

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

MEMOIRE DE MAGISTER

SPECIALITE : PHYTOPATHOLOGIE

ETUDE DU VIRUS DE LA PSOROSE : IDENTIFICATION
BIOLOGIQUE ET IMMUNO- ENZYMATIQUE DAS -ELISA
DE Citrus Psorosis Ophiovirus (CPsV) SUR AGRUMES

Par

Khalissa FELKAI

Devant le jury composé de :

Z.HOUMANI	Professeur, USD. Blida	Présidente
H. BELKAHLA	Professeur, USD. Blida	Promotrice
H.HACENE	Professeur, USTH. Bab- Ezzouar	Examineur
A.GUENDOUCHE	Maître de conférence, USD. Blida	Examinatrice

Blida, 2008

RESUME

Citrus Psorosis Virus (CPsV) est l'une des principales maladies à virus des agrumes transmissibles par greffage qui représente une grave menace pour les régions agrumicoles. Le virus a été détecté pour la première fois en Floride, puis signalé dans plusieurs pays du monde. La détection de CPsV a fait l'objectif de notre travail qui a consisté à identifier ce virus sur 13 variétés d'agrumes. Des prospections ont été effectuées au niveau de 6 stations à savoir : l'EURL Semiani et l'EURL Bourkiza à Hadjout , l'EURL Kerfa à Bourkika ,l'EURL Regueyegue à Boufarik, ferme Belounja à Tipaza et la station expérimentale d'agronomie à Blida. Les contrôles par le test biologique par indexage, transmission mécanique par greffage et par le test immuno-enzymatique(DAS- ELISA) a porté sur des échantillons prélevés de chaque station. Les résultats de la DAS- ELISA ont révélé la présence de CPsV pour les différentes stations prospectées avec une incidence de 59,74% ce qui confirme la présence de la psorose en Algérie. Des symptômes caractéristiques de la psorose ont été extériorisés par les plants d'agrumes greffés et indexés. L'analyse sérologique du test biologique (greffage et indexage) était positive ce qui confirme la présence du virus et la transmission de (CPsV) par greffage.

Mots clés: agrumes; ophiovirus; CPsV ; psorose ; citrus ; indexage greffage ; DAS ELISA

ABSTRACT

Psorosis is one of major graft-transmissible diseases of citrus the virus was reported to occur in Florida, then it was announced in several countries of the world. The main objective of our study was to detect and identify of CPsV In 13 varieties of citrus prospecting were carried out through 6 pilot farms (Blida agricultural farm, EURL Semiani , EURL Bourkiza, EURL Kerfa in Hadjout ,EURL Regueyegue in Boufarik, farm Belounja . The control by biological test and double antibody sandwich ELISA (DAS ELISA) effected on all samples take-in station .The results of serological test DAS- ELISA was positif in the different prospected farms with an incidence of 59,74% confirming the psorosis presence in Algeria. Characteristically symptoms of psorosis have showed by the indexed seedling and grafted. The result also showed that the serological analysis of the biological test (indexing and graft) was positif that confirms the graft drive.

Key words: citrus; ophiovirus, CPsV, psorosis citrus, indexing, graft, DAS ELISA

ملخص

إن مرض (البسروز) من أهم الأمراض التي تصيب الحمضيات و الذي ينتقل عبر عيون التطعيم و يعتبر خطر يهدد مناطق الحمضيات و لقد اكتشف لأول مرة في فتوريدا ثم تم الإشارة بيه في الكثير من بلدان العالم .الهدف الرئيسي من دراستنا هو كشف و تشخيص وجود فيروس (البسروز) في تسعة أصناف من الحوامض و أجريت الدراسة في ستة محطات (مؤسسة سي سمياني و بوركيزة ذات مهام المحدودة بحجوط مؤسسة رقيق ببوفاريك مؤسسة كرفة ذات مهام محدودة ببورقيقة و مزرعة بلونجة بتبازة و المحطة التجريبية للفلاحة بالبليدة) و قد استخدمت الطريقة المصلية "حاس يليزة " و الطريقة البيولوجية في الكشف عن وجود الفيروس و فحص التنقل الميكانيكي عن طريق التطعيم . أظهرت الطريقة المصلية "حاس اليزة " نتائج ايجابية حيث أثبتت عن وجود فيروس (البسروز) في مختلف لمحطات بنسبة %59,74المفحوص .

أعراض متميزة جدا للمرض ظهرت على شجيرات الحمضيات المطعمة.نتائج الفحص المصلي الذي اجري على الشجيرات المطعمة أعطى نتائج ايجابية و أكدت هذه النتائج عن ميكانيكية انتقال الفيروس عن طريق التطعيم

TABLE DES MATIERES

RESUME	12
REMERCIEMENTS.....	12
TABLE DES MATIERES.....	12
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	12
INTRODUCTION	12
1. PRESENTATION DE LA PLANTE HOTE.....	14
1.1. Généralités et origine des agrumes dans le monde.....	14
1.2 .Principaux Porte- greffes utilisés en culture d'agrumes.....	15
2. DONNEES SUR LE CITRUS PSOROSIS VIRUS.....	18
2.1. Origine et distribution géographique de la psorose.....	18
2.2. Position taxonomique de la psorose.....	18
2.2.1. Caractéristique du genre Ophiovirus.....	18
2.3. Caractérisation moléculaire de CPsV	21
2.3.1. Nature du génome.....	21
2.3.2. Transcription.....	21
2.3.3. Réplication.....	22
2.3.4. Organisation du génome.....	22
2.4. Mode de transmission.....	23
2.4.1 Transmission par greffage.....	23
2.4.2. Transmission par semence.....	23
2.4.3. Transmission par vecteur.....	23
2.5. Plante hôte de la psorose.....	24
2.6. Symptomes de CPsV.....	24
2.7. Variabilité de CPsV.....	26
2.7.1. Variabilité symptomatologique.....	26
2.7.2. Variabilité sérologique.....	26
3. MATERIELS ET METHODES.....	32
3.1. Stations prospectées.....	32
3.2.Méthodes d'échantillonnage.....	34
3.3.Conservation de la source d'inoculum.....	35
3.4.Sero- détection du virus de la psorose.....	35

3.4.1. Test immuno –enzymatique.....	35
3.4.2. Extraction du virus.....	37
3.4.3. Anticorps utilisés.....	38
3.4.4. Protocole ELISA.....	39
3.5. Détection biologique du virus de la psorose.....	41
3.5.1. Plante indicatrices.....	41
3.5.2. Méthode du test d'indexage.....	42
3.6. Transmission mécanique.....	43
3.6.1. Gamme d'hôte.....	43
3.6.2. Méthode du test de greffage.....	44
4. RESULTATS ET DISCUSSION.....	
4.1. Distribution des symptômes et impact de la maladie de la psorose dans les différentes stations prospectées	45
4.1.1. Symptômes observés durant la campagne 2004/2005.....	55
4.1.2. Symptômes observés durant la campagne 2005/2006.....	52
4.2. Résultats de la détection sérologique	57
4.3. Résultats de la détection biologique par indexage.....	63
4.4. Résultats de la transmission mécanique de <i>CPsV</i>	66
4.5. Résultats de la détection sérologique des échantillons du test d'indexage	69
4.6. Résultats de la détection sérologique des échantillons du test de la transmission mécanique.....	69
CONCLUSION.....	74
APPENDICE.....	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure2.1	Distribution géographique de la maladie de la psorose dans le Monde [24]	19
Figure2.2	Etude du groupe ophiovirus[25]	20
Figure2.3	Préparation partiellement épurée de CPsV montrant des particules deux de tailles (grandes et petites flèches). Barre = 100 nm. [38]	21
Figure 2.4	Schéma du génome de CPsV [33][35][46][47][48]	23
Figure2.5	L'examen de sections de racines et de sol provenant d'arbres infectés par psorose[66]	24
Figure2.6	Ecaillage de l'écorce typique de la psorose –A sur Oranger en Californie [69][67][24]	28
Figure2.7	Ecaillage de l'écorce sur oranger [69][67][24]	28
Figure2.8	Coloration du bois dans une coupe transversale [67]	28
Figure2.9	Ecaillage d'écorce sur pomelo [69][67][24]	28
Figure2.10	Effets létaux de la psorose sur un arbre au Mexique [24]	29
Figure 2.11	Symptômes de tache annulaire sur feuille de Washington navel [73] [67][24]	30
Figure2.12	Taches chlorotiques sur jeunes feuilles causées par la psorose après inoculation par greffage. [73] [67][24]	30
Figure2.13	Symptômes de tache annulaire sur fruit d'un oranger navel sur Observé sur champ [67] [24]	31

Figure2.14	Symptômes de tache annulaire sur fruit d'oranger [74] [75][67]	31
Figure 3.1	Principe du test ELISA [1].	35
Figure 3.2	Plan d'une plaque ELISA	38
Figure 3.3	Plants d'agrumes destinées au test d'indexage	42
Figure3.4	Plants d'agrumes destinés à l'inoculation par greffage	44
Figure4.1	A droite : feuille saine, a gauche : Eclaircissement des nervures de double fine del' eurl semiani	48
Figure4.2	A droite : plant sain, a gauche : Symptôme d'écaillage sur le tronc de Washington navel de L'EURL Semiani	48
Figure4.3	A droite : feuille saine, a gauche petites taches (Pin point spotting) sur feuille de citronnier de l' EURL Semiani	49
Figure4.4	Desquamation du tronc et gaufrage sur Feuille de bigaradier de la l'EURL semiani	49
Figure 4.5	A droite plant sain, à gauche Panachure réticulée et frisolée , gaufrage et distortion sur Hamlin de la ferme Beloundja	50
Figure4.6	A droite : feuille saine, à gauche : Nervures vertes et froissement des feuilles satsuma dans l'EURL Regueyegue	50
Figure4.7	sévérité de CPsV sur les variétés d'agrumes (Campagne 2004/2005)	51
Figure4.8	: Ecaillage et sécrétion de gomme sur tarocco dans la l'EURL regueyegue	54
Figure4.9	A droite : tache annulaires vertes sur fruit de satsuma à gauche fruit sain de l'EURL Regueyegue	54
Figure4.10	A droite plant sain ; A+B écaillage avec sécrétion de gomme sur tronc et même branche de Hamlin au niveau de la ferme Beloundja	55
Figure4.11	A droite : feuille saine, à gauche : taches annulaire avec Un gaufrage des feuille de Thomson dans l'EURL kerfa	55

Figure4.12	Sévérité de CPsV sur les variétés d'agrumes (campagne 2005/2006)	56
Figure 4.13	Evaluation de la présence de la psorose sur agrume	60
Figure4.14	A droite : plant sain a gauche : taches annulaires sur une partie du limbe, et un gaufrages des feuilles inocule par salustiana	64
Figure 4.15	A droite : plant sain a gauche : symptômes de petites plage claires sur une partie du limbe (inocule par pamplemousse)	64
Figure 4.16	a : Feuille saine, b+c : symptômes de type chloroses foliaires inoculé par Tarocco	65
Figure 4.17	A droite : plant sain, a gauche : décoloration du limbe entre les nervures secondaires et même sur les nervure principale et un rétrécissement de la surface du limbe(Inoculé par double fine)	65
Figure 4.18	a+b : tache annulaire sur une partie du limbe sur Le plant greffe sur bigaradier ; c : feuille saine	67
Figure4.19	a+b feuilles déformées avec un léger gaufrage c : feuille saine	67
Figure4.20	a : taches annulaire sur la totalité du limbe C : feuille saine	68
Figure4.21	De petites plages claires sur les feuilles accompagnées D'un gaufrage du limbe.	68
Figure4.22	Incidence de la maladie sur les échantillons issus du test d'indexage	73
Figure4.23	Incidence de la maladie sur les échantillons issus du test de greffage	73
Tableau1.1	Présentation des principaux porte greffes utilisés en culture d'agrumes [22].	17
Tableau4.1	Incidence de CPsV durant la campagne 2004/2005	58
Tableau4.2	Incidence de CPsV: durant la campagne 2005/2006	59
Tableau4.3	Incidence de CPsV sur échantillons de fleurs	62
Tableau4.4	Résultats de la DAS- ELISA obtenu pour les échantillons	70

issus du de l'indexage	
Tableau4.5 Résultats de la DAS-ELISA obtenu pour les échantillons	72
issus du test de greffage	

REMERCIEMENTS

L'expression de mon entière gratitude et mes plus vifs remerciements vont d'abord à ma promotrice. BELKAHLA .H PROFESSEUR à l'université de Blida d'avoir accepté la direction de ce travail et de m'avoir dirigé et aidé pour ses précieux conseils qui m'ont jamais fait défaut. Je la remercie pour ses encouragements et la confiance qu'elle m'a si gentiment accordée.

C'est avec un grand honneur que j'adresse mes vifs remerciements et mon profond respect aux membres du jury, ont bien voulu accepter d'honorer de leur présence et d'examiner mon travail :

- **Z.HOUMANI**
- **H.HACENE**
- **A.GUENDOUZE**

Un merci tout spécial aussi à ma famille et en particulier mes chers parents qui m'ont donné la force et le courage de continuer sur ce chemin.

Enfin, que toutes les personnes, qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, trouvent ici l'expression de ma gratitude et de ma sympathie.

INTRODUCTION

Les agrumes représentent la première catégorie fruitière en terme de valeur à faire l'objet d'un commerce international [1]. Le terme agrume recouvre différents type de fruit et de produits dérivés bien que les oranges soient le principal représentant de cette catégorie avec environ 70% des agrumes produits, le groupe inclut également d'autres fruits tels que les mandarines, les clémentines, les citrons, ainsi que les pamplemousses...etc. Les agrumes sont produits dans différents pays à travers le monde, bien que la production soit principalement concentrée dans certaines zones géographique, les pays du bassin Méditerranéen constituent la première région productrice de fruit frais [2].

La production agrumicole mondiale 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.

Les agrumes sont confrontés à des virus endémiques et à d'autres qui émergent, parmi ces virus, certains peuvent avoir des conséquences graves tel que la *tristeza*, *stubborn* et la *psorose*. Cette dernière est l'une des plus importantes maladies virales transmise par le greffage [6] [7], qui reste un doute pour l'agrumiculture; du fait de sa large répartition dans le monde en agissant à la fois sur le rendement et sur la longévité des plants, son infection peut produire une destruction des plants atteints [8].

En Algérie, les travaux de recherche sur ce sujet sont restreints et peu d'études ont été conduites d'une manière rigoureuse. La présence de la psorose a été signalée sur plusieurs variétés d'agrumes [9] [10] [11] [12], des symptômes sévères de la psorose écailleuse ont été observés sur Valencia Late, Thomson navel à Boufarik, et sur Clémentine à la Ferme Blanche (Oued Fodda) [13].

Le but de notre étude était de confirmer la présence de CPsV en Algérie par :

- La sero-détection de CPsV par la technique DAS- ELISA des échantillons de feuilles et de fleurs pour 14 variétés : (une variété de *Citronnier eureka* et 9 variétés d'oranger ; *Valencia Late*, *Thomson navel*, *Washington navel*, *Double fine*, Portugaise, Hamlin, salustiana, Sanguine, Pamplemousse et satsuma) et 2 variétés de mandarinier (*Clémentine*, *Tarocco*) et 2 variétés de portes greffe (*Poncirus trifoliata* et bigaradier) provenant des différentes prospections effectuées dans les stations agrumicoles. Station expérimentale d'agronomie de Blida, EURL Semiani, EURL Bourkiza à Hadjout, EURL Regueyegue à Boufarik, ferme Beloundja Tipaza et l'EURL KERF à Bourkika.

- la bio- détection de CPsV par la technique de l'indexage des échantillons de rameaux provenant des différentes stations prospectées.

- l'évaluation de l'efficacité de la transmission de CPsV par greffage des échantillons provenant des stations prospectées.

CHAPITRE1

PRESENTATION DE LA PLANTE HOTE

1.1. : Généralités et origine des agrume dans le monde:

Le mot "agrumes" est d'origine Italienne, désignant les fruits comestibles, et par extension les arbres qui les portent, appartenant au genre Citrus [1]. , les agrumes appartiennent à la classe des Dicotyledones, à l'ordre des Geraniales, à la famille des Rutaceae, et sous famille des Aurantioidae [14]. La famille des Rutaceae se compose de 3 genres : Poncirus, Fortunella, et Citrus [15] [16]. 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 [15] [16]).

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.[17][1].

Les Portugais introduisaient l'oranger en méditerranée aux environs de l'an 1400 bien après le voyage du Marco Polo en Chine en 1287 [17], et c'est à partir du bassin méditerranéen et grâce aux grandes découvertes que les agrumes furent diffusés dans le monde [18][17]. 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 mers 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 [18]. Enfin ce sont les Anglo-Hollandais qui en 1654 introduisent les premiers agrumes dans la province du Cap en Afrique du Sud [19] [18].

Au début du 20^{ème} siècle, l'agrumiculture évolua peu, en raison des difficultés économiques liées aux 2 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* [20].

1.2. Présentation des principaux porte-greffes utilisés en culture d'agrumes :

L'utilisation des porte-greffes est devenue systématique en agrumiculture moderne [21]. Le porte-greffe classiquement utilisé jusque dans les années 50 dans tous les pays producteurs d'agrumes a été le bigaradier ou oranger amer (*Citrus aurantium*). Cependant, bien qu'il soit en tant que tel résistant à la Tristeza (maladie virale causant un flétrissement puis le dessèchement de la frondaison), il présente l'inconvénient, lorsqu'il est utilisé comme porte-greffe, de ne pas conférer de résistance vis-à-vis de cette maladie à l'association greffon/porte-greffe. Il est aussi sensible au *Phytophthora* (champignon dont les attaques se manifestent par un pourrissement de l'écorce au collet de l'arbre, l'exsudation de gomme puis un dépérissement de la frondaison) et l'Exocortis (maladie à virus entraînant des desquamations de l'écorce et une réaction d'incompatibilité au niveau de la greffe). [22].

De nouveaux porte-greffes sont donc recherchés. Ils doivent comporter des tolérances ou résistances à certains facteurs biologiques et pédo-climatiques : maladies (*psorose*, *Tristeza*, *Phytophthora*, *Exocortis*), ravageurs (nématodes...), sécheresse, froid... Ils doivent également apporter une amélioration conséquente sur les qualités agronomiques suivantes : mise à fruit rapide, allongement de l'époque de maturité, productivité (augmentation du rendement et du calibre des fruits), qualités organoleptiques et souplesse des techniques culturales du verger (taille, irrigation, fumure, durée des travaux..). [22][21].

Depuis 35 ans la Station de Recherches Agronomiques de San Giuliano étudie les meilleures associations clémentiniers / porte-greffe adaptées à la Corse et au bassin méditerranéen. En 30 ans, plus de 170 porte-greffes ont été testés quant à leur effet sur le rendement, le calibre et la qualité de la clémentine. Les meilleurs résultats en terme de rendement et de qualité interne des fruits (% de jus, taux d'acidité et teneurs en sucres) sont obtenus avec les clones de *Poncirus Trifoliata* (espèce utilisée comme arbuste ornemental, dont les fruits sont impropres à la consommation) et avec certains de leurs hybrides intergénériques tels que les *Citranges Troyer* et *Carrizo* (hybrides Oranger x *P. trifoliata*). Ces porte-greffes restent sensibles à l'*Exocortis*, mais ils confèrent une tolérance ou une résistance à la *Tristeza* et une tolérance au froid. Ils apportent donc une nette amélioration par rapport au bigaradier. [22][21].

