'ITAFV de Boufarik et l'EURL de Hadjout. Le nombre total de parcelles prospectées étaient de 6.

3.1.1. Station expérimentale de département d'agronomie de Blida :

Le verger d'agrumes de notre département est d'une superficie de 0.25 ha avec une diversité variétale: *Citronnier*, *Thomson*, et *Washington navel*. Les variétés ont été plantées alternativement selon des lignes dont l'écart était de 5x5 avec un nombre total de 208 plants. L'irrigation était basée uniquement sur les pluies (apports naturels).

3.1.2. Verger privé de Benkhellil :

Cette parcelle est située à Boufarik et est constituée de 2 vergers dont 1 âgé et 1 jeune. Le verger âgé était constitué de la variété *Thomson* avec une superficie de 3 ha et un

nombre de 972 arbres, se sont des vieux arbres greffés sur bigaradier et plantés en 1924, et le jeune verger présenté aussi par la variétés *Thomson*, d'une superficie de 2 ha avec un nombre de 512 arbres plantés en 2001 intercalé par pommier.

3.1.3. Parc à bois de l'institut technique d'arboriculture fruitières et de la vigne (ITAFV) de Boufarik :

C'est un parc à bois avec une grande diversité variétale d'agrumes qui sont en nombre de 9, avec une superficie de 1,64 ha, plantés en 1999, (*Clémentine 63*, *Avana apirino*, *Ortanique*, *Carvalhal*, *Double fine* améliorée, *Valencia Late 248*, *Thomson navel 215*, *Washington navel 251*, et le *Citronnier Eureka*).

3.1.4. Parcelles d'agrumes de l'entreprise unité à responsabilité limité (EURL) de Hadjout:

C'est un verger constitué de différentes variétés d'agrumes, plantées en 2001 avec une superficie de 21,58 ha divisée comme suit: *Clémentine* (5,40 ha, 1500 plants), *Citronnier* (5,40 ha, 1500 plants), *Double fine* (1,50 ha, 416 plants), *Valencia Late* (7 ha, 213 plants), *Washington navel* (2,28 ha, 634 plants). Les traitements phytosanitaires étaient effectués selon un calendrier de l'agriculture. L'irrigation était apportée par le système goutte à goutte.

3.1.5. Parcelle de Chebli :

Le site est nommé groupe Hadji qui présente la variété *Thomson* avec une superficie de 75 are, planté en 1999. Les traitements phytosanitaires étaient effectués selon un calendrier de l'agriculture. L'irrigation était apportée par le système goutte à goutte.

3.1.6. Pépinière privée de Guerrouaou :

Situé à Boufarik, constitué de 0,20 ha de *Washington navel* et 0,20 ha de marcottière (*Bigaradier*), plantés en 2001. L'irrigation était apportée par le système de rigoles.

3.2. Méthodes d'échantillonnage :

Les prospections réalisées sur les différents vergers des différentes stations étaient

basées sur l'observation visuelle des symptômes. Il s'agit de repérer les plants présentant des symptômes décelables à l'œil nu suspectés d'être induits par *S. citri* par comparaison à des photos bibliographiques. La partie de l'arbre concernée par les prélèvements était des feuilles avec des chloroses, formes en cuillère, jaunissements des jeunes pousses et la présence du balai de sorcière. Chaque prélèvement correspond à un seul plant et un échantillon représente un certain nombre de feuilles de 5 à 20. Le nombre total d'échantillons prélevés durant la campagne 2003-2004 était de 426 englobant des échantillons de *Citronnier* en nombre de 72, *Carvalhal* (69), *Double fine* (45), *Washington navel* (64), *Valencia late* (33), *Thomson navel* (50), *Ortanique* (50) et la *Clémentine* (43). Par contre le nombre total d'échantillons prélevés durant la période 2004-2005 était de (522) englobant des échantillons de *Clémentine* en nombre de 26, *Washington navel* 251 (118), *Valencia Late* (40), *Citronnier* (38), *Double fine* (60), *Thomson* (202), *Carvalhal* (24), *Bigaradier* (10) et *Ortanique* (4).

3.3. Conservation de la source d'inoculum :

Les feuilles prélevées sur terrain étaient placées dans des sachets en plastiques, sur lesquels a été noté la variété, et la région correspondante et sont par la suite conservés à une température de 4°C afin d'éviter toute altération et /ou dessèchement. Par contre les feuilles et les boutures destinées pour le test d'indexage (inoculation mécanique) étaient conservées dans du papier humecté à 4°C pour uniquement 1 ou 2 jours afin d'éviter leurs dessèchement.

3.4. Sérodétection de *Spiroplasma citri* :

Depuis des années, le test ELISA était la méthode couramment utilisée pour le diagnostic des maladies à virus des plantes. C'est un essai sur phase solide où chaque réactif (anticorps spécifique) agit en succession. D'abord il piège et ensuite il révèle l'antigène cible (particule virale) [154]. C'est une technique à la fois simple, rapide et fiable. Il convient parfaitement pour le diagnostic d'un nombre important d'échantillons [155]. Actuellement elle combine facilité d'emploi et bonne sensibilité, puisqu'il permet de détecter une concentration de 1 à 10 ng de virus par millilitre [156]. Le principe du test est la reconnaissance hautement spécifique entre « Antigène -Anticorps » et fait intervenir le couplage des anticorps avec une enzyme [157]. Ce marquage permet la visualisation du complexe antigène-anticorps grâce à une réaction enzymatique destinée à faire apparaître

une réaction colorimétrique [158] [159] [157]. Selon SAILLARD *et al* [160], cette technique a été utilisée non seulement dans la détection de *S. citri* dans la plante hôte mais également dans l'insecte vecteur. Il existe 2 variantes de la méthode ELISA. DAS-ELISA et TAS-ELISA.

3.4.1. DAS-ELISA :

L'agent pathogène présents dans l'extrait de la plante à tester réagit avec les anticorps polyclonaux fixés sur la plaque de microtitration. Il est ensuite mis en contact avec une préparation d'anticorps polyclonaux spécifique couplée à l'enzyme phosphate alcaline [161]. La double réaction sérologique est mise en évidence par la réaction du substrat de l'enzyme; le paranitrophényl phosphate, ce qui conduit à une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'antigène fixée. La lecture des densités optiques s'effectue à une longueur d'onde de 405nm à l'aide d'un spectrophotomètre [161].

3.4.2. TAS-ELISA :

L'agent pathogène est capté par les anticorps polyclonaux ayant d'être reconnu par les anticorps monoclonaux spécifiques. Ces derniers sont ensuite mis en évidence par un conjugué anticorps de souris ou de rat [162].

Dans le contexte de notre expérimentation nous avons retenu la variante DAS-ELISA « en double antibody » où seuls les anticorps polyclonaux sont utilisés, le *Spiroplasma* est donc littéralement pris en sandwich entre deux couches d'anticorps. Le sérum utilisé a été fourni par le laboratoire Bio-Rad (France) (figure 3.1).

3.4.3. Extraction du *Spiroplasma citri* :

Les échantillons frais de feuilles prélevés sur terrain étaient broyés séparément à froid à l'aide d'un mortier et dilués au 1/100^{ème} de solution tampon phosphate (PBS-PVP-T) pH=7,4 (Appendice B). Les broyats étaient ensuite filtrés. Les échantillons testés proviennent des prospections effectuées sur différentes régions de la Mitidja. Le nombre total était de 456 échantillons: 168 échantillons du *Thomson*, 108 *Washington navel*, 40 *Citronnier*, 26 *Clémentine*, 50 de *Double fine*, 36 de *Valencia late*, 12 de *Bigaradier*, 14 de *Carvalho* et 2 échantillon de l'*Ortanique*.

Concernant les témoins contrôles positifs et négatifs, nous avons utilisés des échantillons frais sains du *Thomson* provient d'une collection de laboratoire de virologie, également les témoins contrôles positifs et négatifs proviennent du laboratoire Bio-Rad, France.

Figure 3.1: Réalisation du test DAS -ELISA selon Clark et Adams [161]



Figure 3.2: Dépôt des anticorps dans les puits des plaques ELISA

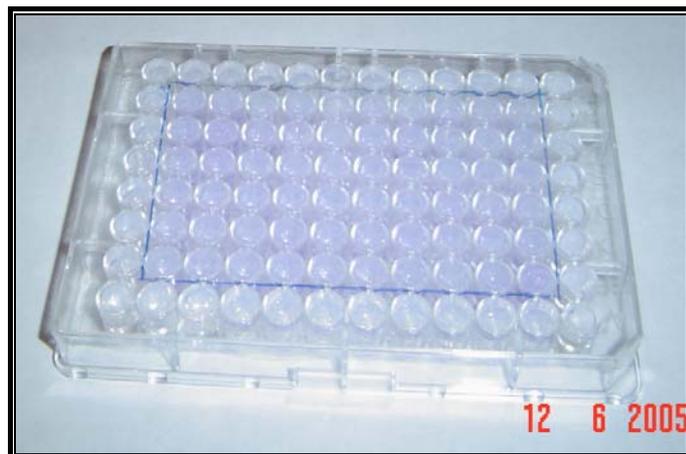


Figure 3.3: La plaque ELISA après dépôt



Figure 3.4: La plaque mise à incubation à 37°C



Figure 3.5: Lavage avec PBS-T



Figure 3.6: La plaque ELISA après dépôt des échantillons

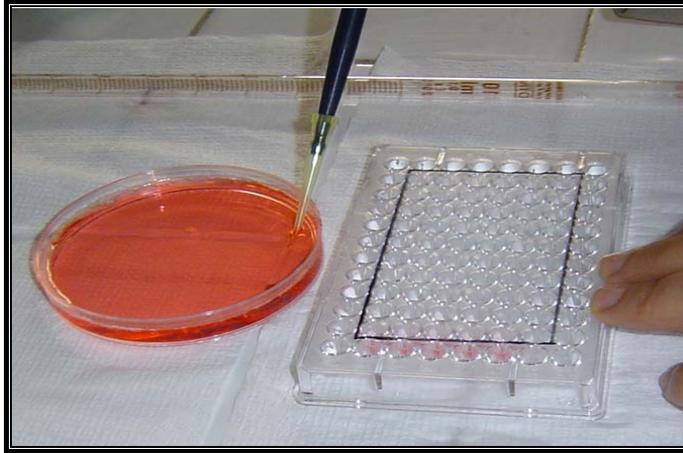


Figure 3.7: Dépôt des anticorps conjugués

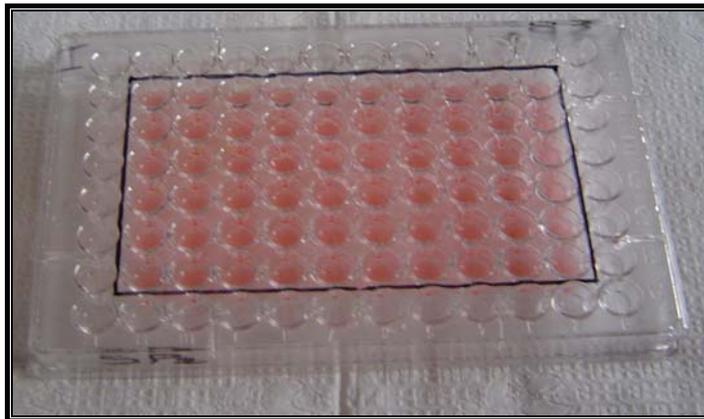


Figure 3.8: La plaque ELISA après dépôt des anticorps conjugués

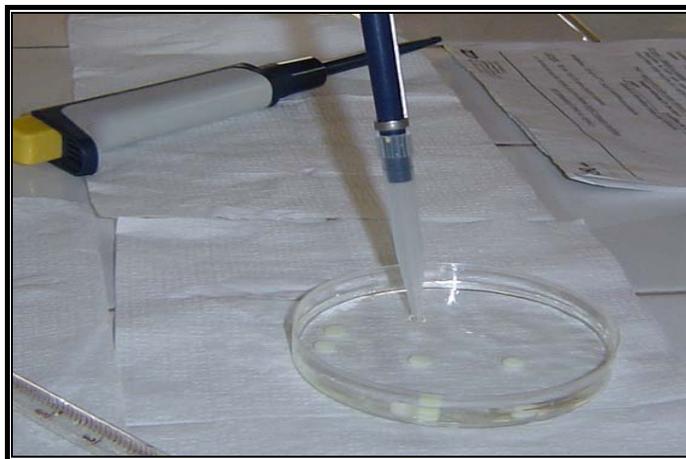


Figure 3.9: Préparation du substrat



Figure 3.10: Dépôt du substrat de l'enzyme

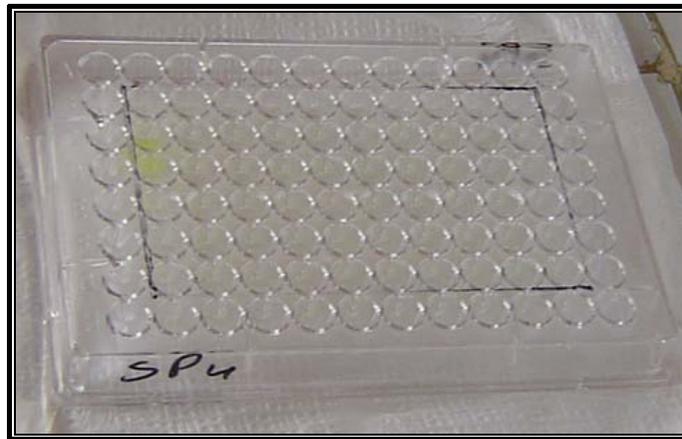


Figure 3.11: Début de la réaction sérologique

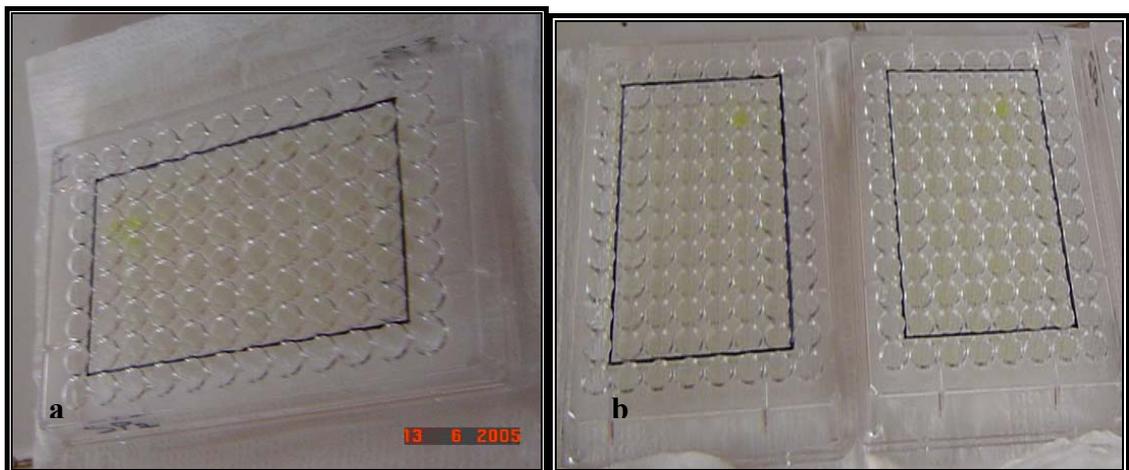


Figure 3.12 (a,b) : Evolution de la réaction sérologique

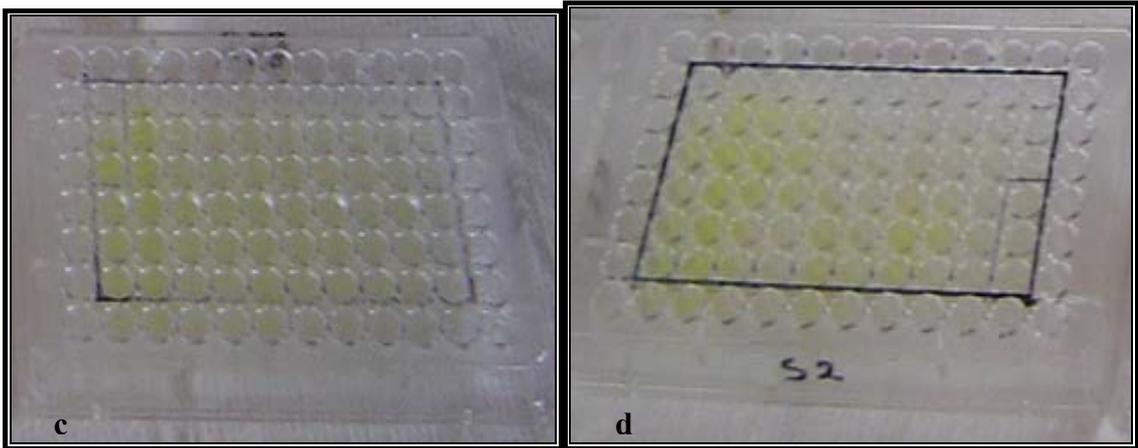


Figure 3.13 (c,d) : Fin de la réaction sérologique

3.5. Transmission mécanique :

De part leurs performances dans la détection des infections dues aux *Spiroplasma*s, certaines techniques biologiques sont couramment utilisées. Elle consistent à transmettre l'agent pathogène à une plante herbacée (par inoculation), ou ligneuse (par greffage) dite indicatrice, et ce par la voie mécanique [21] [8] [110].

3.5.1. Transmission par greffage :

Les techniques d'indexation des agrumes ont considérablement évolués ces dernières années permettant maintenant de détecter tous les agents infectieux qui les affectent en 12 à 18 mois [163]. Ce test est réalisé en pépinière ou en serre [45]. Les inoculum sont constitués de tissus végétaux, des yeux, des morceaux d'écorce et des greffons ou également des feuilles très jeunes prélevées sur l'arbre à tester et sont greffées sur plantes indicatrices. Celles-ci sont mises sous serre à l'abri de toute contamination extérieure [164]. Cette technique, la plus ancienne, est la plus fiable, mais à une durée de réponse assez longue [45].

3.5.1.1. Plantes indicatrices :

Plusieurs plantes-tests peuvent servir comme plantes indicatrices du stubborn : *Parson spécial* (mandarinier), *Madam vinous*, pomelos, certains tangelos cv *Sexton*, la lime, et grappe fruit cv *Marsh* [21] [11], mais les jeunes plantes *Madam vinous* d'oranger doux d'un mètre de longueur et 5 à 7 mm d'épaisseur sont les plus recommandées comme indicateurs principales de cette maladie. Un minimum de 5 plantes devrait être inoculés. Chaque plante peut être inoculée avec 2 greffes latérales, 2 à 3 morceaux de greffes de la

feuille ou 1 greffe latérale et 2 greffes de pièces de feuilles [21].

Dans notre cas, vu l'absence d'indicateur (*Madam vinous*), nous avons procédé au greffage des yeux de cet indicateur sur des portes greffes d'agrumes de semis qui sont : *Bigaradier* dont le nombre était de 29 plants, 4 *Washington navel*, 5 *Clémentine*, 5 *Mandarine*, et 12 *Tangelos*. Ces porte-greffes proviennent d'une pépinière privée à Boufarik. Les prélèvements avaient eu lieu le 19.04.2005 et la transplantation dans des pots avait été effectuée le 23.04.2005. Ces plants ont été soigneusement contrôlés des attaques parasitaires et de maladies. Le nombre total des plants était de 55. Les greffons de *Madam vinous* utilisés dans notre essai provenant de l'ITAFV-Boufarik (figure 3.14).



Figure 3.14: Plants d'agrumes destinées à l'inoculation par indexage

3.5.1.2. Greffage d'inoculum :

Les meilleurs tissus pour transmettre le *S. citri* aux agrumes sont des morceaux de tige d'un diamètre de 5 à 7 mm obtenus à partir des branches nains, ou des feuilles très jeunes [165]. Selon CALAVAN et al [166] et CALAVAN et al [165], la pièce de la feuille et de la tige sont de très bon inoculum durant les saisons chaudes. Dans notre essai d'indexage nous avons utilisé la greffe de la feuille.

3.5.1.3. Méthode du test d'indexage : (figure 3.15)

Selon BERTAUDEAU [167], les étapes du test d'indexage sont résumées comme suit :

Etape 1: Greffage de l'œil de l'indicateur (*Madam vinous*) en écusson sur les porte-greffes:

- Enlèvement de l'écusson d'un rameau greffon (*Madam vinous*) à l'aide d'un greffoir.
- Incision en « T » et soulèvement de l'écorce du porte-greffe.
- Introduction de l'écusson dans le porte-greffe.
- Ligature bien serré du greffon sur les porte-greffes à l'aide du parafilm ou du film plastique (figure 3.16; 3.17).

