

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires

Département des Sciences Agronomiques

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Phytopathologie

MISE AU POINT D'UN SCHEMA D'ASSAINISSEMENT DE LA PRODUCTION DE PLANTS DE PRE BASE DE POMME DE TERRE

(Solanum Tuberosum. L)

Par

Farida HADDADI

Devant le jury composé de :

S.A. SENOUSI	Professer, USD. Blida	Président
M. BENCHABANE	Maître de conférence USD. Blida	Examineur
L. ALLAL	Docteur d'Etat, USD. Blida	Examinatrice
H.BELKAHLA	Professeur, USD Blida	Promotrice

Blida, 08 Juillet 2009.

RESUME

La réussite d'un programme de production de plants de pomme de terre de pré-base, implique en premier lieu la lutte contre les maladies à virus. Ces derniers peuvent réduire les rendements de 5 à 40% pour le Virus X (PVX), Virus M (PVM), Virus S (PVS) et des pertes allant jusqu'à 90%, pour le virus de l'enroulement (PLRV) et les infections combinées des virus Y (PVY) et virus X (PVX). Cette lutte est fondée sur l'obtention permanente d'un matériel de départ indemne et sa multiplication à l'abri des contaminations. Ainsi, et dans le but d'obtenir du matériel sélectionné indemne de virose et de qualité, nous avons essayé d'établir un schéma d'assainissement et de production de plants de pomme de terre de pré base de deux variétés Spunta et Désirée, à travers différentes phases : Culture de méristème seule, culture de méristème associé à la thermothérapie et leur suivi en milieu contrôlé (serre verre) et en milieu naturel (plein champ). Les meilleurs résultats d'assainissement ont été obtenus par les méristèmes de petite taille préalablement traités à la chaleur avec 50 à 83 %.

Titre : Mise au point d'un schéma d'assainissement de la production de plants de pré-base de pomme de terre (*Solanum tuberosum L*)

Mots clés : Pomme de terre, *Solanum Tuberosum L*, variété, méristème, assainissement, virus et thermothérapie.

ملخص

لنجاح برنامج إنتاج غرسه البطاطس ذات الصنف الأول تستوجب قبل كل شيء مكافحة الأمراض الفيروسية. هذه الأخيرة و التي تستطيع تخفيض محصول من 5 إلى 40% بسبب الفيروسات من نوع PVX, PVM, PVS و بخسارة تصل إلى حوالي 90% بالنسبة للفيروس PLRV و العدوى المركبة من الفيروس PVX و PVY أساس هذه المكافحة مبني علي تكوين مستمر لمادة أولية سليمة و تكاثرها بعيدا عن التلوث. علما أنه و من أجل الحصول علي عتاد منتحب سليم من الفيروسات و ذات نوعية متفوقة تقدم ضمانات صحية صحيحة ، ارتأينا أن نجرب إنشاء مخطط لتطهير و إنتاج غرسة البطاطس ذات الصنف الأول لفصيلتين ، سبونت Spunta و ديزيري Désirée ، مرورا بمراحل مختلفة توليد مخبري للأنسجة الإنشائية ، معالجة بالحرارة و أخرى غير معالجة و متابعتهم في محيط مراقب (بيت زجاجي) و في محيط طبيعي (حقل). إن أفضل النتائج (50 إلى 83%) التي تحصلنا عليها هي بفضل توليد مخبري للأنسجة الإنشائية ذات حجم صغير مسبقا معالج بالحرارة.

العنوان: إنشاء مخطط لتطهير و إنتاج غرسة البطاطس ذات قاعدة أولية *Solanum tuberosum L*

كلمات مفتاح : بطاطس, *Solanum tuberosum L* , صنف ' نسيج إنشائي في النبات , 'التطهير, فيروس, معالجة بالحرارة

ABSTRACT

The success of a program to produce seed potatoes breeding material mainly implies the fight against diseases virus. They can reduce yields by 5 to 40 % for the viruses Potato Virus X (PVX), Potato Virus M (PV M) and Potato Virus S (PVS) and losses going to 90 %, for the virus of the rolling-up Potato Leafroll Virus (PLRV) and the infections were combined by virus Potato Virus Y(PVY) and PVX. This struggle is based on the permanent creation of a material of unhurt departure and multiplication free of contamination. So, and with the aim of obtaining from the unhurt selected superior material of viral infection and from quality offering valid health guarantees, we tried to establish a plan of cleansing and production of seed potatoes breeding material of two variety show Spunta and Desiree, through different phases: culture of meristem the only one, the culture of meristem associated with the thermotherapy and their follow-up in controlled environment (green house) and natural environment (fields).The best results of cleansing were obtained by the small-sized meristem beforehand treated in the heat with 50 % to 83 %.

Title: Finalize to establish a plan of cleansing and production of seed potatoes breeding material (*Solanum Tuberosum L*).

Key Words: Potato, *Solanum Tuberosum L*, Variety, meristem, virus and thermotherapy.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu M^{elle} BELKAHLA.H pour m'avoir encadré. Sa disponibilité et son aide lors de la rédaction de cette thèse, ont été particulièrement précieuses.

Je remercie aussi, Mr SENOUSSI.S.A pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Que M^{me} ALLAL.L, accepte l'expression de mes vifs remerciements de bien vouloir accepter d'examiner ce travail.

Je tiens également à remercier Mr BENCHABANE. M. Pour sa gentillesse, ses continuel encouragements, son aide et ses précieux conseils, qu'il retrouve ici toute ma gratitude.

Egalement, je remercie Mr OUALHA. L, Directeur de la SAGRODEV pour tous ces encouragements

Je remercie tout le personnel de la SAGRODEV, M^{me} OUALHA, Hammama, BENDIA, Djamila, Dalila, Riadh, Athmane et mon amie LARBAOUI K, pour leurs aides et sympathie.

Je ne pourrais oublier de remercier, ma très cher amie et chaleureuse sœur Nabila pour l'aide et encouragements qu'elle ma apporté durant la réalisation de ce manuscrit.

A ma mère et à mon père

Qui m'ont appris la volonté et l'amour du savoir que dieu me les garde.

Enfin grand merci à tous mes frères, sœurs, belle-sœur, nièces et neveux qui m'ont soutenu tout le long de ce travail.

TABLE DES MATIERES

RESUME.....
REMERCIEMENTS.....
TABLE DES MATIERES.....
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....
INTRODUCTION.....	10
CHAPITRE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
1. Données générales sur la pomme de terre.....	13
2. Virus de la pomme de terre.....	15
3. Présentation et classification des virus (PLRV, PVY, PVS, PVX et PVA)...	17
4. Réplication.....	25
5. Symptomatologie, dommages et importance économique.....	32
6. Voies de transmission	34
7. Moyens de lutte.....	37
CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE.....	41
1. Phase laboratoire.....	41
2. Phase serre - verre.....	54
3. Phase plein champ.....	57
4. Protocole expérimental.....	61
5. Suivi et paramètres observés.....	60
6. Traitement des données.....	61
CHAPITRE III : PARTIE RESULTATS ET DISCUSSION.....	64
1. Phase laboratoire.....	64
2. Phase serre - verre.....	75
3. Phase plein champ.....	75
4. Discussion.....	81
CONCLUSION.....	89
APPENDICES.....	94
REFERENCES.....	101

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Cycle de la pomme de terre	5
Figure 1.2	Particule du virus PVY partiellement purifié dans le phosphotungstate de potassium à 2 % pH 6,5. (La barre représente 500 nm).....	10
Figure 1.3	Les particules du virus A (PVA) (La barre représente 500 nm)	11
Figure 1.4	Particule du virus X (PVX) marquée avec de l'acétate d'uranyle. La barre représente 50 nm	13
Figure 1.5	Les particules du virus S (PVS) (La barre représente 400 nm).....	14
Figure 1.6	Particule du virus de l'Enroulement (PLRV) marquée avec de l'acétate d'uranyle. La barre représente 100 nm.....	16
Figure 1.7	A gauche un plant sain et à droite enroulement des feuilles en gouttière ou en cornet (PLRV).....	18
Figure 1.8	Stries nécrotiques noirâtres sur la face inférieure des folioles (Potato Virus Y).....	19
Figure 1.9	A gauche un plant sain et à droite mosaïque, gaufrage et cloquage des feuilles (PVY).....	20.
Figure 1.10	A gauche des tubercules sains et à droite Nécroses annulaires Superficielles (PVY ntn).....	20
Figure 1.11	A gauche un plant sain et à droite mosaïque sur feuilles limitées par les nervures. (PVX).....	21
Figure 1.12	A gauche un plant sain et à droite symptôme de gaufrage et brillance feuilles (PVA).....	22
Figure 1.13	A gauche un plant sain et à droite symptôme de mosaïque plus ou moins marquée (PV A).....	22

Figure 1.14	Enfoncement des nervures et extrémité des folioles inclinées vers le bas (PVS).....	23
Figure 2.15	Traitement des tubercules à la chaleur (Thermothérapie) dans l'incubateur	34
Figure 2.16	Les étapes de la technique ELISA double "sandwich" d'anticorps (DAS).....	37
Figure 2.17	Echantillonnage des vitro plants pour le test ELISA dans la chambre de culture.....	38
Figure 2.18	Lavage des plaques avec la solution de lavage.....	40.
Figure 2.19	Broyage des échantillons à l'aide d'un broyeur à rouleaux.....	41.
Figure 2.20	Dépôt des extraits des échantillons et les témoins.....	41
Figure 2.21	Dépôt des anticorps conjugués à l'enzyme.....	42
Figure 2.22	L'irrigation des plants dans la serre -verre par le système goutte à goutte.....	45
Figure 2.23	Les mini tubercules récoltées de la serre – verre.....	46
Figure 2.24	Bac jaune pour le piégeage des pucerons sur la parcelle de pomme de terre.....	49
Figure 2.25	Protocole expérimental de la première partie : culture de méristème Pour les variétés Désirée et Spunta.....	51
Figure 2.26	Protocole expérimental de la deuxième partie : culture de méristèmes avec thermothérapie pour les deux variétés Désirée et Spunta.....	52
Figure 3.27	Effet taille du méristème sur le taux de reprise	53
Figure 3.28	Effet variétés sur le taux de contamination.....	54
Figure 3.29	Effet taille du méristème sur le taux de contamination.....	55
Figure 3.30	Effet taille du méristème sur le taux de nécrose.....	55
Figure 3.31	Effet thermothérapie sur le taux de perte des tubercules.....	56.
Figure 3.32	Effet variétés sur le taux de reprise.....	57
Figure 3.33	Effet taille du méristème combiné à la thermothérapie sur le taux de Reprise.....	57
Figure 3.34	Effet des deux essais sur le taux de reprise.....	58