Une sélection de porte-greffe pour le pomelo Star Ruby est également en cours d'expérimentation depuis 1988. La création variétale par hybridation s'est longtemps heurtée aux contraintes génétiques propres aux agrumes. Actuellement, l'essor des biotechnologies (culture in vitro et marquage moléculaire) permet d'envisager à court terme un regain de la création variétale chez ces espèces [22][21].

Tableau 3 - Présentation des principaux porte-greffes utilisés en culture d'agrumes

Porte-greffe	Description	Aptitudes agronomiques	Sensibilité aux maladies et parasites	Comportement variétal
Bigaradier <i>Citrus aurantium</i>	Porte-greffe dominant, le plus utilisé En cours d'abandon à cause de sa sensibilité à la tristeza Bon enracinement traçant et pivotant	Adapté à une large gamme de types de sol Craint les excès d'eau et les sols bords Tolérant au calcaire et aux chlorures	Associations sensibles à la tristeza Sensible au mal secco et aux nématodes, associations tolérantes au blight, à l'écortis	Amélioration faible pour la résistance au froid, productivité moyenne à bonne. Qualité du fruit correcte, bonne affinité avec l'ensemble des variétés (sauf Kumquat et mandarine de type satsumas)
<i>Poncirus trifoliatus</i>	Porte-greffe résistant au froid (-15°C) partiellement conféré au scion - enracinement puissant traçant et pivotant - développement Faible vigueur des arbres	Supporte les terres humides et l'asphyxie (Craint les sols secs) Sensible au calcaire et aux chlorures	Résistant à la gommose Tolérant aux nématodes Associations tolérantes à la tristeza Sensible à l'écortis et au blight	Amélioration de la sensibilité au froid amélioration de la qualité du fruit (taux de sucre), bonne affinité avec l'ensemble des espèces, mise à fruits tardive
Citrange Troyer	Hybride entre un cranjer et un <i>Poncirus</i> Enracinement de type pivotant Porte-greffe vigoureux	Supporte les sols moyennement humides Peu tolérant au calcaire et aux chlorures Craint les sols secs	Résistant à la gommose Association tolérante à la tristeza, sensible au blight, à l'écortis et aux nématodes.	Amélioration très légère de la sensibilité au froid Fruits de petit calibre, de bonne qualité
Citrange Carrizo	Aujourd'hui porte-greffe le plus utilisé Hybride de même type que le porte-greffe C. Troyer, enracinement de type pivotant, dense et profond, porte-greffe vigoureux	Supporte les sols moyennement humide Peu tolérant au calcaire et aux chlorures Craint les sols secs	Association tolérante à la tristeza Sensible au blight, à l'écortis Tolérant aux nématodes	Amélioration très légère de la sensibilité au froid Productivité élevée sans perte de calibre, de bonne qualité
<i>Citrus volkameriana</i>	Bon porte-greffe adapté à de nombreuses associations notamment pour les citronniers, bon enracinement	Adapté aux sol secs et aérés Résistant aux chlorures Peu adapté aux sols bords et asphyxiants	Résistant à la gommose Association tolérante à la tristeza et à l'écortis, sensible au blight	Bonne résistance au froid Très bonne productivité avec la variété de citron Eureka (forte vigueur)
<i>Citrus macrophylla</i>	Porte-greffe surtout adapté aux citronniers	Sensible au froid et aux sols humides Supporte les chlorures et le calcaire	Tolérant à la gommose et à l'écortis sensible à la tristeza	Bonne mise à fruit Forte affinité avec les citronniers

CHAPITRE2

DONNEES SUR LE CITRUS PSOROSIS VIRUS

2.1. Origine et distribution géographique de la psorose :

La psorose des agrumes à été observée pour la première fois en Floride et en Californie au début des années1890 et elle a été appelée psorose [6] du mot grec *Psora* qui signifie ulcère, bien que communément elle a été connue comme *Sclay Bark* (écorce écailleuse).l'orient est son centre d'origine et successivement, elle a été disséminée dans le monde entier à travers la distribution d'espèces et de variétés d'agrumes [23].

Les symptômes de la psorose ont été observé dans la plupart des régions agrumicoles dans le monde(figure2.1),ce virus est présent en: Algérie, Argentine,Australie,Brésil,Chili,Croicie,Cuba,,Egypte,France,Grèce,Inde,Iran,Israël ,Italie,Jordanie,Lebon,Maroc,Malaisie,Pakistan ,Pérou,,Espagne,Arabie Saoudite, Syrie, Tunisie,Turquie et en Corse....etc[24].

2.2. Position taxonomique du virus de la psorose

2.2.1. Caractéristique du genre *ophiovirus* :

Le genre *Ophiovirus* [25][26] est un genre assigné à la famille des *ophioviridae* [25][26] il est composé de 5 groupes de virus(figure2.2) sérologiquement distinct, et qui sont :

virus de la psorose des agrumes (CPsV), virus des taches annulaires de la laitue(LRNV)[27], virus marbrure blanche du renoncule(RWMV)[28][29], virus de la mosaïque de la tulipe (TMMV)[32] virus de la laitue var mirafiori (MLBVV)[30].

Les particules de ces virus sont filamenteuses d'une longueur de 3nm et possédant un génome à ARN négatif simple brin qui mesure entre 11,3-12,5 kb formé de 3 ou 4 segments. [28][29][30]. Le membre type du genre Ophiovirus est le CPsV qui représente ses caractéristiques typiques dont les plus importants : La nature multipartite du génome [31], la localisation du gène de la capsid protéique dans la région 5' du troisième composant génomique ou il est traduit [35] [34], la transmission assurée par CPsV est la transmission par greffage [24][6][7].

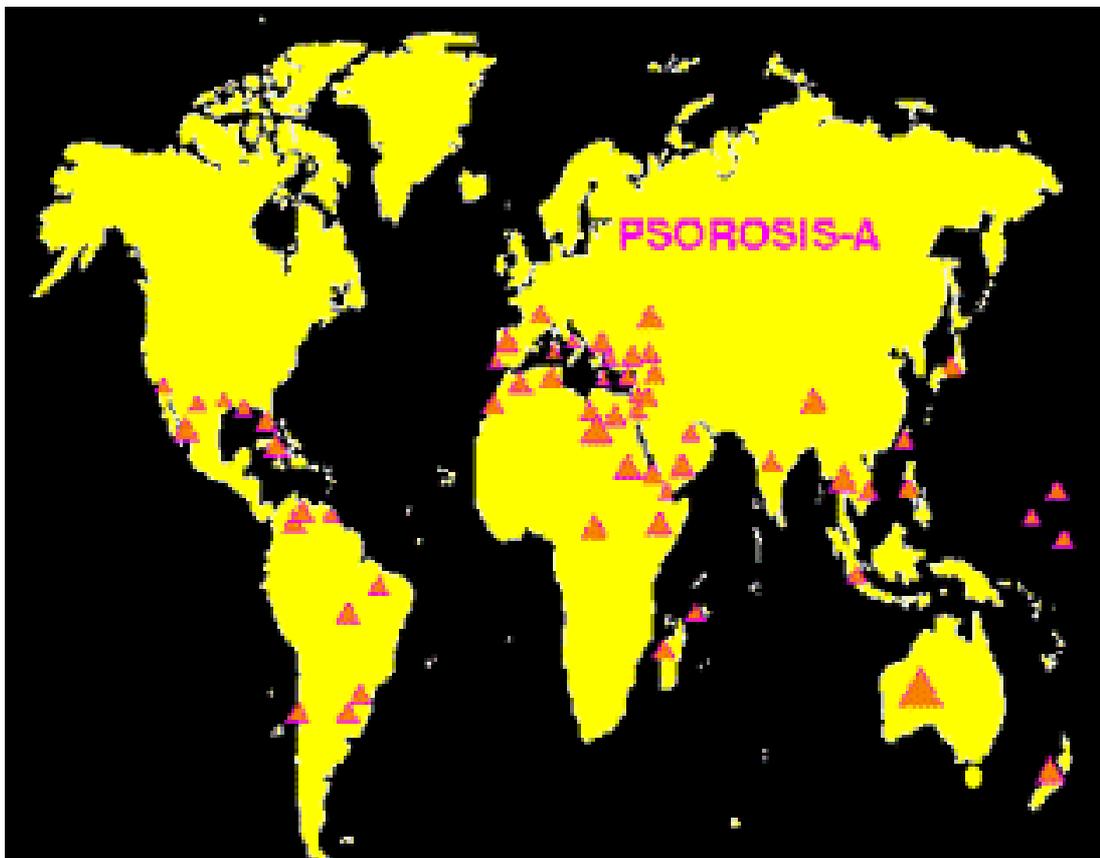


Figure2.1 : Distribution géographique de la maladie de la psorose dans le Monde [24]

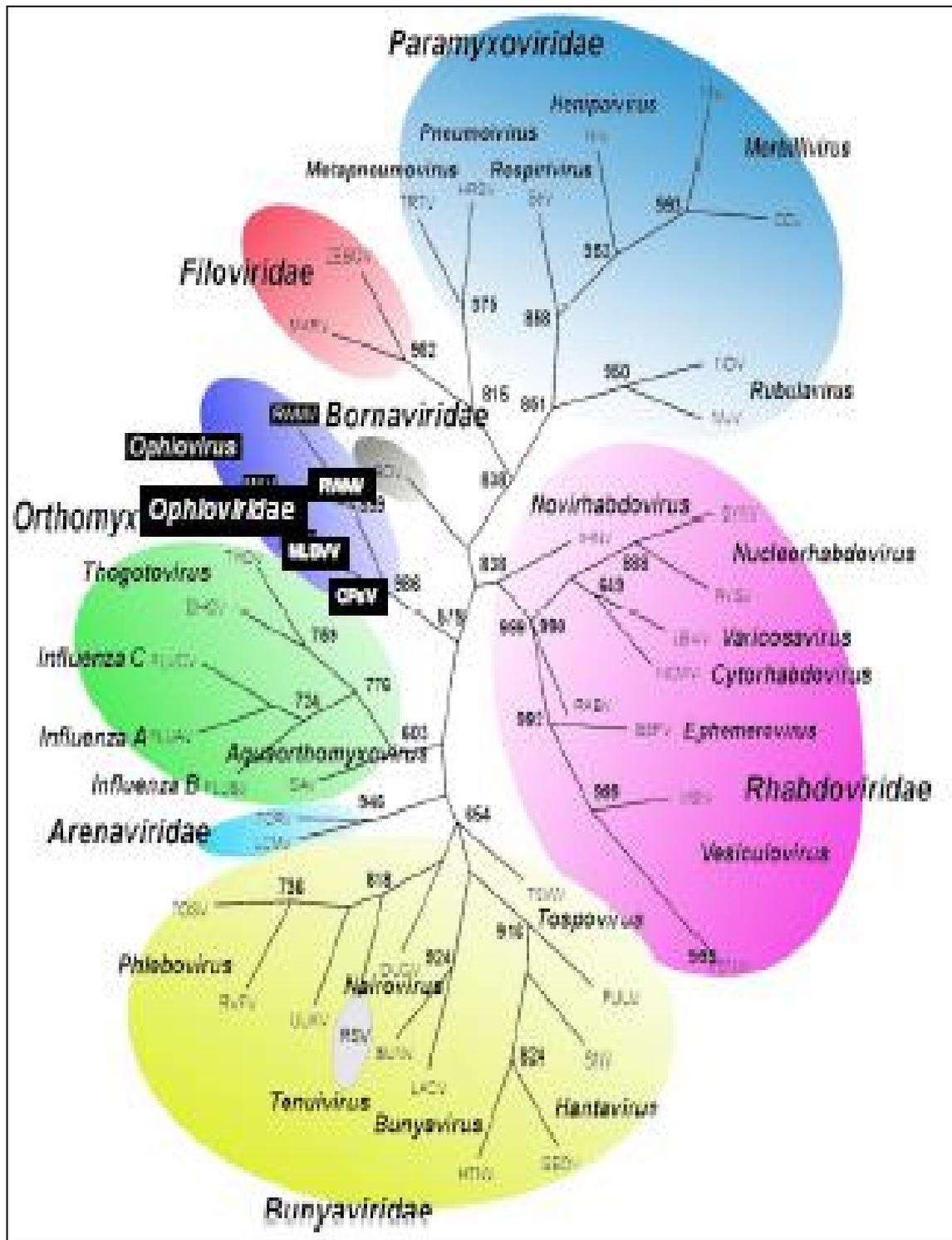


Figure 2.2 : Etude du groupe *Ophiavirus* [27] [28][29][30]

2.3. Caractéristiques moléculaires associées à CPsV :

2.3.1. Nature du génome :

CPsV possède un génome à ARN négatif simple brin [34][35][36][37][38], et composé de 2 particules sous forme de filaments circulaires [39] [25][26][38]. Une particule courte ou composant T « top » de 690-760 nm de longueur et une particule longue ou composant B « bottom » de 3 nm de longueur [25]. (figure 2.3) ; ces 2 particules partagent la même capsid [40] [41].

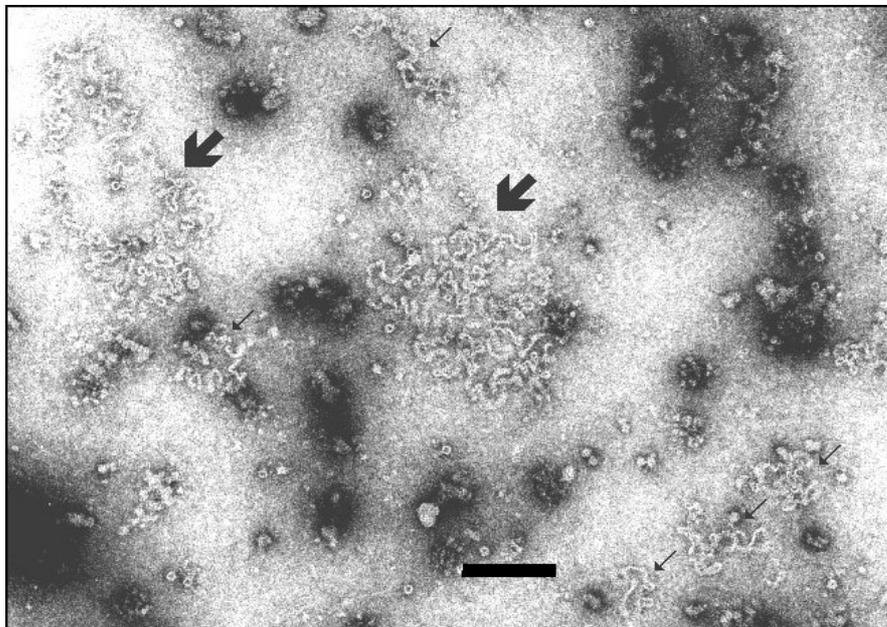


Figure 2.3 : préparation partiellement épurée de CPsV montrant des particules de deux tailles (grandes et petites flèches). Barre = 100 nm. [38]

2.3.2. Transcription :

La transcription des gènes est réalisée par l'ARN polymérase associée au virus. L'ARN polymérase initie la synthèse d'un autre ARN messager à l'extrémité 3' du gène suivant et ainsi de suite jusqu'à l'extrémité 3' du génome. Seule une fraction de l'ARN polymérase franchit ces régions intergéniques. Ainsi, la quantité

d'ARN messagers synthétisés varie selon la localisation des gènes (diminution de 3' en 5'). [42][43]

2.3.3. Réplication :

Lorsque la concentration de nucléoprotéines (protéine N) atteint un certain seuil, celles-ci se fixent sur l'ARN (+) nouvellement synthétisé et permettent à l'ARN polymérase de copier les jonctions intergéniques sans s'arrêter [44][45]

2.3.4. Organisation du génome:

Il ya plusieurs grille de lecture (open reading frame, ORFs) pour la traduction du virus CPsV , les produit de la traduction sont(figure2.4) :

ORF1 :

-le polypeptide 280Ket 24K codé par le gène de l'ARN1 dont la séquence de 8184 nucléotides [46][47][35][36] et premier ORF est différent du deuxième ORF par 190 nucléotides[48].

ORF2 :

-Un seul produit majeur le54K est codé par l'ARN2.de 1644 nucléotides [35][36][46][47]

ORF3 :

La capside protéique ou bien 48K est la traduction produite par l'ARN3 dont la séquence de 1454 nucléotides [33][35][36][46][47]

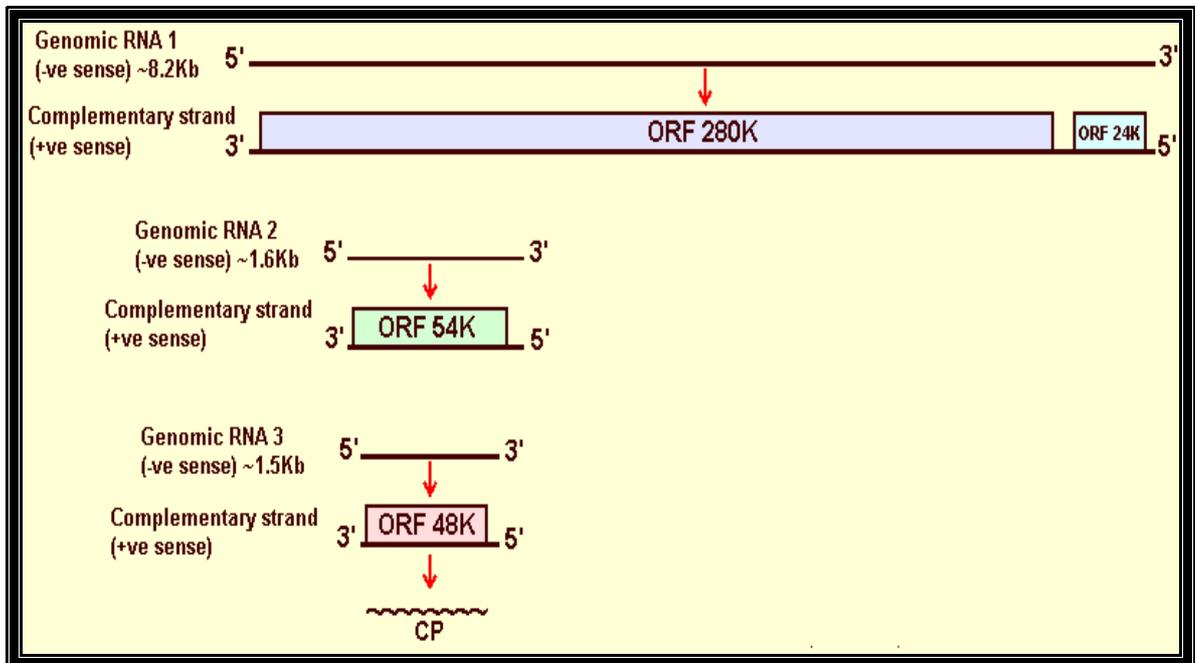


Figure 2.4 : Schéma du génome de CPsV [33][35][46][47][48].