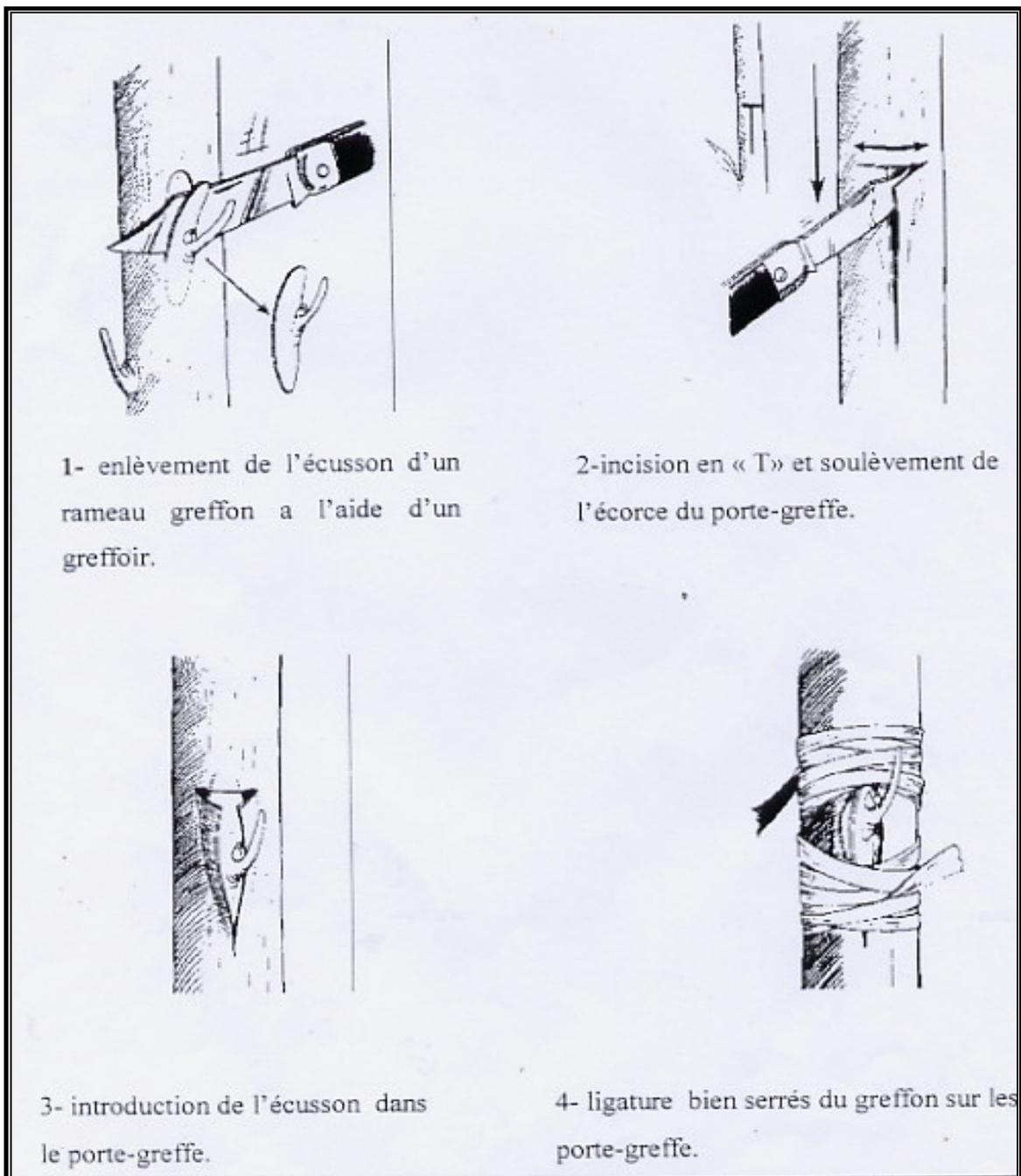


Figure 3.16: Schéma montrant la réalisation de la greffe en écusson
(Selon BERTAUEAU [167])



Figure 3.17: Greffage en écusson des yeux de *Madam vinous*

Etape 2: La greffe de la feuille :

Selon ROISTACHER [167], et BOVE [8], l'inoculation habituellement consiste en une petite section rectangulaire de jeune feuilles (candidats) ; approximativement de 3x12 mm coupée de la région de la nervure principale (figure 3.18) et placé dans une coupe sous forme de languette ou en « T » de l'écorce des porte-greffes à 5 cm de part et d'autre de l'œil de *Madam vinous* (figure 3.19). La ligature est effectuée à l'aide du parafilm. Les feuilles en dessous et en dessus de l'œil de l'indicateur sont éliminés, et en laisse se développer qu'une seule branche principale pour favoriser la montée de sève et la nutrition à l'œil greffé. Les plants ne doivent être arrosés qu'après une période de 10 jours, afin d'éviter la rupture de la soudure des yeux avec le porte-greffe par le flux de sève. L'arrosage peut se faire 5 à 6 jours dans quelques cas extrême du manque d'eau pour éviter

la mort du plant. Après 3 semaines du greffage, les plants étaient rabattus sévèrement au dessus de l'œil pour favoriser son développement.



Figure 3.18: Section rectangulaire de jeune feuilles (candidats) coupée de la région de la nervure principale



Figure 3.19: Greffage en écusson des candidats de part et d'autre de l'œil de *Madam vinous*

Dans ce test nous avons testé 7 variété d'agrumes considérées comme candidats (inoculum) provenant des différents stations visitées : variété *Thomson* (provient de la station de Chebli), *Washington navel* de la pépinière privée de Guerrouaou, *Clémentine*, *Double fine* améliorée et *Valencia late* de l'EURL de Hadjout, *Citronnier* de la station expérimentale de Blida et *Carvalhal* de l'ITAFV-Boufarik. Pour chaque variété nous avons inoculé 7 plants plus 2 témoins négatifs et 4 plants ont été inoculés par un témoin positif de *Madam vinous* qui provient d'une collection de laboratoire de virologie. Les plants sont maintenus sous serre à une température comprise entre 30 à 39°C pendant 4 à 6 mois période nécessaire pour l'apparition de symptômes. L'arrosage s'est effectué 2 à 3 jours par semaine, et un désherbage manuel une fois par semaine. Un traitement par un correcteur de carence « Agrispon » à raison de (1 ml/l) a été effectué sur l'ensemble des plants durant la période d'indexage pour éviter les éventuels problèmes de carences.

3.5.1.4. Conditions de température :

Le développement des symptômes exige des températures élevées. Les températures devraient être maintenues de 32 à 38 °C maximum le jour et pas en dessous de 27°C le soir [168]. Cependant le soin doit être exercé pour ne pas dépasser 40°C pour n'importe qu'elle durée. Ceci aura comme conséquence le développement anormal de feuilles petites [21]. *S. citri* multiplie lentement à des températures de 24°C et 26°C [169]. La lecture des résultats de l'expression symptomatologique peut s'effectuer entre 8 à 12 semaines après la soudure des yeux au niveau des porte-greffes.

3.5.2. Transmission par inoculation :

Selon MARTELLI [170], l'inoculation mécanique à des plantes tests herbacées est une méthode biologique permettant la mise en évidence des agents pathogènes. Le principe impliqué dans cette transmission consiste à l'introduction d'une sève infectieuse à l'intérieur des cellules de la plante test à travers des micro-blessures. Les symptômes induits, peuvent apparaître au bout de quelques jours, et peuvent aller jusqu'à 3 semaines.

3.5.2.1. Solution et produits utilisés :

Solution tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4 (Appendice B).

3.6.2.1.1. Célite ou Carborandum :

Est un produit abrasif, extrait d'algues marines, il induit des micro lésions sur feuilles pour faciliter l'introduction de l'inoculum à l'intérieur du végétal lors de l'inoculation mécanique des plantes herbacées.

3.5.2.1.2. Charbon actif :

L'adjonction du charbon actif à l'inoculum permet d'accroître de 50 à 100 % le pouvoir infectieux des extraits au cours de l'inoculation afin que l'apparition des symptômes soit rapide.

3.5.2.1.3. Le Diethyldithiocarbamate de Sodium :

Le DIECA permet de neutraliser les polyphénols (tanins) libérés de la plante lors de l'extraction pour éviter la dénaturation des particules du *Spiroplasma*. Le DIECA peut être remplacé par la Caféine, Nicotine, ou par le 2-mercaptoéthanol qui ont un même effet.

3.5.2.2. Source du *Spiroplasma citri* :

Dans ce test le matériel végétal utilisé (feuilles) provient des différentes stations prospectées: *Thomson* (station de Chebli), *Washington navel* (pépinière privée de Guerrouaou), *Valencia late*, *Double fine*, et *Clémentine* (EURL de Hadjout), *Citronnier* (station expérimentale de Blida) et *Carvalhal* (ITAFV-Boufarik).

3.5.2.3. Gamme d'hôte :

Pour la détection biologique de la maladie du stubborn des agrumes par voie mécanique, nous avons utilisé une seule plante ornementale. Il s'agit de *C. roseus*. Cette plante test a été choisie en raison de sa réaction spécifique au *S. citri*.

3.5.2.4. Protocole du test d'inoculation :

Avant le semis, les semences de la pervenche ont été préalablement trempées dans une solution contenant de l'eau de javel (25 ml, 32°) et de l'eau distillée (225 ml) pendant 20 minutes. Par la suite elles ont été rincées à l'eau distillée. Ces semences ont été ensuite semées le 25.04.2005 dans des petits pots dans un substrat de tourbe et sol (2/3 de sol et 1/3 de tourbe) préalablement stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. Nous avons

préparé 30 pots à raison de 4 pots par variété (type d'inoculum) et 2 pots pour le témoin sain. Le témoin malade provient d'une collection de laboratoire de virologie.

Des feuilles fraîches des différentes variétés d'agrumes soupçonnées infectés prélevés des différentes stations prospectées ont été broyées à froid dans un mortier à raison de 1g dans 5 ml de solution tampon phosphate (0.1 M, pH7.4) (Appendice B) qui a pour effet de stabiliser les *Spiroplasma* auxquels sont ajoutées 2 gouttes de 2-mercaptoéthanol et 0.75 mg de charbon actif pour réduire l'oxydation. L'inoculation est effectuée au stade 3 à 4 feuilles ; les feuilles ont été saupoudrées de Célite afin de créer les microlésions pour faciliter la pénétration du *Spiroplasma*. 3 à 5 minutes plus tard, la solution infectieuse a été appliquée à l'aide du pousse protégé d'un doigtier. Les plantules inoculées sont ensuite rincées à l'eau courante, et sont placées au phytotron à une température de 25°C (figure 3.20). L'arrosage était effectué régulièrement jusqu'à leur stade optimum d'extériorisation des symptômes.



Figure 3.20: Transmission par inoculation mécanique de *Spiroplasma citri* sur *Catharanthus roseus*

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Distribution des symptômes et impact de la maladie du stubborn sur les différentes stations prospectées :

4.1.1. Symptômes observés durant la campagne 2003-2004 :

Au cours des prospections effectuées au niveau du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik, et la station expérimentale d'agronomie de Blida durant la période 2003-2004, des symptômes rappelant ceux du stubborn ont été observés sur différentes variétés d'agrumes. A la station du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik nous avons remarqué que l'intensité des symptômes diffère selon la variété soupçonnée atteinte de la maladie. Ainsi sur *Carvalho* les symptômes les plus importants étaient des chloroses foliaires prononcés (figure 4.1), des formes en cuillères et le balai de sorcière, ce qui se caractérisait par des proliférations des bourgeons axillaires, des feuilles opposés et un raccourcissement des entre-nœuds. Un retard de croissance a été également signalé sur quelques plants (figure 4.2) et un cas de nanisme a été observé sur un seul plant (figure 4.3). Sur *Citronnier* nous avons observé que le symptôme du balai de sorcière était le plus dominant accompagné de chloroses latérales. Des feuilles petites arrondies et des formes en cuillères ont été également observés mais de moindre importance (figure 4.4). Des cas de nanisme ont été relevés sur la *Valencia late* et le *Thomson* en plus des symptômes foliaires qui étaient des chloroses et des formes en cuillères. Sur *Washington navel* et *Double fine* nous avons observé un retard de croissance où les arbres étaient de taille petite et non développés (figure 4.5). Des formes en cuillères des feuilles ont été également observées mais moins fréquentes. Par contre sur *Ortanique* et *Clémentine* nous avons remarqué uniquement le symptôme des feuilles en cuillères.

Au niveau de la station expérimentale d'agronomie de Blida, les symptômes du stubborn ont été observés seulement sur *Citronnier*, celui-ci présentait le balai de sorcière avec un raccourcissement des entre-nœuds et feuilles opposées (figure 4.6; 4.7). Des jaunissements et chloroses foliaires considérables et une croissance de type verticale ont été également observés (figure 4.8).

4.1.1.1. Sévérité des symptômes du stubborn observés sur les variétés d'agrumes durant la campagne 2003-2004 :

Les symptômes du stubborn ont été observés dans les 2 stations agrumicoles prospectés (ITAFV-Boufarik et station expérimentale de Blida). La variabilité de l'intensité de la maladie a été remarquée à l'ITAFV- Boufarik vue la présence d'une gamme variétale importante par rapport à la station expérimentale de Blida. Pour toutes les variétés visitées uniquement la *Carvalhal* présentait des symptômes très sévères qui étaient des chloroses importantes suivies par le *Citronnier* où la plupart des feuilles étaient de taille petite et présentaient des symptômes de chloroses, accompagné du balai de sorcière qui était dominant. La *Valencia Late* et le *Thomson* ont présenté des symptômes de type moyennement sévères qui étaient des chloroses foliaires et feuilles en formes de cuillères moins importantes. Les autres variétés présentaient des symptômes modérés moins fréquents de type feuilles en cuillères avec quelques cas de retard de croissance ou nanisme il s'agit de *Washington navel*, *Double fine*, *Ortanique* et *Clémentine* (Tableau 4.1).

Tableau 4.1: Sévérité des symptômes du stubborn observés sur les variétés d'agrumes durant la campagne 2003-2004.

Variété	Nombre d'échantillons		Symptômes de type
	prélevés	avec symptômes	
<i>Citronnier</i>	72	53	sévères
	45	36	modérés
<i>Double fine</i>	69	62	très sévères
<i>Carvalhal</i>	64	40	modérés
<i>Washington navel</i>	33	20	moyennement sévères
<i>Valencia late</i>	50	27	moyennement sévères
<i>Thomson</i>	50	31	modérés
<i>Ortanique</i>	43	29	modérés
<i>Clémentine</i>			



Figure 4.1: Chloroses foliaires sur *Carvalhal* (Parc à bois- ITAFV-Boufarik) (2003-2004)



Figure 4.2: Retard de croissance observée sur *Carvalhal* du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2003-2004)



Figure 4.3 : Nanisme sur *Carvalhal* du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2003-2004)



Figure 4.4 : A droite : Feuille saine, à gauche : Feuilles petits arrondies sur *Citronnier* de la station de l'ITAFV-Boufarik (2003-2004)



Figure 4.5: Nanisme sur *Washington navel* du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2003-2004)



Figure 4.6 : Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur *Citronnier* de la station expérimentale de Blida (2003-2004)



Figure 4.7 : Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur *Citronnier* de la station expérimentale de Blida (2003-2004)



Figure 4.8: Croissance de type verticale sur *Citronnier*
(Station expérimentale de Blida) (2003-2004)

4.1.1.2. Discussion :

Au cours de nos prospections durant la campagne 2003-2004 nous avons constaté que les symptômes étaient largement distribués au niveau du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik où une gamme de variété a été soupçonnée atteinte du *CSD* par rapport à la station expérimentale d'agronomie de Blida où seulement 1 variété présentait des symptômes. Pour les 2 stations visitées, la sévérité des symptômes était observée surtout sur *Carvalho* et *Citronnier* du parc à bois de l'ITAFV-Boufarik sur les quelles nous avons observé des chloroses sévères et balai de sorcière et sur *Citronnier* de la station expérimentale de Blida qui a présenté uniquement le symptôme du balai de sorcière. Ces différents types de symptômes ont été également cités par ROISTACHER, [21], BOVE [8], GARNIER et al [116], SMITH et al [86], KLOTZ [138], CALAVAN et GUMPF [141], OLSEN et al [31].

4.1.2. Symptômes observés durant la campagne agricole 2004-2005 :

Des symptômes de type *CSD* ont été observés dans toutes les stations prospectées. Les symptômes étaient surtout des feuilles en forme de cuillères, des chloroses sévères, et le balai de sorcière. Sur les parcelles de Hadjout nous avons observé une diversité symptomatologique sur les différentes variétés plantées. Le symptôme dominant était les

formes en cuillères observées sur *Double fine* (figure 4.9; 4.10), *Valencia late* (figure 4.11), *Washington navel* (figure 4.12) et sur *Clémentine*. Des chloroses foliaires ont été relevées sur *Valencia late* (figure 4.11), *Citronnier* (figure 4.13) et sur *Clémentine* (figure 4.14), par contre le jaunissement apical des jeunes pousses a été remarqué sur *Double fine* et *Valencia late*. Des cas de balais de sorcière avec raccourcissement des entre-nœuds non fréquents étaient observés sur *Valencia late* (figure 4.15) et *Washington navel* 251.

Dans la parcelle de Chebli, des symptômes importants de la catégorie forme en cuillères avec dissymétrie de la nervure principale, forme en cœur et chloroses des feuilles ont été observés sur la variété *Thomson* (figure 4.16; 4.17). Un cas de nanismes avec présence de balai de sorcière a été relevé uniquement sur un seul arbre (figure 4.18; 4.19). Les jaunissements apicaux des jeunes pousses étaient très rares, et des chutes de fruit très importantes en début de formation (avortement des fleurs) ont été également observées sur quelques plants. Par contre dans la station de l'ITAFV-Boufarik, les symptômes les plus marquant étaient des chloroses très prononcées des feuilles sur la *Carvalhal* (figure 4.20; 4.21). Le symptôme de balai de sorcière était non fréquent (figure 4.22), la croissance était de type verticale (figure 4.23) avec abondance du feuillage dont la plupart des feuilles étaient en cuillère, à forme pointue et arrondie avec rétrécissement du limbe (figure 4.24). Sur *Citronnier* nous avons remarqué surtout le balai de sorcière (figure 4.25) avec entre-nœuds courts et des feuilles opposées (figure 4.26). Les arbres présentaient un feuillage très important. Par contre sur les autres variétés *Ortanique*, *Washington navel*, *Double fine*, et *Valencia late*, le symptôme le plus fréquent était les formes en cuillères des feuilles. Un seul cas de nanisme a été observé sur quelques variétés tel que la *Carvalhal*, *Thompson*, et *Valencia late* 248. Certaines variétés ont représenté un retard de croissance très important, il s'agit de *Washington navel*, *Clémentine* et *Double fine*.

Au niveau des parcelles de Benkhellil (verger âgé), les symptômes les plus rencontrés sur la variété *Thomson* étaient les chloroses, les formes en cuillères et arrondies des feuilles (figure 4.27). Un cas du balai de sorcière a été observé (figure 4.28). Sur le jeune verger les symptômes les plus caractéristiques de la maladie du stubborn ont été observés, il s'agit de la forme en gland du fruit (figure 4.29) et fruit déformé asymétrique avec columelle courbée (figure 4.30), inversion de la coloration ; couleur orangée à l'extrémité pédonculaire et verte à la partie stylaire (figure 4.31) en plus de l'abondance du nombre de feuilles en formes de cuillère.

Dans la pépinière de Guerrouaou le symptôme le plus fréquent était la forme en cuillère observé sur *Washington navel*, *Clémentine* et *Bigaradier*. Par contre au niveau de la station expérimentale d'agronomie de Blida, le symptôme le plus spectaculaire était le balai de sorcière avec entre-nœuds courts et feuilles opposées observé uniquement sur *Citronnier Eureka* (figure 4.32). Aucun symptôme n'a été relevé sur les autres variétés : *Washington navel* et *Thomson*.

4.1.2.1. Sévérité des symptômes du stubborn observés sur les variétés d'agrumes durant la campagne 2004-2005 :

Au cours de nos prospections, nous avons observé une très grande variabilité dans la sévérité des symptômes sur la plupart des variétés visitées. Des symptômes de type très sévère ont été remarqués sur *Carvalho* dans le parc à bois de l'ITAFV-Boufarik étaient essentiellement des chloroses foliaires très abondantes et généralisées sur tous les arbres, avec la présence du balai de sorcière, raccourcissement des entre-nœuds et des feuilles opposées. Sur *Valencia late* (station EURL de Hadjout) et *Thomson* (station de Chebli) nous avons observé des symptômes de type sévère où des feuilles en forme de cuillères étaient très abondantes sur toutes ces variétés par rapport aux symptômes de chloroses. En ce qui concerne le *Citronnier* nous avons remarqué des symptômes de type moyennement sévère (station expérimentale d'agronomie de Blida et parc à bois de l'ITAFV-Boufarik), le symptôme le plus fréquent était le balai de sorcière avec raccourcissement des entre-nœuds et feuilles opposées. Les autres variétés (*Double fine*, *Clémentine*, *Washington navel* de l'EURL de Hadjout, *Ortanique* de l'ITAFV-Boufarik et *Bigaradier* de la pépinière privée de Guerrouaou) présentaient des symptômes de type modéré qui étaient des feuilles en forme de cuillères non abondantes par rapport aux autres variétés (Tableau 4.2).