Figure 3.35	Effet taille du méristème et thermothérapie sur le taux de contamination.....	59
Figure 3.36	Effet taille du méristème et thermothérapie sur le taux de nécrose	60
Figure 3.37	Effet taille du méristème et thermothérapie sur le taux d'assainissement	62
Figure 3.38	Pourcentages des captures rencontrées sur la culture d'arrière saison 2006.....	64
Figure 3.39	Courbe de vol global sur pomme de terre d'arrière saison.....	65
Figure 3.40	Courbe de vol global sur pomme de terre de saison.....	67
Figure 3.41	Pourcentages des captures rencontrées sur la culture de saison 2007.....	67
Tableau 1.1	Caractéristiques générales des virus de la pomme de terre économiquement importants en Europe.....	7
Tableau 1.2	Caractéristiques générales des virus présents en Europe, peu répandus ou d'incidence économique mineure.....	7
Tableau 1.3	Caractéristiques générales des virus de la pomme de terre absents en Europe.....	8
Tableau 14	Caractéristiques épidémiologiques des virus de la pomme de terre transmis selon le mode non- persistant ou persistant.....	28
Tableau 2.5	Les variétés utilisées dans notre travail	31
Tableau 3.6	Taux de d'assainissement (%) obtenue avec les deux essais.....	60
Tableau 3.7	Taux d'assainissement (%) obtenue avec les 2 tailles du méristème.....	61
Tableau 3.8	Taux de d'assainissement (%) obtenue avec les 2 essais	61
Tableau 3.9	Taux d'échantillons viroses (%) obtenue avec les 2 essais.....	63
Tableau 3.10	Taux de viroses estimées dans la parcelle en culture d'arrière saison G 0 pour la production de la G 1.....	68
Tableau 3.11	Taux de viroses estimées dans la parcelle en culture de saison G 1 pour la production de la G 2	68

INTRODUCTION

De part les superficies qui lui sont consacrées et du rôle qu'elle joue dans l'alimentation humaine, la pomme de terre (*Solanum Tuberosum. L*) est considérée comme l'une des principales plantes vivrières. Elle occupe la deuxième place après les céréales dans la ration du citoyen algérien.

La production nationale de plants de pomme de terre ne couvre que 25% des besoins nationaux [1]. L'Algérie à importer en 2004-2005 Pour environ 70 millions de dollars de semences de base de pomme de terre destinées aux 200. 000 ha de production de la semence de pomme de terre quasi entièrement dépendante de ces fournisseurs. L'Europe constitue le principal fournisseur de semence pour l'Algérie. Aux alentours de 135 000 tonnes de semences de base provenant à 90% de la zone Europe et à plus de 60% d'une entreprise Hollandaise. Au lieu de coûter 70 millions de dollars d'importation, la production de pomme de terre en Algérie nécessiterait moins d'un million de dollars en semences. C'est toute la filière pomme de terre qui en serait ainsi révolutionnée [2].

Face à cette situation, les pouvoirs publics ont créé le centre national de développement de pomme de terre (**CNDP**) à Sétif appelé actuellement **S.AGRO.DEV** (Société Agro- Développement) établissement producteur, multiplicateur agréé pour la production de semences de plants de pomme de terre de pré base, dont le but la production et la commercialisation de la semence de qualité de pomme de terre pour satisfaire les besoins locaux et par conséquent diminuer notre dépendance alimentaire vis-à-vis de l'étranger.

La technique exploitée au niveau de cette société est celle dite culture *in vitro*.

Avant la mise au point des techniques de culture *in vitro* la production de plants s'avérait très laborieuse. En effet, la pomme de terre est soumise à l'attaque de maladies diverses dus à des champignons, virus, viroïdes, bactéries et à des phytoplasmes qui sont transmis à chaque génération par le tubercule et par lesquels aucune lutte chimique n'est possible. A chaque cycle de multiplication aux champs, les plantes accumulent donc ces parasites qui entraînent des dégénérescences et donc des chutes de rendements considérables.

A la lumière des travaux de recherches réalisés en Algérie de 1977 à 1986, les virus identifiés sur pomme de terre sont: le virus de l'enroulement PLR, PVA, PVS, PVX et PVY [3,4, 5, 6].

Les virus de la pomme de terre transmis par puceron et par contact peuvent réduire les rendements de 5 à 40% pour les virus X, M et S (PVX, PVM et PVS) et des pertes allant jusqu'à 90%, pour le virus de l'enroulement PLRV et les infections mixtes de virus Y & X de la pomme de terre (PVX-PVY) [7].

La réussite d'un programme de production de plants de pomme de terre implique en premier lieu, la lutte contre les maladies à virus appelés aussi maladies héréditaires, contagieuses et incurables. Cette lutte est fondée sur l'obtention permanente d'un matériel de départ indemne de virus et la multiplication de ce matériel à l'abri des contaminations.

En 1954, la culture de méristèmes fut utilisée sur la pomme de terre par Morel et Martin de l'INRA de Versailles. Ces chercheurs qui en 1952 avaient pour la première fois observé le développement *in vitro* de plantes entières à partir de méristèmes de *Dahlia* appliquèrent leur technique sur une variété de pomme de terre « belle de Fontenay à chaire ferme », les méristèmes mis en culture au cours de cette expérience provenaient de tubercules maintenus à l'obscurité sous une forte température (37°C-38°C) [8].

La culture de méristème couplée à la thermothérapie est aujourd'hui appliquée à de nombreuses espèces horticoles et permet d'éradiquer les parasites, notamment les particules virales.

Ainsi, et dans le but d'obtenir du matériel sélectionné indemne de virus et de qualité supérieure offrant des garanties sanitaires valables, nous avons établi un schéma d'assainissement et de production de plants de pomme de terre de pré base de deux variétés, la Spunta (peau blanche) et la désirée (peau rouge).

L'objectif de notre recherche était d'étudier l'assainissement de ces variétés par :

- Culture de méristème seule,
- culture de méristème associé à la thermothérapie,
- leur suivi en milieu contrôlé (serre verre) et en milieu naturel (plein champ).

La production de plants de pré- base sains par culture *in vitro* implique la recherche de l'optimisation des conditions de :

- Choix de matériel de départ,
- culture de méristèmes,
- thermothérapie,
- production de mini - tubercules dans la serre verre en quantité et qualité,
- conduite des productions des premières générations sur champ.

Cette optimisation doit être suivie par un diagnostic sérologique des plants assainis afin de confirmer l'absence ou non d'infections virales.

CHAPITRE 1 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Données générales sur la pomme de terre

La pomme de terre constitue une des premières ressources alimentaires au monde. Cette espèce végétale dont l'origine se trouve dans la Cordillère des Andes s'est propagée à travers tous les continents sans exception. 310 millions de tonnes de pomme de terre sont produites sur notre planète cultivée dans plus de 150 pays [9].

La pomme de terre est surtout cultivée sur la côte méditerranéenne, qui jouit d'un climat tempéré propice à sa culture tout au long de l'année. On en trouve aussi à 500 mètres, sur les montagnes et les vallées entre la côte et les monts Atlas ainsi que les hauts plateaux. La consommation annuelle, qui était de 35 kg/habitant en 1990, est passée à 57 kg en 2005 [10].

Depuis, elle est devenue une des principales cultures destinées à la consommation domestique et en 2006 la production avait atteint le chiffre record de 2,18 millions de tonnes. La superficie cultivée est de 100 000 ha [10], et la pomme de terre peut être plantée et récoltée dans n'importe quelle région, à pratiquement n'importe quel mois de l'année.

La pomme de terre est répartie sur la quasi-totalité du territoire algérien où elle est menée soit en culture de primeur (dite d'hiver) de saison (dite de printemps) et d'arrière saison (dite d'été). C'est une culture à multiplication végétative dont l'organe de propagation est le tubercule, le cycle annuel de la pomme de terre est constitué de quatre phases [11] qui sont phase de croissance, phase de tubérisation, phase de repos végétatif et phase de germination (Figure 1.1).

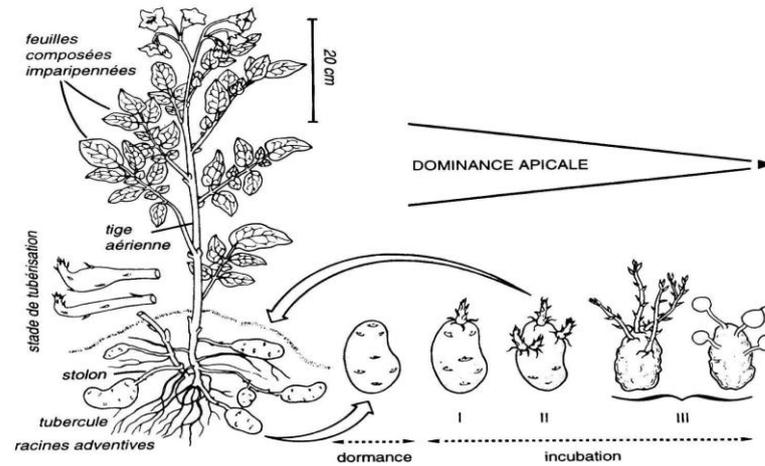


Figure 1.1 : Cycle de la pomme de terre (Extrait de la pomme de terre ed. INRA. 1996) [11].