2.4. Mode de transmission :

2.4.1. Transmission par greffage :

Le virus de la psorose est transmis essentiellement à travers le matériel végétal de multiplication d'un plant d'agrumes à un autre par greffage [6] le virus persiste dans le cal de cellule de croissance des plants infecté au dessous de l'écorce éclaté [7][48]. Ce mode de transmission est le plus rapide pour la propagation de la maladie.

2.4.2. Transmission par semence :

En ce qui concerne ce mode de transmission de nombreux travaux ont été menés dans ce sens, cependant aucun résultat n'a été confirmé pour cette éventuelle voie de dissémination du virus [49] [50] [51] [52][54] [55][56][24].

2.4.3. Transmission par vecteur :

Des études préliminaires [57] [58] ont montré que symptômes de la psorose au champ et la distribution de l'infection semblait suivre les Lignes d'irrigation par

inondation, ces 2 observations suggèrent une dispersion naturelle de la psorosis. L'examen de sections de racines et de sol provenant d'arbres infectés a révélé la présence d'un champignon de type *olpidium* avec des spores dormantes. [59].



Figure2.5 : L'examen de sections de racines et de sol provenant d'arbres infectés par psorose[66]

2.5. Plantes hôtes de la psorose :

Dans les conditions naturelles le CPsV peut affecter aisément les espèces et variété du genre Citrus utilisées comme variétés commerciales ou comme porte greffe dont nous avons : orange douce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), bigaradier (*C. aurantium* L.), le citronnier (*C. limon* (L.) Burn. f.), pamplemousse (*C. paradisi* Macf.), clémentine (*C. clementina* Hort. ex Tan.), satsuma (*C. unshiu* (Macf.) Marc.) et plusieurs hybrides de Fortune mandarin (*C. clementina* x *C. tangerina* Hort. ex Tan.) et Ortanique tangor (*C. reticulata* Blanco x *C. sinensis*). [24][60].

2.6. Les symptômes de CPsV:

La Psorosis est causée par un virus désigné sous le nom de *Cilrivirus psorosis* [56][57]. Les symptômes externes notamment foliaires, sont très spécifiques et peuvent être considérés comme significatifs. Toutefois l'absence de

ces symptômes n'est pas une preuve d'un bon état sanitaire, en plus des taches foliaires la psorose présentent des symptômes, généralement observés sur le tronc et les branches [61][62] [60][24] .

2.6.1. Sur le tronc :

La principale manifestation consiste dans la formation d'écailles ou desquamation sur le tronc, ou sur les premières branches, ou sur les deux à la fois [60][24] . Il apparaît tout d'abord de petites pustules, généralement sans exsudation de gomme (figure 2.6.), qui se boursoufflent, de plus en plus jusqu'à former des desquamations longitudinales plus ou moins longues. Celles-ci s'enroulent sur elles-mêmes, ne demeurant adhérentes aux autres couches de l'écorce que par leurs centres (figure 2.7.) [62][24]; Elles tombent en partie avec le grossissement du tronc ou de la branche ou pour d'autres causes, découvrant les parties vertes restées bien vivantes et non affectées du reste de l'écorce. Ce caractère de nécrose des couches superficielles de l'écorce (figure 2.8) permet de distinguer la psorose écailleuse des autres maladies du tronc pouvant faire confusion, comme la gommose à phytophthora, mais chez lesquelles la totalité de l'épaisseur de l'écorce est affectée. [63][64][65].

L'écaillement gagne peu à peu en importance, s'étend vers le haut et vers le bas de l'arbre et, arrive à un niveau, il s'étend tout autour du tronc ou de la branche, réalisant un véritable barrage pour le mouvement descendant de la sève élaborée; le tronc ou la branche dépérissent plus ou moins rapidement. On observe parfois des exsudations de gomme [67] (figure 2.9.) qui apparaissent à la surface de l'écorce, en général sur le pourtour de la région desquamée. Cet écaillement est dû à la formation de couches concentriques de gomme dans le bois, à l'accumulation de gomme dans les vaisseaux, suivies dans les cas les plus graves d'une désorganisation des tissus avec imprégnation de produits de nature gommeuse. Les manifestations d'écaillement n'apparaissent pratiquement pas avant l'âge de six ans et demandent en général de douze à quinze ans et parfois et parfois d'avantage pour apparaître nettement (figure 2.10) [65] [61][24].

. 2.6.2. Sur feuille :

Les symptômes généralement corticaux de la psorose sont suffisants à eux seuls pour affirmer la présence de cette maladie dans un arbre donné .cependant, Comme cela été rappelé, ces symptômes ne peuvent apparaître que très tardivement (plus de quinze ans après plantation) ou même rester latents ou encore être confondus avec des dégâts,de la panachure d'origine génétique .Il se trouve que la psorose produit sur feuilles des symptômes nets et précis et qui sont des taches chlorotiques et taches annulaire[9][10][12][13],un gaufrage et la torsion du limbe des feuilles ont été observés sur oranger Washington navels (figure2.11)[24]. Qui apparaissent même lorsque l'arbre atteint est très jeune. Ces symptômes foliaires s'observent tous sur des feuilles jeunes qui n'ont généralement atteint que le quart ou le tiers de leur taille adulte (figure2.12) principalement au moment de la pousse de printemps ils sont beaucoup plus difficiles à avoir , pendant les périodes chaudes][63][61].

2.6.3. Sur fruit :

Des symptômes nets et précis et qui sont des taches chlorotiques et taches annulaire vertes sont observé sur fruit (Figure 2.13 ; figure2.14) [60][65][63][24]

2.7. Variabilité de CPsV :

2.7.1: variabilité symptomathologique :

Selon l'expression des symptômes, 2 formes de CPsV ont été identifiées. Il s'agit de la psorose A et B [66][67][68][34], la forme B est plus virulente que la forme A et elle peut induire un écaillage de l'écorce et des branches des taches chlorotiques et annulaires sur feuilles âgées avec sécrétion de gomme sur la face inférieure de la feuille.

2.7.2. Variabilité sérologique :

Plusieurs isolats différents par la taille de leurs capsides protéiques [28]. La capsid de l'isolat américain CRsV-4 [69] est estimé entre 48-49 KDA[40][49], par contre la taille de la capsid de 13 isolats espagnoles[70][71][72] a été estimé à

47KDA[73][74] .à l'exception de l'isolat p-126 qui possède une capsid de 46 KDA,[73].Cependant la capsid d'un isolat 90-1-1[75][41] d'argentine a été estimé à 50 KDA. [76]



Figure 2.6: Ecaillage de l'écorce typique de la psorose –A sur oranger en Californie [63][62][24]

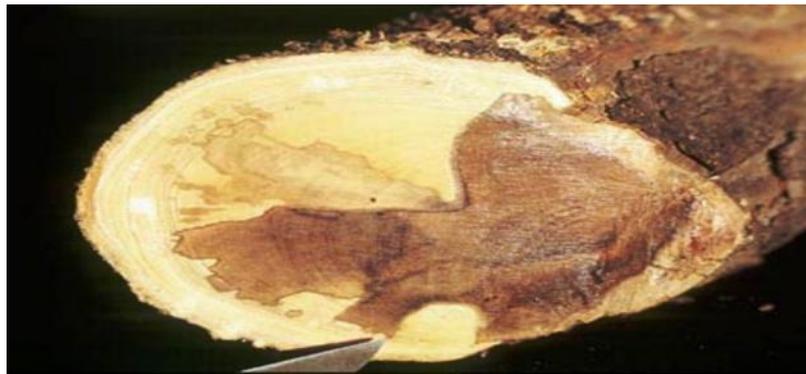


Figure 2.8 : Coloration du bois dans une coupe transversale [65]



Figure2.10 : Effets létaux de la psorose sur un

Arbre au Mexique[24]



Figure 2.11 : Symptômes de tache annulaire sur feuille de Washington navel [9] [13][24]



Figure 2.12 : taches chlorotiques sur jeune feuilles causé par la psorose après inoculation par greffage.[9] [12][24]



figure2.13 : Symptômes de tache annulaire sur fruit d'un oranger navel sur observé sur champ [60][24]



Figure2.14 : Symptômes de tache annulaire sur fruit d'oranger [65][63][60][24]

CHAPITRE 3

MATERIELS ET METHODES

3.1. Prospection et échantillonnage

3.1.1 stations prospectées :

Les prospections sur terrain ont été effectuées sur agrumes durant les deux Campagnes agricoles 2004/2005 et 2005/2006 où plusieurs prélèvements furent réalisés. Les zones prospectées étaient des parcelles d'agrumes entreprises unipersonnelle à responsabilité limitée (EURL Semiani et Bourkiza) à Hadjout, (EURL Regueyegue) à Boufarik, (EURL KERFA) à Bourkika, La ferme Beloundja à Tipaza et la station expérimentale du département d'agronomie à Blida.

3.1.1.1 Parcelles d'agrumes de l'EURL Semiani :

L'entreprise est située dans le périmètre d'irrigation ouest à 2,5km environ à l'est du chef lieu de la commune de Hadjout. Le verger est constitué de différentes variétés d'agrumes, plantées en 2001 avec une superficie totale de 21,58 ha divisée comme suit: 5,40 ha Clémentine, 5,40 ha Citronnier, 1,50ha Double fine, 7 ha Valencia Late 2,28 ha Washington navel. Toutes les variétés sont greffées sur le bigradier. Les traitements phytosanitaires étaient effectués selon un calendrier des traitements des agrumes. L'irrigation est apportée par raie. Les analyses pédoclimatiques de la station d'étude ont montré une texture argileuse et une structure grumeleuse. Le Climat relève du régime méditerranéen caractérisés par

un hiver doux et été chaud et sec. La région reçoit une somme de précipitation entre 600 et 900 mm avec un rythme méditerranéen caractérisé par une double irrégularité annuelle et interannuelle.

3.1.1.1.2 Parcelle de l'EURL Bourkiza :

Les terres de cette EURL sont situées dans la plaine de Mitidja ouest, en partie marécageuse, nécessitant un drainage permanent pour l'exécution des travaux nécessaires à la mise en place et à l'entretien des cultures. Le sol est lourd d'une texture argileuse. Ce site présente une grande diversité d'arbres d'agrumes avec une superficie totale de 38 ha dont 6 ha Sanguine, 10 ha Portugaise, 7 ha Valencia Late, 8 ha Double fine, 7 ha Thomson. Ces plantations datent de 1978, Par ailleurs des plants de bigaradier et de *poncirus trifoliata* sont plantés au milieu des plantations, l'eau d'irrigation provient du barrage.

3.1.1.1.3. Parcelle de L'EURL Regueyegue :

Le site est situé dans la région de Boufarik est présente les variétés suivantes : 3 ha Pamplémousse 5 ha Tarocco, 1 ha Satsuma, 3 ha salustiana. Ces plantations datent de 1988.

3.1.1.1.4 Parcelle de l'EURL Kerfa :

L'entreprise est située dans la plaine de Mitidja ouest dans des terrains plats. Ces derniers sont de nature limoneuse riche en matière organique et le pourcentage du calcaire est de 9,84%. Cette parcelle est d'une superficie de 14,9 ha et se compose de deux vergers dont le premier a été planté en 1992 et l'autre en 2002 ces derniers sont composés uniquement de la variété Thomson.

3.1.1.1.5 Parcelle verger Beloundja :

Ce verger appartient à une exploitation agricole collective située au nord de la wilaya de Tipaza. Cette région bénéficie d'un climat méditerranéen à étage bioclimatique sub-humide à hiver doux caractérisé par une alternance d'une saison sèche et chaude (avril- septembre) suivie d'une saison humide (octobre-mars), la parcelle est d'une superficie de 5 ha est composé d'une seule variété Hamlin.

3.1.1.16. Station expérimentale du département d'agronomie de Blida :

Le verger d'agrumes du département d'agronomie est d'une superficie de 0.25 ha comprenant uniquement deux variétés qui sont le Citronnier, Thomson. Ces dernières ont été plantées alternativement selon des lignes avec un écart de 5x5m. L'irrigation est basée uniquement sur les pluies (apports naturels)

3.2.Méthodes d'échantillonnage :

Les prospections réalisées sur les différents vergers des différentes stations prospectées étaient basées sur l'observation visuelle des symptômes. Il s'agit de repérer les plants présentant des symptômes décelables à l'œil nu et suspectés d'être induits par *citrus psorosis virus* par comparaison à des photos bibliographiques. Les parties de l'arbre concernées par les prélèvements étaient des feuilles avec les symptômes de taches annulaires et gaufrage du limbe, les fleurs sans symptômes et les rameaux charpentiers extériorisant des pustules.

Chaque prélèvement correspond à un seul plant et un échantillon représente un nombre de 5 à 10 feuilles. Le nombre total d'échantillons de feuilles prélevés durant la campagne 2004-2005 était de 934 englobant des échantillons de *hamlin* en nombre de (72), *Citronnier* (80), *clémentine* (69), *Washington navel* (50), *Valencia late* (64), *double fine* (99), *bigaradier* (65), sanguine (65), portugaise (69) le *poncirus trifoliata* (30), *salustiana* (56), *tarocco* (43) , *pamplemousse* (31), *satsuma* (30), *Thomson* (111), également 120 bouture ont été prélevées à l'aide d'un sécateur désinfecté en le trempant dans de l'eau de javel à chaque prélèvement , le nombre d'échantillons prélevé pour chaque variétés été de (06) (*hamlin*, *citronnier*, portugaise, *clémentine* , *Washington navel* *Valencia late*, *double fine*,*bigaradier*,sanguine,le *Poncirus trifolia*, *salustiana*, *Tarocco*, *pamplemousse*, *satsuma*. Durant la campagne 2005-2006 le nombre total d'échantillons prélevés était de 934 échantillons de feuilles englobant des échantillons de *hamlin* en nombre de (72), *Citronnier* (80), *clémentine* (69), *Washington navel* (50), *Valencia late* (64), *double fine* (99), *bigaradier* (65), sanguine (65), portugaise (69) le *poncirus trifoliata* (30), *salustiana* (56), *tarocco* (43) , *pamplemousse* (31), *satsuma* (30), *Thomson* (111). Et des échantillons de fleurs en nombre de (102) dont *double fine* (19) *clémentine* (5) *valencia* (6) portugaise (10) et *Thomson* (62)

3.3. Conservation de la source d'inoculum :

Les feuilles et les fleurs 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 boutures destinées pour le test d'indexage et inoculation mécanique (greffage) étaient conservées dans du papier humecté à 4°C pour uniquement 1 ou 2 jours afin d'éviter leurs dessèchement.

3.4. Serodetection du virus de la psorose.

3.4.1. Test immuno-enzymatique ELISA :

Le test ELISA décrit pour la détection des virus de plantes, a révolutionné le diagnostic en virologie végétal[80]. Il permet de s'affranchir des incertitudes liées à l'étude des symptômes et d'affirmer qu'une plante est affectivement infectée par le virus. Le principe de ce test est la reconnaissance hautement spécifique entre « antigène-anticorps » et fait intervenir le couplage des anticorps avec une enzyme [81] (figure 3.1). Cette technique est très sensible et permet de détecter entre 1 à 10 ng de virus par ml de broyat, selon le virus considéré [82][83].

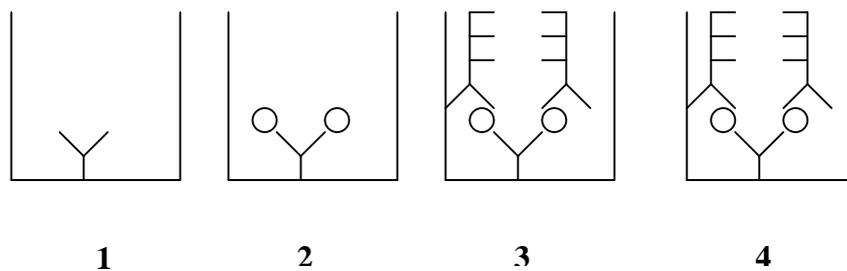


Figure 3.1 : Principe du test ELISA [1].

1. Adsorption de l'anticorps
2. Adsorption de l'antigène
3. Fixation d'un anticorps spécifique de l'antigène
4. Addition du substrat de la phosphatase alcaline

3.4.2. Anticorps polyclonaux :

Un serum polyclonal est un mélange d'IgG dirigés contre une protéine virale, le plus souvent la protéine de la capsid. Des anticorps polyclonaux sont obtenus à partir de prises de sang de lapin effectuées après une immunisation par le virus étudié. Un serum polyclonal renferme de très nombreux anticorps de réactivités différentes [84][85][86].

Aujourd'hui, ces anticorps sont principalement utilisés grâce au test ELISA, mais ils sont très utiles pour d'autres tests comme l'immuno précipitation ou l'immuno diffusion et l'immuno- électro- microscopie [87] [98] [89]. Ces tests peuvent permettre, de révéler des relations sérologiques entre virus différents. Toutefois un anticorps reconnaît un grand nombre de sites antigéniques différents, ce qui ne permet pas toujours de différencier des souches d'un même virus.

3.4.3. Anticorps monoclonaux :

Le développement des anticorps monoclonaux permet une étude plus approfondie des structures antigéniques. Contrairement aux anticorps polyclonaux, chaque anticorps monoclonal reconnaît un site antigénique unique ou épitope de la protéine virale. L'utilisation des anticorps monoclonaux peut permettre de détecter des mutations ponctuelles ayant ou non une influence au niveau biologique. Ils reconnaissent en principe un épitope unique formé de quelques acides aminés, par conséquent une mutation d'un seul acide aminé impliqué dans la formation de l'épitope empêche la reconnaissance par l'anticorps. Cette méthode permet à la fois de différencier des souches de virus entre elles si l'épitope correspond à une partie variable de la séquence de la protéine virale et de mettre en évidence des relations sérologiques entre virus si l'épitope reconnaît une partie conservée [83].

Les anticorps monoclonaux sont des outils très fins qui permettent l'étude de la variabilité d'un virus. Ils sont fréquemment dirigés contre la capsid d'un virus et utilisés pour la distinction sérologique des souches virales [88][89].

Il existe 2 variantes de la méthode ELISA. DAS-ELISA et TAS-ELISA.

3.4.4. 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 [90]. 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 [90].

3.4.5. 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 [91].

3.4.6. Extraction du virus :

Les échantillons de feuilles et de fleurs prélevés sur terrain étaient broyés séparément à froid à l'aide d'un mortier et dilués au 1/1000 dans une solution tampon (1g de poids frais/ 2ml de tampon phosphate Buffered Saline (PBS-T), pH7,4) en présence de Polyvinylpyrrolidone,1% (PVP) du Sérum Albumine Bovine (SAB), 0,1%. Les jus virosés récupérés des échantillons ont été ensuite mis dans des tubes et conservés à froid. Les échantillons testés proviennent des prospections effectuées sur différentes régions de la Mitidja. Le nombre total était de 467 échantillons: 365 échantillons de feuilles englobant des échantillons de *Hamlin* en nombre de (31), *Citronnier* (17), *clémentine* (31), *Washington navel* (18), *Valencia late* (27), *double fine* (58), *bigaradier* (40), sanguine (33), portugaise (23) et le *Poncirus trifoliata* (10) et, salustiana (10), *Tarocco* (29) , *Pamplemousse* (10), *satsuma* (5), *Thomson* (23), et 102 échantillons de fleurs dont double fine (19) Clémentine (5) valencia Late (6) portugaise (10) et Thomson (62).