Tableau 4.2 : Sévérité des symptômes du stubborn observés sur les différentes variétés durant la campagne 2004-2005

Variété	Nombre d'échantillons		Symptômes de type
	prélevés	avec symptômes	
<i>Citronnier</i>	65	43	moyennement sévères
<i>Double fine</i>	69	60	modérés
Carvalhal	66	50	très sévères
<i>Washington navel</i>	125	118	modérés
<i>Valencia late</i>	64	40	sévères
<i>Thomson</i>	209	202	sévères
<i>Ortanique</i>	43	22	modérés
<i>Clémentine</i>	56	43	modérés
<i>Bigaradier</i>	31	25	modérés



Figure 4.9 : A droite : Feuille saine, à gauche: Feuilles en cuillère sur *Double fine* (EURL de Hadjout) (2004-2005)



Figure 4.10 : A droite : Feuille saine, à gauche : Feuilles en cuillère sur *Double fine* (EURL de Hadjout)(2004-2005)



Figure 4.11: A droite : Feuille saine, à gauche : En haut : Chloroses foliaires, en bas : Feuilles en cuillères avec dissymétrie de la nervure principale sur *Valencia late* (EURL de Hadjout) (2004-2005)



Figure 4.12 : A droite : Feuille saine, à gauche : Feuilles en cuillère avec dissymétrie de la nervure principale sur *Washington navel* (EURL de Hadjout) (2004-2005)



Figure 4.13 : A droite : Feuilles sains, à gauche : En haut : Chloroses foliaires, en bas: Feuilles en cuillère avec dissymétrie de la nervure principale sur *Citronnier* (EURL de Hadjout)(2004-2005)



Figure 4.14 : Adroite feuille saine, à gauche : Chloroses sévères sur *Clémentine* (EURL de Hadjout) (2004-2005)



Figure 4.15 : Balai de sorcière sur *Valencia late* de l'EURL de Hadjout (2004-2005)



Figure 4.16 : A droite : Feuille saine, à gauche : En haut : Chloroses sévères des feuilles, en bas : Feuilles en cuillères avec dissymétrie de la nervure principale sur *Thomson* (Station de Chebli) (2004-2005)



Figure 4.17 : A droite : Feuille saine, à gauche : Feuilles petits en forme de cœur sur *Thomson* de la station de Chebli (2004-2005)



Figure 4.18 : Adroite : Arbre sain, à gauche : Arbre nain du *Thomson*
(Station de Chebli) (2004-2005)



Figure 4.19 : Balai de sorcière observé sur *Thomson*
(station de Chebli) (2004-2005)



Figure 4.20 : Chloroses sévères sur feuilles de *Carvalhal* du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)



Figure 4.21: Chloroses sévères sur feuilles de *Carvalhal* du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)



Figure 4.22 : Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière)
sur *Carvalho* du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)



Figure 4.23 : Croissance de type buissonnante verticale
sur *Carvalho* de l'ITAFV- Boufarik (2004-2005)



Figure 4.24 : A droite feuille pointue avec rétrécissement du limbe, A gauche : feuille arrondie avec rétrécissement du limbe observée sur *Carvalhal* de la station de l'ITAFV-Boufarik (2004-2005)



Figure 4.25 : Balai de sorcière avec raccourcissement des entre-nœuds et feuilles opposées sur *Citronnier* du Par à bois de l'ITAFV-Boufarik. (2004-2005)



Figure 4.26 : Raccourcissement des entre-nœuds et feuilles opposées sur un balai de sorcière du *Citronnier* de l'ITAFV-Bouarik (2004-2005)



Figure 4.27 _a : Feuilles saines observées sur *Thomson* de la station de Benkhellil (2004-2005)



Figure 4.27_b : Feuilles petits et arrondies observées sur *Thomson* de la station de Benkhellil (2004-2005)



Figure 4.28 : Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur *Thomson* de la station de Benkhellil (2004-2005)



Figure 4.29 : Fruit en gland observé sur *Thomson* de la station de Benkhellil (2004-2005)



Figure 4.30 : Fruit déformé asymétrique avec columelle courbée
Sur *Thomson* de la station de Benkhellil (2004-2005)



Figure 4.31: Inversion de la coloration: Couleur orangée à l'extrémité pédonculaire et verte à la partie stylaire observé sur *Thomson* de la station de Benkhellil (2004-2005)



Figure 4.32 : Prolifération des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) sur *Citronnier* de la station expérimentale de Blida. (2004-2005)

4.1.2.2. Discussion :

Selon les prospections réalisées durant la campagne 2004-2005 nous avons remarqué que toutes les stations visitées présentaient des symptômes typiques du *CSD*. Sur la plupart des variétés nous avons observés des formes en cuillères des feuilles, certaines ont représentés des chloroses très sévères tel que la *Carvalhal* (Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik), *Valencia late*, *Double fine* (EURL de Hadjout) et *Thomson* (station de Chebli). Le jaunissement apical des jeunes pousses n'était pas très fréquent, il a été relevé seulement sur *Double fine* et *Valencia late*. Les cas de nanisme étaient rares, et n'étaient observés que sur *Thomson* dans la station de Chebli, *Valencia late* et surtout *Carvalhal* à l'ITAFV-Boufarik. Nous avons remarqué également que le balai de sorcière était fréquent et spectaculaire uniquement sur *Citronnier* à l'ITAFV-Boufarik et dans la station expérimentale de Blida, par contre sur *Valencia late*, *Washington navel* (au niveau de l'EURL de Hadjout), *Thomson* (station de Chebli) et *Thomson* (station de Benkhellil) il était moins abondant. Nous avons constaté que pour toutes les variétés prospectées des différentes stations, le symptôme de feuilles arrondies et en forme de cœur sont très rares, par contre les feuilles déformées étaient très fréquentes.

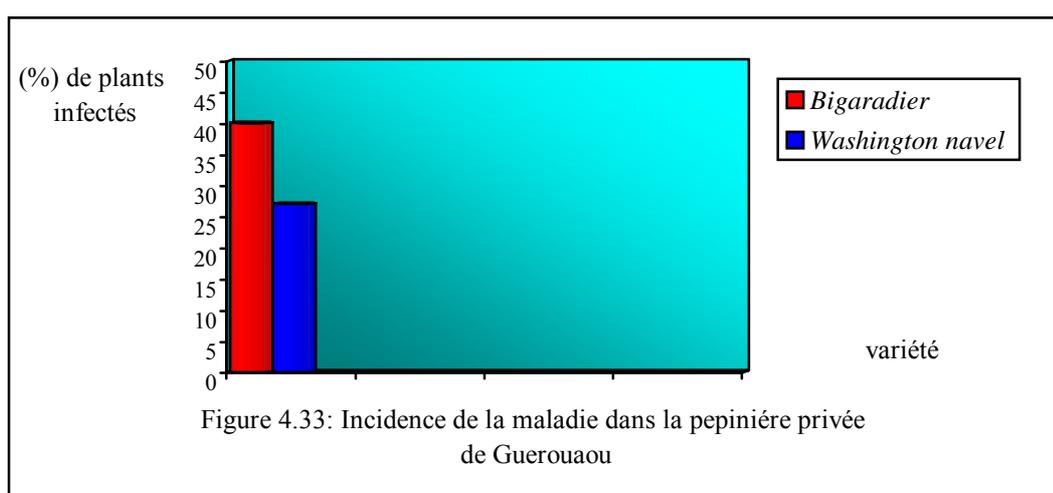
Les symptômes observés sur les différentes variétés au cours de nos prospections sont semblables à ceux observés par ROISTACHER, 1991 [21], PRALORAN, 1971 [11], BOVE, 1995 [8], HAAS *et al*, 1944 [35], CALAVAN, 1969 [151], GARNIER *et al*, 2001 [116], KLOTZ, 1973 [138], OLSEN *et al*, 2000 [31], SMITH *et al*, 1992 [86], CALAVAN *et GUMPF*, 1974 [141], DURET *et al*, 2003 [110], MENGE *et OHR*, 2001 [140], CALAVAN *et CARPENTER*, 1965 [134], CALAVAN, 1980 [135], CARPENTER *et al*, 1965 [136], KLOTZ *et al*, 1972 [137].

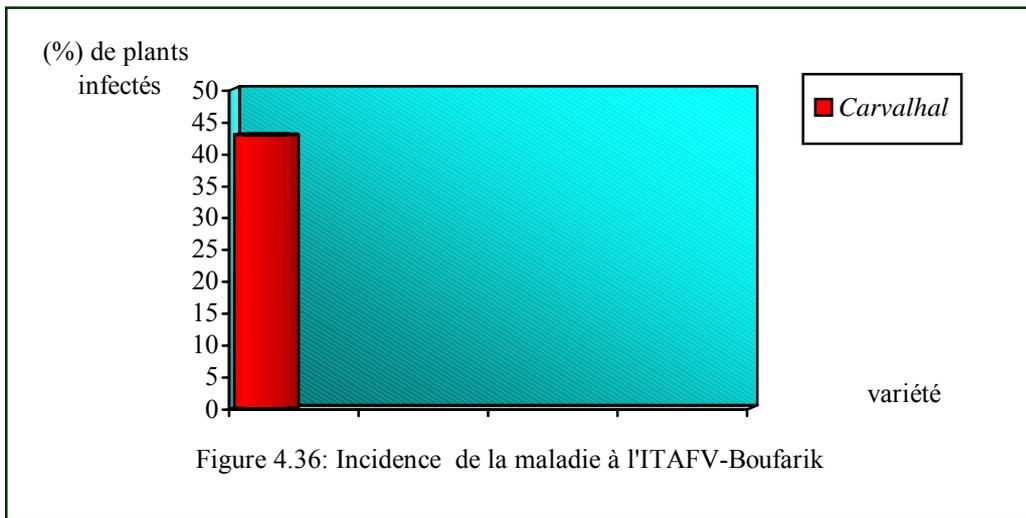
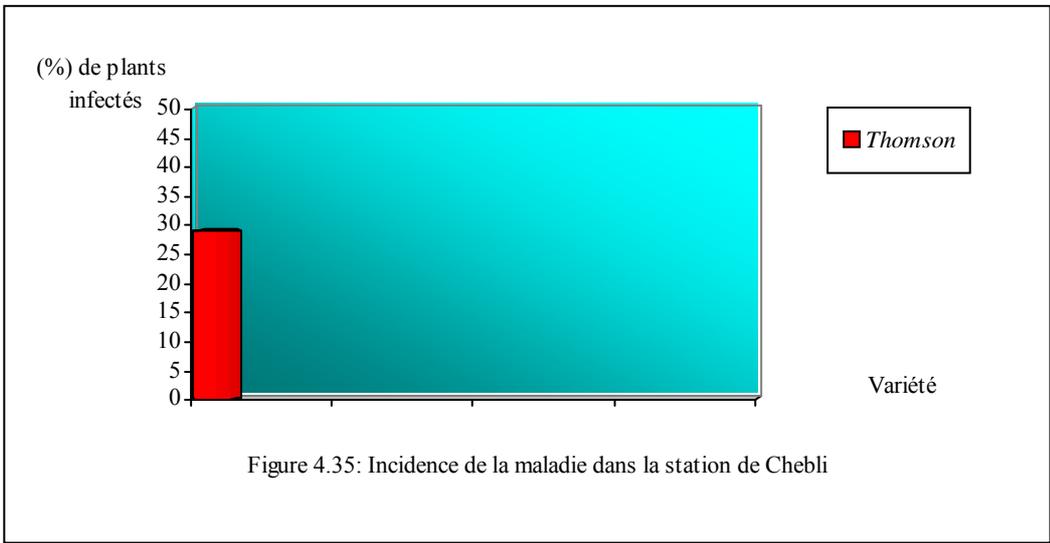
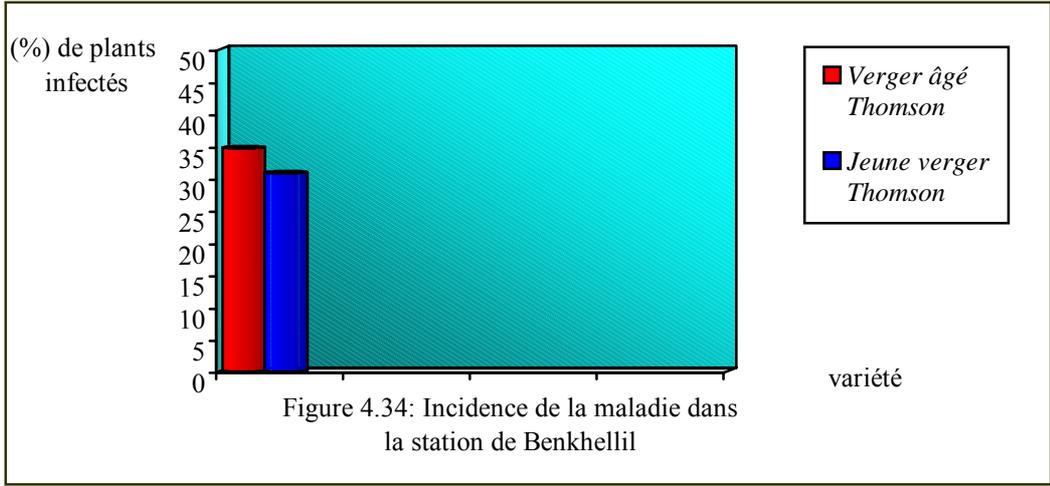
4.2. Résultats de la Sérodétection :

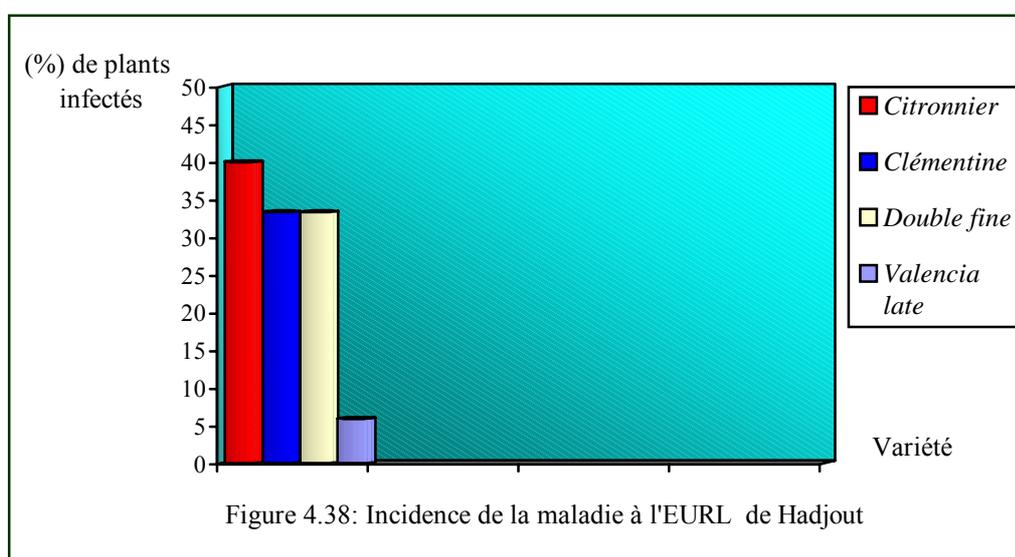
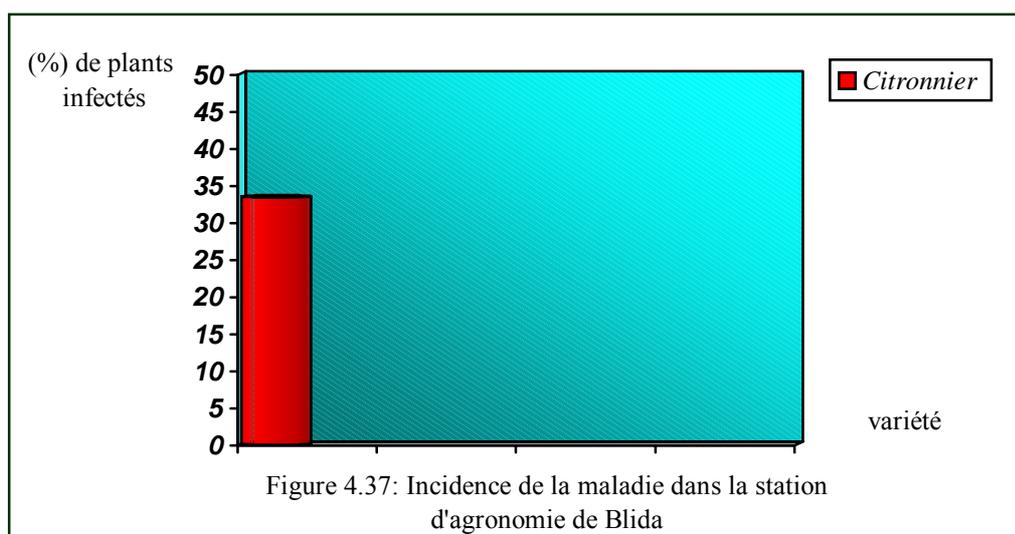
L'ensemble des échantillons prélevés a été analysé par la technique DAS -ELISA [161]. Pour toutes les stations expérimentées, la présence du stubborn a été détectée. Sur les 456 échantillons testés uniquement 124 ont répondu positivement, ce qui correspond à une incidence de 27,19%.

Au niveau de la station de Guerrouaou (figure 4.33) nous avons obtenu 4 échantillons positifs du bigaradier sur un nombre de 10 testés ce qui a donné une incidence

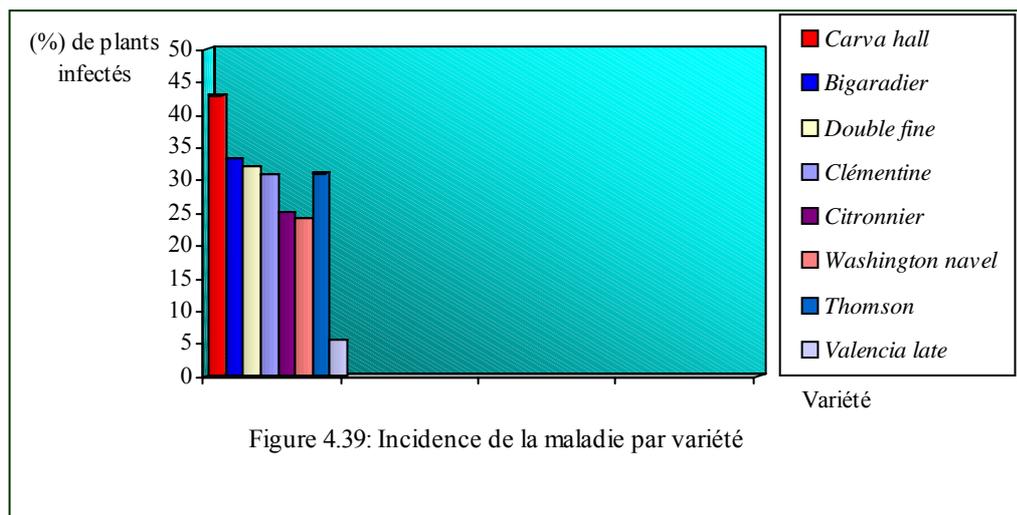
de 40 % et 27,08% sur *Washington navel* pour le quel nous avons testé un nombre élevé où 26 ont répondu positivement. Aucun échantillon n'a été révélé positif pour la *Clémentine*. Par contre au niveau de la station de Benkhellil (figure 4.34) l'incidence de la maladie était de 34,61% sur la variété *Thomson* du verger âgé où nous avons enregistré 18 échantillons positifs sur 40 testés. Tandis que le jeune verger a présenté 8 échantillons positifs sur un total de 26 testés avec une incidence de 30,76%. Dans la station de Chebli (figure 4.35), nous avons enregistré une incidence de 28,88% sur la variété *Thomson* où peu d'échantillons se sont révélés positifs sur 90 échantillons testés, et une incidence de 42,85% a été calculé sur la variété *Carvalho* du Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik où seulement 6 échantillons s'avérés positifs sur 14 testés (figure 4.36). Par contre aucun échantillon n'a été signalé positif sur *Citronnier*, *Ortanique*, *Washington navel*, *Valencia late* et *Double fine*. Au niveau de la station d'agronomie de Blida (figure 4.37) nous avons calculé une incidence de 33,33% sur *Citronnier* pour le quel 2 échantillons étaient positifs sur 6 testés. Dans la station de Hadjout (figure 4.38) où différentes variétés ont été testées, nous avons obtenu les résultats suivants : un nombre de 8 échantillons positifs sur 20 testés pour le *Citronnier* avec une incidence de 40%. 2 échantillons positifs sur 34 testés de la *Valencia late* ce qui nous a permit d'avoir une incidence de 5,88%. Par contre une incidence de 33,33% a été signalée sur *Clémentine* et *Double fine* avec 8 échantillons positifs sur 24 testés et 16 échantillons positifs sur 48 testés respectivement. Tandis que sur *Washington navel* et *Bigaradier* aucun échantillon ne s'est révélé positif.



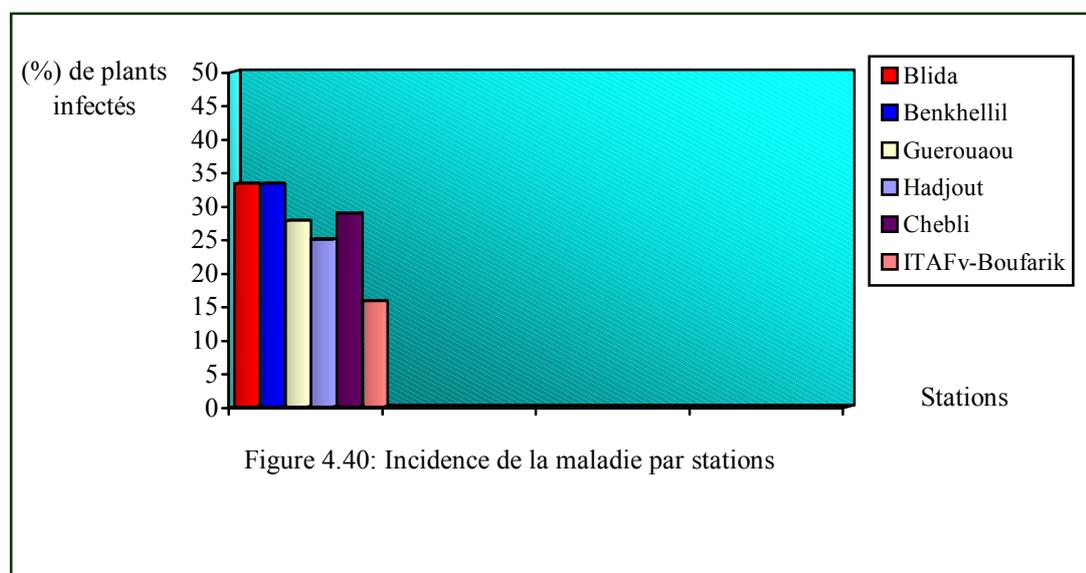




Selon les différentes incidences obtenues par variété (figure 4.39) nous avons calculé une incidence de 42,85% sur la *Carvalhal*, 5,55% sur la *Valencia late*, 30,95% sur *Thomson*. Par contre le *Bigaradier* et la *Double fine* présentaient une incidence de 33,33% et 32% respectivement, vient ensuite la *Clémentine* avec une incidence de 30,76% et le Citronnier de 25%. En fin le *Washington navel* présentait une incidence de 24,07%.

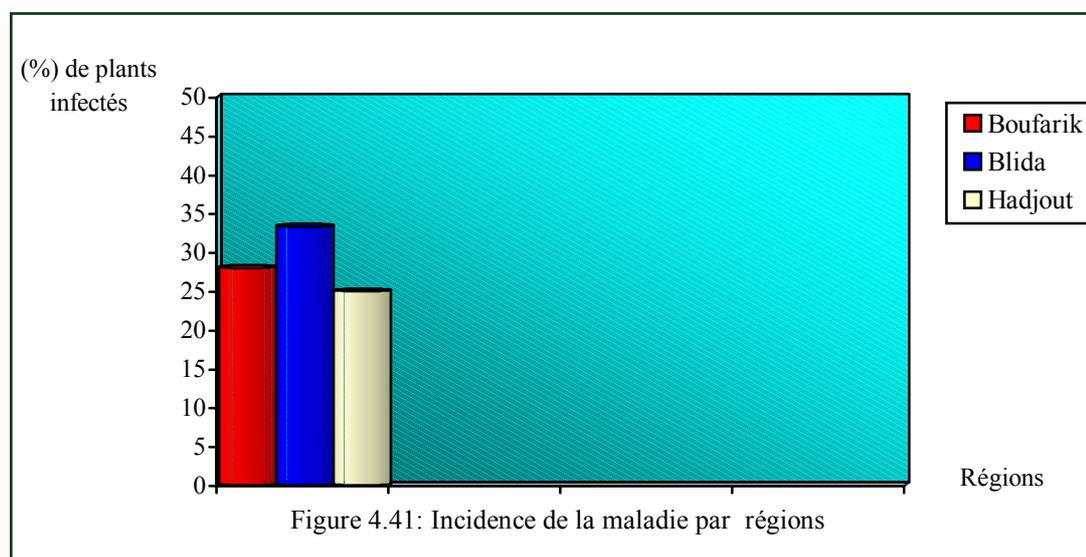


Pour l'incidence de la maladie enregistrée par station (figure 4.40), nous avons obtenu 33,33% au niveau de la station de Benkhellil et la station d'agronomie de Blida, par contre la pépinière privée de Guerrouaou et l'EURL de Hadjout présentaient une incidence de 27,77% et 25% respectivement. Sur la station de Chebli nous avons enregistré une incidence de 28,88%. En fin dans le parc à bois de l'ITAFV-Boufarik l'incidence de la maladie était de 15,79%.