Dans le cas de la multiplication végétative, voie classique de propagation, la plus grosse difficulté réside dans la propriété des tubercules à accumuler et transmettre à la génération suivante des maladies virales, fongiques ou bactériennes, affaiblissant ainsi progressivement le potentiel de croissance de la plante et donc la production elle-même. Afin de lutter contre ce phénomène dit de "dégénérescence" progressive, la meilleure technique consiste en l'introduction régulière de semences (plants) possédant un bon état sanitaire dans la filière de production. Les techniques *in vitro* de production du matériel initial font aujourd'hui partie intégrante de la plupart des schémas de multiplication mis au point à travers le monde [12].

Parmi les agents pathogènes susceptibles de réinfecter le matériel initial une fois transféré en plein champ, les phytovirus sont fréquents et potentiellement très dommageables.

2. Virus de la pomme de terre

Un grand nombre de virus peut affecter la pomme de terre, BEEMSTER et de BOKX [13], décrivent 23 virus appartenant à dix (10) familles virales, avec des incidences très diverses sur la plante et des répartitions géographiques variées pouvant s'étendre à l'ensemble de la planète.

Les tableaux 1.1 à 1.3 récapitulent les caractéristiques essentielles de la plupart des virus connus :

Les huit virus économiquement importants en Europe sont: le virus de l'Enroulement de la pomme de terre (PLRV), le virus Y (PVY), le virus A (PVA), le virus X (PVX), le virus S (PVS), le virus M (PVM), le virus du Rattle du Tabac (TRV) et le virus du Mop-top (PMTV) (Tableau 1.1).

Les virus présents en Europe, peu répandus ou d'incidence économique mineure sont en nombre de six qui sont : le virus des anneaux noirs de la tomate (TBRV), le virus de la nécrose du tabac (TNV), le virus de la mosaïque de la luzerne (AMV), le virus de la mosaïque aucuba de la pomme de terre (PAMV), le virus de la maladie bronzée de la tomate (TSWV) et le virus de la mosaïque du concombre (CMV) (Tableau 1.2).

Les principaux virus signalés hors Europe, notamment en Amérique du Sud (d'où leur nom usuel de virus andins) sont: le virus de la jaunisse nanisant de la pomme de terre (PYDV), le virus de la marbrure de la pomme de terre des Andes (APMV), le virus des taches annulaires du tabac (TRSV), le virus des anneaux noirs de la pomme de terre (PBRV), le virus latent de la pomme de terre des Andes (APLV) et le virus T de la pomme de terre (PVT) (Tableau 1.3).

Tableau 1.1. Caractéristiques générales des virus de la pomme de terre économiquement importants en Europe.

Virus	Genre	Famille	Particule (dimensions)	ARN (PM x 10 ⁶ Da; %)
PLRV Potato Leafroll Virus	<i>Polérovirus</i>	<i>Lutéoviridae</i>	Icosaédrique (24 nm)	2; 28
PVY Potato virus Y	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>	Hélicoïdale (730 x 11 nm)	3,1; 6
PVA Potato virus A	<i>Potyvirus</i>		Hélicoïdale (730 x 15 nm)	≈ 3; 6
PVX Potato virus X	<i>Potexvirus</i>	<i>Flexiviridae</i>	Hélicoïdale (515 x 13 nm)	2,1 ; 6
PVS Potato virus S	<i>Carlavirus</i>		Hélicoïdale (650 x 12 nm)	2,4 ; 6
PVM Potato virus M	<i>Carlavirus</i>		Hélicoïdale (650 x 12 nm)	≈ 3; 6
TRV Tobacco Rattle Virus	<i>Tobravirus</i>	<i>Togaviridae</i>	Hélicoïdale (45-210 x 20 nm)	2,4 + 0,6 ; 5
PMTV Potato Mop-Top Virus	<i>Pomovirus</i>		Hélicoïdale (100-300x20 nm)	2,2 + 1,0+0,8; *

* : paramètre non déterminé

(Extrait de la pomme de terre Ed. INRA. 1996) [11]

Tableau 1.2. Caractéristiques générales des virus présents en Europe, peu répandus ou d'incidence économique mineure

Virus	Genre	Famille	Particule (dimensions)	ARN (PM x 10 ⁶ Da; %)
TBRV Tomato Black -Ring Virus	<i>Népovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Icosaédrique (30 nm)	2,5 + 1,5 ; 28-38
TNV Tobacco Necrosis Virus	<i>Nécrovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	Icosaédrique (26 nm)	1,5; 19
AMV Alfalfa Mosaic Virus	<i>Aflamovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Bacilliforme Longueur variable (ø : 18 nm)	1,3 + 1,1+ 0,9; 18
CMV Cucumber Mosaic virus	<i>Cucumovirus</i>		Icosaédrique (30 nm)	1 ; 18+0,82;*
PAMV Potato Aucuba Mosaic Virus	<i>Potexvirus</i>	<i>Flexiviridae</i>	Hélicoïdale (580 x 11 nm)	2,1 ; 5
TSWV Tomato Spotted Wilt Virus	<i>Tospovirus</i>	<i>Bumyaviridae</i>	Pseudo-sphérique (85 nm)	2,6+1,7+1,3+1,9 ; 5

* : paramètre non déterminé

(Extrait de la pomme de terre Ed. INRA. 1996) [11].

Tableau 1.3. Caractéristiques générales des virus de la pomme de terre absents en Europe

Virus	Genre	Famille	Particule (dimensions)	ARN (PM x 10 ⁶ Da; %)
PYDV Potato Yellow Dwarf Virus	<i>Rhabdovirus</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	Bacilliforme (380 x 75 nm)	4,3 ; 0,4
APMV Andean Potato Mottle virus	<i>Comovirus</i>	<i>Comoviridae</i>	Icosaédrique (26 nm)	1,4+2; 27+37
PBRV Potato Black Ring Spot virus	<i>Népovirus</i>		Icosaédrique (25 nm)	2,5+1,5 ; 41+28 ou 1,5+1,5 ;23+23
TRSV Tobacco Rings Spot Virus			Icosaédrique (28 nm)	2,2+1,2 ; 40
PVT Potato Virus T	<i>Clostérovirus</i>	<i>Clostéroviridae</i>	Hélicoïdale (640 x 12 nm)	2,2 ; 5
APLV Andean Potato Latent Virus	<i>Tymovirus</i>	<i>Tymoviridae</i>	Icosaédrique (30 nm)	2; 35

(Extrait de la pomme de terre Ed. INRA. 1996) [11].

Seuls les virus, PLRV, Y, X, A et S considérés comme organismes nuisibles pour lesquels une tolérance en végétation et/ou sur lot est admise et font objet d'un contrôle officiel conformément à l'application du règlement technique pris par arrêté du ministère de l'Agriculture, seront ici décrits en détail.

3. Présentation et classification des virus PLRV, PVA, PVY, PVX et PVS

Actuellement la classification est basée sur plusieurs critères : les propriétés physiques et physico-chimiques du virion, la nature, la composition, l'organisation du génome, la nature des protéines structurales et non structurales, la morphologie, les propriétés biologiques et sérologiques [14]. C'est à partir de ces critères que l'ICTV (International Committee for the Taxonomy of Viruses) établi la classification des virus [15]

3.1. Présentation de la famille *Potyviridae*, le genre *potyvirus* et ces membres (PVY et PVA)

3.1.1. Famille *Potyviridae* :

C'est la famille la plus répandue des phytovirus, avec 172 membres répertoriés [16, 15]. Il s'agit de virus à ARN simple brin positif portant une protéine VPg de 24 kDa environ liée de façon covalente à l'extrémité 5' du génome et une queue poly adénylé de longueur variable en 3'. Les ARN de polarité positive sont directement infectieux car ils ont des propriétés d'ARN messenger. Chaque ARN comporte un seul cadre ouvert de lecture (ORF) codant pour une poly protéine d'environ 3000 acides aminés clivée par activité auto catalytique en 10 protéines fonctionnelles.

Cette famille comprend 6 genres dont le regroupement s'appuie sur des similarités de structure et de séquence, et différant par leur mode de transmission [17, 18, 15]. Le génome des *Potyviridae* est monopartite (l'information génétique est contenue dans un seul segment de l'ARN), à l'exception des *Bymovirus* chez lesquels il est bipartite.

3.1.2. Genre *Potyvirus* :

Le genre *Potyvirus* constituent le genre de virus de végétaux le plus important avec plus de 91 espèces décrites et 88 espèces potentielles [19].

Les *potyvirus* sont caractérisés par des particules flexueuses de 700-900 nm de longueur et de 11-13 nm de diamètre [16]. La longueur des particules peut varier, notamment en fonction de la concentration en magnésium du milieu [20]. L'information génétique est portée par un ARN monocaténaire positif, et protégée par une capsid résultant de l'assemblage d'environ 2000 sous unités protéiques (d'environ 32-36 kDa) arrangées de façon régulière en hélice selon une symétrie hélicoïdale (un tour d'hélice comprenant 7 à 8 sous unités) [21, 22]. Le génome des *potyvirus* a une taille d'environ 9,7 kb (Mr 3,0-3,5X10⁶) [15].

3.1.3. Espèce PVY :

Le virus Y de la pomme de terre et le membre type du groupe de *Potyvirus*. C'est un virus à ARN monocaténaire, à particules filamenteuses, flexueuses, d'une longueur moyenne de 730 nm et de 11 nm de diamètre, les particules contiennent environ 6% d'ARN simple brin et d'une protéine d'une masse moléculaire de 34,000 daltons (Figure 1.2) [23].