Concernant les témoins contrôles positifs et négatifs, nous avons utilisés des échantillons frais sains de valencia late provenant d'une collection de

laboratoire de virologie, et également des témoins contrôles positifs et négatifs lyophilisés fournis par laboratoire AGRITEST (Italie) [92][93]

3.4.7. Anticorps utilisés :

Dans notre expérimentation on a utilisé la technique DAS-ELISA avec des Anticorps polyclonaux fournis par le laboratoire AGRITEST (Italie) [92] [93], La réalisation du test DAS ELISA a été effectuée selon les étapes suivantes [90] :

3.4.7.1 Préparation des plaques :

- ne pas utiliser les puits de bordure
- déposer chaque échantillon dans un puits

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B	Substrat	TP	1	4	7	10	13	16	19	22	25		
C	Substrat	TP	1	4	7	10	13	16	19	22	25		
D	Substrat	T ⁺	2	5	8	11	14	17	20	23	26		
E	Substrat	T ⁺	2	5	8	11	14	17	20	23	26		
F	Substrat	T ⁻	3	6	9	12	15	18	21	24	27		
G	Substrat	T ⁻	3	6	9	12	15	18	21	24	27		
H													

TP : Tampon T⁺ : contrôle positif T⁻ : Contrôle négatif 1,2, Échantillons

Figure 3.2 : Plan d'une plaque ELISA

3.4.7.2. Protocole DAS- ELISA :

Etape 1 : Fixation des anticorps

Diluer les anticorps au 1/100 dans le tampon de fixation

Tampon de fixation	10ml
Anticorps	100 μ l

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

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN.

Etape 2 : Dépôt des échantillons

Selon les échantillons broyer au 1/3, 1/5 ou 1/10 dans un tampon de broyage adapté. Les jus peuvent se conserver 12h à +2- 8 C°

Préparation des témoins : ils sont lyophilisés et doivent être réhydratés dans 0,5, 1 ou 2ml d'eau distillée. Après hydratation, les témoins doivent être conservés à +2- 8 C° et utilisées dans la journée.

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

Lavage : 2 lavages PBS-TWEEN puis 2 lavages PBS-TWEEN avec 3min d'incubation entre chaque lavage.

Etape 3 : Dépôt des anticorps conjugués

Diluer les anticorps conjugués au 1/100 dans le tampon de conjugué

Tampon conjugué	10ml
Anticorps conjugué	100 μ l

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

Lavage : 3 lavages avec du PBS-TWEEN

Etape 4 : Dépôt de substrat

Dissoudre le pNPP juste avant utilisation dans le tampon de substrat

Tampon substrat	10ml
pNPP	2 pastilles de 5mg

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

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

3.3.7. Lecture et interprétation : (figure3.10 ,3.11, 3.12)

L'évaluation des réactions ELISA a été effectuée avec un lecteur ELISA à 405 nm

Pour calculer les absorbances, les valeurs de DO des tampons, témoins et échantillons sont les valeurs brutes diminuées de DO du substrat.

$$\text{DO échantillons} = \text{DO brute} - \text{moyenne des DO des puits de substrat}$$

Un échantillon est considéré positif lorsque sa densité optique est 2 ou 3fois la densité du témoin négatif.

3.5. Détection biologique du virus de la psorose :

Les techniques d'indexation des agrumes ont considérablement évolués ces dernières années permettant maintenant de détecter tous les agents infectieux qui les affectent durant 12 à 18 mois [94]. Ce test est réalisé en pépinière ou en serre [95]. Les inocula 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 [96].

Cette technique, la plus ancienne, est la plus fiable, mais à une durée de réponse assez longue [95].

3.5.1. Plantes indicatrices :

L'oranger en général peut être utilisé comme plante indicatrice dans le bassin Méditerranéen, c'est la variété Hamlin [97][98] qui est utilisée actuellement, elle est capable de présenter les symptômes foliaires typiques de la psorose. Cette variété est polyembryonnée ce qui permet d'utiliser la majorité des plants de semis pour l'indexation.

Le nombre de plant de Hamlin utilisé dans notre expérimentation était de 82 (figure 3.3), ces derniers proviennent de l'ITAF de Boufarik.



Figure 3.3 : Plants d'agrumes destinées au test d'indexage

3.5.1.2. Méthode du test d'indexage :

La technique la plus utilisée pour l'indexation de la psorose est le greffage en écusson [24] [67]. L'inoculum est un morceau d'écorce rectangulaire sans yeux d'une longueur de 5 à 7mm obtenu à partir des branches charpentières des plants candidats. L'inoculation consiste à placer l'inoculum dans une coupe sous forme de languette ou en T de l'écorce des plantes indicatrices de façon à assurer le contact entre les deux cambiums et faciliter leur soudure. Le greffage est suivi évidemment d'une ligature. Les plants ne doivent être arrosés qu'après une période de 10 jours afin d'éviter la rupture de la soudure des 2 cambiums par le flux de la sève. Après 3 semaines du greffage les plants doivent être rabattu à 10cm de l'inoculation la plus haute pour favoriser leur développement

Pour notre étude nous avons testé 20 variétés d'agrumes provenant des différentes stations prospectées : la variété Hamlin provenant du verger Beloundja, citronnier clémentine, valencia late, Double fine Washington navel, Bigaradier, poncirus trifoliata de l'EURL Semiani, bigaradier, sanguine, portugaise et double fine de l'EURL Bourkiza, Salustiana, Tarocco, pamplemousse, Satsuma de l'EURL Regueyegue, Thomson jeune verger et Thomson verger âgé de l'EURL Kerfa et Thomson, citronnier de la station expérimentale d'agronomie. Pour chaque variété 5 plants ont été inoculés où chaque plant est inoculé avec 2 greffes latérales. Uniquement 2 plants ont été inoculés par le témoin positif provenant du laboratoire de virologie, les témoins sains au nombre de 2 plants proviennent de l'ITAF de Boufarik. Les plants sont maintenus sous serre à une température comprise entre 18-25°C pendant 6 mois, période nécessaire pour l'apparition des symptômes foliaires. L'arrosage est effectué 2 à 3 fois par semaine et un traitement par un correcteur de carence « Agrispon » à raison (1ml/l) a été effectué sur l'ensemble des plants durant la période d'indexage pour éviter les éventuelles problèmes de carence.

3.6. Transmission mécanique:

Cette méthode consiste à transmettre l'agent pathogène à une plante herbacée (par inoculation), ou ligneuse (par greffage) et ce par la voie mécanique [99] [100] [67]. De part leurs performances dans la détection des infections dues aux virus de la psorose, certaines techniques biologiques sont couramment utilisées. 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 le greffage. La lecture des résultats de l'expression symptomatique peut être effectuée après la troisième semaine d'inoculation.

3.6.1. Gamme d'hôte :

Pour la transmission mécanique de CPsV, nous avons utilisé 3 portes greffes il s'agit du Bigaradier, Citrange Carrizo et Poncirus trifoliata provenant d'une pépinière privée à Boufarik. (Figure 3.4).

3.6.2. Méthode du test d'inoculation :

Nous avons suivi les étapes du test de transmission mécanique par greffage. Pour chaque candidat trois échantillons été utilisé, Les plants sont placés à une température ambiante de l'ordre 18 à 25°C.

- . Greffage de l'œil de l'indicateur (*Hamlin*) en écusson sur les portes- greffes
- . Enlèvement de l'écusson d'un rameau greffon 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.



Figure3.4 : Plants d'agrumes destinés à l'inoculation par greffage

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

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

4.1.1. Symptômes observés durant la campagne 2004-2005:

Au cours des prospections effectuées au niveau de l'EURL Bourkiza , l'EURL Semiani, l'EURL Kerfa ,l'EURL Regueyegue, le verger Beloundja et la station expérimentale de Blida durant la campagne 2004-2005, des symptômes foliaires et corticaux rappelant ceux de la psorose ont été observés sur différentes variétés d'agrumes. A l'EURL Semiani nous avons remarqué que les symptômes étaient différents selon la variété soupçonnée atteinte de la maladie. Sur *Washington navel* et *double fine* nous avons observé que le symptôme d'éclaircissement des nervures était le plus fréquents (figure4.1). Des taches annulaires sur jeunes feuilles ont été également observées mais de moindre importance sur clémentine. Des cas de desquamations longitudinales ont été repéré sur citronnier, *valencia late* avec sécrétion de gomme dans certains cas (figure 4.2) accompagné sur une partie du limbe de petites plages claires de 1 à

6mm (figure4.3) .Des desquamations du tronc et gaufrage de feuille de bigaradier figure4.4) également sur *Poncirus trifoliata* ont étaient observées.

Au niveau de la station Belounja, les symptômes extériorisé étaient de type psorose sur Hamlin , des panachures réticulées et frisolée, gaufrage et distorsion

(figure4.5) suivi d'importants écailllements sur plusieurs plants avec sécrétion de gomme sur le tronc et branches des arbres.

Au niveau de l'EURL Bourkiza un mélange apparent de symptômes sur plusieurs plants a été observé, des symptômes d'écailllements avec sécrétion de gomme sur portugaise et sanguine et des taches annulaires sur jeunes feuille. Des cas de desquamations longitudinales ont été observés sur double fine. Le bigaradier a présenté des feuilles a aspect froissé et des nervures vertes.

Des symptômes de type CPsV ont été observés dans les parcelles de Regueyegue ou nous avons observé une diversité de symptômes sur les différentes variétés prospectées. Le symptôme fréquent était les formes d'écailllements sur salustiana, et un écaillage accompagné d'exsudat de gomme sur Tarocco. Des taches foliaires annulaires abondantes ont été relevées sur pamplemousse et salustiana. Des taches annulaires vertes sur fruits de satsuma ont été également observées (figure4.6).

Dans les parcelles de l'EURL kerfa, des symptômes importants de la catégorie taches annulaires autour de la nervure principale, des gaufrages des feuilles ont été relevés, sur la variété Thomson jeune verger, ainsi que des cas d'écaillage sur la variété Thomson du verger âgé.

Au niveau de la station expérimentale d'agronomie de Blida, le symptôme le plus spectaculaire était : des pustules sur branches de citronnier et Thomson avec sécrétion de gomme dans plusieurs cas et les taches chlorotiques étaient remarquables.

4.1.1.1. Sévérité des symptômes type psorose observés sur variétés d'agrumes durant la Campagne 2004-2005 :

Les symptômes de type psorose ont été observés dans les 6 stations agrumicoles prospectées à savoir : l'EURL Bourkiza, l'EURL Semiani, l'EURL kerfa, l'EURL, Regueyegue, la ferme Beloundja et la station expérimentale de Blida. La variabilité de l'intensité de la maladie a été remarquée (figure4.7), vu la

présence d'une gamme variétale importante d'une part et l'âge des plants d'autre part. Toutes les variétés visitées présentaient des symptômes de psorose. Ces dernières étaient des taches chlorotiques très importantes et des desquamations au niveau du tronc avec exsudation de gomme dans certains cas, dans le verger Beloundja sur la variété Hamlin, nous avons enregistré sur les 72 plants prélevés 21 présentaient des symptômes foliaires similaires à ceux de la psorose soit un pourcentage de 29,16% et des symptômes corticaux ont été observés sur 32 plants soit 44,44%. Par contre les symptômes corticaux étaient importants sur la double fine au niveau de l'EURL Semiani avec 30,30% et le pourcentage le plus faible été enregistré sur clémentine soit 8,69%. (annexe c)

Nous avons observé une très grande variabilité dans la sévérité des symptômes sur la plupart des variétés visitées dans l'EURL Regueyegue de Boufarik. Les symptômes observés sur *Tarocco* étaient essentiellement des formes d'écailllements accompagné d'exsudat de gomme et des chloroses foliaires très abondantes et généralisées sur la plus part des arbres ou nous avons enregistré 23 plants sur 43 prélevés soit 53,48%. Sur pamplemousse, satsuma et salustiana nous avons remarqués que les symptômes foliaires étaient très abondants soit respectivement 64%, 53,57%, 40%. (annexe c)

En ce qui concerne la station expérimentale de Blida les symptômes corticaux sur la variété Thomson était de 48,38% alors que sur citronnier on a enregistré 5,71%. Des symptômes corticaux relevés sur *Thomson du verger âgé de l'EURL Kerfa* était de 60,9%. Cependant les symptômes foliaires étaient dominant sur *Thomson du jeune verger* où 20 plants sur 39 prélevés soit 51,28% Présentaient les symptômes typiques de la psorose (annexe c).



Figure4.1 : A droite : feuille saine, à gauche : Eclaircissement des nervures de double fine del' eurl semiani

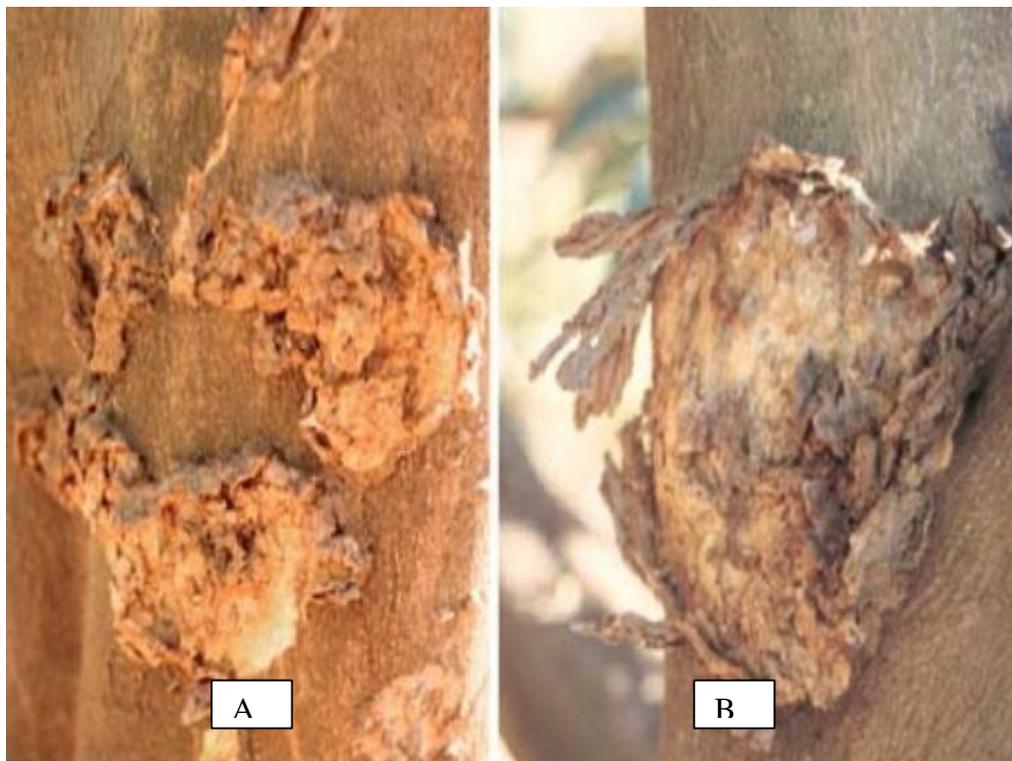


Figure4.2 : A +B : Symptôme d'écaillement sur le tronc de Washington navel de L'EURL Semiani

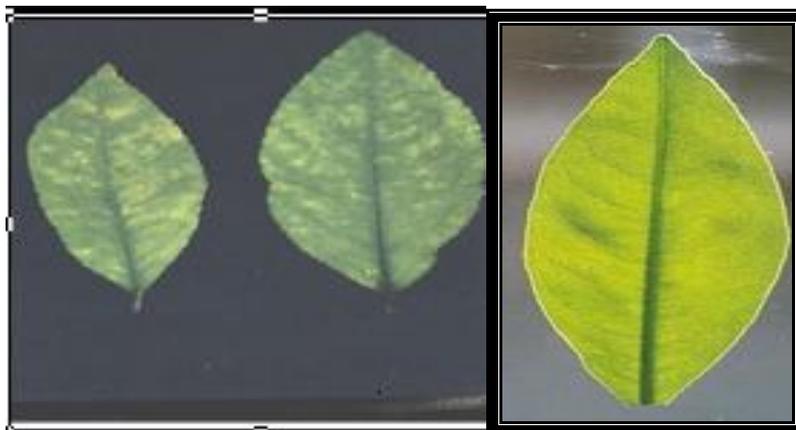


Figure4.3 : A droite : feuille saine, à gauche petites taches (pin point spotting)

Sur feuille de citronnier de l' eurl semiani



figure4.4 : desquamation du tronc et gaufrage sur Feuille de bigaradier dans

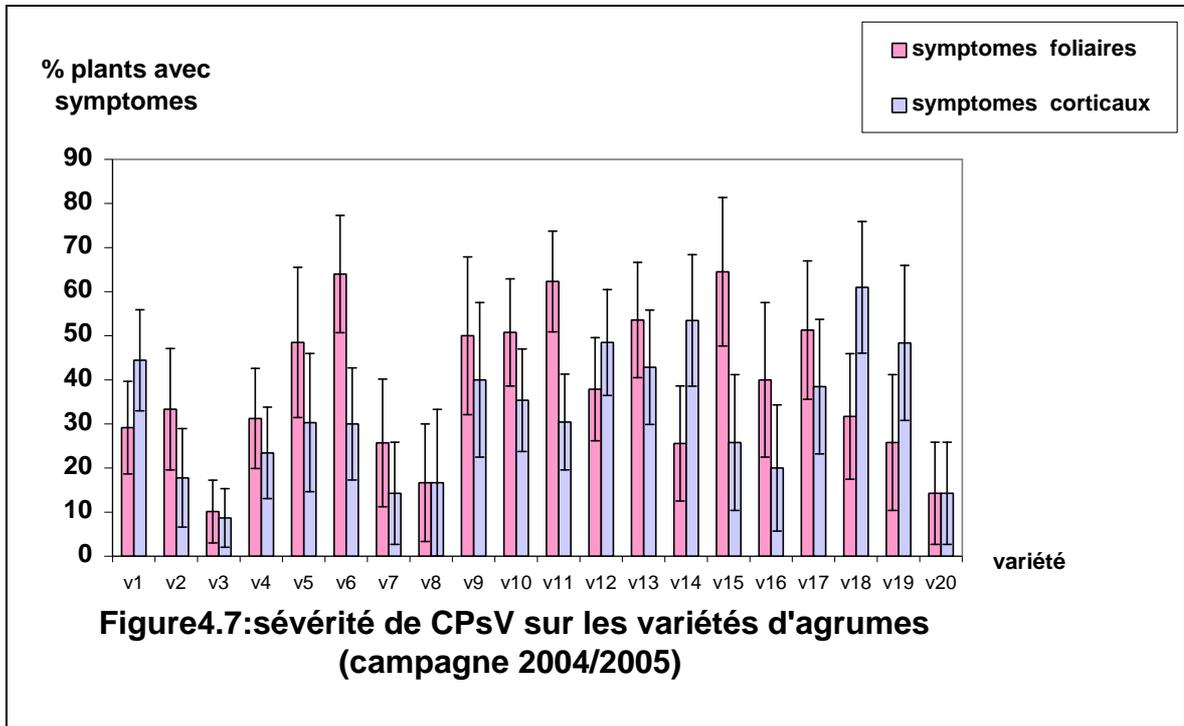
l'EURL Semiani



Figure4.5 : A droite : plant sain, à gauche : Panachure réticulée et frisolée, gaufrage et distorsion sur hamlin de la ferme Beloundja



Figure4.6 : A droite : feuille saine, à gauche : Nervures vertes et froissement des feuilles de satsuma dans l'EURL Reguyegue



4.1.2.2. Discussion :

D'après nos prospections durant la campagne 2004/2005 nous avons pu constater que la plupart des variétés présentaient des symptômes foliaires principalement des taches annulaires sur limbe, des cas de rétrécissements de la surface du limbe et des déformations foliaires avec un léger gaufrage, et des éclaircissements des nervures, Nos observations concordent avec celles décrites par ROSTACHER en 1992 sur valencia late, double fine et Washington navel.