Selon l'incidence calculé au niveau de toutes ces stations (figure 4.41) nous avons obtenu 28,02% dans la région de Boufarik (pépinière privée de Guerrouaou, station de Benkhellil, station de Chebli, et le parc à bois de l'ITAFV-Boufarik), par contre la station

d'agronomie da Blida et l'EURL de Hadjout présentaient une incidence de 33,33% et 25% respectivement.



4.2.1. Discussion :

Selon les résultats obtenus par la DAS-ELISA, nous avons remarqué que le taux d'infection de la maladie du stubborn était variable d'une station à une autre. Les stations les plus infectées étaient la station de Benkhellil et la station d'agronomie de Blida qui présentaient une incidence très élevée qui est de 33,33%. Le verger âgé de la station de Benkhellil s'est montré très sensible au stubborn par le nombre d'échantillons qui ont répondu positivement 18 par rapport au jeune verger qui présente seulement 8 échantillons positifs, ce la peut être du à l'âge des arbres qui est de 81 ans ce qui les rendent très sensibles aux atteintes du stubborn. Dans la station de Chebli où seulement la variété *Thomson* à été testé, nous avons enregistré une incidence de 28,88% qui est moins élevé à celle de Benkhellil (33,33%). Au niveau de la pépinière privée de Guerrouaou, le *Bigaradier* est le plus atteint par la maladie du stubborn où une incidence de 40% a été enregistrée par rapport au *Washington navel* qui présentait une incidence de 27,08%. En fin le parc à bois de l'ITAFV-Boufarik avec une incidence plus faible qui est de 15,79% ce qui nous permet de dire que l'ITAFV-Boufarik est la moins atteints par le stubborn par rapport aux autres stations.

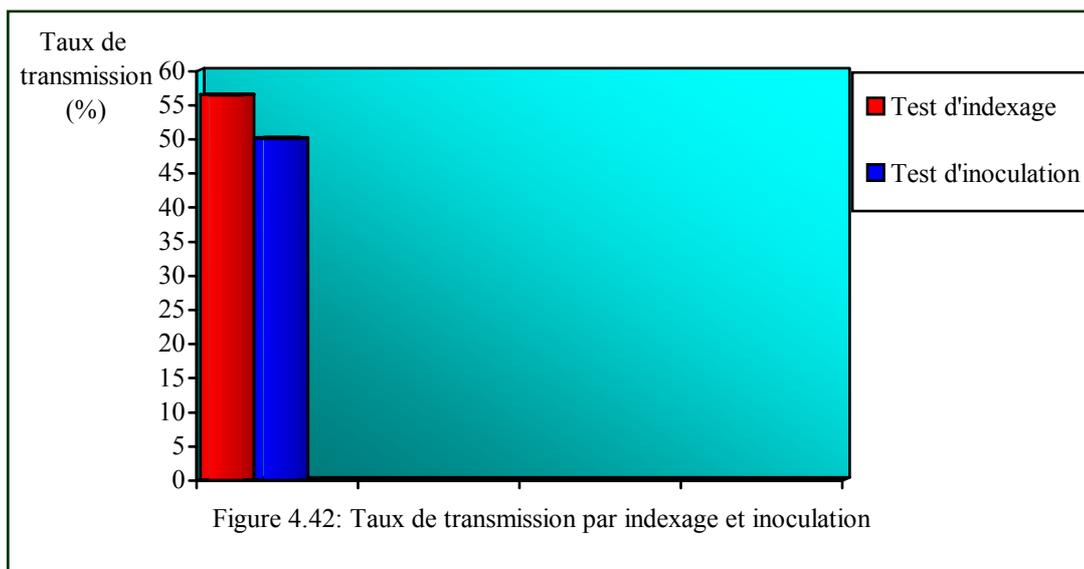
En ce qui concerne les taux d'infection par variétés nous avons remarqué que la *Carvalhal* était la plus sensible et cela par l'incidence la plus élevée qui est de 42,85% ce qui explique les symptômes sévères observés sur terrain, ensuite vient le *Bigaradier* qui représente une incidence de 33,33%. L'incidence la plus faible qui était de 5,55% a été enregistrée sur la variété *Valencia late* où les symptômes étaient modérés. On peut considérer donc que cette variété était la plus tolérante ou résistante au stubborn. Selon les résultats de la DAS-ELISA nous avons constaté que la station d'agronomie de Blida est la plus infecté par rapport à la région de Boufarik et l'EURL de Hadjout.

Malgré la présence des symptômes de type *CSD* dans les différentes stations prospectées, le test DAS-ELISA était révélé négatif pour 72,80% d'échantillons testés, ce la peut être du au fait que les prospections effectuées pendant la période de la mi-mai à la mi-juin n'étaient pas favorables à la détection sérologique du stubborn par la DAS-ELISA à partir des feuilles. Selon CALAVAN et *al*, 1968 [165], CALAVAN et GUMPF, 1974 [141], *S. citri* est mal distribué dans les différents organes d'agrumes infectés et d'après ROISTACHER, 1991 [21], les meilleurs résultats peuvent être obtenus avec les échantillons collectés pendant la période du printemps. Ainsi selon GARNIER et *al*, 2002 [106], les *Spiroplasma* se trouvent en faible concentration dans la plante, comme il peut être du également à l'absence de *S. citri* dans ces variétés. Les vecteurs du stubborn (cicadelles) et leurs plantes hôte réservoirs *S. kali* n'étaient pas observées durant nos prospections dans toutes les stations agrumicoles, ce qui nous permet de conclure que la variation de l'incidence entre les différentes stations est due aux pratiques culturales ou à l'utilisation du matériel de multiplication infecté (greffons ou porte-greffes provenant des plants infectés) ce qui a été prouvé dans la pépinière de Guerrouaou où les échantillons du *Bigaradier* ont donné des résultats positifs par le test DAS-ELISA. Celui-ci constitue un danger très important dans la multiplication des variétés par greffage et contribue dans la dispersion de la maladie, ce la confirme aussi que les variétés atteintes du stubborn ont été multipliées par des porte-greffes de *Bigaradier* infectés. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par BOVE, 1981 [171] et par BOVE et *al*, 1984 [172], où des réponses positives ont été obtenues dans le diagnostic de la maladie du stubborn par le test ELISA en Syrie, Irak, Turquie et Iran.

4.3. Résultats de la transmission mécanique de *Spiroplasma citri* :

4.3.1. Résultats de la transmission par indexage :

Après 4 mois d'inoculation nous avons observé que sur 55 plants inoculés, seulement 31 ont extériorisés des symptômes plus ou moins fort, ce qui a donné un taux de transmission de 56,36% (figure 4.42). Sur les plants inoculés par le candidat du *Citronnier*, nous avons obtenu 6 plants avec des symptômes caractéristiques du stubborn qui étaient des chloroses sévères, jaunissements des feuilles (figure 4.43), feuilles en cuillères et arrondies, et une dissymétrie de la nervure principale (figure 4.44; 4.45; 4.46). Pour les candidats de *Washington navel* nous avons obtenus 6 plants qui présentaient des symptômes de chloroses (figure 4.47), feuilles à forme pointue, arrondies, en forme de cœur et un rétrécissement de la surface du limbe avec dissymétrie de la nervure principale (figure 4.48; 4.49; 4.50; 4.51). Uniquement 2 plants sur 7 inoculés par la *Double fine* a extériorisé des symptômes de jaunissement des feuilles (figure 4.52), feuilles en cuillères, arrondies et en forme de cœur avec un rétrécissement de la surface du limbe (figure 4.53). Sur les plants inoculés par la *Valencia late* nous avons obtenus 3 plants avec des symptômes de jaunissement (figure 4.54), à feuilles arrondies (figure 4.55) et en forme de cœur accompagnée d'un rétrécissement de la surface du limbe, également 4 plants pour ceux inoculés par la *Clémentine* présentaient des symptômes de type chloroses et un raccourcissement des entre-nœuds (figure 4.56), feuilles à forme pointue (figure 4.57), en cuillères et en forme de cœur (figure 4.58). Par contre les plants inoculés par la *Carvalhal* 5 plants ont extériorisé des symptômes qui étaient des chloroses importantes (figure 4.59; 4.60; 4.61) et des feuilles en forme de cœur (figure 4.61). Enfin les plants inoculés par la variété *Thomson* nous avons enregistré 4 plants exprimant des symptômes de chloroses à feuilles en cuillères et arrondies (figure 4.62), prolifération des bourgeons axillaires, raccourcissement des entre-nœuds (figure 4.63) et un rétrécissement de la surface du limbe. Sur les plants inoculés par le témoin positif de *Madam vinous*, nous avons signalé 1 plant avec le symptôme de prolifération excessif des bourgeons axillaires (Balai de sorcière) avec raccourcissement des entre-nœuds (figure 4.64).



4.3.1.1. Discussion :

Les symptômes extériorisés sur l'ensemble des plants indexés étaient variables selon le type du candidat utilisé, il s'agissait essentiellement des chloroses, feuilles en cuillère, arrondies, rétrécissement de la surface du limbe avec une dissymétrie de la nervure principale, prolifération des bourgeons axillaires, raccourcissement des entrenœuds et des feuilles en forme de cœur. Ce dernier est un symptôme très caractéristique du stubborn selon SMITH et *al* [86]. Les plants étaient moins développés, les symptômes étaient plus forts sur les plants inoculés par le candidat du *Citronnier*, *Carvalhal*, *Washington navel* et *Thomson* que sur ceux inoculés par la variété *Clémentine*, *Valencia late*, et *Double fine*. Nous avons remarqué que pour tous les candidats utilisés le symptôme de chloroses était le plus dominant, les feuilles en formes de cuillères et arrondies ont été également observées pour la plupart des candidats. Les feuilles en forme de cœur, prolifération des bourgeons axillaires, raccourcissement des entrenœuds et le rétrécissement de la surface du limbe avec dissymétrie de la nervure principale étaient des symptômes moins fréquents. Nous avons remarqué également que les plants inoculés par le candidat de *Carvalhal* ont montré uniquement le symptôme de chloroses plus ou moins importantes et des feuilles en forme de cœur. Durant nos prospections nous avons remarqué que ce type de symptômes était le plus dominant sur cette variété dans le Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik. L'inoculation du témoin positif de *Madam vinous* a permis l'extériorisation des symptômes typiques de *S. citri* qui sont le balai de sorcière et raccourcissement des entrenœuds ce qui confirme la transmission par greffage du

stubborn. Les différents types de symptômes extériorisés par les plants indexés sont typique et caractéristique du stubborn et se rapprochaient beaucoup de ceux observé sur les variétés des stations prospectées. Nos résultats concordent avec ceux obtenu par ROISTACHER en 1991 [21] sur *Madam vinous*, KLOTZ en 1973 [138], BOVE [8], et par CALAVAN en 1980 [151], qui a démontré que l'oranger avec toutes ses variétés étant sensible au stubborn.



Figure 4.43 : Jaunissement des feuilles
(Résultat de l'inoculation par *Citronnier*)



Figure 4.44 : A droite : Feuille à forme pointue et dissymétrie de la nervure principale, à gauche : Feuille saine (Résultat de l'inoculation par *Citronnier*)



Figure 4.45 : Feuille arrondie
(Résultat de l'inoculation par *Citronnier*)



Figure 4.46 : A droite : Feuilles en cuillères (Résultat de l'inoculation par le *Citronnier*)
Au centre : Feuille arrondie (Résultat de l'inoculation par le *Citronnier*)
A gauche : Chloroses sur feuille (Résultat de l'inoculation par le *Citronnier*)

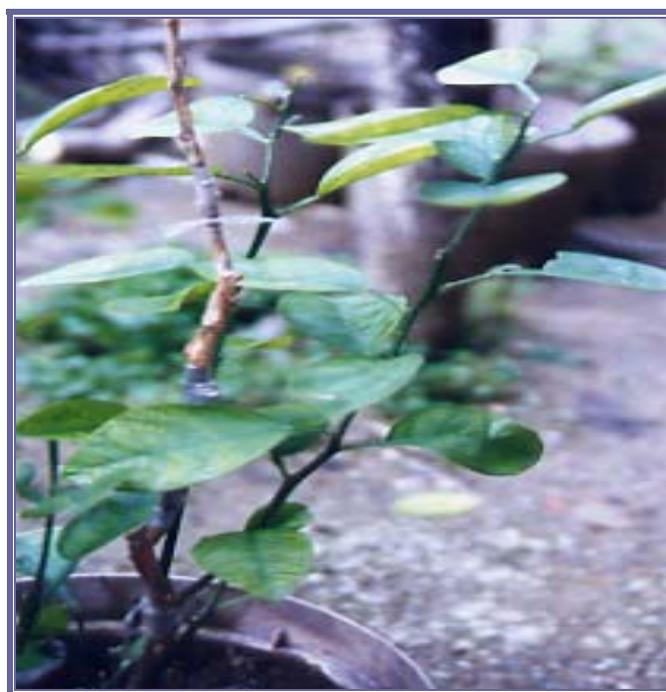


Figure 4.47 : Chloroses foliaires
(Résultat de l'inoculation par *Washington navel*)



Figure 4.48 : A droite : Feuille saines, à gauche : Dissymétrie de la nervure principale et rétrécissement du limbe (Résultat de l'inoculation par *Washington navel*)



Figure 4.49 : A droite : Feuille saines, à gauche : Feuille à forme pointue (Résultat de l'inoculation par *Washington navel*)



Figure 4.50 : Feuille en forme de cœur
(Résultat de l'inoculation par *Washington navel*)

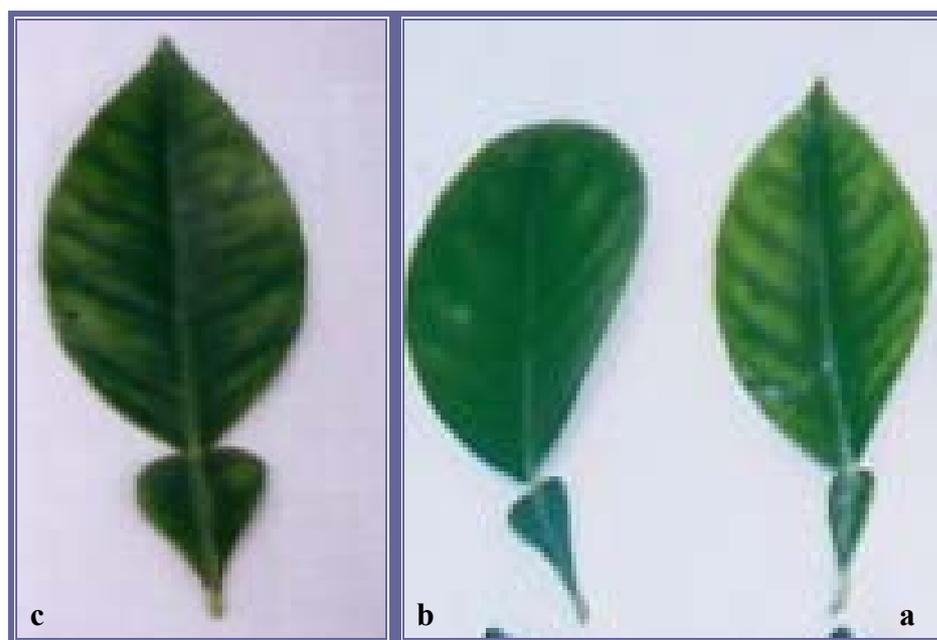


Figure 4.51: a. Chloroses foliaires (inoculé par *Washington navel*)
b. Feuilles arrondies avec chloroses (inoculé par *Washington navel*)
c. Feuille à forme pointue avec chloroses (inoculé par *Washington navel*)



Figure 4.52 : Jaunissements des feuilles
(Résultat de l'inoculation par la *Double fine*)

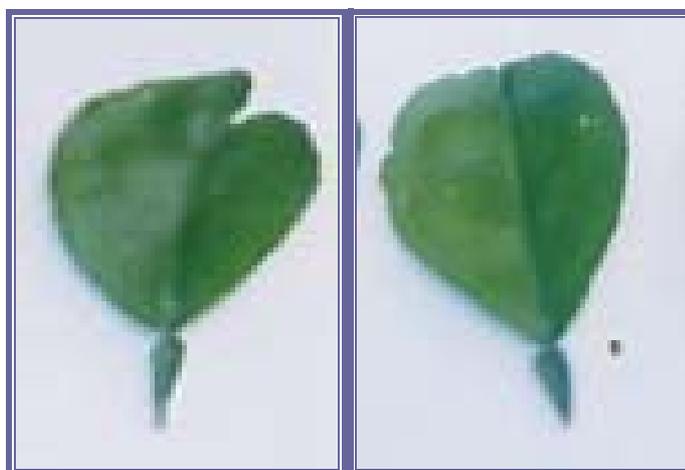


Figure 4.53 : A droite : Feuilles arrondies (résultat de l'inoculation par la *Double fine*)
A gauche : Feuilles en forme de cœur (Résultat de l'inoculation
par la *Double fine*)



Figure 4.54 : Jaunissement des feuilles
(Résultat de l'inoculation par la *Valencia late*)



Figure 4.55 : Feuille arrondie
(Résultat de l'inoculation par la *Valencia late*)



Figure 4.56 : Chloroses foliaires avec raccourcissement des entre-noeuds
(Résultat de l'inoculation par la *Clémentine*)



Figure 4.57 : A droite : Feuille saine, à gauche : Feuille à forme pointue avec
Chloroses (Résultat de l'inoculation par la *Clémentine*)



Figure 4.58 : Feuille en forme de cœur
(Résultat de l'inoculation par la *Clementine*)



Figure 4.59 : Chloroses sévères
(Résultat de l'inoculation par la *Carvalhal*)



Figure 4.60 : Chloroses sévères (Résultat de l'inoculation par la *Carvalhal*)



Figure 4.61: A droite : Chloroses sur feuilles de *Madam vinous* (Résultat de l'inoculation par la *Carvalhal*), à gauche : Feuilles en forme de cœur (Résultat de l'inoculation par la *Carvalhal*)



Figure 4.62 : A droite : Feuille saine, à gauche : Feuille petite arrondie
(Inoculé par *Thomson*)



Figure 4.63 : Raccourcissement des entre-nœuds
(Résultat de l'inoculation par *Thomson*)



Figure 4.64 : Prolifération des bourgeons axillaires avec raccourcissement des entre-nœuds (Résultat de l'inoculation par *Madam vinous*)

4.3.2. Résultats de la transmission par inoculation :

Les symptômes ont été apparus après 3 semaines d'inoculation, sur un nombre de 28 plants inoculés, uniquement 14 ont extériorisés des symptômes ce qui a donné un taux de transmission de 50% (figure 4.42). Nous avons obtenu 3 plants avec symptômes de feuilles petits en forme de cuillères (figure 4.65), feuilles déformées (figure 4.66) et jaunissement sévère (figure 4.67) pour les inoculum du *Citronnier*. 4 plants pour ceux inoculés par la *Carvalhal* où nous avons enregistré des symptômes de chloroses (figure 4.68), feuilles petites en forme de cuillères (figure 4.69) avec des cas de déformation foliaires. Sur ceux inoculé par le *Washington navel* nous avons obtenu 3 plants avec des symptômes de jaunissement apical (figure 4.70). Par contre ceux inoculés par la variété *Thomson* uniquement 2 plants ont extériorisés des symptômes de chloroses (figure 4.71), jaunissement latéral et feuilles petits en forme de cuillères (figure 4.72). Sur ceux inoculés par la *Clémentine* nous avons enregistré 2 plants avec des chloroses (figure 4.73), et des feuilles petits en forme de cuillères (figure 4.74).