Le mode de transmission du virus Y implique une gamme d'espèces de pucerons beaucoup plus large puisque ce virus peut être acquis et transmis par de simples piqûres d'essai.

Ce processus ne concerne dès lors plus seulement les pucerons de la pomme de terre, mais aussi ceux qui visitent la culture à la recherche de nourriture. Plus d'une cinquantaine d'espèces aphidiennes ont été répertoriées comme pouvant transmettre les souches Y^O et pour un grand nombre d'entre elles, les souches Y^N , mais avec une efficacité différente [24].

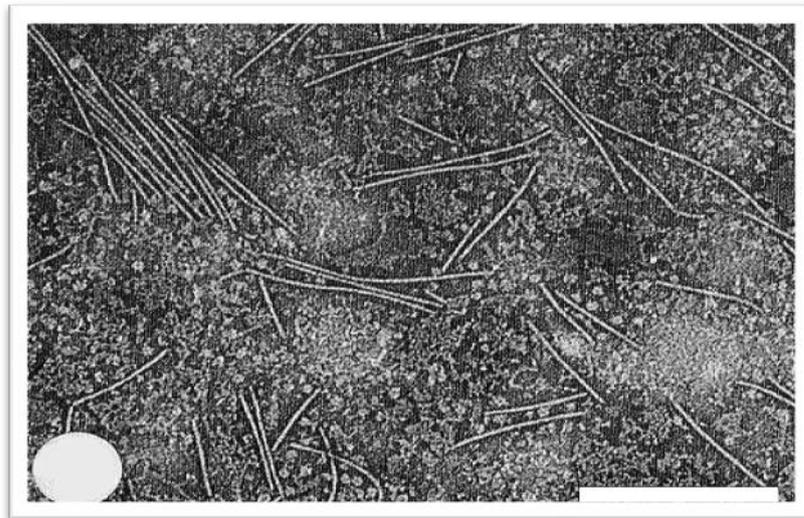


Figure 1.2: Particule du virus PVY partiellement purifié dans le phosphotungstate de potassium à 2 % pH 6,5. (La barre représente 500 nm) [23].

Il existe 3 grands groupes de souches, les souches Y^O appelées souches ordinaires, les souches Y^N appelées souches nécrotiques et les souches Y^C souches à stries nécrotiques en pointillés et une souche relativement nouvelle $PVY^N W$ (W pour "Wilga"), a été signalée, entre autres par des chercheurs de France et de Pologne.

Il s'agit d'un virus recombinant de PVY^N et PVY^O , qui infecte les végétaux sans apparaître de symptôme de maladies sur la plante et sur pied [25].

3.1.4. Espèce PVA :

Le virus A est apparemment le virus le moins étudié, sans doute parce qu'il est moins dommageable, que ses symptômes sont assez souvent confondus avec ceux du virus Y voire du virus X. C'est un des membres du groupe des *potyvirus*, il est très proche du virus Y pour l'essentiel de ses caractéristiques morphologiques et constitutives, ainsi que pour son mode de transmission aphidienne.

Le virus A possède un ARN, avec des particules filamenteuses d'une longueur de 730 nm et 15 nm de diamètre (Figure 1.3) [26].

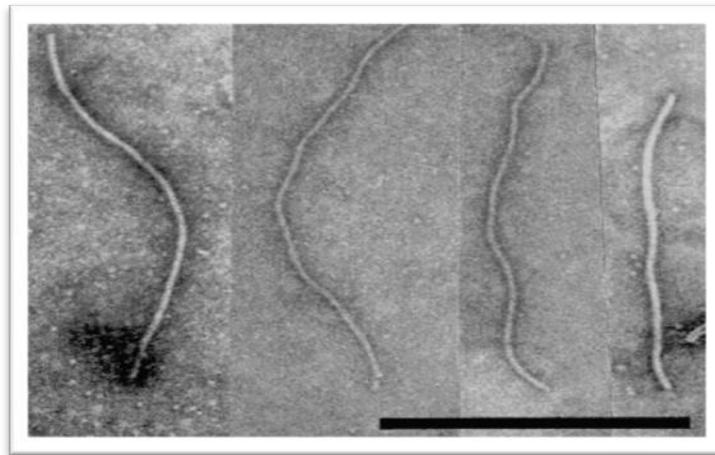


Figure 1.3: Les particules du virus A (PVA) (La barre représente 500 nm) [26].

3.2. Présentation de la famille *Flexiviridae*, les genres *Potexvirus*, *Carlavirus* et ces membres (PVX et PVS)

3.2.1. Famille *Flexiviridae* :

La famille *Flexiviridae* contient des virus à particules filamenteuses flexueuses non enveloppé avec 12-13 nm de diamètre et 470-1000 nm de longueur (d'où le nom de la famille). Le génome est monopartite, linéaire à sens positif et l'extrémité 3' du génome est une queue poly adénylée.

Cette famille comprend 9 genres qui se distinguent par le type de protéine de mouvement (Triple gène bloc « TGB » ou simple protéine de '30 K'), le nombre d'ORFs et de la taille du virion, la protéine de réplication et la protéine de capsid. Parmi ces genres nous avons les *Carlavirus* et les *Potexvirus*.

3.2.2. Genre *Carlavirus* :

Le genre *Carlavirus* appartient à la famille *Flexiviridae*, à particules filamenteuses et légèrement flexueuses, non enveloppés avec 610-700 nm de longueur et 12-13 nm de diamètre à symétrie hélicoïdale et les particules sont composé de 5-7% de l'acide nucléique. Le génome est monopartite, linéaire à ARN simple brin positif d'une longueur de 8.4 – 8.7 KBS. Il est polyadénylé à son extrémité 3'et mono phosphate à l'extrémité 5'.

L'ARN est traduit par les 06 cadres ouverts de lecture qui sont : ORF (1) avec 219-223 KDA se traduit en protéine de polymérase, ORF(2) avec 25-26 KDA, ORF (3) avec 11-12 KDA et ORF (4) avec 7-8 KDA sont traduit en TGB impliqués probablement dans le mouvement de cellule à cellule , ORF(5) avec 32-36 KDA traduit en protéine de capsid et l'ORF (6) se traduit en protéine obligatoire d'acide nucléique (NABP) [27].

3.2.3. Genre Potexvirus :

Le genre *Potexvirus* est caractérisé par ses particules stables et filamenteuses et par la transmission mécanique, dont l'organisation de génome ressemble en particulier aux genres *Carlavirus*, *Allexivirus* mais les virions sont plus courts. Leur taille est de 470-580 nm de longueur et 13 nm de diamètre à symétrie hélicoïdale et les virions sont composés de 6% d'acide nucléique et de 94 % de protéine.

Le génome est monopartite, linéaire à ARN simple brin positif d'une longueur de 5800-7200 nucléotides. Il est polyadénylé à son extrémité 3'et monophosphate à l'extrémité 5'. Des gènes sont traduits au moyen d'ARNs subgénomique avec un total de cinq cadres ouvertes de lecture [28].

3.2.4. Espèce PVX :

Le virus X de la pomme de terre est l'un des membres de genre Potexvirus, à particules filamenteuses flexueuses de 515 nm de longueur et 13 nm de diamètre (Figure 1.4). Et un génome à ARN simple brin positif monopartite constitué environ 6 % de poids de la particule, la protéine de capsid est approximativement 94 % de poids de la particule [29].



Figure 1.4: Particule du virus X (PVX) marquée avec de l'acétate d'uranyle. La barre représente 50 nm [29].

L'ARN génomique du virus a une coiffe de m⁷ GpppG à l'extrémité 5', une terminaison de polyadénylée à son extrémité 3' et 5 cadres ouvertes de lecture. Le virus infecte les Solanaceae et 15 autres familles. Le virus X est fortement immunogène et facilement purifiable à partir d'une plante à infection systémique comme *Nicotiana tabacum* où il a un pouvoir de multiplication très élevé.

3.2.5. Espèce PVS :

Le virus S a été découvert seulement en 1952, probablement parce qu'il a été longtemps confondu avec d'autres virus à infection latente ou peu sévères comme le virus X. Le virus S appartient au genre des *Carlavirus*. C'est un virus à ARN monocaténaire, à particule filamenteuse quasiment rigide, légèrement incurvées de dimension 650 x 12 nm (Figure 1.5) généralement transmis par aphides. La pomme de terre étant pour le PVS la seule espèce naturellement infectée, le plus souvent de façon latente [30].

On distingue deux types de souches de virus S, les souches PVS^o ou ordinaires très réparties en Europe (Allemagne, Pologne, Europe centrale) et les souches andine PVS^A, classées en parasites de quarantaine car provoquant des réactions beaucoup plus sévères. [31].

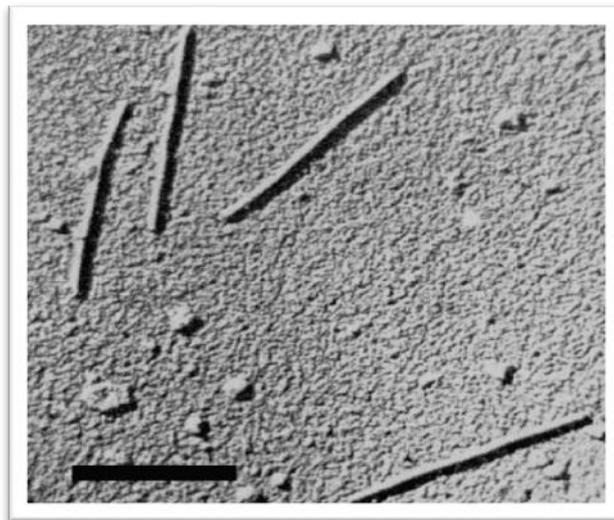


Figure 1.5: Les particules du virus S (PVS) (La barre représente 400 nm) [30].