Des symptômes d'écailllements accompagnés de sécrétion de gommages dans certains cas ont été relevés sur Washington navel, salustiana, valencia late, portugaise, sanguine et satsuma. Ces mêmes symptômes rappellent ceux observés par KLOTZ et FAWCETT en 1941 en Californie, MUTIN et al en 2002 sur oranger.

4.1.2. Symptômes observés durant la campagne agricole 2005-2006 :

L'observation des symptômes sur les variétés d'agrumes de l'EURL Semiani de la campagne 2005/2006 a été réalisé au printemps, ou on a observé sur la plupart des variétés, des taches annulaires sur les jeunes feuilles. Ces dernières étaient de couleur jaune pour les variétés valencia late, Washington navel et clémentine, un autre symptôme de taches abondantes de couleur marron a été observé sur citronnier et double fine, on a remarqué également des cas de desquamations du tronc sur toutes les variétés et sécrétion de gomme sur tronc et branches de Washington navel et double fine.

Sur les parcelles de Regueyegue nous avons observé une diversité de symptôme sur les différentes variétés prospectées. Le symptôme dominant était des formes d'écaillements accompagnés d'exsudat de gomme observés sur Tarocco (figure4.8), Des taches foliaires annulaires abondantes ont été relevées sur pamplemousse et salustiana. Des taches annulaires vertes sur fruit de satsuma et salustiana ont été également observées (figure4.9)

L'observation des symptômes sur la variété Hamlin du verger Beloundja semblent être les symptômes induits par CPsV, car ils étaient caractérisés par le développement d'écaillements sur la plupart des plants prélevés avec sécrétion de gomme sur le tronc et même sur les branches (figure4.10).

Les variétés du verger de l'EURL Kerfa ont montré des symptômes très importants de type taches annulaires autour de la nervure principale sur la variété Thomson du jeune verger le gaufrage des feuilles a été observé (figure4.11) La maladie était marquée par la présence du symptôme d'écaillement avec des exsudats de gomme sur le tronc des plants de la variété Thomson du verger âgé.

Au niveau de la station expérimentale d'agronomie de Blida, le symptôme le plus spectaculaire était l'écaillement du tronc de la variété Thomson et les taches chlorotiques remarquables sur Thomson et citronnier.

4.1.2.1. Sévérité des symptômes de la psorose observés sur les variétés d'agrumes durant la campagne 2005-2006 :

Au cours de nos prospections, nous avons observé une très grande variabilité dans la sévérité des symptômes sur la plupart des variétés prospectées (figure 4.12). Les symptômes remarquables sur *Tarocco* dans l'EURL Regueyegue de Boufarik étaient essentiellement des formes d'écaillement accompagné d'exsudat de gomme et des chloroses foliaires très abondantes et généralisées sur la plupart des arbres. Sur satsuma et salustiana nous avons observé des symptômes de taches annulaires vertes sur fruit qui étaient très abondantes. En ce qui concerne le citronnier de la station expérimentale de Blida nous avons remarqué que le symptôme le plus fréquent était des pustules sur branches. Pour le pamplemousse (EURL Regueyegue) et *Thomson* (EURL Kerfa) présentaient des symptômes de type modéré qui étaient des taches foliaires annulaires.



Figure4.8 : écaillage et sécrétion de gomme sur Tarocco dans l'EURL Regueyegue



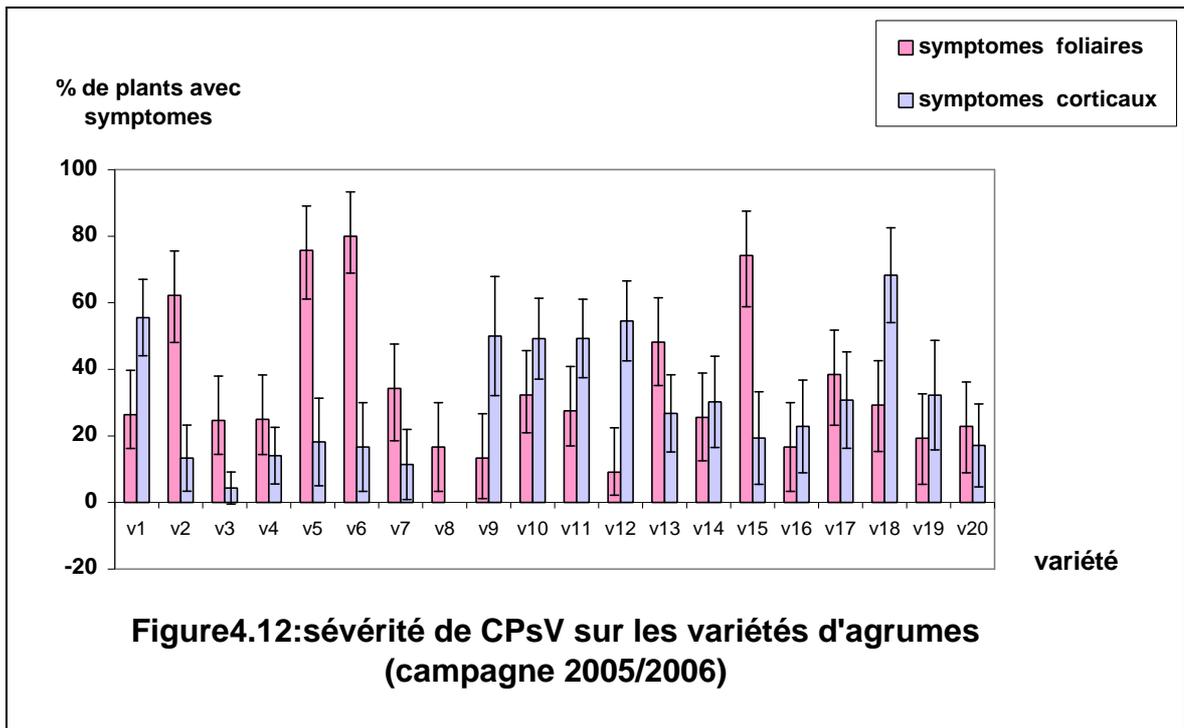
Figure 4.9 : A droite : taches annulaires vertes sur fruits de satsuma à gauche : fruit sains au niveau de l'EURL Regueyegue



Figure 4.10 : A droite : plan sain ; A +B : Écaillements avec sécrétion de gomme sur le tronc et même branche de Hamlin au niveau de la ferme Beloundja.



Figure4.11 : a droite : feuille saine, à gauche : taches annulaire avec un gaufrage des feuille de Thomson dans l'EURL kerfa



Discussion :

Les symptômes observés sur les variétés d'agrumes au cours de nos prospections durant la campagne 2005/2006 étaient de type taches annulaires pour l'ensemble des variétés, ceci correspond aux symptômes de CPsV décrit par Roistacher en 1992 sur pamplemousse .Des symptômes très développés sous formes d'écailllements accompagnés d'exsudats de gomme ont été remarqués sur Tarocco .Ces symptômes étaient identiques à ceux observés sur oranger par SWINGLE et WEBER 1896 , KLOTZ et FAWCET en1941 en Californie . Le symptôme extériorisé par satsuma et salustiana était des taches annulaires vertes sur fruits .Nos observations concordent avec ceux de ROISTACHER en 1992 sur valencia late en grèce.

4.2. Résultats de la Sérodétection :

Le nombre total d'échantillons prélevés au cours des 2 campagnes était de 1980 dont 1878 échantillons de feuilles et 102 échantillons de fleurs seulement. 467 dont 365 échantillons de feuilles et 102 échantillons de fleurs a été analysé par la technique DAS- ELISA [98]. Pour toutes les stations prospectées, la présence de la psorose a été identifiée. Sur les 467 échantillons testés, 278 ont répondu positivement, ce qui correspond à un taux 59,52%.

4.2.1. Résultat de la sero-detection durant la campagne 2004/2005 :

Les résultats du test DAS-ELISA effectué sur les échantillons de feuilles prélevés sur les différentes stations prospectées ont montré la présence de CPsV sur ces variétés testés . Toutes les variétés ont réagit positivement au test avec une incidence qui varie entre 15% et 100% (tableau 4.1)

4.2.2. Discussion:

Le test ELISA appliqué aux échantillons de feuilles des variétés d'agrumes a permis la détection de CPsV . Pour cet essai, la totalité des variétés ont réagit positivement à la DAS –ELISA. Il ressort que les variétés valencia late, double fine et salustiana se sont montrées plus sensibles à CPsV par rapport à la variété clémentine où on a enregistré l'incidence la plus faible . Ces résultats confirment nos observations sur terrain.

Tableau4.1 : Incidence de CPsV durant la campagne 2004/2005

site	variété	Nb. échan	Incidence (%)
Verger Beloundja	Hamlin	*10/16**	62,5
EURL Semiani	Citronnier	4/7	57,14
	Double fine	11/18	61,11
	Washington navel	4/9	44,44
	Valencia late	15/15	100
	poncirus trifoliata	3/5	60
	Bigaradier	7/15	46,66
	Clémentine	3/20	15
Station du département d'agronomie	Thomson	2/6	33,33
	Citronnier	2/3	66,66
EURL kerfa	Thomson verger âgé	4/5	80
	Thomson jeune verger	1/2	50
EURL Bourkiza	Bigaradier	3/10	30
	Sanguine	10/23	43,47
	Double fine	13/13	100
	Portugaise	8/15	53,33
EURL Regueyegue	Salustiana	5/5	100
	Tarocco	10/20	50
	Satsuma	1/3	33,33
	Pamplemousse	6/7	85,71
Total		122 /217	56,22

* : nombre d'échantillon ayant répondu positivement

** : nombre d'échantillon testés

4.2.2. Résultat de la sero-detection durant la campagne 2005/2006 :

Le test sérologique DAS -ELISA effectué sur les échantillons de chaque variété a révélé la présence de CPsV sur toutes ces variétés où l'incidence de la maladie variait entre 18,18 % a 100% 5 (tableau 4.2) .

Tableau 4.2 : Incidence de CPsV durant la campagne 2005/2006

site	variété	Nb.échan	Incidence (%)
Verger Beloundja	Hamlin	*13/15**	86,66
EURL Semiani	Citronnier	3/4	75
	Double fine	13/13	100
	Washington navel	9/9	100
	Valencia late	11/12	91,66
	Poncirus trifoliata	4/5	80
	Bigaradier	2/5	40
	Clémentine	2/11	18,18
Station du département d'agronomie	Thomson citronnier	3/4 1/3	75 33,33
	Thomson verger agé	3/4	75
EURL kerfa	Thomson jeune verger	2/2	100
	Bigaradier	1/10	10
EURL Bourkiza	Sanguine	7/10	70
	Double fine portugaise	14/14	100
		5/8	62,5
EURL Regueyegue	Salustiana	5/5	100
	Tarocco	3/9	33,33
	Satsuma	1/2	50
	pamplemousse	1/3	33,33
TOTAL		103/148	69,59

* : nombre d'échantillon ayant répondu positivement

** : nombre d'échantillon testes

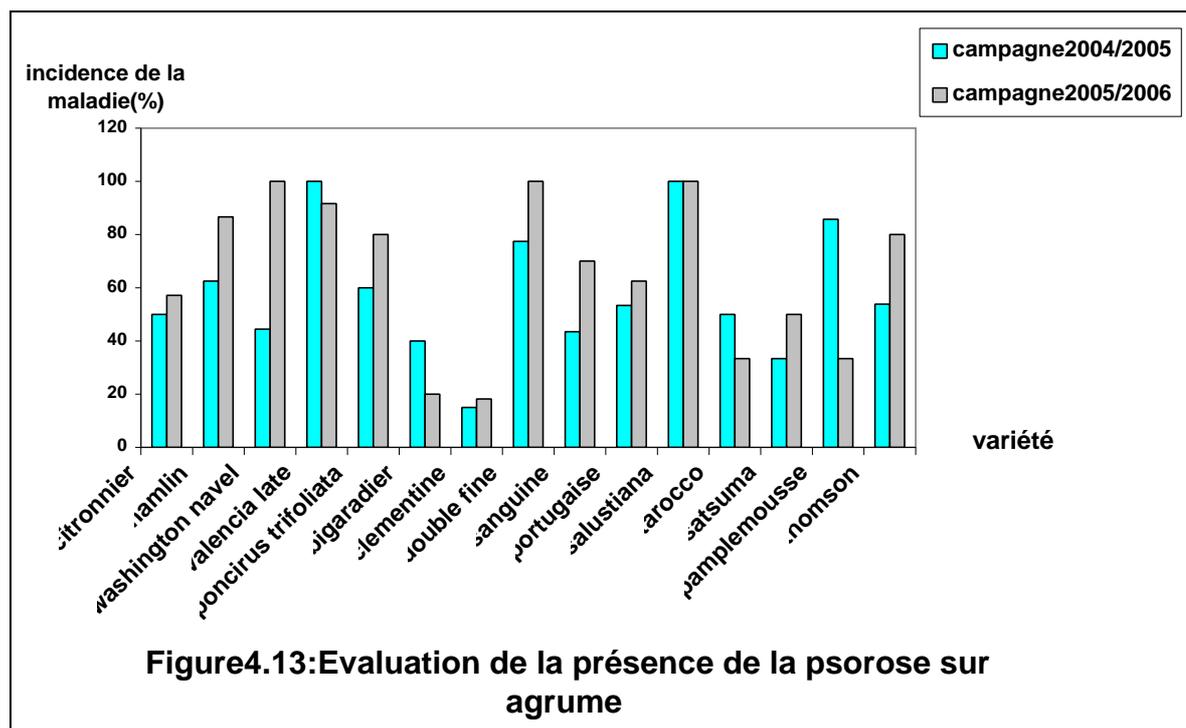
4.2.2.2. Discussion :

Les réponses positives au test sérologique DAS –ELISA enregistrées ont expliqué la forte présence du virus dans ces variétés d'agrumes ce qui a confirmé les symptômes observés sur terrain la variété clémentine s'est montrée moins sensible à CPsV par rapport à la variété Washington navel.

4.2.3. Evaluation de la présence du CPsV sur agrume durant les 2 campagnes

(2005/2005-2005/2006) :

Selon les différentes incidences obtenues par variété durant les deux campagnes (figure 4.13) nous avons remarqué que le taux d'infection de la psorose était variable d'une variété à l'autre, et dans le classement inter-variétale, le sommet est occupé par salustiana, valencia late, Washington navel et double fine avec une incidence de 100%, ce qui explique les symptômes observés sur terrain suivi par la Hamlin, Pamplemousse et Tarocco, par contre nous avons constaté que la variété Clémentine était la plus tolérante ou résistante à la psorose où la plus faible incidence a été enregistrée.



4.2.4. Discussion :

La présence des symptômes de type CPsV dans les différentes stations prospectées, a été confirmée par le test DAS-ELISA qui s'est révélé positif pour 59,52% d'échantillons testés. Cela peut être dû au fait que les prospections ont été réalisées au printemps où les meilleurs résultats peuvent être obtenus avec les échantillons collectés durant cette période. Les résultats de la DAS-ELISA, nous ont permis de détecter des plants atteints de psorose sur différentes variétés et porte-greffes. D'après ces résultats nous pouvons confirmer la présence de la psorose en Algérie déjà signalée sur plusieurs variétés d'agrumes à Boufarik.[9][10][11][12].

Selon les résultats obtenus par la DAS-ELISA réalisée pour les échantillons durant des 2 campagnes, nous avons remarqué que l'incidence de la maladie de la psorose était variable d'une station à une autre. Cette dernière est due aux pratiques culturales [4] ou à l'utilisation du matériel de multiplication infecté (greffons ou porte-greffes provenant des plants infectés) [7] ce qui a été prouvé dans les EURL Bourkiza et Semiani où les échantillons du *Bigaradier et poncirus trifoliata* 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 de psorose ont été multipliées par des porte-greffes de *Bigaradier et poncirus trifoliata* infectés. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par BOVE, 1981 [102] et par BOVE et al, 1984 [103], où des réponses positives ont été obtenues dans le diagnostic de la maladie de la psorose .

4.2.5. Dosage immuno-enzymatique sur la présence du CPsV sur fleurs :

Le test DAS-ELISA effectué sur les échantillons de fleurs issues des différentes stations prospectées a révélé la présence de CPsV sur les variétés étudiées, sur 102 échantillons testés 53 ont répondu positivement au test DAS-ELISA soit une incidence de 51,96% (tableau 4.3)

Tableau 4.3: incidence de CPsV sur échantillons de fleurs

Site	variété	Nb. échan	Incidence (%)
EURL Semiani	<i>Double fine</i>	*9/14**	64,28
	<i>Valencia late</i>	3/6	50
	<i>clémentine</i>	1/5	20
EURL Bourkiza	<i>Portugaise</i>	5/10	50
	<i>double fine</i>	2/5	40
	<i>Thomson</i>	3/11	27,27
EURL kerfa	<i>Thomson verger agé</i>	26/36	72,22
	<i>Thomson jeune verger</i>	4/15	26,66
TOTAL		53/102	51 ,96

* : nombre d'échantillon ayant répondu positivement

** : nombre d'échantillon testes

4.2.5.1. Discussion :

Les résultats obtenu en DAS –ELISA sur échantillons de fleurs confirme la présence du virus de la psorose sur fleurs. Egalement toutes les fleurs ayant répondu positivement à la DAS- ELISA proviennent des plants atteint de psorose , ceci explique la systémie de l'infection de la plante par la psorose ;nos résultats concordent avec ceux obtenu par CAMBIRA et alen1995 et GARCIA et ALen1997 en utilisant la technique de la DAS –ELISA.