Figure 4.65 : Feuilles petits en cuillères (Résultats de l'inoculation par le *Citronnier*)



Figure 4.66 : Feuille déformée (Résultat de l'inoculation par le *Citronnier*)



Figure 4.67 : Jaunissement sévère (Résultat de l'inoculation par le *Citronnier*)



Figure 4.68 : Chloroses apicales sévères
(Résultat de l'inoculation par la *Carvalhal*)



Figure 4.69 : Feuilles petits en cuillères (Résultats de l'inoculation
par la *Carvalhal*)



Figure 4.70 : Jaunissement apical (Résultat de l'inoculation par *Washington navel*)



Figure 4.71: A droite : plants sains, à gauche : Chloroses foliaires (Résultat de l'inoculation par *Thomson*)

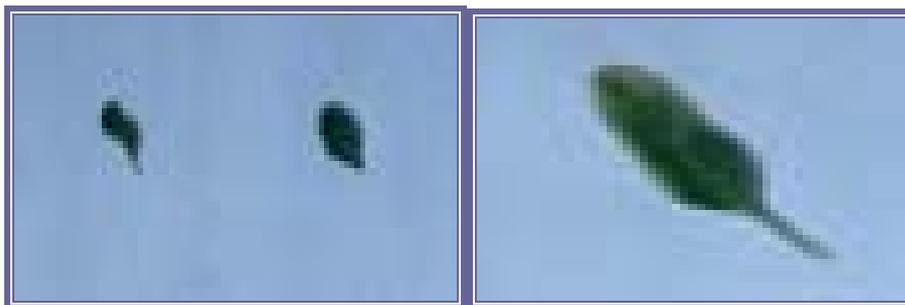


Figure 4.72 : A droite : Jaunissement, à gauche : Feuilles petits en cuillères
(Résultats de l'inoculation par *Thomson*)



Figure 4.73 : Chloroses sévères
(Résultat de l'inoculation par la *Clémentine*)



Figure 4.74 : Feuilles petits en cuillères
(Résultat de l'inoculation par la *Clémentine*)

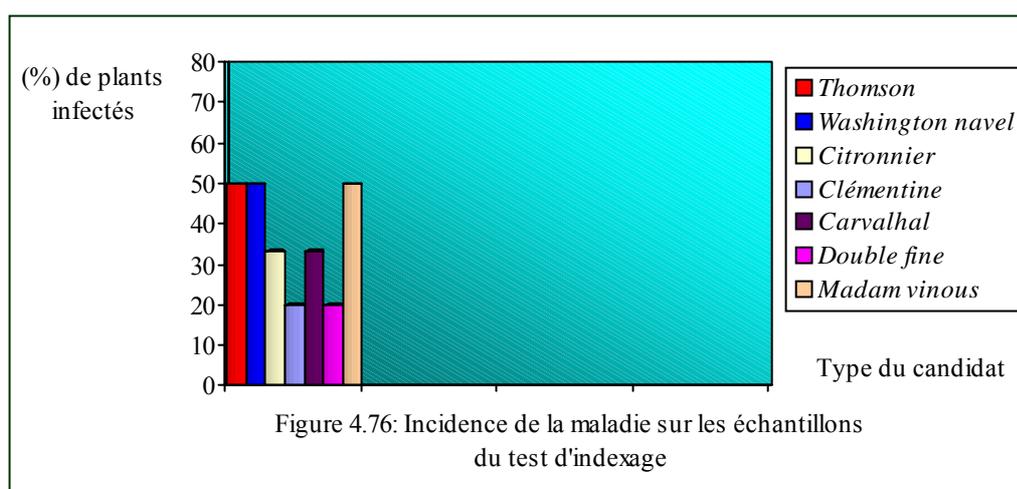
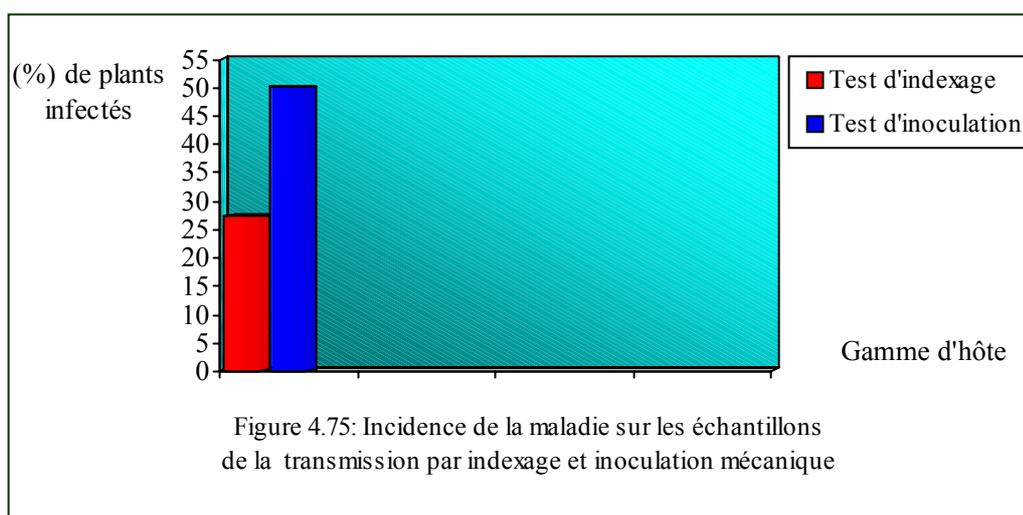
4.3.2.1. Discussion :

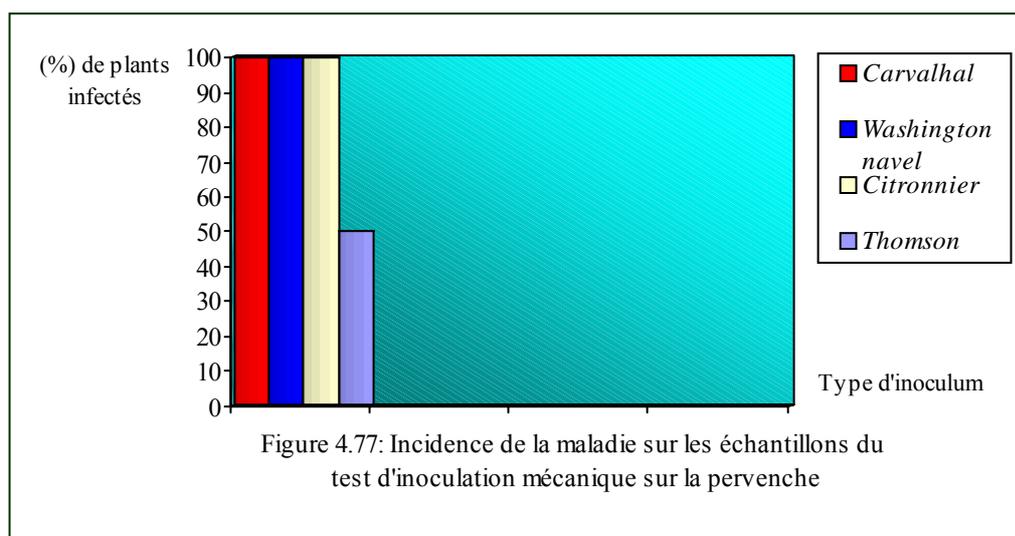
Les plantules de la pervenche ont extériorisé des symptômes variables en fonction du type d'inoculum utilisé. Ils s'agissaient des chloroses, jaunisses, jaunissement apical et latéral, déformation de feuilles, et des feuilles en cuillères. Les symptômes étaient sévères sur les pervenches inoculées par le *Citronnier*, *Washington navel*, *Carvalho* et *Thomson*, par contre celles inoculées par la *Clémentine* ont montré des symptômes modérés, et aucun symptôme n'a été extériorisé par les plantules inoculées par *Valencia late* et *Double fine*. Nous avons remarqué que les plants inoculés par les candidats de *Double fine* et *Valencia late* ont extériorisées des symptômes très faible sur le test d'indexage par contre aucun symptôme n'a été signalé chez les plantules de la pervenche, ce la peut être dû à la faible concentration de *S. citri* dans les échantillons utilisées comme source d'inoculum ou à sa faible multiplication dans la plante. Selon GARNIER et al [21], les *Spiroplasma*s n'existent qu'en faible concentration dans les plantes. Nos résultats sont semblables à ceux obtenu par BOVE en 1995 [21], GASPARICH en 2002 [21], et par DURET et al [21], en 2003 sur *C. roseus*.

4.4. Résultats de la sérodétection des échantillons du test de transmission mécanique par inoculation et indexage :

La plupart des plants de la pervenche et agrumes inoculés ont extériorisés des symptômes du stubborn, mais sur 66 plants d'agrumes testés, seulement 18 ont répondu positivement au test DAS-ELISA soit une incidence de 27,27% et sur 20 plants testés de la pervenche, seulement 10 étaient atteints de *S. citri* soit une incidence de 50% (figure 4.75). Sur un total de 86 échantillons testés uniquement 28 se sont révélés positifs ce qui a donné une incidence de 32,55%. Pour le test d'indexage (figure 4.76) nous avons obtenu 4 échantillons positifs sur 12 testés sur les plants inoculés par le *Citronnier* avec une incidence de 33,33%. Sur les plants inoculés par *Thomson* et *Washington navel* nous avons enregistré 2 échantillons positifs sur 4 testés, et 4 échantillons positifs sur 8 testés respectivement soit une incidence de 50%. Par contre sur les plants inoculés par *Clémentine* et *Double fine*, 2 échantillons ont été enregistrés positifs sur 10 testés ce qui a donné une incidence de 20%. Sur ceux inoculés par *Carvalho*, 2 échantillons ont été révélés positifs sur 6 échantillons testés ce qui a permis d'obtenir une incidence de 33,33%. Par contre sur 12 échantillons testés de *Valencia late* aucun résultat n'a été révélé positif. Sur les plants inoculés par *Madam vinous*, nous avons obtenu 2 échantillons

positifs sur 4 testés ce qui a permis de calculer une incidence de 50%. Pour les plantules de la pervenche (figure 4.77), nous avons obtenu une incidence de 100% sur les plants inoculés par *Carvalho*, *Citronnier* et *Washington navel* où nous avons enregistré 4 échantillons positifs sur 4 testés pour ceux de la *Carvalho* et 2 échantillons positifs sur 2 testés pour les plants inoculés par *Citronnier* et *Washington navel*. Sur *Thomson* 2 échantillons ont été obtenus positifs sur 4 testés ce qui a donné une incidence de 50%. Par contre sur les plants inoculés par *Double fine*, *Valencia late* et *Clémentine* aucun échantillon n'a été révélé positif.





4.4.1. Discussion :

L'absence de symptômes sur les plantules de la pervenche inoculées par la *Valencia late* et les faibles symptômes observés sur agrumes (*Madam vinous*) inoculés par cette variété a donné un résultat négatif par la DAS-ELISA pour les deux types d'inoculation, ce la peut être expliqué par la faible concentration de *S. citri* dans les plants sources d'inoculum ce qui a été obtenu par les résultats de la DAS-ELISA (5,88%) sur les échantillons de la *Valencia late* provenant de l'EURL de Hadjout. Les plants d'agrumes inoculés par les candidats de *Clémentine* et *Double fine* ont enregistré une incidence faible qui était de 20%, par contre sur la pervenche ont donné un résultat négatif, ce la peut être dû à la faible concentration de *S. citri* dans le jus d'extraction provenant de ces variétés destinées pour l'inoculation de la pervenche. Selon GARNIER et al [106], les *Spiroplasma* se trouvent à faible concentration dans les plantes ou peut être dus également à la faible multiplication du *Spiroplasma* dans la plante ce qui échappe à la détection par l'ELISA. Ce type de résultat a été obtenu également par BOVE [8], en Corse où des tests de détection par ELISA ont été effectués sur des plants de pervenches et agrumes infectés expérimentalement à partir des sources d'inoculation présentant des symptômes du stubborn.

L'inoculation par le *Citronnier*, *Washington navel*, *Carvalhal* et *Thomson* ont donné des incidences très élevées (33,33%, 50%, 33,33%, 50%) respectivement sur agrumes et (100%, 100%, 100%, et 50%) respectivement sur pervenche par apport aux autres types d'inoculum qui ont été révélés négatifs (*Double fine*, *Clémentine* et *Valencia*

late), cela nous a permis de conclure que la concentration du *S. citri* était très élevée dans les plants sources d'inoculum. Cette forte concentration a été confirmée par les résultats de la DAS-ELISA sur les échantillons de ces variétés provenant de différentes stations prospectées pour lesquelles nous avons enregistré 42,85% pour la *Carvalhal* du parc à bois de l'ITAFV-Boufarik, 33,33% du *Citronnier* provenant de la station expérimentale de Blida, 27,08% de *Washington navel* de la pépinière privée de Guerrouaou, 28,88% du *Thomson* de la station de Chebli et 33,33% du *Thomson* de la station de Benkhellil. Le test sérologique réalisé sur les plantes inoculées par *Madam vinous* a donné 2 échantillons positifs. Ce résultat montre que *S. citri* a été transmis et multiplié dans les plants indexés ce qui lui a permis l'extériorisation des symptômes du stubborn.

CHAPITRE 5

MESURES DE QUARANTAINE ET METHODES DE LUTTE CONVENTIONNELLES

5.1. Mesures de quarantaine concernant les échanges de matériel végétal entre différents pays :

Les échanges de matériel végétal entre différents pays doivent être rigoureusement contrôlés car ce matériel peut être porteur de cicadelles vectrices ou de *Phytoplasmes*. Le transport de plantes atteintes de phytoplasmoses dans un pays où ces maladies n'existent pas, mais où des vecteurs potentiels sont présents, est particulièrement dangereux. Des vecteurs connus peuvent être transportés avec le matériel végétal et introduit dans une nouvelle région. Mais des vecteurs alternatifs peuvent également être présents dans la région où le matériel contaminé sera introduit, et prendre le relais de la propagation à la place du vecteur principal [173].

5.2. Méthodes de lutte conventionnelles :

5.2.1. Sélection sanitaire, surveillance du matériel de départ : pieds-mères :

Les phytoplasmoses ne sont pas transmissibles par les semences, mais les parties végétatives contaminées peuvent être responsables de leur propagation, particulièrement dans le cas d'espèces ligneuses. La sélection sanitaire repose sur le choix de pieds-mères sains lorsque la multiplication s'effectue à partir d'organes végétatifs. Dans le cas de plantes greffées, la sélection sanitaire exige le choix de pieds-mères sains à la fois pour la production de scions et de porte-greffes, ce qui est particulièrement délicat car des pieds sans symptômes peuvent se révéler infectés s'ils ont été contaminés tardivement au cours de l'été précédent le prélèvement des greffons, alors que la maladie est encore en incubation. De plus, certains porte-greffes sont tolérants et fréquemment infectés. Ils se

comportent comme des porteurs sains et sont responsables de la propagation de maladies à *Phytoplasmes*, de sorte qu'une sélection sanitaire rigoureuse est indispensable [174].

5.2.2. Elagage de plantes malades :

Dans certains cas, l'élagage de branches malades dès l'apparition des premiers symptômes peut être recommandé [175].

5.2.3. Élimination des plantes-hôtes réservoirs :

L'élimination des plantes hôtes réservoirs et l'élimination des adventices par le nettoyage des jachères et des zones entourant les champs sont fortement conseillées et favorables au maintien d'un bon état sanitaire des plantes [173].

5.2.4. Surveillance de l'activité des vecteurs :

On ne connaît pas, à l'heure actuelle en Europe, de parasites naturels des cicadelles vecteurs du stubborn, ce qui exclut toute possibilité de lutte biologique [174].

5.2.5. Thermothérapie :

Un programme d'élimination des *Phytoplasmes* et des virus a été entrepris en Nouvelle-Zélande pour régénérer des variétés et des porte-greffes de poiriers introduits d'autres continents [176]. La thermothérapie s'est révélée efficace en Inde pour lutter contre les « pousses étroites » (*grassy shoot*) de la canne à sucre, phytoplasmoses qui constitue l'une des maladies les plus dangereuses pour cette espèce, avec des pertes de rendement pouvant atteindre 100 % [177]. La vapeur en milieu aéré [*aerated steam therapy (AST)*], à 50°C pendant une heure, ne suffit pas pour réduire la maladie de façon significative, tandis que le traitement à 52 °C, pendant la même durée, élimine complètement les *Phytoplasmes*, sans altération des bourgeons.

5.2.6. Prémunition :

La protection croisée, dont l'efficacité a été signalée dans le cas de la « prolifération du pommier » [178] et de « l'enroulement chlorotique de l'abricotier » [179], pourrait être étendue à d'autres *Spiroplasma*s responsables de maladies des arbres fruitiers contre lesquelles il n'existe pas actuellement de méthodes efficaces de lutte. Cependant, la prudence est de rigueur afin d'éviter la dissémination de porteurs sains.

5.3. Recherche de variétés résistantes ou tolérantes par sélection classique :

Les méthodes d'investigation permettent de distinguer entre résistance « vraie » à l'agent pathogène, différences de sensibilité des cultivars, résistance à l'insecte vecteur ou variation de l'appétence d'une plante pour les vecteurs [180]. La « tolérance » est utilisée dans la lutte contre les phytoplasmoses des essences fruitières, forestières, ornementales et aromatiques [181]. L'absence de symptômes, corrélée à une faible teneur en *Phytoplasmes*, pourrait être utilisée dans des programmes de sélection en l'absence de résistance vraie [182]. Les différences « d'attirance » de l'insecte vecteur envers la plante peuvent aussi être à l'origine des variations de sensibilité observées [174].

Les efforts de sélection doivent désormais prendre en considération la résistance ou la tolérance au *Phytoplasmes* et au *Spiroplasmes*, la répulsion à ses vecteurs, la qualité des essences produites et une bonne adaptation au milieu [183]. Ainsi, une sélection pourrait être effectuée parmi leurs descendances.

5.4. Génétique et physiopathologie :

5.4.1. Identification de gènes codant pour la résistance naturelle chez la plante :

Les efforts pour identifier et introduire des gènes codant pour la résistance naturelle aux *Spiroplasmes* chez la plante devront être poursuivis. Des programmes de sélection ont déjà été entrepris pour les arbres fruitiers, forestiers ou d'ornement. L'étude des porte-greffes présente un intérêt particulier dans le cas des arbres fruitiers. Il serait aussi intéressant de rechercher des sources de résistance chez des plantes sauvages proches des plantes cultivées.

5.4.2. Mécanismes intervenant dans la prémunition :

La nature de l'agent responsable de la prémunition, qui est transmissible par la greffe et persiste chez l'arbre fruitier, n'a pas encore été élucidée. Plusieurs hypothèses sont envisagées : présence d'une souche avirulente ou faiblement virulente du *Spiroplasme* responsable de la maladie ou association avec un *Spiroplasme* « atypique » (dont le rôle devrait être élucidé) qui atténuerait la virulence du *Spiroplasme* responsable de ces jaunisses. Ces mécanismes mériteraient d'être étudiés afin de développer des systèmes de protection croisée dans la lutte contre les phytoplasmoses chez d'autres arbres fruitiers [173].

5.5. Rôle des métabolites secondaires dans l'interaction entre plantes et *Spiroplasma* :

Les variations, chez la plante-hôte, sous l'effet des *Spiroplasma*s, de métabolites secondaires (polyphénols et polyamines comme la spermine, la spermidine et la putrescine), ont été étudiées [184]. L'apport de polyamines en culture *in vitro* de *C. roseus* entraîne une déformation et une agglutination des *Spiroplasma*s, et simultanément un développement moins rapide des symptômes de la maladie. Ces résultats suggèrent donc un rôle important de ces métabolites dans les interactions entre plantes et *Spiroplasma*s, en particulier dans les réactions de défense et dans les mécanismes de guérison de la plante. Cette voie de recherche, encore peu explorée dans le domaine des *Spiroplasma*s, mériterait sans doute une étude plus approfondie [173]. IGEWEGBE [185], en 1968 a découvert que la tétracycline supprime les symptômes du stubborn. Des plants infectés par le stubborn ont été guéris par leur croissance dans des solutions contenant 100 à 500 mg/ml de tétracycline -Hcl [141].

5.6. Interactions entre *Spiroplasma*s et hôtes (plante ou vecteur) :

L'exploration des interactions des *Spiroplasma*s avec leurs hôtes devra être considérée comme l'un des pôles de la recherche à venir [173].

5.7. Gènes intervenant dans la pathogénicité ou la transmissibilité :

L'expression différentielle de gènes est utilisée pour l'étude de la biologie des *Mollicutes* phytopathogènes dans différents environnements, plantes ou insectes vecteurs. Les gènes des *Mollicutes* transcrits seulement dans les plantes pourraient être liés aux phénomènes de pathogénicité, alors que ceux transcrits seulement sur insectes pourraient être reliés à la transmissibilité. L'identification de gènes exprimés dans des souches de *Mollicutes* pathogènes ou transmissibles, mais non dans des mutants non pathogènes ou non transmissibles, pourrait conduire à déceler des produits ou des fonctions liés à ces deux principales activités: pathogénicité des *Mollicutes* ou transmissibilité par les insectes vecteurs [186].

5.8. Protéine membranaire majeure des *Mollicutes* et gènes régulateurs :

La protéine majeure de la surface des *Mollicutes* joue un rôle important dans les phénomènes de reconnaissance, d'invasion et de pathogénicité envers les cellules de l'hôte.

Ces phénomènes d'adhérence ont été étudiés dans le cas de la reconnaissance entre les *Mycoplasmata* stricto sensu et leurs hôtes animaux [187]. La présence d'épitopes majeurs à la surface des cellules de *Phytoplasmas*, spécifiques de chaque espèce, suggère que les protéines membranaires en cause jouent un rôle clé dans les interactions spécifiques du *Phytoplasme* avec son hôte. L'adhésion aux cellules de l'hôte intervient dans le transfert à travers les barrières de l'insecte.

5.9. Connaissance du génome entier des *Spiroplasmata* :

La connaissance du génome entier permettra de progresser dans la compréhension des fonctions des différents gènes de *Spiroplasmata*. L'utilisation de l'électrophorèse en champ pulsé permet de séparer la totalité de l'ADN chromosomique d'un *Spiroplasmata* de celui de la plante-hôte [188]. L'ADN ainsi obtenu n'étant pas en quantité suffisante, il convient de le digérer complètement avec un enzyme de restriction et de le cloner dans des vecteurs appropriés (chromosome artificiel de bactéries ou cosmides [*bacterial artificial chromosome* (BAC)] [173].

5.10. Introduction de gènes de résistance par manipulation génétique :

5.10.1. Introduction de résistances à l'agent pathogène par manipulation génétique :

Le but poursuivi est ici d'introduire dans le génome de la plante, des gènes codant pour des molécules capables d'interférer avec la multiplication du *Spiroplasma*. Les anticorps dirigés contre les épitopes de la protéine membranaire des *Spiroplasma* inhibent leur développement et les gènes codant pour la production d'anticorps dirigés contre cette protéine sont à l'étude. Des manipulations génétiques de ces anticorps afin de les faire exprimer dans la plante ont connu des succès divers (échec dans le cas du maïs infecté par *Spiroplasma kunkelii* [189], succès dans le cas du « stolbur » sur tabac [190]. Il est important en la matière d'utiliser des promoteurs qui déterminent l'expression de la protéine au niveau du phloème, site de la multiplication des *Spiroplasmata*. Il convient toutefois de maintenir la diversité génétique tant au niveau des variétés qu'à celui des porte-greffes dans le cas des arbres fruitiers et de la vigne.