3.3. Présentation de la famille *Luteoviridae*, le genre *Polerovirus* et le membre PLRV

3.3.1. Famille *Luteoviridae* :

La famille *Luteoviridae* se distingue par ses particules isométriques de diamètre 25 à 30 nm, le génome est monopartite et se transmet par les aphides selon le mode persistant. Les virions sont non enveloppés avec 32 capsomères par nucléocapside, ils contiennent 28 % d'acide nucléique. L'ARN est linéaire simple brin avec 5300-5800 nucléotides, le génome est lié avec une protéine VPg à son extrémité 5' [32].

La famille *Luteoviridae* comprend 3 genres qui sont distingués par le nombre des cadres ouvertes de lecture à savoir : le genre *Enamovirus* avec 02 ORFs, le genre *Luteovirus* avec 02 ORFs et le genre *Polerovirus* avec 06 ORFs

3.3.2. Genre *Polerovirus* :

Le genre *Polerovirus* comprend 6 cadres de lecture: ORF (1) de 28 KDa avec une fonction inconnue, ORF (2) de 70 KDa traduit une protéine de réplication, ORF (3) de 36 KDa exprimé en protéine de polymérase [32].

Les trois ORFs restant sont exprimés de l'ARN subgénomique, ORF (4) de 23 KDa traduit une protéine de capsid, ORF (5) de 17 KDa traduit une protéine de mouvement et ORF (6) de 80 KDa traduit une protéine impliqué probablement dans la transmission par les aphides.

3.3.3. Espèce PLRV :

Le virus de l'enroulement de la pomme de terre PLRV est l'unique membre du genre *Polerovirus* c'est un virus à particules isométriques, l'acide nucléique est ARN simple brin constitue 30 % du poids de la particule et les protéines constitue 70 % du poids de la particule [32]. (Figure 1.6)

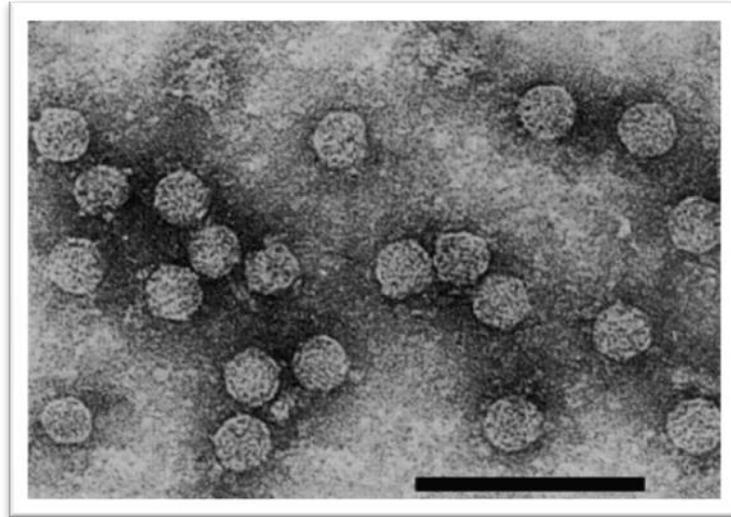


Figure 1.6: Particule du virus de l'Enroulement (PLRV) marquée avec de l'acétate d'uranyle. La barre représente 100 nm [32].

4. Réplication

Les ARN des virus PLRV, PVY, PVA, PVS et PVX se comporte comme des ARN positif de type messenger. Pour que le cycle viral puisse débuter, il faut qu'une particule virale pénètre à l'intérieur d'une cellule végétale. Puis le virus utilise la machinerie cellulaire de la plante pour répliquer. La plante possède des barrières biologiques comme la cuticule recouvrant l'épiderme des feuilles et la paroi pecto-cellulosique des cellules qui empêche l'entrée du virus. La présence de micro blessures souvent créées par des vecteurs (insectes piqueurs) est requise pour permettre la pénétration des virus [19]. Il débute par la libération de l'acide nucléique dans le cytoplasme: c'est la décapsidation. Le pH intracellulaire légèrement basique déstabilise suffisamment l'architecture du virion pour que l'acide nucléique porteur de l'information génétique soit libéré et devienne accessible.

La décapsidation et la traduction sont souvent liées. En effet, les ribosomes de la cellule se fixent à l'extrémité 5' de l'ARN viral accessible à l'extrémité de la nucléocapside. En se déplaçant le long de l'ARN pour la traduction, ils dissocient

les sous unités protéiques de la capside. Les premières protéines synthétisées sont tout de suite utilisées et interviennent dans la réplication.

La réplication de l'ARN positif viral s'effectue en 2 étapes. Dans un premier temps, la réplicase se fixe en 3' de l'ARN génomique puis synthétise un ARN de polarité opposée (-), complémentaire de l'ARN viral. Ce dernier va servir de matrice à la réplicase virale pour la synthèse d'un grand nombre de molécules d'ARN (+). La traduction de ces copies conduit à l'accumulation de protéines virales en particulier la protéine de capside, permettant la formation de nouveaux virions par auto assemblage (jusqu'à 10^6 particules virales par cellule).

L'encapsidation du génome viral est encore un phénomène mal connu. Une fois le virus répliqué dans la cellule, il va infecter les cellules adjacentes en empruntant des canaux préexistants qui relient les cellules entre elles, les plasmodesmes. Ce mouvement du virus de cellule à cellule dit de courte distance, s'explique par le fait que les virus ne peuvent se libérer des cellules par bourgeonnement en raison de la présence de la paroi pecto-cellulosique. Les plasmodesmes ont une structure interne tellement complexe qu'ils ne laissent passer que des molécules plus petites que les virus. Pour passer d'une cellule à l'autre, le virus nécessite l'intervention d'une ou plusieurs protéines virales dites protéines de mouvement. Grâce au mouvement à courte distance, le virus gagne petit à petit le système vasculaire et plus précisément les cellules du phloème, impliqué dans la circulation de la sève élaborée.

Le virus peut alors se propager dans la plante entière et produire une infection généralisée dite aussi infection systémique. On parle alors de mouvement à longue distance [19].

5. Symptomatologie, dommages et importance économique

La multiplication des particules virales généralisée à l'ensemble de la plante provoque des perturbations métaboliques conduisant à l'expression des symptômes variés [33]. Les virus provoquent chez les plantes sensibles différentes modifications au niveau des feuilles et des fruits [34, 19].

La symptomatologie est à l'origine de la description des maladies virales : par convention, le nom du virus est choisi en fonction des symptômes qu'il provoque sur la plante chez laquelle le virus a été observé la première fois.

5.1. Le virus PLRV :

Pour le virus de l'Enroulement de la pomme de terre, typiquement, les symptômes caractéristiques de l'infection secondaire sont l'enroulement des feuilles de la base en cuillère, le port dressé et nanisme de la plante (figure 1.7); les feuilles sont dures et craquantes, ce qui peut permettre de différencier l'infection virale des enroulements mous dus aux *Rhizoctonia* ou aux *Erwinia*. Les infections primaires sont souvent latentes, chez les variétés les plus sensibles, les feuilles du sommet sont dressées, plus ou moins chlorosées (jaunisse apicale). Sa gamme d'hôtes est restreinte, composée essentiellement de solanacées.



Figure 1.7. A gauche un plant sain et à droite enroulement des feuilles en gouttière ou en cornet (PLRV).

Avant 1974, le PLRV était le virus le plus répliqué en production de semences en France (3 à 4 fois plus que le PVY); actuellement, il ne représente plus que 10 % des infections [24]. C'est l'une des viroses les plus répandues et dans les situations les plus défavorables, dès la deuxième année et selon les variétés. Des pertes de rendement de 20 à 30% lui ont été attribuées [40].

Le PLRV est un des trois virus de pomme de terre les plus importants en termes de réduction de rendement [41]. Les pertes annuelles en Algérie sont de l'ordre de 15% [40]. Ils s'agissent avant tout d'une diminution du nombre de tubercules et de leur poids.

5.2. Le virus PVY :

Le virus Y de la pomme de terre est l'un des virus les plus dangereux et les plus répandues dans le monde entier. Le danger réside aussi dans la discrétion de certains de ses symptômes et donc de la difficulté d'épurer les cultures des plantes atteinte [24]. Les symptômes les plus fréquents associés au virus Y sont des mosaïques foliaires, généralement accompagnées de frisolées, parfois de nécroses. En fait les réactions dépendent du type de souches virales, de la variété, du caractère primaire et dans ce cas de la précocité de l'attaque ou secondaire de l'infection, ainsi bien sûr que des conditions d'environnement.

Les symptômes de l'infection primaire (symptôme de bigarrure) sont des nécroses brunes se développent le long des nervures sur les deux faces de la feuille. La maladie évolue en taches nécrotiques, qui gagnent les tissus internervaires ainsi que les pétioles et la tige, les feuilles se dessèchent et pendent le long de la tige (Figure 1.8).



Figure 1.8. Stries nécrotiques noirâtres sur la face inférieure des folioles (Potato Virus Y) [36].

Les symptômes de l'infection secondaires (symptôme de frisolée) sont nettement plus marqués: une mosaïque s'installe sur les feuilles, des déformations telles qu'ondulations, gaufrages ou des cloquages (Figure 1.9).



Figure 1.9. . A gauche un plant sain et à droite mosaïque, gaufrage et cloquage des feuilles (PVY).

La variation des symptômes dépend des facteurs du milieu et de la variété ; le PVY est sensible aux variations de température et réagit entre 10 et 26°C. L'optimum de température pour la souche yⁿ se situe entre 22°C et 26°C, alors que pour la souche y^o, l'optimum varie entre 14 et 22°C [31]. Dans les essais variétaux, le virus Y nécrogènes provoque sur 20% des variétés des nécroses sur les tubercules. Plusieurs variétés considérées comme moyennement ou peu sensibles au virus Y sont très sensibles aux souches nécrogènes. Figure 1.10 [36].



Figure 1.10. A gauche des tubercules sains et à droite Nécroses annulaires superficielles (PVYntn) [36].