4.3.1. Résultats de la détection biologique par indexage :

Après 6 mois d'inoculation nous avons observé que sur 82 plants inoculés, 44 ont extériorisé des symptômes plus ou moins fort, ce qui a donné un taux de transmission de 53,65%. Les plants inoculés par le candidat *salustiana*, avaient extériorisé des symptômes caractéristiques de la psorose qui étaient des taches annulaires sur une partie du limbe, et un gaufrage des feuilles (figure 4.14). Pour les candidats de *Hamlin* les symptômes révélés étaient des chloroses foliaires, des décolorations sur le limbe entre les nervures secondaires. Uniquement 1 plant inoculé par la *satsuma* avait extériorisé des symptômes de jaunissement des feuilles, accompagnées d'un rétrécissement de la surface du limbe. Sur les plants inoculés par le *pamplemousse* les symptômes étaient de petites plages claires sur une partie du limbe (figure 4.15). Les symptômes de type chloroses foliaires, un léger gaufrage du limbe a été obtenus sur les plants inoculés par Tarocco (figure 4.16). Par contre les plants inoculés par la *Washington navel* ont extériorisé des symptômes de taches légèrement arrondies très importantes. On a remarqué sur les plants inoculés par la variété double fine les symptômes de décoloration sur le limbe entre les nervures secondaires et même sur les nervures principales (figure 4.17) accompagnés d'un rétrécissement de la surface du limbe.

Pour les autres variétés (portugaise citronnier bigaradier clémentine sanguine, valencia late (plantation 2002 et 1978, *poncirus trifoliata*) les symptômes observés étaient de petites plages claires sur feuilles et légèrement arrondies avec un limbe rétréci.

Les plants inoculés par le témoin positif de *Hamlin* ont extériorisé les symptômes typiques de CPsV qui était des taches annulaires foliaires avec rétrécissement de la surface du limbe.



Figure4.14 : A droite : plant sain a gauche : taches annulaires sur une partie du Limbe, et un gaufrage des feuilles (inocule par salustiana)

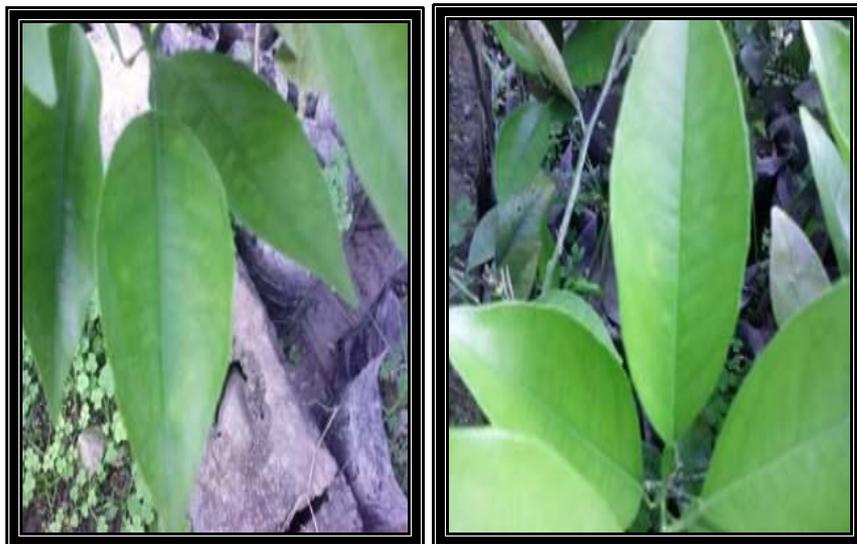


Figure 4.15 : a droite : plant sain a gauche : symptômes de petites plage claires sur une partie du limbe (inocule par pamplemousse)

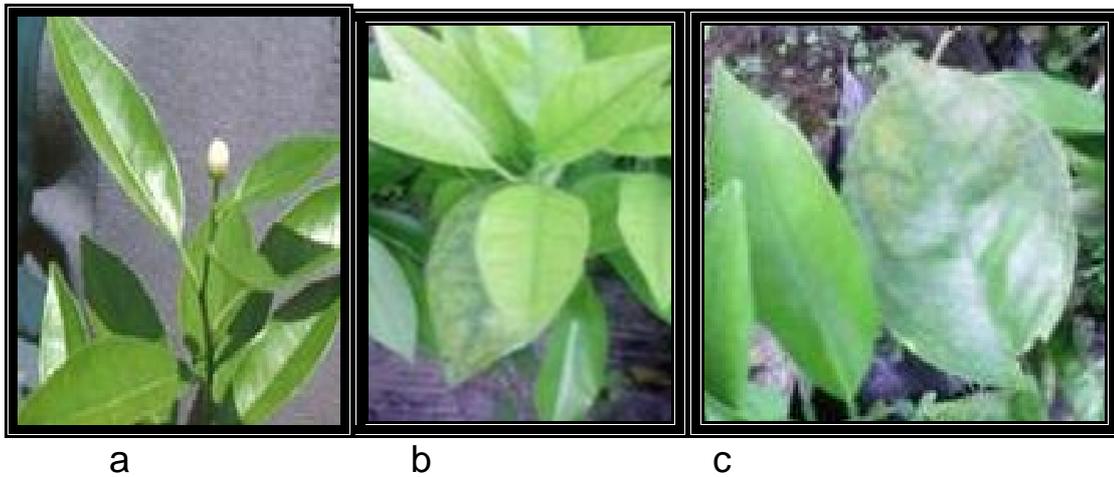


Figure 4.16 : a : feuille saine, b+c : symptômes de type chloroses foliaires

inoculé par Tarocco



Figure 4.17 : a droite : plant sain, a gauche : décoloration du limbe entre les nervures secondaires et même sur les nervure principale et un Rétrécissement de la surface du limbe. (Inoculé par double fine)

Discussion :

Dans les essais d'indexage sur plante indicatrice (Hamlin), il a été constaté que la maladie s'est développée sur un grand nombre de plants indexés. En effet les plants ont exprimé des symptômes caractéristiques de la psorose. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par ROISTACHER et NAUER en 1964. Ces symptômes correspondent à un taux de transmission, de 53,65%. Ce développement des symptômes indique la bonne réceptivité de ces plants au virus de la psorose, se traduisant par l'installation du pathogène, son développement et l'expression de son pouvoir pathogène aux contacts des plants d'agrumes. En comparaison avec le témoin positif qui a extériorisé des symptômes typiques de la psorose. Les symptômes extériorisés étaient plus forts sur les plants inoculés par le candidat double fine, *Washington navel*, bigaradier, pamplemousse, Tarocco, Hamlin et salustiana ce qui confirme la transmission mécanique de la psorose. L'ensemble des types de symptômes observés sur les plants indexés sont typiques et caractéristiques de la psorose et se rapprochaient beaucoup de ceux observés sur les variétés des stations prospectées.

4.3.2. Résultats de la transmission par greffage :

Les symptômes ont été apparus après 3 semaines de greffage, sur un nombre de 42 plants inoculés, 33 ont extériorisés des symptômes ce qui a donné un taux de transmission de 78,57%. Nous avons obtenu des symptômes caractéristiques de la psorose sur les plants greffés sur bigaradier qui ont été de taches annulaires sur une partie du limbe (figure 4.18), feuilles déformées avec un léger gaufrage a été enregistré également des cas de rétrécissement de la surface du limbe ont été observés (figure 4.19). Les plants ont extériorisés des symptômes sur feuilles ou on a observé des taches annulaires sur la totalité du limbe figure (4.20).

Pour ceux inoculés sur *Poncirus Trifoliata* les symptômes observés étaient de petites plages claires sur les feuilles accompagnées d'un gaufrage du limbe (figure 4.21).

Les plants inoculés sur le *citranger troyer* ont extériorisé des symptômes de feuilles déformées accompagnés d'un rétrécissement de la surface du limbe, sur certains plants on a pu observé de petites plages claires.

Discussion :

Notre expérimentation a mis en évidence l'étude de la transmission mécanique de la psorose par greffage. Afin de définir le taux de transmission de cette maladie qui est liée au type de porte greffe, les inocula ont été introduits dans le même compartiment hébergeant le pathogène. Les plantules greffées ont extériorisé des symptômes variables en fonction du type d'inoculum utilisé ceci confirme la transmission de CPsV par greffage. L'évolution de la maladie sur *poncirus trifoliata* est moins importante que sur le bigaradier. Nos résultats concordent avec ceux obtenu par ROSTACHER en 1992.

Cependant les plants greffés sur *citrange* n'ont pas engendré de fort symptômes cela peut être dû à la faible concentration de CPsV dans les échantillons utilisés comme source d'inoculum ou à sa faible réplication dans la plante.

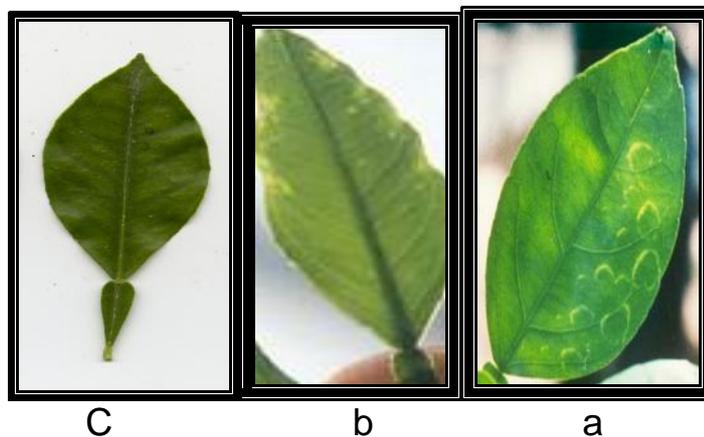


Figure 4.18 : a+b : tache annulaire sur une partie du limbe sur Le plant greffe sur bigaradier ;c : feuille saine



Figure 4.19 :a+b feuilles déformées avec un léger gaufrage sur feuille de Bigaradier c :feuille saine

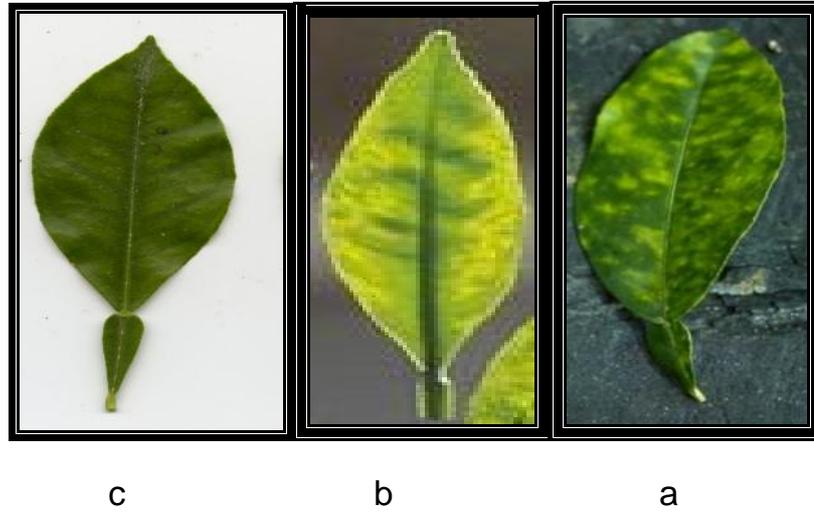


Figure 4.20 : a +b: taches annulaire sur la totalité du limbe sur feuille de Bigaradier c : feuille saine



Figure4.21 : de petites plages claires sur les feuilles accompagnées d'un gaufrage du limbe.

4.3.3. Résultats de la séro-détection des échantillons issu du test d'indexage

Pour le test d'indexage. Sur 80 échantillons testés seulement 42 échantillons ont répondu positivement au test DAS- ELISA soit une incidence de 52,50% (figure 4.23). Les plants inoculés par *valencia* late nous avons 6 échantillons positifs (3échantillons appartenant a *valencia* 2002 et les autre a *valencia* 1978). Nous avons obtenu 4 échantillons positifs sur 10 testés sur les plants inoculés par la double fine (2 échantillons de doubles fins 2002 et 2 échantillons de double fine 1987) avec une incidence de 40%. Sur les plants inoculés par Washington navel, nous avons enregistré 4 échantillons positifs sur 5 testés soit une incidence de 80%, Par contre sur les plants inoculés par Clémentine une incidence de 20% a été calculé, seulement 2 échantillons a été enregistré positif sur échantillons inoculé par citronnier, portugaise, sanguine, satsuma , *Poncirus trifoliata*, bigaradier. Sur ceux inoculés par pamplemousse, 3 échantillons ont été révélés positifs sur 5 échantillons testés ce qui a permit d'obtenir une incidence de 60 %. par contre sur 10 échantillons testés par *Tarocco*, 4 échantillons a été enregistrés positif soit une incidence de 80%. Une incidence de 100% a été enregistrée sur les plants inoculés par le candidat Hamlin et salustiana .Les échantillons du témoin positif ont réagit positivement au test DAS-ELISA (Tableau 4.4).

4.3.4. Résultats de la séro-détection des échantillons issus du test de greffage

La plupart des plants d'agrumes greffés ont extériorisés des symptômes de psorose, mais sur 36 plants d'agrumes testés, seulement 25 ont répondu positivement au test DAS-ELISA soit une incidence de 69 ,44% (figure 4.22). Les plants greffés sur bigaradier ont révélés une incidence de 100% cependant les plants inoculés sur *Poncirus trifoliata*, où nous avons obtenu 7 échantillons positifs sur 12 testés soit 58,33%. Pour ceux greffés sur le porte- greffe citrange carrizo, une incidence de 41,66% a été calculée, Où 5 échantillons a été obtenus positifs sur 12 testés. Les échantillons issus des plants greffés par le témoin positif ont répondu positivement au test DAS ELISA (tableau4.5).

Tableau 4.4: résultats de la DAS- ELISA obtenu pour les échantillons issus du test d'indexage

Variétés	Nbre de plants avec symptômes après indexage	Test serologique	
		DO	observation
T+	2/2	2,450	+
		2,450	+
T-	2/2	0,015	-
		0,015	-
Double fine2002	2/5	0,002	-
		2,339	+
		2,116	+
		0,011	-
		0,002	-
		0,002	-
Valencia2002	2/5	2,225	+
		0,000	-
		0,000	-
		2,119	+
		0,001	-
Washington navel	4/5	2,235	+
		2,355	+
		0,011	-
		2,356	+
		2,266	+
Bigaradier	2/5	0,011	-
		2,359	+
		0,000	-
		2,225	+
		0,002	-
Poncirus trifoliata	2/5	0,003	-
		2,368	+
		2,219	+
		0,001	-
		0,002	-
Double fine1987	2/5	0,001	-
		0,002	-
		2,500	++
		2,355	+
		0,011	-
Citronnier	2/5	0,011	-
		2,250	+
		0,000	-
		0,009	-
		2,119	+
Portugaise	2/5	0,000	-
		2,356	+

		0,013	-
		2,260	+
		0,008	-
Pamplémousse	3/5	0,004	-
		2,358	+
		2,458	++
		0,009	-
		2,119	+
Satsuma	2/5	2,400	+
		2,210	+
		0,001	-
		0,002	-
Tarocco	4/5	2,119	+
		2,504	++
		2,000	+
		2,009	+
Sanguine	2/5	0,011	-
		0,002	-
		2,353	+
		2,300	+
Hamlin	5/5	2,119	+
		2,350	+
		2,356	+
		2,750	++
Valencia 1978	2/5	2,314	+
		0,000	-
		2,362	+
		0,015	-
Salustiana	5/5	2,358	+
		2,302	+
		2,119	+
		2,112	+
Clémentine	1/5	2,353	+
		0,015	-
		0,011	-
		0,012	-

DO : densité optique

T+ : Témoin positif

T- : Témoin négatif

++ : Échantillon >DO Témoin positif

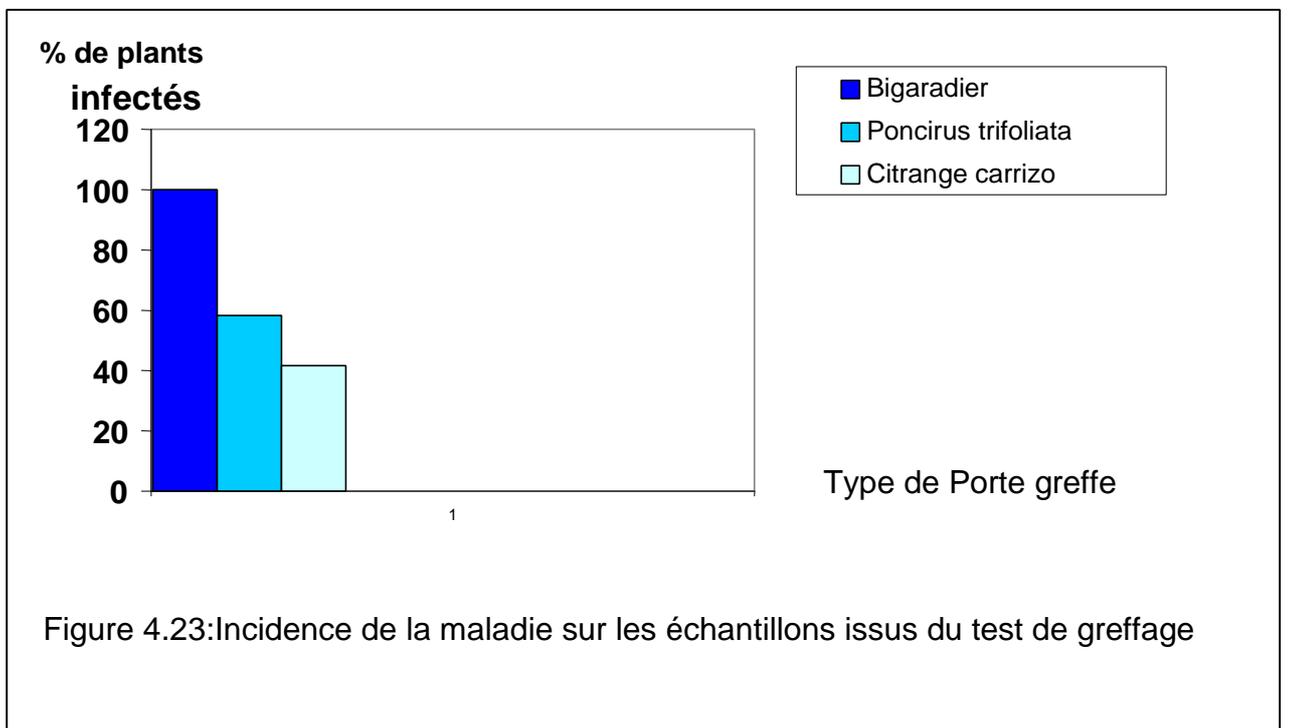
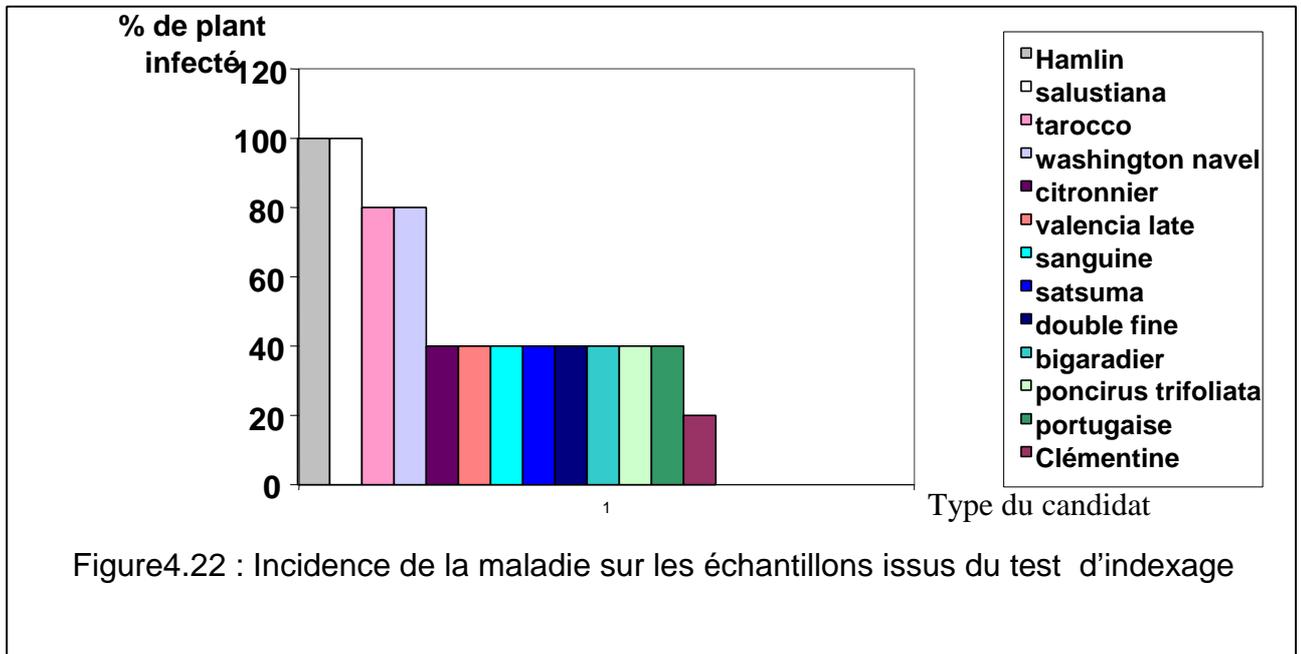
Tableau4.5 : résultats de la DAS-ELISA obtenu pour les échantillons issus du test de greffage