5.10.2. Introduction de résistances au vecteur par manipulation génétique :

La lutte contre les insectes vecteurs de *Spiroplasmata* par manipulation génétique peut être envisagée sous différents aspects. La recherche de gènes intervenant dans les

interactions entre insectes vecteurs et *Mollicutes* a été entreprise en vue de les utiliser comme cibles pour des manipulations génétiques destinées à déclencher la résistance. Dans le cas de *S. citri* des mutations naturelles entraînent la perte de motilité et de transmission par insectes vecteurs. Les gènes liés à ces différents phénotypes ont été isolés et sont en cours de caractérisation [191]. Mais il conviendra encore d'éviter les risques liés à la monoculture des clones transformés.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'agrumiculture occupe une place importante dans l'économie du pays, mais cette culture a subi une diminution du point de vue qualité et quantité du fait de la propagation de nombreuses maladies grave en plus du vieillissement des arbres. Parmi ces affections, le stubborn qui est classé en deuxième position après la tristeza peut causer des pertes allant de 50 à 100%. Les prospections ont été effectuées au niveau de 6 stations agrumicoles de la région de la Mitidja : Station de Chebli, station de Benkhellil, pépinière privée de Guerrouaou, station expérimentale d'agronomie de Blida, EURL de Hadjout, et Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik. Les symptômes observés étaient très caractéristiques et très fréquent sur la plupart des variétés prospectées (Balai de sorcière sur *Citronnier* de l'ITAFV-Boufarik et la station expérimentale d'agronomie de Blida, feuilles en cuillères, chloroses plus ou moins sévère et balai de sorcière sur *Thomson* de la station de Chebli et la station de Benkhellil et sur *Carvalhal* de l'ITAFV-Boufarik, feuilles en cuillères et chloroses sur *Clémentine*, *Double fine* et *Valencia late* de l'EURL de Hadjout avec présence de jaunissement apicale de jeunes pousses sur *Double fine* et *Valencia late* et balai de sorcière sur *Valencia late*. Par contre dans la pépinière de Guerrouaou des feuilles en cuillères abondante ont été observés sur *Washington navel* et *Bigaradier*.

L'étude sérologique en DAS-ELISA entreprise sur le *S. citri* des agrumes a permis de confirmer la présence du Stubborn dans les différentes stations (station de Chebli, pépinière privée de Guerrouaou, l'EURL de Hadjout, station expérimentale de Blida, Parc à bois de l'ITAFV- Boufarik, et station de Benkhellil) avec une incidence de 27,19%. La transmission de *S. citri* par inoculation sur *C. roseus* et par greffage sur agrumes (*Madam vinous*) a permis l'extériorisation des symptômes typiques du stubborn (feuilles en forme de cœur, en cuillère, et arrondies, des chloroses plus ou moins sévères, prolifération des bourgeons axillaires et raccourcissement des entre-nœuds) avec un taux de transmission de 50% sur les pervenches et 56,36% sur agrumes. Des échantillons provenant de cette

gamme d'hôte ont été testés en DAS-ELISA. Ce test a donné des résultats positifs avec une incidence de 32,55%. Le résultat positif obtenu par la DAS-ELISA dans le Parc à bois de l'ITAFV-Boufarik et dans la pépinière privée de Guerrouaou (Soumaa) présente un réel danger vu la destination de ces derniers (multiplication et production).

Les maladies à *Mollicutes* concernent de nombreuses plantes, dans le monde entier. Il n'existe aucun moyen de lutte efficace contre les *Mollicutes* phytopathogènes tel que *S. citri*, et l'incidence dans les plantes ligneuses est donc très élevée. La détection précoce de ces agents est nécessaire dans les programmes de certification. La détection et l'identification précoce, la connaissance des insectes vecteurs et des plantes réservoirs peut permettre d'établir une lutte raisonnée contre ces agents pathogènes. L'identification des bases génétiques de la résistance naturelle des plantes, de la pathogénicité et de la transmissibilité, la connaissance du génome des *Spiroplasma*s, constitueront des pôles de recherches futures.

L'agrumiculteur doit prendre en considération certaines recommandations qui devraient être appliqués pour ne pas contribuer à l'introduction ou à la dissémination de la maladie. Il est donc sensé d'éliminer les plantes hôtes réservoirs, surveiller le matériel de départ (pieds-mères) destinés à la multiplication, utiliser des porte-greffes qui ont subi le traitement par thérapie thermique, élaguer les branches malades dès l'apparition des premiers symptômes et utiliser des variétés connues par leur résistance ou tolérance à la maladie.

En Algérie, des études approfondies doivent être centrées sur la connaissance de nos ressources génétiques dont le potentiel n'est certainement pas épuisé, aussi sur le génie génétique pour l'obtention des espèces d'agrumes tolérantes au stubborn.

Notre travail a tenté de contribuer de collecter certaines données sur l'état des vergers agrumicoles algériens. Il serait important de poursuivre les recherches afin de bien connaître le *S. citri* du stubborn, son comportement et la souche présente en Algérie.

APPENDICE A
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide desoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomale
ARNt	: Acide ribonucléique de transfert
°C	: Degree celçus
<i>CSD</i>	: <i>Citrus Stubborn Disease</i>
CV	: Cultivars
DAS-ELISA	: Anticorps polyclonaux-ELISA
D.O	: Densité optique
EDTA	: Ethylendiaminotétracide
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EURL	: Entreprise Unité à Responsabilite Limité
FAO	: Food Agricultural Organisation
G+C	: Guanine+Cytosine
Ha	: Hectares
ITAFV	: Institut Technique d'Arboriculture Fruitières et de Vigne
Kb	: Kilo base
Kda	: Kilo Dalton
Kpb	: Kilo paire de bases
<i>MLO</i>	: <i>Mycoplasma-like-organisms</i>
Mpb	: Mega paire de bases
ORF	: Open Reading Frame
PBS-PVP-T	: Phosphate Buffer Saline- Polyvynilpyrrolidone- Tween
PBS-T	: Phosphate Buffer Saline-Tween
PNPP	: Paranitrophenylphosphate
Qx	: Quintaux

TAS-ELISA	: Triple Antibody Sandwich-ELISA
TM	: témoin malade
TS	: témoin sain
USA	: United States American
g/cm ³	: Gramme/Centimètre cube
h	: Heures
m	: Mètre
mg	: Milligramme
min	: Minutes
ml	: Millilitre
ml/l	: Millilitre /litre
mm	: Millimètre
mol %	: pourcentage en masse moléculaire
nm	: Nano mètre
pH	: potentiel hydrogène
μ	: Micron
μg	: Micro gramme
μl	: Micro litre
μm	: Micromètre
%	: pourcentage

APPENDICE B
LES SOLUTIONS TAMPONS

-Tampon de broyage 1x20 (référence 51804) :

Tampon de broyage standard, utilisé pour la majorité des réactifs des gammes maraîchage, grandes cultures, arboriculture et horticulture

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	2,9 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
NaN ₃	0,2 g
Polyvinylpyrrolidone:(PVP-PM:40.000)	10 g
qsp eau distillée 1 litre	
PHx20=6,4	
PHx1= 7,4	

-Tampon de lavagex20 (référence 51803) :

NaCl	8 g
Na ₂ HPO ₄	2,9 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Tween 20	0,5 ml
NaN ₃	0,2g
qsp eau distillée 1 litre	
PHx20=6,4	
PHx1= 7,4	

-Solution tampon phosphate 0,1M pH 7,4 :

Solution A : 0,05M

Phosphate dissodique (Na ₂ PO ₄)	3,750 g
Eau distillée	1000 ml

Solution B : 0,05M

Phosphate mono potassique (KH ₂ PO ₄)	1,425 g
--	---------

Eau distillée

1000 ml

Solution finale

Solution A

143 ml

Solution B

57 ml

Eau distillée

800 ml

APPENDICE C
RESULTATS DE LA DAS-ELISA

Plaque 1:

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				2,173
TS				0,009
1	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,110
2			-	0,000
3			-	0,000
4			+	0,113
5			-	0,000
6			-	0,000
7			-	0,001
8			-	0,000
9			-	0,003
10			+	0,186
11			+	0,127
12		<i>Thomson (PV)</i>	-	0,000
13			-	0,000
14			-	0,000
15			-	0,000
16			+	0,125
17			-	0,002
18			-	0,000
19			+	0,195
20			+	0,186
21			-	0,000
22			-	0,000
23	Hadjout	<i>Clémentine</i>	+	0,173
24			-	0,000
25		<i>Double fine</i>	-	0,000
26			-	0,000
27			+	0,156
28			-	0,000
29			-	0,000
30			+	0,134
31			-	0,000

32			-	0,000
33		<i>Bigaradier</i>	-	0,000
34		<i>Valencia late</i>	-	0,001
35			-	0,000
36			-	0,000
37			-	0,001
38			-	0,000
39	ITAFV-Boufarik	<i>Carvalho</i>	-	0,000
40		<i>Valencia late</i>	-	0,002
41		<i>Citronnier</i>	-	0,000
42			-	0,000
43	Chebli	<i>Thomson</i>	-	0,000
44			-	0,000
45			-	0,004
46			-	0,000
47			-	0,000
48			-	0,001
49	Guerrouaou	<i>Bigaradier</i>	+	0,113
50			+	0,129
51		<i>Washington navel</i>	-	0,000
52			-	0,001
53			-	0,000
54			+	0,163
55			-	0,000
56			-	0,000
57	Benkellil	<i>Thomson (GV)</i>	-	0,000

Plaque 2:

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				2,165
TS				0,009
58	Guerrouaou	<i>Washington navel</i>	-	0,000
59			-	0,002
60			+	0,123
61			-	0,000
62			-	0,000
63			-	0,000
64			+	0,145
65			-	0,000
66			-	0,003
67		<i>Clémentine</i>	-	0,000
68	Chebli	<i>Thomson</i>	+	0,183
69			+	0,176
70			+	0,149
71			-	0,000
72			-	0,001
73			+	0,193

74			-	0,000
75			-	0,000
76			+	0,162
77			+	0,171
78			-	0,001
79			-	0,001
80			+	0,122
81			-	0,000
82			-	0,000
83			+	0,151
84			+	0,153
85			-	0,001
86	Hadjout	<i>Citronnier</i>	+	0,127
87			+	0,148
88			+	0,134
89			-	0,001
90			-	0,000
91			-	0,002
92			-	0,000
93		<i>Clémentine</i>	+	0,137
94			-	0,000
95			+	0,194
96		<i>Double fine</i>	-	0,000
97			-	0,001
98			+	0,141
99			+	0,125
100			+	0,162
101			-	0,000
102			-	0,001
103			-	0,001
104			-	0,000
105		<i>Valencia late</i>	+	0,184
106			-	0,000
107			-	0,000
108			-	0,003
109			-	0,000
110			-	0,002
111		<i>Washington navel</i>	-	0,000
112			-	0,001
113			-	0,001
114	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,169

Plaque 3:

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				2,159
TS				0,009
115	Benkhellil	Thomson (GV)	+	0,137

116			-	0,000
117			-	0,001
118			-	0,001
119			-	0,000
120			+	0,171
121		<i>Thomson (PV)</i>	-	0,000
122			+	0,138
123	Chebli	<i>Thomson</i>	-	0,000
124			-	0,002
125			-	0,000
126			-	0,002
127			-	0,001
128			-	0,000
129			-	0,001
130			-	0,000
131			+	0,165
132			+	0,163
133			-	0,000
134	Hadjout	<i>Double fine</i>	+	0,175
135			+	0,191
136			+	0,186
137			-	0,000
138			-	0,001
139		<i>Valencia late</i>	-	0,001
140			-	0,002
141			-	0,000
142			-	0,004
143			-	0,000
144		<i>Clémentine</i>	-	0,003
145			-	0,000
146			-	0,001
147			-	0,002
148			+	0,129
149		<i>Washington navel</i>	-	0,000
150		Citronnier	+	0,184
151	Guerrouaou	<i>Washington navel</i>	+	0,136
152			+	0,147
153			+	0,195
154			-	0,000
155			-	0,001
156			-	0,000
157			-	0,001
158			-	0,001
169			-	0,000
160			+	0,122
161	ITAFV-Boufarik	<i>Washington navel</i>	-	0,001
162			-	0,000
163		<i>Citronnier</i>	-	0,002

164			-	0,001
165			-	0,004
166		<i>Double fine</i>	-	0,000
167		<i>Ortanique</i>	-	0,001
168		<i>Carvalhal</i>	+	0,153
169			-	0,000
170			-	0,000
171	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,000

Plaque 4:

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				2,169
TS				0,009
172	Guerrouaou	<i>Washington navel</i>	-	0,000
173			-	0,001
174			-	0,000
175			-	0,002
176			-	0,000
177			-	0,001
178			-	0,001
179			-	0,000
180			-	0,003
181			-	0,000
182			-	0,000
183			+	0,131
184			+	0,162
185			+	0,143
186			-	0,001
187			+	0,152
188			-	0,002
189			-	0,000
190			-	0,001
191			-	0,001
192			-	0,000
193			+	0,137
194			-	0,000
195			+	0,122
196		<i>Bigaradier</i>	-	0,000
197			-	0,000
198			-	0,000
199	ITAFV-Boufarik	<i>Carvalhal</i>	+	0,124
200			+	0,157
201			-	0,000
202		<i>Citronnier</i>	-	0,001
203			-	0,001
204	Chebli	<i>Thomson</i>	-	0,000
205			-	0,000

206			-	0,001
207			-	0,003
208			-	0,000
209			-	0,001
210			+	0,118
211			-	0,000
212			-	0,000
213			+	0,143
214	Hadjout	<i>Citronnier</i>	-	0,005
215			-	0,000
216		<i>Double fine</i>	-	0,004
217			-	0,000
218		<i>Clémentine</i>	-	0,001
219			-	0,000
220		<i>Valencia late</i>	-	0,000
221	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	-	0,003
222			-	0,000
223			-	0,002
224			-	0,001
225			-	0,000
226	Blida	<i>Citronnier</i>	+	0,197
227			-	0,000
228			-	0,004
229	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,183

Plaque 5:

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				0,170
TS				0,009
230	Chebli	<i>Thomson</i>	+	0,176
231			+	0,192
232			+	0,168
233			-	0,000
234			-	0,000
235			+	0,173
236			-	0,000
237			-	0,000
238			+	0,154
239			+	0,156
240			-	0,000
241			-	0,001
242			+	0,137
243			-	0,000
244			-	0,000
245			+	0,149
246			+	0,180
247			-	0,000

248	Hadjout	<i>Citronnier</i>	+	0,189
249			+	0,176
250			+	0,166
251			-	0,000
252			-	0,000
253			-	0,000
254			-	0,000
255		<i>Clémentine</i>	+	0,155
256			-	0,000
257			+	0,125
258		<i>Double fine</i>	-	0,000
259			-	
260			+	0,112
261			+	0,136
262			+	0,152
263			-	0,000
264			-	0,002
265			-	0,000
266			-	0,001
267		<i>Valencia late</i>	+	0,121
268			-	0,000
269			-	0,000
270			-	0,001
271			-	0,000
272			-	0,001
273		<i>Washington navel</i>	-	0,001
274			-	0,000
275			-	0,003
276	Guerrouaou	<i>Washington navel</i>	-	0,000
277			-	0,000
278			+	0,111
279			-	0,000
280			-	0,000
281			-	0,000
282			+	0,118
283			-	0,001
284			-	0,002
285		<i>Clémentine</i>	-	0,000
286	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,130

Plaque 6:

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				2,169
TS				0,009
287	ITAFV-Boufarik	<i>Carvalho</i>	-	0,000
288		<i>Valencia late</i>	-	0,003
289		<i>Citronnier</i>	-	0,000

290			-	0,001
291	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,170
292			-	0,000
293			-	0,000
294			+	0,169
295			-	0,000
296			-	0,002
297			-	0,001
298			-	0,000
299			-	0,000
300			+	0,137
301			+	0,164
302	Chebli	<i>Thomson</i>	-	0,000
303			-	0,001
304			-	0,000
305			-	0,005
306			-	0,001
307			-	0,000
308	Guerrouaou	<i>Bigaradier</i>	+	0,142
309			+	0,137
310		<i>Washington navel</i>	-	0,001
311			-	0,000
312			-	0,000
313			+	0,158
314			-	0,000
315			-	0,001
316	Benkhellil	<i>Thomson (PV)</i>	-	0,001
317			-	0,001
318			-	0,000
319			-	0,000
320			+	0,153
321			-	0,000
322			-	0,003
323			+	0,156
324			+	0,137
325			-	0,000
326			-	0,000
327	Hadjout	<i>Clémentine</i>	+	0,180
328			-	0,000
329		<i>Double fine</i>	-	0,002
330			-	0,000
331			+	0,123
332			-	0,000
333			-	0,000
334			+	0,129
335			-	0,000
336			-	0,000
337		<i>Bigaradier</i>	-	0,001

338		<i>Valencia late</i>	-	0,001
339			-	0,000
340			-	0,003
341			-	0,001
342			-	0,000
343	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,126

Plaque 7:

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				2,171
TS				0,009
344	Blida	<i>Citronnier</i>	-	0,000
345			+	0,134
346			-	0,000
347	Hadjout	<i>Clémentine</i>	-	0,001
348			-	0,002
349		<i>Valencia late</i>	-	0,002
350		<i>Double fine</i>	-	0,000
351			-	0,001
352		<i>Citronnier</i>	-	0,000
353			-	0,000
354	Chebli	<i>Thomson</i>	-	0,000
355			-	0,000
356			-	0,001
357			-	0,001
358			-	0,000
359			-	0,000
360			+	0,137
361			-	0,000
362			-	0,000
363			+	0,167
364	Guerrouaou	<i>Washington navel</i>	-	0,000
365			-	0,000
366			-	0,000
367			-	0,000
368			-	0,000
369			-	0,000
370			-	0,000
371			-	0,000
372			-	0,000
373			-	0,000
374			+	0,139
375			+	0,145
376			+	0,162
377			-	0,000
378			+	0,148
379			-	0,000

380			-	0,000
381			-	0,000
382			-	0,000
383			-	0,000
384			+	0,139
385			-	0,000
386			+	0,121
387		<i>Bigaradier</i>	-	0,000
388			-	0,000
389			-	0,000
390	ITAFV-Boufarik	<i>Carvalhal</i>	+	0,160
391			+	0,167
392			-	0,000
393		<i>Citronnier</i>	-	0,000
394			-	0,000
395	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	-	0,000
396			-	0,000
397			-	0,000
398			-	0,000
399			-	0,000
400	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	-	0,000

Plaque 8 :

Code	Site	Variété	Résultat	D.O
TM				2,169
TS				0,009
401	Guerrouaou	<i>Washington navel</i>	+	0,139
402			+	0,131
403			+	0,139
404			-	0,000
405			-	0,000
406			-	0,001
407			-	0,000
408			-	0,001
409			+	0,127
410	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,120
411			-	0,000
412			-	0,000
413			-	0,000
414			-	0,003
415			+	0,164
416		<i>Thomson (PV)</i>	-	0,000
417			+	0,119
418	Hadjout	<i>Double fine</i>	+	0,131
419			+	0,129
420			+	0,110
421			-	0,005

422			-	0,000
423		<i>Valencia late</i>	-	0,001
424			-	0,001
425			-	0,001
426			-	0,000
427			-	0,002
428		<i>Clémentine</i>	-	0,000
429			-	0,001
430			-	0,001
431			-	0,000
432			+	0,156
433		<i>Washington navel</i>	-	0,000
434		<i>Citronnier</i>	+	0,162
435	Chebli	<i>Thomson</i>	-	0,000
436			-	0,000
437			-	0,000
438			-	0,001
439			-	0,001
440			-	0,000
441			-	0,003
442			-	0,000
443			+	0,159
444			+	0,167
445			-	0,000
446	ITAFV-Boufarik	<i>Washington navel</i>	-	0,001
447			-	0,001
448		<i>Citronnier</i>	-	0,000
449			-	0,000
450			-	0,000
451		<i>Double fine</i>	-	0,000
452		<i>Ortanique</i>	-	0,004
453		<i>Carvalhal</i>	+	0,171
454			-	0,000
455			-	0,001
456	Benkhellil	<i>Thomson (GV)</i>	+	0,139

Plaque 9 :

Code	Gamme d'hôte	Type d'inoculum	Résultat	D.O
TM				2,170
TS				0,009
1	Pervenche	<i>Carvalhal</i>	+	0,153
2			+	0,142
3			+	0,136
4			+	0,165
5		<i>Citronnier</i>	+	0,149
6			+	0,158
7		<i>Washington navel</i>	+	0,139

8			+	0,137
9		<i>Thomson</i>	-	0,001
10			-	0,001
11			+	0,122
12			+	0,137
13		<i>Double fine</i>	-	0,000
14			-	0,000
15		<i>Valencia late</i>	-	0,001
16			-	0,000
17		<i>Clémentine</i>	-	0,001
18			-	0,000
19			-	0,000
20			-	0,000
21	Agrumes	<i>Citronnier</i>	-	0,001
22			+	0,256
23			+	0,134
24			-	0,002
25			-	0,000
26			+	0,180
27			-	0,001
28			-	0,001
29			-	0,001
30			+	0,153
31			-	0,000
32			-	0,001
33		<i>Thomson</i>	-	0,000
34			+	0,128
35			+	0,160
36			-	0,000
37		<i>Washington navel</i>	+	0,126
38			-	0,000
39			-	0,000
40			+	0,110
41			-	0,000
42			+	0,124
43			+	0,135
44			-	0,000
45		<i>Clémentine</i>	-	0,001
46			-	0,000
47			-	0,000
48			+	0,150
49			-	0,000
50			-	0,000
51			-	0,001
52			+	0,131
53			-	0,000
54			+	0,113
55		<i>Double fine</i>	-	0,000

56			+	0,124
57			-	0,000
58			+	0,111
59			-	0,000
60			-	0,000
61			-	0,001
62			-	0,000
63			-	0,000
64			-	0,000
65		<i>Carvalho</i>	+	0,130
66			-	0,000
67			+	0,120
68			-	0,000
69			-	0,001
70			-	0,000
71		<i>Valencia late</i>	-	0,000
72			-	0,000
73			-	0,000
74			-	0,000
75			-	0,000
76			-	0,000
77			-	0,000
78			-	0,001
79			-	0,001
80			-	0,000
81			-	0,000
82			-	0,000
83	Témoin malade	<i>Madam vinous</i>	-	0,001
84			+	0,141
85			-	0,000
86			+	0,138

APPENDICE D
PROTOCOLE DU TEST DAS -ELISA SELON
CLARK ET ADAMS [161]

Etape 1 : Fixation des anticorps (figure 3.2; 3.3).