Le virus Y peut infecter de très nombreuses espèces dans 30 familles différentes [19]. En conditions naturelles, le virus est disséminé par les pucerons, soit à partir des cultures de pomme de terre (plants ou autres), soit à partir d'autres plantes hôtes du virus Y

Des pertes de rendement allant jusqu'à 50 %, voire 80 % ont été attribuées au virus Y (PVY). Il est responsable de très fortes dégénérescences des plants dans de nombreux pays [13]. Actuellement le virus PVY (mosaïque) représente plus de 90% des infections en Suisse et la variété désirée est classée dans le groupe des variétés très sensible au PVY [42].

5.3. Le virus PVX :

La contamination de l'année en cours du virus X de la pomme de terre ne provoque pas de symptômes faciles à distinguer ; seule l'infection de l'année précédente les exprime nettement, apparition de mosaïques limitées par les nervures et sans déformation de feuillage figure 1.11. Les symptômes s'observent mieux en phase de croissance active des plantes et par faible ensoleillement [37]. L'association fréquente avec le PVY ou le PVA se traduisant par des symptômes de bigarrure, le virus infecte surtout les Solanacées, dont la tomate et le tabac, sur lequel il est aussi responsable d'affection spécifiques [29].



Figure 1.11. A gauche un plant sain et à droite mosaïque sur feuilles limitées par les nervures. (PVX) [37].

Le virus X a été autrefois le virus le plus commun sur pomme de terre, infectant entre autres toutes les variétés cultivées aux Etats-Unis et de façon chronique en France, des variétés comme Eersteling, Alpha [43]. Au plan national, son importance a fortement diminué, même s'il demeure un sujet de préoccupation pour les producteurs de plants. Son incidence sur le rendement est plus faible que celle du virus Y ou du PLRV, car il n'entraîne pas de réduction marquée de la croissance de la plante ou de la taille et du nombre de tubercules. BEEMSTER et BOKX [13], font cependant état de pertes de plus de 50 % chez certaines variétés atteintes par des souches nécrosantes.

5.4. Le virus PVA :

Pour le virus A, la manifestation des symptômes en végétation est fonction de la variété et des conditions climatiques. Cependant lorsqu'il s'agit d'une contamination de l'année en cours, les symptômes correspondent à l'apparition de mosaïques légères et fugaces non limitées par les nervures qui sont visibles surtout par temps couvert.

En revanche, lorsqu'il s'agit d'une contamination de l'année précédente, les symptômes peuvent être beaucoup plus prononcés, pouvant correspondre à un gaufrage des feuilles accompagné d'un phénomène de brillance (figure 1.12) et de mosaïque plus ou moins marquée (figure 1.13) selon les variétés [38]. Ses seules hôtes connus sont les Solanacées et son seul hôte naturel, la pomme de terre, sur laquelle il est fréquemment associé au virus Y ou au virus X.

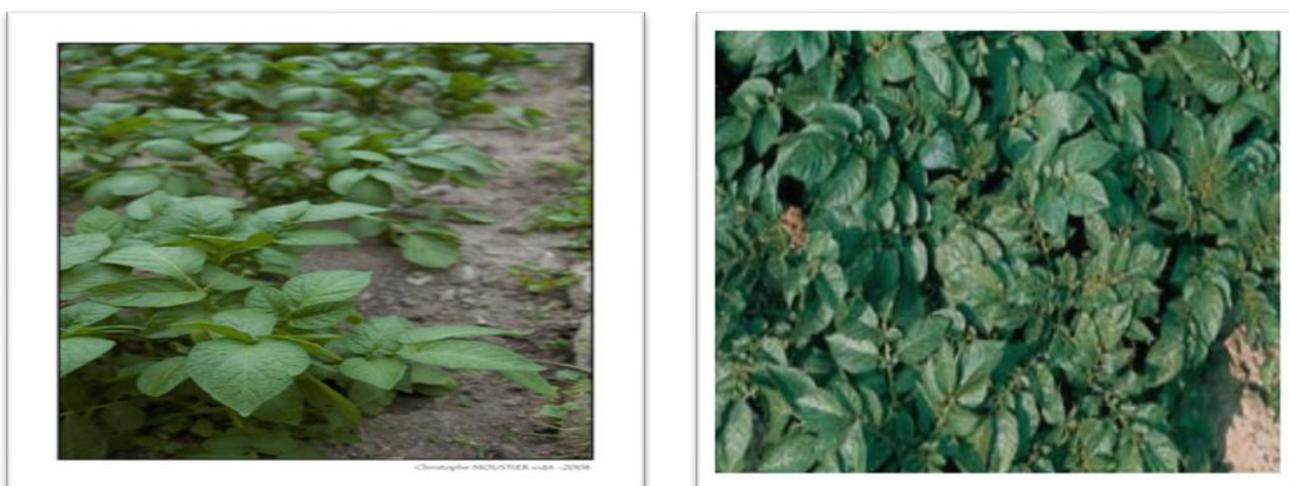


Figure 1.12. A gauche un plant sain et à droite symptôme de gaufrage et brillance des feuilles (PVA) [38].



Figure 1.13. A gauche un plant sain et à droite symptôme de mosaïque plus ou moins marquée (PV A) [38].

5.5. Le virus PVS :

Le virus S provoque des symptômes généralement faibles (latence), variables selon la variété et la souche viral, nous avons un éclaircissement du feuillage, enfoncement des nervures sur la face supérieure des feuilles (figure 1.15.), réduction de la taille des feuilles, extrémité des folioles inclinées vers le bas et sur des variétés très sensibles les feuilles sont d'aspect bronzé avec taches nécrotiques [39].

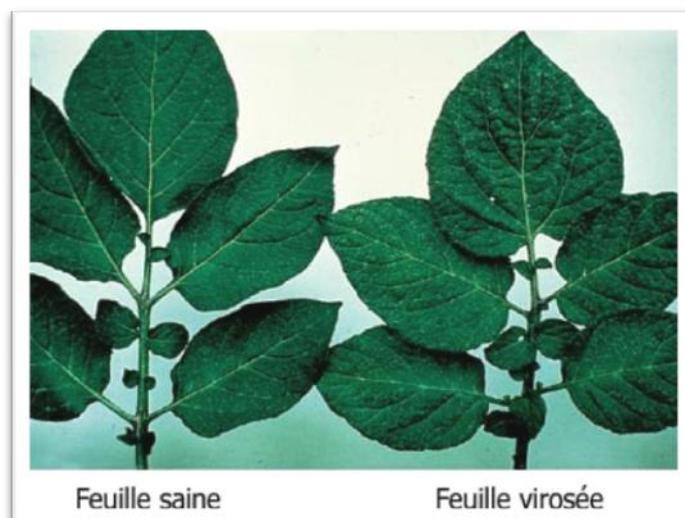


Figure 1.14. Enfoncement des nervures et extrémité des folioles inclinées vers le bas (PVS) [39].

Le virus S est présent dans toutes les régions du monde où la pomme de terre est cultivée. Le virus S est également très fréquent et préoccupant en Amérique du Nord, notamment aux États-Unis où les taux de re-contamination peuvent atteindre 100 % en trois ans [44]. L'effet du virus S sur le rendement se traduit, soit par une augmentation relative du nombre des petits tubercules, chez Bintje par exemple, soit par une diminution de poids des gros tubercules de l'ordre de 1 % pour Katahdin, 4 % pour Russet burbank.

Dans ce domaine, VAN DER ZAAG [45], situe le virus S au même niveau que le virus X, soit 5 à 15 % de pertes dans les parcelles contaminées à 100 %.

6. Voies de transmission

A de très rares exceptions près, les particules virales se dénaturent rapidement dès que la plante ou la cellule meurt. Pour survivre, les virus doivent donc passer d'une plante malade à une plante saine, ce qui peut être fait par transmission verticale ou par transmission horizontale.

6.1. Transmission verticale ou à la descendance

Appelée aussi transmission passive, les maladies virales étant généralisées, les organes de multiplication végétative de la plante sont infectés et les virus sont ainsi presque systématiquement transmis à la descendance issue de boutures, greffons, tubercules, stolons, bulbes, caïeux... récoltés sur une plante-mère infectée [19, 46].

La transmission par la graine ou par le pollen est plutôt rare ce qui peut s'expliquer par la présence de systèmes d'inhibiteurs, ainsi qu'une diminution de la compétitivité d'un pollen infecté vis-à-vis d'un pollen sain voire même d'une perte du pouvoir germinatif [47].

Malgré la surveillance réalisée sur les lots de semences, la transmission à la descendance permet une dissémination du virus dans le monde entier par le biais des échanges commerciaux qui sont de plus en plus nombreux [46]. La voie interne permet au virus de se perpétuer de génération en génération, mais ne lui permet pas d'infecter d'autres individus de la même génération. Ainsi, les

tubercules récoltés sur une pomme de terre infectés par le virus Y (PVY, Potato Virus Y) sont généralement tous infectés (au minimum ceux de la tige portant l'infection), une fois replantés, la nouvelle plante sera porteuse de l'infection [12].

6.2. Transmission horizontale ou par un vecteur

Appelée aussi transmission active, ce mode de transmission fait le plus souvent intervenir un intermédiaire : le vecteur. Celui-ci prélève le virus dans une plante malade et l'inocule à une plante saine. Il contribue efficacement à la survie et à la dissémination spatiale du virus.

Les pucerons, qui constituent le groupe de vecteurs de *phytovirus* le plus important, sont des insectes piqueurs suceurs dont les pièces buccales (le stylet) sont particulièrement adaptées à la transmission des virus.