variétés	Nb de plants avec symptômes après greffage	DO	test sérologique
T+	2/2	2,300	+
		2,450	+
T-	-	0,015	-
Bigaradier	12/12	2,353	+
		2,300	+
		2,150	+
		2,119	+
		2,350	+
		2,356	+
		2,353	+
		2,300	+
		2,150	+
		2,119	+
		2,350	+
		2,356	+
T+	2/2	2,300	+
		2,450	+
T-	-	0,015	-
Poncirus Trifoliata	07/12	2,322	+
		0,009	-
		0,003	-
		2,356	+
		2,353	+
		2,300	+
		0,011	-
		2,321	+
		0,011	-
		2,219	+
		0,009	-
		2,356	+
T+	2/2	2,300	+
		2,450	+
T-	-	0,015	-
Citrange carrizo	06/12	2,300	+
		2,150	+
		2,119	+
		0,011	-
		2,300	+
		0,015	-
		0,002	-
		0,003	-
		0,009	-
2,300	+		

DO : densité optique

T+ : Témoin positif

T- : Témoin négatif



CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude menée sur le CPsV dans les 6 stations prospectées (station expérimentale d'agronomie de Blida, EURL Semiani Hadjout, EURL Bourkiza Hadjout, EURL Regueyegue Boufarik, ferme Beloundja Tipaza et l' EURL Kerfa a permis de détecter la présence de ce virus sur plusieurs variétés d'agrumes.

Les prospections faites sur agrumes des 2 campagnes (2004/2005) et 2005/2006) ont montré des symptômes typiques du virus sur plusieurs variétés des 6 stations. Ces symptômes étaient plus fréquents durant la campagne (2004/2005) que la campagne (2005/2006). Durant ces prospections on a remarqué que les symptômes foliaires de la psorose étaient modérés par contre les symptômes corticaux étaient sévères.

Les résultats de la DAS-ELISA ont confirmé les symptômes observés. Ces résultats ont montré que toutes les variétés d'agrumes étaient infectées par le virus avec une incidence 59,52%. L'inoculation des échantillons par indexage sur *Hamlin* et par greffage sur porte greffe d'agrumes a permis l'extériorisation des symptômes typiques de la psorose (tache annulaires sur feuilles, rétrécissement de la surface du limbe, gaufrage des feuilles et des chloroses foliaires plus ou moins sévères, avec un taux de transmission de 52,50% sur *Hamlin* et 69,44% sur portes greffes.

Enfin, l'analyse sérologique des échantillons provenant de la gamme d'hôte du test de d'inoculation biologique (transmission par indexage et par greffage) a confirmé la transmission mécanique de ce virus et sa présence.

Notre travail, s'inscrit dans la logique d'une meilleure connaissance du CPsV. Par notre travail nous avons confirmé la présence de la psorose sur les mêmes variétés ou la psorose a été déjà signalé (Thomson navel, valencia late et clémentine), nous avons également détecter et identifier le CPsV sur d'autre variétés a savoir : citronnier, Washington navel, double fine, portugaise, Hamlin, satsuma salustiana, sanguine pamplemousse, Tarocco, et sur 2 porte greffes(poncirus trifoliata , bigaradier).

De part les informations intéressantes déduites, notre étude mérite d'être poursuivie par d'autres travaux plus poussés qui incluraient :

- L'élargissement des prospections à toutes les zones agrumicoles afin de détecter le CPsV.

- Caractérisation du vecteur de CPsV qui un champignondu genre Olpidium.

- La recherche et l'étude de ce virus dans les nouvelles variétés.

- L'étude épidémiologique de la maladie pour mieux comprendre l'évolution des symptômes et déterminer les stades les plus sensibles à l'infection.

- Des études approfondies impliquant les techniques moléculaires pour mieux apprécier le taux et les mécanismes de la transmission par le greffage, par vecteur et par d'autre moyen s'ils existent.

Enfin et à titre préventif, il faut penser à mettre en place des méthodes de lutte qui pourraient diminuer l'incidence de la maladie telles que :

- contrôle rigoureux des lots de variétés et porte greffes importés.

- adaptation d'un programme de certification de tous les champs agrumicoles et si c'est possible de tous les lots de variétés utilisés pour la production des agrumes.

- utilisation des variétés résistantes à la maladie sous nos conditions.

APPENDICE A
LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ARNr	: Acide ribonucléique ribosomale
ARNt	: Acide ribonucléique de transfert
°C	: Degree celçus
<i>CPsV</i>	: <i>Citrus psorosis virus</i>
CV	: Cultivars
DAS-ELISA	: Anticorps polyclonaux-ELISA
D.O	: Densité optique
EDTA	: Ethylendiaminotétracide
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EURL	: Entreprise Unipersonnelle à Responsabilité 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 Sanwich-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 : 0,05MPhosphate mono potassique (KH_2PO_4)

1,425 g

Eau distillée

1000 ml

Solution finale

Solution A

143 ml

Solution B

57 ml

Eau distillée

800 ml

APPENDICE E
RESULTATS DE LA DAS-ELISA

Code	Site	Variété	Organe testé	Résultat	D.O
TM	EURL Beloundja	Hamlin	Feuille	+	2,450
TS				-	0,015
1				+	2,161
2				+	2,300
3				+	2,230
4				+	2,110
5				+	2,350
6				+	2,210
7				+	2,431
8				+	2,351
9				+	2,410
10				+	2,338
11				+	2,356
12				-	0,001
13				-	0,002
14				+	2,350
15				-	0,009
16				+	2,410
17				+	2,412
18				+	2,392
19				-	0.011
20				+	2,419
21				+	2,410
22				+	2,338
23				+	2,413
24				-	0.011
25				+	2,400
26				+	2,442
27				+	2,351
28				-	0.009
29				-	0,002
30	+	2,445			
31	-	0,000			
32	EURL Semiani	Citronnier	Feuille	-	0,008
33				+	2,352
34				+	2,392
35				+	2,300
36				+	2,392

37				-	0,008
38				+	2,442
39				+	2,365
40				-	0,008
41				+	2,365
42				-	0,001
43				+	2,000
44				+	2,009
45				-	0,002
46				+	2,119
47				-	0,013
48				+	2,118
49				+	2,355
50				-	0,000
51				+	2,365
52				+	2,355
53				-	0,001
54				-	0,009
55				+	2,119
56				+	2,127
57				-	0,003
58				-	0.003
59				-	0.009
6				-	0.011
61				-	0.003
62				-	0.009
63				-	0.001
64				-	0.008
65				+	2,441
66				+	2,410
67				-	0.009
68				-	0.009
69				-	0.011
70				-	0.003
71				-	0.001
72				-	0.009
73				-	0.011
74				-	0.002
75				-	0.009
76				-	0.009
77				-	0.003
78				+	2,353
79				-	0.001
80				-	0.001
81				-	0.001
82				-	0.011

83				+	2,350
84				-	0.011
85				-	0.009
86				+	2,355
87				-	0.005
88				-	0.011
89	EURL semiani	Valencia Late	Feuille	+	2,335
90				+	2,338
91				+	2,410
92				+	2,410
93				+	2,442
94				+	2,335
95				+	2,116
96				+	2,119
97				+	2,225
98				-	0,002
99				+	2,225
100				+	2,220
101				+	2,355
102				+	2,410
103				+	2,355
104				+	2,336
105				+	2,335
106				+	2,339
107				+	2,110
108				+	2,000
109				+	2,115
110				+	2,115
111	+	2,115			
112	+	2,119			
113	+	2,119			
114	+	2,200			
115	+	2,335			
116	EURL Semiani	Bigaradier	Feuille	-	0.003
117				-	0.003
118				+	2,335
119				-	0.003
120				+	2,336
121				-	0.005
122				-	0.009
123				-	0.009
124				-	0.003
125				+	3,335
126				+	2,119
127				+	2,119
128				-	0.001
129				-	0.001
130				+	2,115

131				+	2,115
132				+	2,235
133				+	2,410
134				-	0.009
135				-	0.009
136	EURL Semiani	Washington navel	Feuille	+	2,335
137				+	2,410
138				+	2,336
139				+	2,335
140				-	0.005
141				+	2,410
142				-	0.003
143				+	2,441
144				+	2,449
145				+	2,410
146				-	0.011
147				-	0.009
148				+	2,410
149				+	2,119
150				+	2,115
151				+	2,119
152				-	0.003
153				+	
154	EURL Regueyegue	Salustiana	Feuille	+	2,119
155				+	2,445
156				+	2,355
157				+	2,432
158				+	2,435
160				+	2,440
161				+	2,353
162				+	2,339
163				+	2,336
164				+	2,229
165	Station exp	Citronnier	Feuille	+	2,335
166				+	2,119
167				-	0.001
168				-	0.003
169				-	0.011
170					0,001
171	EURL Bourkiza	Bigaradier	Feuille	-	0.001
172				+	2,335
173				-	0.002
174				+	2,119
175				-	0.003
176				-	2,116
177				-	0.001
178				-	0,001

179				+	2,115
180				-	0,011
181				-	0,003
182				-	0,011
183				-	0,011
184				-	0,009
185				-	0,008
186				-	0,000
187				-	0,002
188				+	2,330
189				-	0,009
190				-	0,010
191				-	0,009
192				-	0,003
193	EURL Kerfa	<i>Thomson agée</i>	Feuille	+	2,000
194				+	2,119
195				+	2,115
196				+	2,130
197				+	2,100
198				+	2,000
199				+	2,113
200				+	2,116
201	EURL Bourkiza	<i>Double fine</i>	Feuille	+	2,114
202				+	2,200
203				+	2,353
204				+	2,410
205				+	2,450
206				+	2,350
207					2,442
				+	
208				+	2,119
209				+	2,115
210				+	2,130
211				+	2,100
212				+	2,000
213				+	2,113
214				+	2,000
215				+	2,114
216				+	2,150
217				+	2,410
218				+	2,440
219				+	2,000
220				+	2,119
221				+	2,115
222				+	2,130
223				+	2,100
224				+	2,000

225				+	2,113
226				+	2,000
227	EURL semiani	Double fine	Feuille	-	0,009
228				+	2,119
229				-	0,001
230				+	2,441
231				+	2,312
232				-	0,003
233				-	0,009
234				+	2,410
235				+	2,442
236				+	2,353
237				-	0,005
238				+	2,321
239				+	2,154
240				+	2,213
241				-	0,003
242				+	2,353
243				+	2,356
244				+	2,412
245				-	0,005
246				+	2,321
247	+	2,316			
248				+	2,362
249	EURL Bourkiza	<i>Portugaise</i>	Feuille	+	2,112
250				-	2,354
251				+	2,449
252				-	2,112
253				+	2,441
254				+	2,354
255				+	2,112
256				-	0,003
257				-	0,009
258				+	2,353
259				+	2,400
260				+	2,000
261				+	2,119
262				+	2,200
263				-	0,002
264				-	0,004
265				+	2,312
266				+	2,119
267				+	2,335
268				-	0,009
269				-	0,003
270				-	0,001
271				-	0,009

272	EURL Bourkiza	<i>Sanguine</i>	Feuille	+	2,118
273				-	0,003
274				-	0,003
275				-	0,006
276				+	2,410
277				-	0,001
278				+	2,441
279				+	2,359
280				+	2,392
281				-	0,003
282				-	0,009
283				+	2,355
284				-	0,006
285				-	0,001
286				-	0,003
287				-	0,009
288				+	2,119
289				+	2,119
290				+	2,115
291				-	2,412
292				-	0,003
293				+	2,412
294				+	2,413
295				+	2,359
296				+	2,390
297				+	2,159
298				-	0,003
299				+	2,369
300				-	0,005
301				+	2,126
302	-	0,003			
303	+	2,368			
304	-	0,001			
305	-	0,011			
306	EURL Regueyegue	<i>Tarroco</i>	Feuille	-	0,003
307				+	2,359
308				-	0,012
309				+	2,112
310				+	2,354
311				+	2,449
312				+	2,112
313				+	2,441
314				+	2,354
315				+	2,112
316				+	2,412
317				+	2,413
318				+	2,359
319				+	2,390

320				+	2,159
321				-	0,009
322				-	0,003
323				-	0,001
324				-	0,001
325				-	0,009
326				-	0,003
327				-	0,011
328				-	0,009
329				-	0,005
330				-	0,009
331				-	0,003
332				-	0,001
333				-	0,002
334	EURL	Pamplemousse	Feuille	-	0,009
335	Regueyegue			-	0,009
336				+	2,412
337				+	2,413
338				+	2,359
339				+	2,390
340				+	2,159
341				-	0,011
342				+	2,413
343				+	2,359
344	EURL	Thomson	Feuille	-	0,001
345	kerfa	jeune.p		+	2,441
346				+	2,354
347				+	2,112
348	Station exp	Thomson	Feuille	+	2,412
349				+	2,413
350				-	0,001
351				+	2,390
352				+	2,159
353				-	0,009
354				-	0,012
355				-	0,011
356				+	2,359
357	EURL	<i>Double fine</i>	Fleur	+	2,441
358	Semiani			+	2,354
359				+	2,112
360				+	2,363
361				-	0,009
362				-	0,001
363				+	2,412
364				+	2,413
365				+	2,359
366				-	0,011
367				+	2,159

368				-	0,012
369				+	2,159
370				-	0,009
371	EURL Semiani	<i>clémentine</i>	Fleur	+	2,413
372				+	2,359
373				-	0,001
374				-	0,011
275				+	2,413
376	EURL Semiani	<i>valencia</i>	Fleur	-	0,012
377				+	2,413
378				+	2,359
379				-	0,001
380				-	0,003
381				+	2,412
382	kerfa	<i>Thomson J.V</i>	Fleur	-	0,009
383				+	2,359
384				+	2,390
385				+	2,4132,159
386				+	2,413
387				-	0,003
388				-	0,009
389				-	0,011
390				-	0,003
391				-	0,003
392				-	0,001
393				-	0,006
394				-	0,009
395				-	0,008
396				-	0,011
397	EURL Bourkiza	<i>Double fine</i>	Fleur	-	0,012
398				-	0,013
399				+	2,413
400				+	2,359
401				-	0,011
402	Bourkiza	Portugaise	Fleur	+	2,365
403				-	0,009
404				+	2,423
405				-	0,003
406				-	0,009
407				+	2,419
408				+	2,423
409				-	0,011
410				-	0,012

411				+	2,119
412	EURL kerfa	Thomson V.A	Fleur	-	0,009
413				-	0,012
414				-	0,011
415				-	0,012
416				+	2,359
417				+	2,441
418				+	2,354
419				+	2,112
420				+	2,423
421				+	2,432
422				-	0,009
423				+	2,112
424				+	2,412
425				+	2,413
426				-	0,003
427				-	0,001
428				-	0,009
429				+	2,412
430				+	2,413
431				+	2,232
432				+	2,441
433				-	0,005
434				+	2,441
435				+	2,354
436				+	2,112
437				+	2,412
438				+	2,413
439				-	0,009
440				+	2,441
441				+	2,354
442	+	2,112			
443	+	2,412			
444	+	2,413			
445	+	2,156			
446	+	2,390			
447	+	2,159			
448	EURL Bourkiza	Thomson	Fleur	-	0,009
449				-	0,005
450				-	0,001
451				+	2,350
452				+	2,410
453				-	0,001
454				-	0,011
455				-	0,009
456				+	2,350
457				-	0,001
458				-	0,003

459	EURL Semiani	Double fine	Feuille	+	2,250
460				+	2,116
461				+	2,145
462				+	2,350
463				+	2,410
464				+	2,250
465				+	2,353
466				+	2,369
467				+	2,156

APENDICE C
Sévérité de la maladie Durant la campagne 2004/2005

site	N° V	varietés	Nbr de plant prèlevé	Nbr et (%) de plants avec symptômes foliaire	Nbr et (%) de plants avec symptôme corticaux
Verger Beloundja	V1	Hamlin	72	*29,16±10,49	44,44±11,47
EURL Semiani	V2	Citronnier	45	33,33±13,77	17,77±11,16
	V3	Clémentine	69	10,14±7,12	8,69±6,64
	V4	Valencia late	64	31,25±11,35	23,43±10,37
	V5	Double fine	33	48,48±17,03	30,30±15,67
	V6	Washington navel	50	64±13,30	30±12,70
	V7	Bigaradier	35	25,71±14,47	14,28±11,59
	V8	Poncirus trifoliata	30	16,66±13,33	16,66±13,33
EURL Bourkiza	V9	Bigaradier	30	50±17,89	40±17,53
	V10	Sanguine	65	50,76±12,15	35,38±11,62
	V11	Portugaise	69	62,31±11,43	30,43±10,85
	V12	Double fine	66	37,87±11,70	48,48±12,01
EURL Regueyegue	V13	salustiana	56	53,57±13,06	42,85±12,96
	V14	Tarocco	43	25,58±13,04	53,48±14,90
	V15	Pamplemousse	31	64,51±16,84	25,80±15,40
	V16	Satsuma	30	40±17,53	20±14,31
EURL Kerfa	V17	Thomson jeune verger	39	51,28±15,68	38,46±15,26
	V18	Thomson verger adulte	41	31,70±14,24	60,97±14,93
Station expérimentale	V19	Thomson	31	25,80±15,40	48,38±17,59
	V20	citronnier	35	14,28±11,59	14,28±11,59