Les anticorps ont été dilués au 1/100 dans le tampon de fixation juste avant utilisation.

Un volume de 100 µl / puit d'anticorps a été déposé dans la plaque de microtitration.

Incubation : 2 h à 37°C (les plaques sont couvertes avec un film plastique adhésif) (figure 3.4).

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN (figure 3.5).

Etape 2 : Dépôt des échantillons (figure 3.6)

Un volume de 100 µl / puit d'échantillons comprenant le témoin sain, et le témoin positif a été déposé dans la plaque de microtitration.

Incubation : 1 nuit à +2-8 (les plaques sont couvertes avec un film plastique adhésif).

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN

Etape 3 : Dépôt des anticorps conjugués (figure 3.7; 3.8)

Les anticorps conjugués ont été dilués au 1/100 dans le tampon conjugué juste avant utilisation.

Un volume de 100 µl / puit d'anticorps conjugués a été déposé dans la plaque de microtitration

Incubation : 2 h à 37°C (les plaques sont couvertes avec un film plastique adhésif).

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN.

Etape 4 : Dépôt du substrat

Le PNPP a été dissout dans le tampon de substrat juste avant utilisation. La concentration finale doit être de 1 mg/ml de PNPP (figure 3.9; 3.10).

Attendre la dissolution totale avant utilisation

Incubation : 30 min à 37°C puis à température ambiante

Lecture : 30 min, 1h et 2 h après dépôt du substrat

Lecture et interprétation :

Les densités optiques (DO) sont lues à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 405 nm (figure 3.11; 3.12; 3.13)

Solutions tampons :

Les protocoles des solutions tampons sont décrits en (Appendice B).

Calcul de l'incidence :

L'incidence de la maladie a été calculé comme suit :

$$I = \text{Nbre de plants positifs} / \text{Nbre de plants testés} \times 100$$

REFERENCES

1. Allaya, M., Lenquette, L., Pradeilles, M.N., Debabi, L., et Arfa, L., “Medagri, annuaire des économies agricoles”, Ian, C.I.H.E.A.M., I.A.M.M, (1995), 341-346.
2. Jacquemond, C., Curk, F., Zurru, R., Ezzoubir, D., Kabbage, T., Luro, F., et Ollitraut, P., “Les porte-greffes composants clef d’une agrumiculture durable”, Session3. La qualité dans le verger, (2002)
3. Anonyme, “L’agriculture dans l’économie nationale”, statistiques agricoles, ministère de l’agriculture, (2000), 48p.
4. Anonyme, “Note de conjoncture. Premier trimestre. Ministère de l’agriculture et du développement rural”, (2003), 1p.
5. Anonyme, “Statistiques agricoles, Ministère de l’agriculture et du développement rural”, (2004), 25p.
6. Khemiri, M., “Stubborn: Etiologie, Epidémiologie et diagnostic: Cours de protection intégrée des cultures fruitières méditerranéennes”, I. A. M, Bari, 000), 34p.
7. Kersting, U., Sengonca, C., and Cinar, A., “Detection of *Spiroplasma citri* in non-*Citrus* host plants and their associated leaf hopper vectors in Southern Turkey”, V. 40, n° 3, FAO. Plant. Prot. Bull, (1992), 89-94.
8. Bove, J.M., “Virus and virus-like diseases of *Citrus* in the Near East region”. Food and Agriculture Organisation of the united nations Rome, ed. Italy, Univ. Bordeaux, I.N.R.A, (1995).

9. Loussert, R., "Les agrumes", Ed. Baillière, J.B., Paris, (1985), 136p.
10. Loussert, R., "Les agrumes, arboriculture. Techniques agricoles méditerranéennes", ed. Lavoisier, Liban, V.1, (1989), 90p.
11. Praloran, J.C., "Les agrumes. Technique agricoles et production tropicales", ed. Maison neuve et Larose, France, (1971), 565p.
12. Zeman, V., "Una enfermedad nueva en los naranjales de covientes", *Physis*, (1931), 19: 410-411.
13. Derocca-Serra, D., Ollitrault, P., "L'amélioration des agrumes, les sources génétiques fruit", V. 47, n° 1, (1992), 50p.
14. Hodgson, W.R., Webber, J.H., "Horticultural varieties of *Citrus*", (1967), 431-591.
15. Loussert, R., "Les agrumes, arboriculture. Techniques agricoles méditerranéennes", ed. Lavoisier, V. 1, n° 2, (1987), 85P.
16. Anonyme, "L'agriculture dans l'économie nationale", Ministère de l'agriculture, (2002), 59p.
17. Anonyme, "Secrétariat de la CNUCED. D'après le données statistiques de l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation de l'agriculture", (2004), 7p.
18. Aubert, B., "Prospects for citriculture in South - East Asia by the year 2000", *EAO. Plant protec. Bull.* (1990), 151-174.
19. Rey, J.Y., "L'agriculture de la production agrumicole d'Afrique de l'Ouest et du centre", In: *Proceeding of the VISCN Congress, Marsh 1997, Montpellier, France*, ed. Cirad-Flhor, (1997).
20. Klotz, L.J., "Color Handbook of *Citrus* diseases", Univ. Calif. (1973), 121p.
21. Roistacher, C.N., "Graft transmissible diseases of citrus", *Handbook for detection and*

- diagnosis. Emeritus. Plant. Pathol. Univ. Calif. Ed. Novarro, L., C., International organization of *Citrus* virologists, (1991), 286p.
23. Blondel, L. "Compte rendu des travaux du VII^{ème} Colloque de la commission de technique agronomique du C.L.A.M", (Comité de liaison de l'agrumiculture méditerranéenne), I.N.R.A. France, (1974), 194p, 11-20.
 24. Fawcett, H.S., Perry, J.C., and Johnson, J.C., "The stubborn disease of *Citrus*", Calif. Citrogr. (1944), 29: 146-147.
 25. Bove, J.M., "Stubborn and its natural transmission in the mediterranean area and the Near East", F.A.O. Plant. Prot. Bull, (1986), 34 (1): 15-24.
 26. Bove, J.M., Fos, A., Lallemand, J., "Epidemiology of *Spiroplasma citri* in the Old World", J. Med Sci, (1987), 23 (6) : 663-666.
 27. Reichert, I., "Diseases, new to *Citrus*, found in Palestie", Phytopathology, (1930), 20: 999-1002.
 28. Chapot, H., Dellucchi, V.L., "Maladies, troubles et ravageurs des agrumes au Maroc", I.N.R.A, Rabat, (1964), 339p.
 29. Igwegbe, E.C.K., et Calavan, E.C., "Occurrence of *Mycoplasma*-like bodies in phloem of stubborn infected *Citrus* seedlings", Phytopathology, (1970), 60: 1525-1526.
 30. Lafleche, D., Bové, J.M., "*Mycoplasmas* dans les agrumes atteints de greening, de stubborn ou de maladies similaires", Fruits, (1970), 25: 455-465.
 31. Olsen, M., Matheron, M., Xiong, Z., "*Mycoplasma* disease: diseases of *Citrus* in Arizona. Stubborn disease", (2000), 925p
 32. Saglio P., L'hospital, M., Lafleche, D., Dupont, G., Bove, J. M., Tully, J. G., Freundt, E. A., "*Spiroplasma citri* gen. and sp. Nov. a *Mycoplasma*-like organisms associated with "stubborn" disease of *Citrus*". Int. J. Syst. Bacteriol. (1973), 23: 191-204

33. Bové, J.M., Saglio, P., Tully, J.G, Ann.Y. Acad. Sci. (1973), 225: 462-470
34. Bové, J.M., Saglio, P., Proc. 6th Conf. Inter. Organ. *Citrus* Virol. Univ. Calif. Div. Agr. Sci., Berkeley, (1974) , 50: 86-87.
35. Haas, A.R.C., Klotz, L.J., and Johnston, J.C., “A corn disease in oranges”, Calif. Citrogr. (1944), 29 (6): 148, 168-69.
36. Reichert, I., et Perlberger, J., “Little leaf disease of *Citrus* trees and its causes”, Hadar, (1931), 4: 193-194.
37. Chapot, H., “Une nouvelle maladie des agrumes dans le Moyen-Orient”. C.R. Soc. Sci. Nat. Phys. Maroc, (1956), 22(6): 99-105.
38. Chapot, H., “First studies on stubborn disease of *Citrus* in some mediterranean countries”, Ed. Wallace, J.M., Virus diseases, Riverside. Univ. Calif. (1959), 109-117.
39. Jamoussi, B., “Les viroses des *Citrus* en Tunisie et les moyens de lutte”. Ann. Inst. Nat. Recherche Agric. Tunisie, (1966), 39(2): 1-60.
40. Childs, J.F.L., “Observations on virus and other diseases of *Citrus* in Sudan”, (1964).
41. Bové, J.M., “*Citrus stubborn disease* in Syria and natural transmission of its causal agents *Spiroplasma citri*”, V. 34, n° 1, (1986), 60-68.
42. Anonyme, UNDP/FAO, “Fruit crop sanitation in the Mediterranean and Near East region: Status and requirements”, Ed. Taher, M., FAO, Rome, Italy, (1988), 105-112.
43. Cousin, M.T., Boudon-Padiou, E., “*Phytoplasmes* et phytoplasmoses: Caractéristiques, symptômes et diagnostic”, Cahiers d'études et de recherches francophones Agriculture. V. 10, n° 6, (Nov- Déc 2001), 361-376.
44. Campbell, B.C., Steffen - Campbell, J.D., Sorensen, J.T., Gill, R.J., “Paraphyly of *Homoptera* and *Auchenorrhyncha* inferred from 18S rDNA nucleotide sequences”,

- Syst. Entomol, (1995), 20 : 241-62.
45. Lemoine, J. “Maladies de dégénérescence des arbres fruitiers à pépins (pommier, poirier). Maladies à *Virus*, *Viroides*, *Phytoplasmes*”, I.N.R.A. Angers, (2000), 320p.
 46. Maramorosh, K., “Direct evidence for multiplication of *Aster yellow virus* in its insect vector”, *Phytopathology*, (1952), 59-64.
 47. Moreau, J.P., Cousin, M.T., Lacote, J.P., “Rôle du *Jasside Aphrodes bicinctus* (*SCHRK*) (*Homoptères Auchénorrhynques*) dans la transmission de jaunisses du trèfle blanc”, *Ann. Epiphyties*, (1968), 18 : 103-10.
 48. Bragard, G., “Cours de Phytopathologie, essai - montage en cours”, (2000), 298p
 49. Gasparich, G.E., “Frontiers in Bioscience. *Spiroplasmas*: Evolution, Adaptation and Diversity”, *Dep. Biol. Sci. Univ. Towson.*, V. 7, n° d, (2002), 619- 640.
 50. Gauriveaud, P., Laigret, F., Bove, J.M., “Insusceptibility of members of the class *Mollicutes* to rifampin: Studies of the *Spiroplasma citri* RNA polymerase beta-subunit gene. *Antimicrob Agents Chemother*”, (Apr 1996) , 40 (4): 858-62
 51. Joffin, J.N., “Classification de la classe des *Mollicutes* ; *Mollicutes* (*Mycoplasmes*)”, *Bactériol. Syst.* (2004), 59-63.
 52. Whitcomb, R. F, Williamson, D.,L., Gasparich, G.E., Tully, J. G., French, F.E., “*Spiroplasma* taxonomy, First Internet Conference on Phytopathogenic *Mollicutes*”, (1998), 45: 63-91.
 53. Euzeby, J.P., “ Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire, *Spiroplasma*, systématique”, (1998).
 54. Williamson, D.L., Whitcomb, R.F., Tully, J.G., Gasparich, G.E., Rose, D.L., Carle, P., Bové, J.M., Hackett, K.J., Adams, J.R., Henegar, R.B., Konai, M., Chastel, C., and French, F.E., “ Riverside group classification of the genus *Spiroplasma*”, *J. Syst. Bacteriol.* (1998), 48:1-12.

55. McCoy, R. E., Caudwell, A., Chang, C. J., Chen, T. A., Chiykowski, L. N., Cousin, M. T., Dale, J. L., DeLeeuw, G. T., Golino, D. A., Hackett, K. J., Kirkpatrick, B. C., Marwitz, R., Petzold, H., Sinha, R. C., Sugiura, M., Whitcomb, R. F., Yang, I. L., Zhu, B. M., and Seemüller, E., "Plant diseases associated with *Mycoplasma-like organisms*", Ed. Whitcomb, R. F., and Tully, J. G., *The Mycoplasmas*, Acad. Press, Inc., N.Y, V. 5, (1989), 545-640.

56. Seemüller, E., Garnier, M. and Schneider, B., "*Mycoplasmas* of plants and insects", Ed. Razin, S., and Herrmann, R., *Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas*. Kluwer. Acad. Plenum Pub. N.Y, (2002), 91-115.

57. Seemüller, E., Marcone, C., Lauer, U., Ragozzino, A., and Göschl, M., "Current status Of molecular classification of the *Phytoplasmas*", *J. Plant. Pathol.* (1998), 80:3-26.

58. Bové, J.M., "Les bactéries phytopathogènes de la sève élaborée: Nouvelle vision sur Les relations plantes / micro-organismes", *C.R. Acad. Agric. Fr.* (2000), 86: 37-39.

59. Garnier, M., Foissac, X., Gauriveaud, P., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C., et Bove, J.M., "*Mycoplamses*, Plantes insectes vecteurs : un ménage à trois", *C.R. Acad. Sci. Paris*, (2000), 324 : 923-928.

60. Wolf, M., Muller, T., Dandekar, T., Pollack, J.D., "Phylogeny of *Firmicutes* with special reference to *Mycoplasma (Mollicutes)* as inferred from phosphoglycerate kinase aminoacid sequence data", *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2004), 54 (3): 871-875.

61. Andre, A., Mac cheroni, W., Doignon, F., Garnier, M., Renaudin, J., "Glucose and Trehalose *PTS* permeases of *Spiroplasma citri* probably share a single II A domain, enabling the *Spiroplasma* to adapt quickly to carbohydrate changes in its environment", UMR Genomic Developpment et pouvoir pathogène, IBVM, centre INRA, Bordeaux. Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Séquençage Microbiology 149, (2003), 2687-2696.

62. Calavan, E.C., and Bove, J.M., "Ecology of *Spiroplasma citri*. In: *The Mycoplasmas*",

Ed. Whitcomb, R. F., Tully, J.G., Acad. Press, (1989), CA 37-64

63. Cole R. M., Tully, J. G., Popkin, T. J., and Bove, J. M., "Morphology, ultrastructure, and bacteriophage infection of the helical *Mycoplasma-like* organism (*Spiroplasma citri* gen. nov., sp. Nov) cultured from "stubborn" disease of *Citrus*", J. Bacteriol. (1973), 115: 367-386
64. Davis, R. E., Worley, J. F., Whitcomb, R. F., Ishijima T., and Steere R. L., "Helical filaments produced by a *Mycoplasma-like* organism associated with *Corn stunt disease*", Science, 1972, 176: 521-523
65. Davis R. E., and Worley, J. F., "*Spiroplasma*: motile, helical microorganisms associated with *Corn* stunt disease", Phytopathology, (1973), 63: 403-408
66. Roistacher, C.N., "The cachexia and xyloporosis diseases of *Citrus* - a review; *Citrus tatterleaf virus*: further evidence for a single virus complex", In Proc. 10th Conf IOCV, Riverside, Univ. Calif, (1998), 116-124p; 353-359p.
67. Skerman, V.B.D., McGowan, V., and Sneath, P.H.A. "Approved lists of bacterial names", J. Bacteriology, (1980), 30: 225-420
68. Young, J.M., Saddler, G.S., Takikawa, Y., De Boer, S.H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R.I., and Stead, D.E., "Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995", Rev. Plant Pathol. (1996) 75: 721-763
69. Budbury, J.F., "*Spiroplasma citri*, description of fungi and bacteria", n° 1045, CAB international, Waling ford, Royaume-Unis, (1991), 49.
70. Anonyme, "International committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Mollicutes*: Revised minimum standards for descriptions of new species of the class *Mollicutes* (Division *Tenericutes*)", J. Syst. Bacteriol. (1995), 45: 605-612
71. Razin, S., Tully, J.G., "Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmology", ed. Acad. Press, V. 1, N. Y, (1983).

72. Williamson, D. L., Whitcomb R. F., Tully, J. G., “The *Spiroplasma* deformation test, a new serological method”, *Curr. Microbiol.* (1978), 1: 203-207
73. Williamson, D. L., “The combined deformation metabolism inhibition test”, *Meth. Mycoplasmol.* (1983), 1: 477-483
74. Williamson, D. L., Tully, J. G., Whitcomb, R. F., “Serological relationships of *Spiroplasmas* as shown by combined deformation and metabolism inhibition tests”, *J. Syst. Bacteriol.* (1979), 29: 345-351
75. Tully, J. G, Rose, D. L Clark, E., Carle, P., Bove, J. M., Henegar, R. B., Whitcomb, R. F., Colflesh, D. E., and Williamson, D. L., “ Revised group classification of the genus *Spiroplasma* (class *Mollicutes*), with proposed new groups XII to XXIII”, *J. Syst. Bacteriol.* (1987) , 37: 357-364
76. Woese, C. R., “Bacterial evolution”, *Rev. Microbiology*, (1987) , 51: 221-271
77. Woese, C.R., “Prokaryotic systematics, the evolution of science”, *The prokaryotes*, 2nd edition, Ed. Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, T.M., Schleifer, K-E., Springer-Verlag, N. Y, (1991), 3-18
78. Grau, O., Laigret, F., Carle, P., Tully, J. G., Rose, D. L., and Bove, J. M., “Identification of a plant-derived mollicute as a strain of an avian pathogen, *Mycoplasma iowae*, and its implications for mollicute taxonomy”, *J. Syst. Bacteriol.* (1991), 41: 473-478
79. Artiushin, S., Duvall, M., and Minion, F. C., “Phylogenetic analysis of *Mycoplasma* strain ISM1499 and its assignment to the *Acholeplasma oculi* strain cluster”, *J. Syst. Bacteriol.* (1995), 45: 104-109
80. Weisburg, W. G., Tully, D. L., Rose, J. P., Petzel, H., Oyaizu, D., Yang, L., Mandelco, J., Sechrist, T. G., Lawrence, J. V, Etten, J., Maniloff, J., and Woese, C. R., “A phylgenetic analysis of the *Mycoplasmas*: Basis for their classification”, *J. Bacteriol.* (1989), 171: 6455-6467

81. Maniloff, J., “Phylogeny of mycoplasmas”, In: “Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis”, Ed. Maniloff, J., McElhane, R.N., Finch, L.R., and Baseman, J.B., American. Soc. Microbiol. Washington, (1992), 549-559
82. Stackebrandt, R., and Goebel, B. M., “Taxonomic note, a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology”, J. Syst. Bacteriol. (1994), 44: 846-849
83. Whitcomb R. F., Bove, J. M. Chen, T. A. Tully, J. G., Williamson, D. L., “Proposed criteria for an interim serogroup classification for members of the genus *Spiroplasma* (class *Mollicutes*)”, J. Syst. Bacteriol. (1987), 37: 82-84
84. Whitcomb R. F, Tully, J. G., Clark, T. B., Williamson, D. L. , Bové, J. M., “Revised serological classification of *Spiroplasmas*, new provisional groups and recommendations for serotyping of isolates”, Curr. Microbiol. (1982), 7: 291-296
85. Saillard, C.,and Bové, J. M., “Application of ELISA to *Spiroplasma* detection and classification”, Meth. Mycoplasma. (1983), 1: 471-476
86. Smith, M., Mc Namara, D.G., Scott, P.R., and Haris, K.M., “Les maladies de quarantaine de l’Europe (quarantine pests for Europe)”, 1992.
87. Bové, J.M., Garnier, M., “Recent developpment in phloem-restricted wall-less bacteria of *Citrus*: Candidates *Phytoplasma aurantiifolia* and *Spiroplasma citri*, two *Mycoplasma* plants pathogen”, Fruit, (1997), 52: 349-359.
88. Igwegbe, E.C.K., and Calavan, E.C., “ Occurrence of *Mycoplasma-like* bodies in phloem of stubborn infected *Citrus* seedlings”, Phytopathology, (1970), 60: 1525-1526.
89. Lafleche, D., Bove, J.M., “*Mycoplasmas* dans les agrumes atteints de « greening », de « stubborn » ou de maladies similaires”, Fruits, (1970), 25 : 455-465.