L'acquisition du virus sur une plante infectée et la transmission à une plante saine par le vecteur se fait au cours de piqûres d'épreuves, brèves (quelques 10èmes de secondes) [48]. Les pucerons ont une gamme d'hôtes assez spécifique, mais sont incapables de distinguer un hôte favorable à leur développement. Ils effectuent donc des piqûres d'essai, brèves et superficielles (au niveau des cellules épidermiques) afin d'évaluer les propriétés nutritionnelles de la plante sur laquelle ils se sont posés et de reconnaître si c'est un hôte favorable à leur développement.

La rétention du virus s'effectue sur la partie distale du stylet, où le canal alimentaire et le canal salivaire sont fusionnés [48]. Le virus ne se multiplie pas dans le vecteur, et le puceron reste virulifère (capable de transmettre le virus après l'avoir acquis) de quelques minutes à quelques heures. Le puceron peut inoculer le virus immédiatement (sans temps de latence) à la prochaine plante testée, puis le virus est dénaturé ou n'est plus infectieux au bout de quelques piqûres. Ce mode de transmission appelée mode non persistant est très efficace et peut permettre la propagation de la maladie dans une culture sans que la population de puceron soit importante les virus qui se transmet par ce mode sont le PVY, PVA et PVS. La dissémination par voie externe, confronte le virus à des hôtes différents ce qui implique des contraintes d'adaptation.

Alors que le PLRV se transmet selon le mode persistant dits "circulants", c'est-à-dire qu'il va effectuer un transit dans le corps du puceron. Le virus est situé dans la sève élaborée de la plante (qui est transportée par le phloème), où il se multiplie. Pour acquérir un virus, le puceron doit effectuer des piqûres d'alimentation profondes pour atteindre le phloème avec ses stylets, d'où un temps d'acquisition relativement long (de quelques dizaines de minutes à quelques heures).

Le virus transite ensuite dans le corps du puceron, il passe du canal alimentaire à l'intestin, puis dans l'hémolymphe. Enfin il vient s'accumuler dans les glandes salivaires avant d'être inoculé à une autre plante lors d'une piqûre d'alimentation. Ce transit explique qu'il existe une période de latence (plusieurs heures à plusieurs jours) avant que le puceron soit virulifère (capable de transférer un virus). Ce mode de transmission est beaucoup plus spécifique que le mode non persistant : une espèce de puceron transmet seulement une ou deux espèces de virus.

Les stratégies de transmission des virus sont très variées, elles impliquent pour chaque couple virus - vecteur des interactions moléculaires très spécifiques [45]. Cela explique pourquoi, en général un virus donné ne sera transmis que par une espèce vectrice ou par un ensemble d'espèces taxonomiquement proches. Souvent l'ensemble des virus d'un genre sera transmis par le même type de vecteur. La transmission par vecteur est donc très spécifique. Des études indiquent qu'il existe des signaux moléculaires de reconnaissance entre virus et pucerons. Deux protéines virales sont indispensables au processus de transmission des *potyvirus* [49] : la protéine de capsid et une protéine appelée facteur assistant de la transmission (FAT) [50, 51].

Sur la base de ces différents paramètres, les virus transmis par les pucerons ont été classés en virus de type persistants, semi-persistants ou non persistants. Le tableau 1.4. Renseigne les principales caractéristiques des deux grands groupes de virus de la pomme de terre transmis par les pucerons, les virus non persistants (PVY, PVA et certaines souches de PVS) et persistant (PLRV).

Tableau 1.4. Caractéristiques épidémiologiques des virus de la pomme de terre transmis selon le mode non- persistant ou persistant [12].

Caractéristiques	Virus persistants (PLRV)	Virus non persistants (PVY, PVA et PVS)
Longueur de la période d'acquisition	Minutes à heures	Secondes à minutes
Partie de la plante ou le virus est prélevé	phloème	Parenchyme
Longueur de la période de latence	Heures à jours	Quelques secondes
Longueur de la période d'inoculation	Heures	Secondes
Longueur de la période de rétention	Toute la vie	Minutes à heures
Comportement du virus dans le puceron	Virus circulant (organes digestifs, hémolymphe, salive)	Virus affectant uniquement les stylets, perdus dès que le puceron à une nouvelle piqûre
Distance sur laquelle peut être transporté le virus	Longue	Courte
Délai pour qu'une plante nouvellement infectée devienne à son tour une source d'infection	1 à 3 semaines	1 à 3 semaines
Délai pour la translocation du virus du feuillage vers les tubercules	1 à 5 semaines	1 à 5 semaines

7. Moyens de lutte

7.1. Conditions naturelles

7.1.1. Sélection sanitaire

Dans les productions de semences, la lutte contre les virus et les maladies se fait par une sélection sanitaire durant la multiplication des semences et par l'épuration des touffes malades [52]. Le schéma traditionnel de sélection comporte la sélection par filiation, à partir des tubercules choisis indemnes et la sélection massale par multiplication en mélange avec extirpation des plantes malades (épuration).

Un schéma plus récent fait appel à la multiplication par « bouturage *in vitro* ». Au départ, des tubercules sont également choisis indemnes ; le bouturage se fait à partir de germes et de plantules développées en tubes. Cette méthode accélère la multiplication, à la demande, en conditions de non contamination au premier stade. Les cultures de plants, au champ, sont tributaires des interactions entre : le milieu, le climat, les vecteurs (pucerons), l'état des plantes et les virus.

Le succès de la sélection sanitaire réside dans une conjugaison optimale des ces facteurs ; d'où l'importance du choix sélectif du milieu (régions, sites, isolements) et de la lutte contre les maladies (épuration, traitements).

7.1.2. Résistance variétale

La méthode de lutte la plus simple à mettre en œuvre reste l'utilisation de variété très résistante au virus. Malheureusement, la lutte génétique demeure longue, elle reste souvent plus de 10 ans entre le moment où l'on découvre une résistance dans une banque de gènes et le moment où cette résistance est intégrée dans une variété commerciale. Par ailleurs, cette approche est très spécifique. Une variété résistante à un virus restera sensible à un second virus. Il faudra alors, créer des variétés possédant des résistances à plusieurs virus pour évaluer et contourner la résistance [53].

7.2. En culture in vitro

7.2.1. La culture de méristème

La culture de méristème permet le sauvetage des variétés virosées menacées de disparition. Elle concerne essentiellement les plantes à reproduction par voie végétative qui permet la transmission des virus à la descendance.

En 1952, MOREL et MARTIN [54], réussissaient à éliminer le virus de la mosaïque de *Dahlia* en mettant en culture des méristèmes de ces plantes.

Quelques années plus tard, ils éliminaient les virus A, S et Y de différentes variétés de pomme de terre entièrement infectées.

Le développement in vitro, sur un milieu adéquat, d'un dôme méristématiques végétatif prélevé au niveau d'un bourgeon terminal ou axillaire d'une plante infectée par des virus ou des microorganismes, conduit généralement à l'obtention de plantes saines.

Les raisons de cette immunité peuvent s'expliquer selon Morel [55], par les besoins de cellules des régions en voies de multiplication cellulaires, en matière première pour faire la synthèse des acides nucléiques dont-elles ont besoin et ainsi le virus ne peut utiliser ces précurseurs pour sa multiplication. Plusieurs facteurs peuvent influencer l'efficacité de cette méthode : la taille du méristème et sa localisation. Généralement les succès de l'éradication virale et inversement proportionnel à la taille du méristème [56].

La facilité relative à l'assainissement par culture de méristème dépendra de l'agent pathogène en cause. Chez la pomme de terre, les virus suivant peuvent être éliminé par ordre de difficulté croissante, virus de l'enroulement (PLRV), virus A, virus Y, virus X et virus S [57]. Les variétés obtenues par culture de méristème sont conformes à la variété d'origine et on peut les multiplier en grande quantité. Cependant les plantes obtenues sont indemnes de virus mais ne sont pas devenues résistantes aux virus, elles peuvent être re-contaminées via des insectes si des mesures de prophylaxie ne sont pas prises.

7.2.2. Thermothérapie

La température élevée à laquelle sont soumis les plants ralentit la multiplication du virus alors que le développement du végétal se poursuit.

Le traitement des végétaux par des températures élevées fut utilisé par KUNKEL en 1936 [58]. Chez la pomme de terre, le virus responsable de l'enroulement des feuilles peut être éliminé par un traitement des tubercules à 35 à 38°C pendant 2 à 4 semaines.

7.2.3. Chimiothérapie

L'incorporation d'un produit chimique anti-métabolique tel que le virazole (ribavirin) dans le milieu de culture des méristèmes apicaux, peut bloqué la réplication virale dans les tissus infectés. Ce qui entraîne la dégradation des virus présents jusqu'à leur éradication. Cependant cette méthode présente quelques inconvénients : l'importante phytotoxicité dans la plante hôte, l'augmentation de la concentration des virus dès l'arrêt du traitement et la cherté de la méthode [59].

CHAPITRE 2 PARTIE EXPERIMENTAL

1. Phase laboratoire

1.1. Matériel végétal

1.1.1. Origine du matériel :

Nous avons utilisé pour notre travail, deux variétés une à peau rouge et l'autre à peau blanche de pomme de terre provenant des pays bas. Ce matériel est réceptionné sous forme de lot de 50 kg par variété avec des étiquettes de certifications. (Tableau 2.5).

Tableau 2.5: Les variétés utilisées dans notre travail

Variétés	Origine	Classe	Calibre	Date de certification	N° du lot
Désirée	Tubercules Nederland (pays bas)	A	35/55	11/12/2005	159 804
Spunta			45/55		-

Le choix des variétés utilisés pour l'étude est selon la demande du marché national.

Ces tubercules sont utilisés pour deux essais à savoir :

- ☀ Le premier essai : culture de méristème à partir des germes de tubercules sans thermothérapie.
- ☀ Le deuxième essai : culture de méristème à partir des germes de tubercules avec thermothérapie.

Les caractéristiques des deux variétés utilisées sont données en Appendice B.