* : écart type après calcul de l'intervalle de confiance

APPENDICE D
Sévérité de la maladie Durant la campagne 2005/2006

SITE	N° V	varietés	Nbr de plant prélevé	Nbr et (%) de plants avec symptômes foliaire	Nbr et (%) de plants avec symptôme corticaux
Verger Beloundja	V1	Hamlin	72	*26,38±10,17	55,55±11,47
EURL Semiani	V2	Citronnier	45	62,22±14,16	13,33±9,93
	V3	Clémentine	69	24,63±10,16	4,34±4,80
	V4	Valencia late	64	25±10,60	14,06±8,51
	V5	Double fine	33	75,75±14,62	18,18±13,15
	V6	Washington navel	50	80±11,08	6±6,58
	V7	Bigaradier	35	34,28±15,72	11,42±10,53
	V8	Poncirus trifoliata	30	16,66±13,33	(0%)
EURL Bourkiza	V9	Bigaradier	30	13,33±12,16	50±17,89
	V10	Sanguine	65	32,30±11,36	49,23±12,15
	V11	Portugaise	69	27,53±10,53	49,27±11,79
	V12	Double fine	66	9,09±6,93	54,54±12,01
EURL Regueyegue	V13	salustiana	56	48,2±13,08	26,78±11,59
	V14	Tarocco	43	25,58±13,04	30,23±13,72
	V15	Pamplemousse	31	74,19±15,40	19,35±13,90
	V16	Satsuma	30	16,66± 13,33	22,85± 13,91
EURL Kerfa	V17	Thomson jeune verger	39	38,46±15,26	30,76±14,48
	V18	Thomson verger adulte	41	29,26±13,92	68,29±14,24
Station expérimentale	V19	Thomson	31	19,33±13,90	32,25±16,45
	V20	citronnier	35	22,85±13,91	17,14±12,48

* : écart type après calcul de l'intervalle de confiance

REFERENCES

1. Loussert. R « Les agrumes », Ed. Baillière, J.B., Paris, 1985, pp136.
2. Bové. J.M, Saglio. P « Organ. *Citrus Virol* »Proc. 6th Conf. Inter. Univ. Calif. Div. Agr. Sci., Berkeley, 1974, pp. 86-87.
3. Anonyme, « L'agriculture dans l'économie nationale », statistiques agricoles, Ministère de l'agriculture, 2000, pp 48.
4. Anonyme, « Note de conjoncture. Premier trimestre. Ministère de l'agriculture et du développement rural », 2003, pp1.
5. Anonyme, « Statistiques agricoles, Ministère de l'agriculture et du développement rural » 2004, pp25.
6. Swingle. W.T, Webber H.J « The Principal Diseases of Citrus Fruits in Florida » United States Department of Agriculture, Division of Vegetable Physiology and Pathology, Bulletin, 1896.
7. Duran-Vila. N, Medina. V, Pina. J.A ,Ortega. C, Molins. M.I, Navarro. L, « Growth and morphogenesis of citrus tissue cultures infected with psorosis and cachexia» *Phytopathology* 1991, pp 81.
8. Wallace. J.M « Virus and virus-like diseases » In *The citrus industry*, vol. IV, pp. 67-184. Berkeley, Div. Agric. Sci., Univ. Calif, 1978.

9. Brichet. J «Une maladie redoutable qui se répand dans nos orangeraias » la psorose "scaly bark" des Américains. *Fruits et Primeurs*, 14(158), 1994, pp. 228-230.
10. Frezal. M « L'agrumiculture algérienne ». Réglementation de contrôle de la psorose dans les plantations d'arbres étalons et les pépinières. *Rev. Fr. Oranger*, 19 N°22, 1994, pp 154.
11. Lamour. R, « Viroses des agrumes en Afrique du Nord ». *Rev. Fr. Oranger*, 20(220), 1950, pp. 381-384.
12. Amizet. L, « Contribution à l'étude des moyens pratiques de lutte contre certaines maladies virusiformes en Algérie»*Fruits et Primeurs*. 24N°255, 1954, pp. 165-168.
13. Bové. J.M « Citrus virus diseases in the Mediterranean area». Report presented at the meeting on Phytiatry and Phytopharmacy, Marseilles France, 1965.
14. Derocca-Serra. D, Ollitrault . P « L'amélioration des agrumes, les sources génétiques fruit» , V. 47, N° 1, 1992, pp50.
15. Hodgson. W.R, Webber. J.H « Horticultural varieties of *Citrus* » 1967, pp. 431-591.
16. Loussert . R « Les agrumes, arboriculture. Techniques agricoles méditerranéennes », ed. Lavoisier, V. 1, N° 2, 1987, pp 85.
17. Allaya. M, Lenquette. L, Pradeilles. M.N, Debabi. L., et Arfa. L., « Medagri. Annuaire des économies agricoles », lan, C.I.H.E.A.M., I.A.M.M, 1995, pp. 41-346.
18. Loussert .R « Les agrumes, arboriculture. Techniques agricoles méditerranéennes », ed. Lavoisier, Liban, V.1, 1989, pp90.

19. Praloran . J.C « Les agrumes. Technique agricoles et production tropicales » ed. Maison neuve et Larose, France, 1971, pp 565.
20. Zeman. V « Una enfermedad nueva en los naranjales de covientes », Physis, 1931, pp. 410-411.
21. Jacquemond. C, Curk . F, Zurru . R, Ezzoubir. D, Kabbage. T, Luro. F, Ollitaut. P « Les porte-greffes composants clef d'une agrumiculture durable » Session 3. La qualité dans le verger, 2002.
22. 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.
23. Fawcett. H.S « Citrus Diseases and their Control ». 2nd edn, New York: McGraw-Hill, 1936.
24. Roistacher .C.N Organization of Citrus Virologists Psorosis a review Proceedings of the Twelfth Conference of the International University of California,1993,pp. 139-154.
25. García. M.L , Dal Bo. E, Grau. O, Milne. R « The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology » *Journal of General Virology* N°75, 1994, pp. 3585 –3590.
26. Milne.R.G, Djelouah. K , García.M.L, Dal Bo. E and Grau. O « structure of citrus ringspot- psorosis associated virus particules » implications for diagnostic and taxonomy 1996, pp. 189-197.
- 27.Torok . V, Vetten. H.J « *International Working Groups on Legume Viruses and Vegetable Viruses*»2002, pp 4.
28. Vaira A.M, Milne.R.G, Accotto, Luisoni, Masenga et Lisa« *Archives of Virology*» N°142,1997,pp 21-31.
- 29.Djelouah. K, Poter .O, Boscia. D, D' onghia . and A.M, Savano. V « production of monoclonal antibodies to citrus psorosis virus”. Porc.14th conf. IOCV, Riverside ,2000, pp. 152-158.

30. Morikawa.T, Nomura, Yamamoto et Natsuaki, *Annals of the Phytopathological Society of Japan* N° 61, 1995, pp 578.
31. Roggero, Ciuffo, Vaira.A.M, Accotto, Masenga et Milne.R.G, «*Archives of Virology* » N°145, 2000, pp. 26-29.
32. Barthe.G.A, Ceccardi.T.L, Manjunath.K.L et Derrick.K.S, «Citrus psorosis virus:nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridation and RT-PCR » *Journal of General Virology* N°79,1998,pp.1531-1537.
33. Sánchez de la Torre.E, Riva.O, Zandomeni.R, Grau.O, and García.M.L, « *Molecular Plant Patholog* »y On-line, <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1019sanchez>, 1998.
34. Derrick.K.S, Lee.R.F, Hewitt.B.G, Barthe.G.A and Graisia . J.V « *International Organization of Citrus Virologists*» *Proceedings*, 11th Conference, 1991, pp 386.
35. Naum M., García.M.L, Sánchez de la Torre.E and Grau.O « *International Organization of Citrus Virologists*», *Proceedings*, 14th Conference,2000,pp. 347.
36. Milne.RG « *New Aspects of Resistance Research on Cultivated Plants* » *Proceedings*, 7th Aschersleben Symposium, 2000, pp35.
37. van Regenmortel. M.H.V, Fauquet .C.M, Bishop. D.H.L, Carstens .E, Estes M.K, Lemon. S, Maniloff .J, Mayo. M.A, McGeogh. D, Pringle. C.R, Wickner. R.B « *Virus Taxonomy*» 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, San Diego: Academic Press, 2000.
38. Derrick. K.S, Brlansky. R.H, Graisa J.V, Lee. R.F, Timmer. L.W, Nguyen. T.K « *Partial characterization of a virus associated with citrus ringspot.* » *Phytopathology* N°78, 1988, pp.1298–301.

39. García.M.L, Grau.O and Sarachu .H, « Research in Virology»N°142,1991,pp303.
40. Alioto. D, Malfitano, Troisi. A, Peluso.A, Martín, Guerri and Moreno, Archives of Virology (in press), 2003.
41. Derrick. K.S, Lee. R.F, Hewitt. B.G, Barthe. G.A, 1993. « Spiroviruses: a new group of serologically diverse plant viruses associated with citrus psoros»is and ringspot.. Riverside, CA, USA: IOCV, University of California, 1993, pp. 428-490.
42. Djelouah.K, Potere.O, Boscia. D, D'onghia. A.M, Savino .V, 1999. "Production of monoclonal antibodies to citrus psorosis-associated virus. Journal of Plant Pathology in press.
- 43.Fox. R.T.V « *Principles of Diagnostic Techniques in Plant Pathology*» Kew, UK: CAB International,1993
- 44.Garcia. M.L, Sanchez de la Torre .E, Dal Bó E, Djelouah. K, Rouag. N, Luisoni. E, Milne. R.G, Grau. O« Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA». *Plant Pathology* 1979.
45. Van- Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeogh D, Pringle CR, Wickner RB, « Virus Taxonomy» Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses New York Academic Press, in press 1999.
46. Sánchez de la Torre, López, Grau & García, « *Journal of General Virology* » 83: 1777, 2002.
47. Naum-Ongania, Gago-Zachert, Peña, Grau & Garcia, « *Virus Research*» (in press), 2003.
- 48.D'Onghia A.M, De Pasquale. F, Carimi. F, Savino .V, Crescimanno. F.G, «Somatic embryogenesis from style culture as a possible means for virus elimination in *Citrus* ». *Journal of Phytopathology* N°145,1997.
49. Calavan. E.C, Roistacher .C.N, Nauer. E.M « Thermotherapy of citrus for inactivation of certain viruses. » *Plant Disease Reporter* N°56, 1972,pp.976–80.

50. Alioto. D, Troisi. A, Peluso. A, Quatrano. G, Masenga .V, Milne.R.G
«Occurrence of Citrus psorosis virus in Campania». *European Journal of Plant Pathology* N°106, Southern Italy, 2000, pp.795–9.
51. Fawcett . H.S « New symptoms of psorosis, indicating diseases of citrus »
Phytopatology N°28,1933,pp 670.
52. Fawcett. H.S, Klotz. L.J, « Types and symptoms of psorosis and psorosis-like
diseases of citrus ». *Phytopatology* N° 28, 1938, pp670.
53. Fawcett .H.S, Cochran. L.C, « Symptom expression of psorosis of citrus as
related to kind of inoculum. *Phytopathology* N°32, 1942, pp 22.
54. Fawcett .H.S, Bitancourt. A.A « Comparative symptomatology of psorosis
varieties on citrus in California ». *Phytopathology* N°33, 1943, pp. 837–64.
55. Martín, Alioto, Milne, Guerri & Moreno, " Plant Pathology» **51**: 134, 2002
56. Moreno. P, da Graiça J.V, Timmer. L.W, eds. Proceedings of the 12th
Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA,
USA: « International Organization of Citrus Virologists", 39–
57. Navas-Castillo. J, Moreno . P, Cambra . M, Derrick . K.S « Partial purification
of a virus associated with a Spanish isolate of citrus ringspot. » *Plant Pathology*
N°42, 1993, pp. 339–346.
58. Navas-Castillo .J and Moreno.P, « *European Journal of Plant Pathology*»N°
101,1995, pp343.
59. Chapot. H, et Dellucchi. V.L. « Maladies, troubles et ravageurs des agrumes
au Maroc»I .N.R.A, Rabat, 1964, pp339.
60. Alioto, Malfitano, Troisi, Peluso, Martín, Guerri & Moreno, *Archives of Virology*
(in press), 2003

61. Pujol, INTA Centro Regional Entrerriano, Estación Experimental de Concordia Serie Técnica No.N° 10,1966,pp3.
62. D'Onghia. A .M, Djelouah .K , Savino.V., Journal of Plant Pathology N°82,2000,pp 233.
63. D'Onghia.A.M,Carimi.F,DePasquale.F,Djelouah.K and Martelli. PlantPathology 50: 266, 2001a.
- 64.Bridges.G.D. ousteyC.O , Nixon R.R, « observations indicating psorosis transmission by seed of carizocitrangle».Proceedings of the Florida State Horticultural Society N°78, 1965,pp. 48-50.
- 65.Campiglia.H.G, Silveira M.and Salibe. A .A «psorosis transmission through seeds of trifoliatate orange»Proceedings, 7th Conference, International Organization of Citrus Virologists, 1976, pp. 132.
66. Miao. H, Seyran. M, daGraica. J.V, Skaria. M «Circumstantial evidence of natural spread of Citrus psorosis virus in Texa»s. Abstract of a paper presented at the APS Annual Meeting (Charlotte, US, 2003-08-09/13). Phytopathology 6 N°93, supplements, 2003,pp.61-62.
67. 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, pp286.
68. Roistacher.C.N, D'Onghia.A.M and Djelouah.K «Psorosis»a review Proceedings, 14th Conference, International Organization of Citrus Virologists, 2000, pp. 144.
69. García. M.L, Sánchez de la Torre. M.E, Dal Bo. E, Djelouah. K, Rouag .N, Luisoni .E, Milne. R.G, Grau. O, « Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA». Pathology N° 46, 1997,pp 830–6.

70. Garnsey..S.M, Permar. T.A, Cambra. M, Henderson C.T « Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV) » 1993.
71. Guerri . J, « Concavidades gomosas (concave gum) ». Madrid, Spain: Ediciones Mundi-Prensa,2000, pp. 65–6.
72. Hiltabrand. W.F « Certification program for maintenance of virus-free propagation sources of citrus in California».: University of California Division of Agricultural Sciences 1957, pp. 229–31.
73. Hsu. H, Kim .J.Y, Lawson. R.H «Purification of lily symptomless carlavirus and detection of the virus in lilies» *Plant Disease* N°79, 1995 pp. 912–6.
74. Klotz . L.J, Fawcett . H.S «*Color Handbook of Citrus Diseases* Berkeley», CA, USA: University of California Press. 1941.
75. Lin. N.S, Hsu. YH, Hsu. H.T, « Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes». *Phytopathology* N° 80, 1990, pp. 824–8.
76. Van Regenmortel, M.H.V, and Burckard, J., « Detection of a wide spectrum of *Tabacco mosaic virus* strains by indirect enzyme immunoassay (ELISA) » *Virology* N°106, 1980, pp. 327-334.
77. Jamoussi, B., « Les viroses des *Citrus* en Tunisie et les moyens de lutte. » *Ann. Inst. Nat. Recherche Agric. Tunisie*, (1966, 39(2): 1-60.
78. Childs, J.F.L., « Observations on virus and other diseases of *Citrus*» in Sudan, 1964.
80. Alaux, C., « Le Immuno-Empreinte de détection viral »e, *Phytoma*, (1994), 490: 17- 19.
81. 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, pp 34.

82. Berling. A « La détection des *Potyvirus* par la méthode ELISA» Phytoma, défense des végétaux 1991, pp 27.
83. Albouy.J et Devegne. J.C « maladies a virus des plantes » INRA 1998,pp.13-136.
84. Hames. B.D, Hooper.N.et Houghton. J « L'essentiel en biochimie ». ed potyviruses phytopathol .N° 88.2000,PP.965-971
- 85.Nelson.P.N,Rebolds.G.M,Waldron.E.E,Giannopoulos.E.T,Murray.P.G « monoclonal antibodies » J.Clin. Patholo : Mol. Pathol.N°53.2000,pp.111-117.
- 86.Torrance .I« Serological methods to detect plant viruses» production and use of monoclonal antibodies.Ed.J.M.Duncan et Torrance, 1977,pp39.
87. 96. Purcifull . D.E., Batchelor. D. L. « Immunodiffusion tests with sodium dodecyl sulphate(sds)-treated plant viruses and plant viral inclusions» .Agricult. Experim Stat. Tech. Bull,N° 788. Florida,1977,39p.
88. Baker. C.A, Lecoq.H.,purcifull. D.E « Serological variability among papaya ring spot virus type isolates in Florida». Phytopathol N°81, 1991, pp.722-728.
89. Desbiez .C, wipf-scheibel. C, Granier .F, Robaglia.C, Delaunay .Tet Lecoq. H « biological and molecular variability of zucchini yellow mosaic virus in the island of Martinique » Plant.Dis,N°80.1996,pp.203-207
- 90.Clark . M.F and Adams. M.R« Characteristic of microplate methods of enzymes immunosorbent assay of the detection of plant virus» J. Gen. Virol N°34, 1977, pp. 475 - 483.
91. Lister. R.M., and Rochow, W.F., « Detection of Barley yellow dwarf by enzyme linked immunosorbent assay" Phytopathology,N°69, 1979, pp. 649-654.

92. Djelouah. K, Poter .O, Boscia. D, D' onghia . and A.M, Savano. V « production of monoclonal antibodies to citrus psorosis virus”. Porc.14th conf. IOCV, Riverside ,2000, pp. 152-158.
93. Potere. O, Boscia. D, Djelouah. K, Elicio.V, and Savino.V « Use of monoclonal antibodies to citrus psorosis virus for diagnosis”. Short communication. Journal of Plants Pathology .81 N°3, 1999.pp. 209-212.
94. Vogel. R, and Bové. J.M « La nouvelle technique d'indexation de la cachexie- xyloporose, son utilisation en Corse», (1976), 70p.
95. Lemoine. J « Maladie de dégénérescence des arbres fruitiers à pépins Maladies à virus, viroïdes, phytoplasmes» I.N.R.A. Angers, 2000, pp320.
96. Oualhadj . J , 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, pp60.
97. Klotz. L. J. « Color Handbook of diseasesCitrus» Univ .Calif, 1973, pp.121.
98. Olsen.E .O and Roger. B « Plant Dis » Repr, 1969, pp.45-49.
99. Bove. J. « M Virus and virus –like disease of Citrus in the Near East region food and Agriculture Organisation of the united Rom »e, ed. Italy. Bordeaux .N.R.A, 1995.
100. Bertaudea . J « Atlas d'arboriculture fruitier»e. Ed. Lavoisier, V. 1, 1992, pp.6-40.