90. Garnier, S.M., "The international organization for Mycoplasmaology", (2003), 32: 254-258.
91. Markham, P.G., Townsen, D., "Transmission of *Spiroplasma citri* to plant", In: Coll. Inst. Nat. Santé. Rech. Méd. Les *Mycoplasmes. Mycoplasmas*. Ed. Bové, J.M., and Duplan, J.F, INSERM, Paris, France, (1974), 201-206.
92. Bové, J.M., Whitcomb, R.F., and McCoy, R.E., "Culture technique for *Spiroplasma* from plants", In: *Methods in Mycoplasmaology*". Ed. Tully, J.G, et Razin, S., Acad. Press, N. Y, (1983), 225-234
93. Garnier, M., Clerc, M., and Bové, J.M., "Growth and division of *Spiroplamsas*: Morphology of *Spiroplasma citri* during growth in liquid medium", J. Bacteriol. (1981), 147 (2): 642-652.
94. Razin, S., Hasin, M., Ne'eman, Z., and Rottem, S., "Isolation, chemical composition, and ultrastructural features of the cell membrane of the *Mycoplasma-like- organism, Spiroplasma citri*", J. Bacteriol. (1973), 116 (3): 1421-1435.
95. Bové, J. M., Renaudin, J., Saillard, C., Foissac, X., and Garnier, M., "*Spiroplasma citri*, a plant pathogenic *Mollicute*: Relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector", Annu. Rev. Phytopathol. (2003), 41: 483-500.
96. Trachtnberg, S., Andrews, S.B., and Leapman, R.D., "Mass distribution and spatial organization of the linear bactriol motor of *Spiroplasma citri* R8A2", J. Bacteriol. (2003), 185 (6): 1987-94.
97. Bowyer, J.W., Calavan, E.C., *Phytopathology*, (1974), 64: 346-349.
98. Freeman, B.A., Sissenstein, R., Mc Manus, T.T., Woodward, J.E., Lee, I.M., and Mudd, J.B., "Lipid composition anlipid metabolism of *Spiroplasma citri*", (1976), 125 (3): 946-954.
99. Laura , B., Regassa, L.B., Kimberly, M. S., April, C.M., Frank, E.F., Tao, I., Whitcomb, R.F., "Differentiation of group VIII *Spiroplasma* strain with sequences of

- the 16S 23Sr DNA intergenic spacer region”, *Can. J. Microbiol., Rev. Can. Microbiology. Univ. Chicago*, (2005), 50 (12): 1061-1067.
100. Bové, J.M., “Wall-less *Prokaryotes* of plants”. *Annu. Rev. Phytopathol.* (1984), 22: 361-396.
101. Whitcomb, R.F, Chen, T.A., Williamson, D.L., Liao, C., Tully, J.G., Bové, J.M., Mouches, C., Rose, D.L., Coan, M.E., and Clark, T.B., “*Spiroplasma kunkelii* sp. nov. characterization of the etiological agent of *Corn stunt disease*, *J. Syst. Bacteriol.* (1986), 36:170-178.
102. Saillard, C., Vvignault, J.C., Bové, J.M., Raie, A., Tully, J.G., Williamson, D.L., Fose, A., Garnier, M., Gadeau, A., Carle, P., and Whitcomb, R.F., “*Spiroplasma phoeniceum* sp”, *Nov Syria.* 37 (2) : 106-115. *Sci. Tech. Languedoc*, (1987, 318p.
103. Wroblewski, H., Johansson, K. E., and Hjerten, S., “Purification and characterization of spiralin, the main protein of the *Spiroplasma citri* membrane”, *Biochim. Biophys. Acta*, (1977), 465: 275-289.
104. Bové, J. M., Foissac, X., and Saillard, C., “Spiralins, Subcellular biochemistry, Mycoplasma cell membrane”, Ed. Rottem, S., and Kahane, I. Plenum. Press, N.Y, V. 20, (1993), 203-223
105. Foissac, X., Bové, J. M., and Saillard, C., “Sequence analysis of *Spiroplasma phoeniceum* and *Spiroplasma kunkelii* spiralin genes and comparison with other spiralin genes”, *Curr. Microbiol.* (1997), 35: 240-243.
106. Garnier, M., Boutareaud, A., Bové, J., M., Carle, P., Danet, J.L., Foissac, X., Gaurivaud, P., Jagoueix, E.S., Laigret, F., Renaudin, J., and Saillard, C., “Pouvoir pathogène des *Mollicutes*: du modèle *Spiroplasma citri* aux *Phytoplasmes*”, 12^{ème} colloque sur les recherches fruitiers. Les apports de la biologie moléculaires en arboricultures fruitières, Bordeaux, (30-31 mai 2002), 3p.
107. Gadeau, A., Mouches, C., and Bové, J.M., “Resistance of *Mollicutes* to rifampicin”, In 4th Int. Cong. Int. Organ. Mycoplasmology, Tokyo, (Sept 1982), 127 p.

108. Le Dantec, L., Bove, J.M., and Saillard, C., “Gene organization and transcriptional analysis of the *Spiroplasma citri* rps B/ tsf/ X operon”, INRA. Univ. Segalen, France, (1998), 37 (4): 249-73.
109. Chevalier, C., Saillard, C., and Bové, J. M., “Organization and nucleotide sequences of the *Spiroplasma citri* genes for ribosomal protein S2, elongation factor Ts, spiralin, phosphofructokinase, pyruvate kinase, and an unidentified protein”, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire, I.N.R.A, France. J. Bacteriol. (May 1990), 172 (5): 2693–2703
110. Duret, S., Berho, N., Danet, J.L., Garnir, M., Renaudin, J., “Spiralin is not essential for helicity, motility, or pathogenicity but is required for Efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematoceps*”, Applied and Environmental Microbiology, U.M.R Génomique Développement et Pouvoir Pathogène, IBVM, INRA Bordeaux, France, (October 2003), V. 69, n° 10, 6225-6234
111. Oldfield, G.N., “Ecological association of *Spiroplasma citri* with insects, plants and other plant *Mycoplasmas* in the Western Unites States”, (175-191). In: *Mycoplasma* diseases of crops. Basic and applies aspects, Ed. Maramorosch, K., Raychaudhuri, S.P., N. Y, (1988), 260p.
112. Melcher, U., “Genomes *Spiroplasma*”, Department of Biochemistry and Molecular Biologie at Oklahoma State. Curr. Research. in Ulrich melcher’s Lab, Univ, Stilwater, (1999), 405-744.
113. Maillet, P.L, Gouranton, J., “Étude du cycle biologique du *Mycoplasme* de la phyllodie du trèfle dans l'insecte vecteur, *Euscelis lineolatus* Brullé (*Homoptera, Jassidae*) ”. J. Microscop. (1971), 11: 143-62.
114. Berg, M., Melcher, U., Fletcher, J., “Characterization of *Spiroplasma citri* adhesion related protein SARP 1, which contain a domain of novel family designated Sarpin gene”, (2001), 275 (1): 57-64.

115. Yu, J., Wayadande, A.C., and Fletcher, J., “*Spiroplasma citri* surface protein P89 implicated in adhesion to cells of the vector *Circulifer tenellus*”, *Phytopathology*, (2000), 90: 716-722.
116. Garnier, M., Boutareaud, A., Bové, J.M., Carle, P., Danet, J.M., and Foissac, X., Gauriveaud, P., Jagoueix-Eveillard, S., Laigret, F., Renaudin, J., Saillard, C., “Pouvoir pathogène des *Mollicutes*: Du modèle *Spiroplasma citri* aux *Phytoplasmes*”, (2001), 89: 589-599
117. Myoung-Ok, K., Wayadande, A.C., and Jacqueline, F., “*Spiroplasma citri* Movement Into the intestines and salivary glands of its leafhopper vector, *Circulifer tenellus*”, *Dep. Entomol. Plant. Pathol. Univ. Oklahoma State, Stillwater, Phytopathology*, (1999), 89: 1144-1151.
118. Lherminier, J., Prensier, G., Boudon-Padieu, E., Caudwell, A., “Immunolabeling of grapevine flavescence dorée *MLO* in salivary glands of *Euscelidius variegatus*: a light and electron microscopy study”, *J. Histochem. Cytochem.* (1990), 38: 79- 85.
119. Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E., “Presence of attachment sites accounting for recognition between "Flavescence dorée" *MLO* and its leafhopper vector”. *IOM. Letters* (1994), 3: 283.
120. Liu, H.Y., Gumpf, D.J., Oldfield, G.N., and Calavan, E.C., “The relationship of *Spiroplasma citri* and *Circulifer tenellus*”, *Phytopathology*, (1983), 73: 585-590.
121. Rana, G.L., Kaloostian, G.H., Oldfield, G.N., Granett, A.L., Calavan, E.C., Pierce, E.D., Lee, I.M., and Gumpf, D.J., “Acquisition of *Spiroplasma citri* through membranes by homopterous insects”, *Phytopathology*, (1975), 65: 1143- 1145.
122. Bové, J.M., Nhami, A., Saillard, C., Vignault, J.C., Mouches, C., Garnier, M., Moutous, G., Fos, A., Bonfils, J., Abassi, M., Kabbage, K., Hafidi, B., et Viennot, G., “Présence au Maroc de *Spiroplasma citri*, l’agent causal de la maladie du stubborn des Agrumes dans les pervenches (*Vinca rosea L.*) implantées en bordure d’orangeries malades et contamination probable du chiendent (*Cyodon dactylon L. Pers.*) par *Spiroplasma*”, *C.R. Acad. Sci. Ser. D.* (1979), 288 : 399-402.

123. Duret, S., Danet, J.L., Garnier, M., and Renaudin, J., "Gene disruption through homologous recombination in *Spiroplasma citri*: An *Scm1* disrupted motility mutant is pathogenic", *J. Bacteriol.* (1999), 181: 7449-7456.
124. Gaurivaud, P., Danet, J. L., Laigret, F., Garnier, M., and Bové, J.M., "Fructose utilization and pathogenicity of *Spiroplasma citri*", *Mol. Plant. Microbe. Int.* (2000), 13: 1145-1155.
125. Chambaud, I., Wroblewski, H., and Blanchard, A., "Interactions between *Mycoplasma* lipoproteins and the host immune system", *Trends Microbiol.* (1999), 7: 493-499.
126. Krause, D.C., "*Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: Unraveling the tie that binds", *Mol. Microbiol.* (1996), 20:247-253.
127. Razin, S., Yogeve, D., and Naot, Y., "Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*", *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (1998), 62: 1094-1156.
128. Wieslander, A., and Rosén, M., "The cell membrane and transport", Ed. Razin, S., and Herrmann, R., "Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*", Kluwer, Acad. Plenum. Pub. N.Y, (2002), 131-16
129. Barbara, D. J., Morton, A., Clark, M. F., and Davies, D. L., "Immunodominant membrane proteins from two *Phytoplasmas* in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region", *Microbiology*, (2002), 148: 157-167.
130. Berg, M., Davies, D. L., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C., and Seemüller, E., "Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation *Phytoplasma*, and expression and characterization of the gene product", *Microbiology*, (1999), 145: 1937-1943.
131. Blomquist, C. L., Barbara D. J, Davies, D. J., Clark, M. F., and Kirkpatrick, B. C., "Cloning and characterization of a major membrane protein of the X-disease

- Phytoplasma*”, *Microbiology*, (2001), 147:571-580.
132. Yu, Y.L., Yeh, K.W., and Lin, C.P., “An antigenic protein gene of a *Phytoplasma* associated with sweet potato witches broom”, *Microbiology*, (1998), 144: 1257-1262.
 133. Ye, F., Laigret, F., Whitley, J.C., Citti, C., Finch, L.R., Carle, P., Renaudin, J., and Bové, J.M., “Aphysical and genetic map of the *Spiroplasma citri* genome. Nucleic Acid”, *Res. Oxford Univ. press*, (1999), V. 20, n° 7, 1559-1565
 134. Calavan, E.C., and Carpenter, J.B., *California Citrograph*, (1965), 50: 86-87, 96: 98-99.
 135. Calavan, E.C., *Pro. Ist. Inter. Citrus Symp. 3. Univ. Calif. Riverside*, (1969), 1403-1412.
 136. Carpenter, J.B., Calavan, E.C., and Christiansen D.W., *Plant. Dis. Repr.* (1965), 49: 668-672
 137. Klotz, L.J., Calavan, E.C., and Weathers, L.G., *Calif. Agr. Exp. Sta. Ext. Circ*, (1972), 559, 42p.
 138. Klotz, L.J., “Color Handbook of *Citrus* diseases”, *Univ. Calif.* (1973), 121p.
 139. Whiteside, J.O., Garnsey, S.M., and Timmer, L.W., “Compendium of *Citrus* disease”, *APS. Press*, (1988), 80p.
 140. Menge, J.A., and Ohr, H.D., *Plant pathol. Citrus stubborn disease*”, *UC . Riverside*, (2001), 783p.
 141. Calavan, E.C., and Gumpf, D.J., “Studies on *Citrus stubborn disease* and its agent, les *Mycoplasmes, Mycoplasma*”, 2^{ème} colloque. I. N. S. R.M. (11-17 Sep 1974), V. 33, 181-186.
 142. Clark, J. K., “Statewide, integrated Pest Management Program”, *Agric. Nat. Ress, Univ. Calif.* (2003), 421p.

143. Bové, J.M., “Epidemiology of *Spiroplasma citri* in the old world”, In Proc. 10th Conf. IOCV, Riverside, (1988), 295-299.
144. Fos, A., Bové, J.M., Ali, Y., Brun, D., et Vogel, R., “La cicadelle *Neoliturus haematoceps* est le vecteur de *Spiroplasma citri* en Méditerranée”, Ann. Institut. Pasteur, Microbiol. (1986), 137: 97-107.
145. Wittmer, W., and Buttiker, W., “*Fauna of Saudi Arabia*”, Basle, Switzerland, Pro Entomologica”, Nat. Hist. Mus, V. 3, (1979-1981).
146. Saillard, C., Vvignault, J.C., Gadeau, A., Carle, P., Garnier, M., Fos, A., Bové, J.M., and Whitcomb, R.F., “Discovery of new plant-pathogenic, *Spiroplasma*”, Med. Science, (1984), 20: 1013-1015.
147. Oldfield, G.N., Kaloostian, C.H., Pierce, H.D., Calavan, E.C., Granett, A.L., and Blue, R.L., “Beet leaf hopper transmits *Citrus stubborn disease*”, Calif. Agric, (1976), 30:15
148. Kaloostian, G.H., “Leafhopper, natural vector of *Citrus stubborn disease*”, Calif. Agric, (1975), 29 (2): 14-15.
149. Kaloostian, G.H., “Leafhopper transmits disease to weed host”, Citrogr, (1976), 61 (11): 389-390.
150. Smith, I.M, McNamara, D.G., Scott, P.R., and Holderness, M., “List of A2 pests regulated as quarantine pests in the EPPO region”, CABI International, Wallingford, UK: EPPO/CABI Quarantine Pests for Europe, 2nd edition, (Nov, 2005), 1425p.
151. Calavan, E.C., “Stubborn: In description and illustration of virus and *Virus-like diseases of Citrus*”, Ed. Bové, J.M., Secto-IRFA, Paris, France, (1980), 422p.
152. Clark, M.F., Fleggy, C.L., Bar-Joseph, M., and Ruttem, S., “The detection of *Spiroplasma citri* by Enzyme-Linked- Immunosorbent – Assay (ELISA)”, Phytopathology, (1978), 92: 332-337.

153. Kersting, U., Sengonca, C., and Cinar, A., "Detection of *Spiroplasma citri* in non-*Citrus* host plants and their associated leaf hopper vectors in Southern Turkey", FAO. Plant. Prot. Bull, V. 40, n° 3, (1992), 89-94.
154. Van Regenmortel, M.H.V, and Burckard, J., "Detection of a wide spectrum of *Tobacco mosaic virus* strains by indirect enzyme immunoassay (ELISA)", Virology, (1980), 106: 327-334.
155. Alaux, C., "Le Immuno-Empreinte de détection virale", Phytoma, (1994), 490: 17-19.
156. Berling, A., "La détection des *Potyvirus* par la méthode ELISA", Phytoma, défense des végétaux (1991), 27p.
157. Devergne, J.C., "Possibilités actuelles des tests immuno enzymatiques à la détection des agents phytopathogènes des végétaux", 2^{ème} Congrès de la S..F.P. Montpellier, (1990), 34p.
158. Dunez, J., "Application des techniques immuno-enzymatiques à la détection des Agents phytopathogènes des végétaux. La méthode ELISA", Ann. Phytopathol. (1977), 9(2) : 219-221
159. Ardoin, P., "Virus et diagnostic virologique", Ed. Malouine, Paris, (1983), 997p.
160. Saillard, C., "Application of ELISA to the detection of *Spiroplasma citri* in plants and insects", In Proc, 8th Conf. IOCV. Riverside, (1980), 145-152.
161. Clark, M.F., and Adams, M.R., "Characteristic of microplate methods of enzymes immunosorbent assay of the detection of plant virus", J. Gen. Virol, (1977), 34: 475-483.
162. Lister, R.M., and Rochow, W.F., "Detection of *Barley yellow dwarf* by enzyme linked immunosorbent assay", Phytopathology, (1979), 69: 649-654.

163. Vogel, R., and Bové, J.M., “La nouvelle technique d’indexation de la cachexie-xyloporose, son utilisation en Corse”, (1976), 70p.
164. Oualhadj, A., Taguemount, M., Identification de quatre maladies de dégénérescence chez le genre *Prunus* dans le parc à bois de Tessala El-Merdja de Boufarik, Mém. Ing. Agro. Univ. Tizi-ouzou, (1996), 60p.
165. Calavan, E.C., Roistacher, C.N., and Christiansen, D.W., “Distribution of *Stubborn disease virus* in trees of *Citrus sinensis* and *Citrus paradisi* at different seasons”, In Proc. 4th Conf. IOCV, Gainesville, Univ. Fla.Press, (1968), 145-153.
166. Calavan, E.C., Roistacher, C.N., and Naver, E.M., “Thermotherapy of *Citrus* for Inactivation of certain viruses plant disease”, (1972), 110p.
167. Bertaudeau, J., “Atlas d’arboriculture fruitière”. Ed. Lavoisier, V. 1, (1992), 6-40.
168. Olsen, E.O., and Rogers, B., “Plant Dis”, Repr. (1969), 53: 45-49
169. Fudl-Allah, A.E.-S.A., and Calavan, E.C., *Phytopathology*, (1973), 63: 256-259
170. Martelli, G.P., “Virus and *Virus like disease* of grape vine in Algeria”, Rapport to the government of Algeria, F.A.O, Rome, (1985), 53p.
171. Bové, J.M., “*Mycoplasma* infections of pants”, *J. Mes. Sci*, (1981), 17: 572-585.
172. Bové, J.M., Saillard, C., Vignault, J.C., and Fos, A., “*Citrus stubborn disease* in Iraq and Syria: correlation between symptom expression and detection of *Spiroplasma citri* by culture and ELISA”, In *Proc. 9th Conf. IOCV*, Riverside, Univ. Calif, (1984), 145-152
173. Cousin, M.T., et Boudon-Padieu, E., “*Phytoplasmes* et phytoplasmoses : vecteurs, méthodes de lutte et thèmes de recherche”, *Cahiers d’études et de recherches francophones, Agricultures, I. N. R. A. Laboratoire de phytoparasitologie, Équipe Phytoplasmes*, France V. 11, n° 2, (Mars-Avril 2002), 115-26

174. Boudon-Padieu, E., "Grapevine phytoplasmas", First. Int. Conf. on Phytopathogenic *Mollicutes*, (1999), 456p.
175. Cousin, M.T., "Witches broom: A *Phytoplasma* disease of poplar", Ed. Raychaudhuri, S.P., Maramorosch, K., Forest Trees and Palms, diseases and control. Leban, New Hampshire, Etats-Unis. Sci. Pub. (1996), 267-83.
176. Wood, G.A., "Viruses and phytoplasma in European pear trees in New Zealand and the role of these pathogens in the compatibility of pear with quince rootstocks", New Zealand, J. Crop. Hort. Sci. (1997), 25: 333-40.
177. Kunze, L., "The effect of different strains of apple proliferation on the growth and Crop of infected trees", Mitt. Biol. Bundesamt Land-Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, (1976), 170: 107-15.
178. Castelain, C., Chastelière, M.G., Jullian, J.P., Morvan, G., and Lemaire, J.M., "La Prémunition contre l'enroulement chlorotique de l'abricotier", Bilan de dix années d'observation sur huit vergers, Phytoma, (1997), 493 : 39-44.
179. Mc Coy, R.E., Howard, F.W., and Tsai, J.H., "Lethal yellowing of palms", Univ. Fl IFAS Agric. Exp. Stn. Tech. Bull. (1993), 834: 1-100.
180. Carraro, L., Loi, N., Ermacora, P., and Osler, R., "High tolerance of European plum varieties to plum leptonecrosis", European. J. Plant. Pathol. (1998), 104: 141-5.
181. Guo, Y.H., Cheng, Z.M., Walla, J.A., and Zhang, Z., "Large-scale screening for X-Disease *Phytoplasma* infection in chokecherry", Hort. Sci. (1998), 33: 293-5.
182. Cousin, M.T., and Moreau, J.P., "Yellow decline of Lavandin (Hybrid *L. Officinalis* x *L. Latifolia*): A MLO (*Mycoplasma-like organism*) disease, Symptoms, experimental transmission, ultrastructural studies, role of leafhoppers, methods of control", Ed. Raychaudhuri, S.P., Recent Advances in Medicinal, Aromatic and Spice Crops. New Delhi, India, (1991), 1: 59-62.
183. Musetti, R., Pressaco, L., Vighi, C., Favali, M.A., and Torrigiani, P., "Secondary

- metabolites in *Phytoplasma-infected plants*”, First. Int. Conf. on *Phytoplasma Mollicutes*, (1999)
184. Igewegbe, E.C.K., Ph. D. dissertation, Univ. Calif. Riverside, (1970), 106p.
185. Rascoe, J., Melcher, U., and Fletcher, J., “Arbitrarily primed PCR of cDNA for determination of differential gene presence and expression among lines of *Spiroplasma citri*”, *Phytopathology*, (1998), 88 (suppl. 9): S75.
186. Razin, S., “*Mycoplasma adherence*”, *The Mycoplasmas*, Ed. Razin, S., Barile, M., N.Y. Acad. Press, Inc, V.4, (1985), 160-202.
187. Neimark, H., and Kirkpatrick, B.C., “Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic *Mycoplasma-like organisms*”, *Mol. Microbiol.* (1993), 7: 21-8.
188. Chen, Y.D., and Chen, T.A., “Expression of engineered antibodies in plants: a possible Tool for *Spiroplasma* and *Phytoplasma* disease control”, *Phytopathology*, (1998), 88: 1367-71.
189. Le Gall, F., Bové, J.M., and Garnier, M., “Engineering of a single-chain variable-fragment (*scFv*) antibody specific for the *Stolbur Phytoplasma (Mollicute)* and its expression in *Escherichia coli* and tobacco plants”, *Appl. Env. Microbiol.* (1998), 64: 4566-72.
190. Foissac, X., Danet, J.L., and Saillard, C., “Mutagenesis insertion of tn 4001 into the genome of *Spiroplasma citri*: Characterization of mutants affected in plant pathogenicity and transmission to the plant by the leafhopper vector *Circulifer haematoceps*”, *Mol. Plant. Microbiol. Interact.* (1997), 10: 454-61.
22. البرنامج الإرشادي للحمضيات. إعداد مديرية مكتب الحمضيات. قسم الإعلام. مديرية الإرشاد الزراعي. الجمهورية العربية السورية. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. رقم النشرة 440. الطبعة الثانية (2000)