1.2. Etapes du travail

1.2.1 Désinfection du matériel végétal

Les tubercules choisis après un tri, sont désinfectés selon les étapes suivantes :

1. Lavage des tubercules à l'eau courante pour éliminer toute terre adhérente ou autre.
2. Immersion des tubercules dans l'hypochlorite de sodium à 0.5% pendant 20 minutes.
3. Trois rinçages successifs de 5 minutes à l'eau distillée.
4. La désinfection est achevée par un séchage des tubercules sur un papier absorbant stérile.

Une fois le matériel est séché, chaque tubercule est indiqué par la première lettre de la variété et un numéro. Pour finir les tubercules sont mis dans des clayettes et laissés pour une pré germination à l'abri de toute contamination.

1.2.2. Milieux de culture

1.2.2.1 Milieux d'initiation et de multiplication

Le milieu utilisé dans notre essai est celui de MURASHIG et SKOOG (MS) [60], c'est un milieu complet couramment utilisé par tous les expérimentateurs et pour toutes les cultures qui est composé d'éléments minéraux (les macroéléments et les microéléments), d'éléments organiques (les sucres et les vitamines), les régulateurs de croissance et un gélifiant (Agar). La composition du milieu se trouve en appendice C.

Le milieu de culture est stérilisé juste après sa préparation avec un PH de 5,5 à 5,8 par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes

La micro propagation est réalisée sur le même milieu de repiquage « MS » sans hormones dans des récipients (Boites Magenta) dont le volume de milieu est de 30 ml / boites avec 9 micro boutures. Le cycle de chaque subculture est de 3 semaines.

1.2.3 Prélèvement et mise en culture des méristèmes

Les germes prélevés sont désinfectés par trempage, pendant 15 minutes dans la solution composée de 2 ml de Tween 20 et 5 ml d'eau de javel de 32 °C suivi de deux rinçages de 5 minutes à l'eau distillée stérile.

La dissection aseptique du méristème a été réalisée sous une hotte à flux laminaire horizontal, sous une loupe binoculaire G X 10 à 40 fois. A l'aide d'une pince de dissection très fine dite « pince d'horloger », on a enlevé une à une les ébauches de feuilles, jusqu'à apparition de l'apex, qui se présente généralement sous forme d'un petit dôme brillant. Le fragment isolé comporte généralement 1 à 3 ébauches foliaires. L'explant ainsi prélevé est transféré rapidement dans de petits tubes contenant 10 ml du milieu de culture d'initiation.

Le matériel de départ utilisé pour la culture de méristème avec ou sans thermothérapie est numéroté en mentionnant la première lettre de la variété. Ainsi nous avons utilisé 50 tubercules Spunta Numérotés du S₁ jusqu'aux S₅₀ et 50 tubercules Désirée Numérotés du D₁ jusqu'au D₅₀.

Les conditions dans la chambre de culture étaient de 20 à 25 °C de température, la photopériode avec 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité. La culture d'apex ne réclame qu'une faible intensité lumineuse dispensée par des lampes à lumière blanche d'environ 1000 et 2000 Lux à la hauteur des tubes.

La croissance est lente au cours de premier mois de la mise en culture, le développement d'une rosette de feuilles, base de multiplication végétative

In vitro, nécessite le transfert de l'explant dans un milieu riche en cytokinine. Après excision d'un germe de chaque tubercule pour la culture de méristème, ces tubercules sont placés dans l'incubateur afin de subir la thermothérapie. Chaque bouture (nœud de germe) est individualisée (clone) jusqu'à l'obtention de tous les résultats de contrôle.

1.2.4 Taille des méristèmes

Afin d'étudier l'influence de la taille de l'explant méristématiques sur le pourcentage de régénération et l'assainissement du matériel végétal, on a prélevé à partir des germes de tubercule des apex méristématiques de deux tailles différents T_1 avec 0,2 mm et T_2 avec une taille de 1 à 3 mm. La taille a été mesurée à l'aide d'une loupe binoculaire équipée d'une échelle millimétrique.

1.2.5 Thermothérapie

Pour améliorer le taux d'assainissement de nos plants, nous avons associé la thermothérapie à la culture de méristème. Les tubercules testés sont placés dans l'incubateur pour être acclimatés petit à petit à la température de thermothérapie qui est de 37°C pendant un mois, ce qui conduit à une durée totale de thermothérapie d'un mois et demi (Figure 2.15).



Figure 2.15: Traitement des tubercules à la chaleur (Thermothérapie) dans l'incubateur.

1.2.6 Micro - propagation

Après repiquage des méristèmes sur un milieu de culture frais et l'obtention de vitro plants, ces dernières seront multipliées sur plusieurs générations jusqu'à obtention du nombre voulu de vitro plants. La multiplication consiste à fragmenter le vitro plant en autant de fragments qu'il comporte de bourgeons axillaires pour les repiquer après, sur un milieu de culture et les placer dans la chambre de culture. Le vitro plant porte de 5 à 10 nœuds. Chaque nœud repiqué sur un milieu adéquat donnera en 3 à 4 semaines une plantule de 5 à 10 nœuds. Soit un coefficient de multiplication de 6 environ par mois pour la variété désirée et de 8 pour la Spunta.

Les vitro plants issus de la micro propagation cultivés dans les boîtes Magenta sont placés dans une ambiance où la température, photopériode, l'intensité lumineuse et l'humidité sont entièrement contrôlés et définis pour favoriser la croissance des plantules. La température est de 23 à 25 °C avec une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité et une intensité lumineuse d'environ 3000 lux.

1.2.7 Dépistage des maladies virales sur plantules en phase de multiplication par la technique sérologique

L'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay' (**ELISA**) décrite pour la détection des virus de plantes par CLARK et ADAMS en 1977 [61], a révolutionné le diagnostic en virologie végétale. Elle permet de s'affranchir des incertitudes liées à l'étude des symptômes et d'affirmer qu'une plante est effectivement infectée par un virus. Cette technique est très sensible et permet de détecter entre 1 à 10 ng de virus par ml de broyat (de feuilles ou de fruits), selon le virus considéré [19].

Les techniques ELISA sont généralement les plus utilisées, elles sont polyvalentes, se prêtent généralement bien aux travaux de routine, elles sont automatisables et elles assurent une utilisation rationnelle et économique des

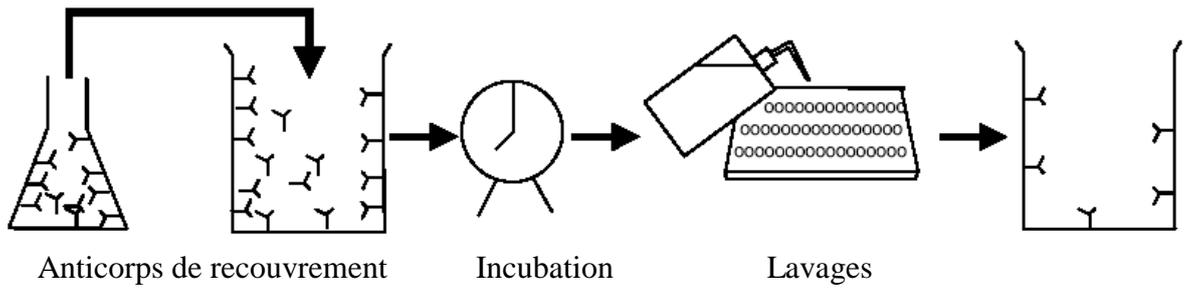
anticorps et des antiséras. Il existe deux variantes du test ELISA : la méthode directe DAS-ELISA et la méthode indirecte TAS-ELISA. Dans notre cas, nous avons utilisé la DAS-ELISA.

1.2.7.1 La méthode directe DAS-ELISA

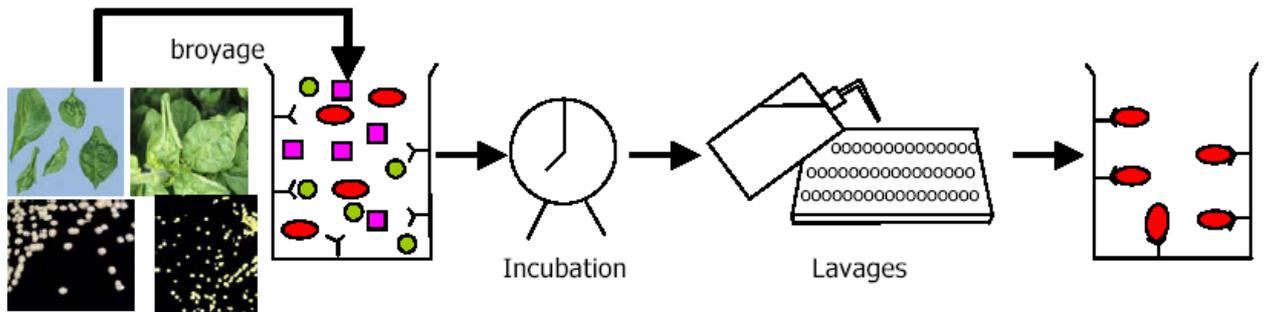
Elle consiste à immobiliser les anticorps sur un support de polystyrène ou de polyvinyle, constitué généralement par des plaques de microtitration comportant 96 puits. On dépose ensuite l'extrait contenant les antigènes viraux (échantillons à tester) qui seront fixés aux anticorps homologues. Par la suite, on dépose les anticorps marqués avec une enzyme (généralement la phosphatase alcaline) qui se fixeront à leur tour sur les antigènes spécifiques.

La quantité d'enzyme retenue est estimée après addition d'un substrat approprié. Le choix d'un substrat formant un produit coloré par réaction d'hydrolyse, permet un contrôle visuel aisé de la présence ou de l'absence d'antigène dans l'échantillon. De plus, comme la quantité d'enzyme fixée est proportionnelle à la quantité d'anticorps immobilisés, la mesure quantitative de l'antigène est réalisable par l'analyse colorimétrique. (Figure 2.16) [62].

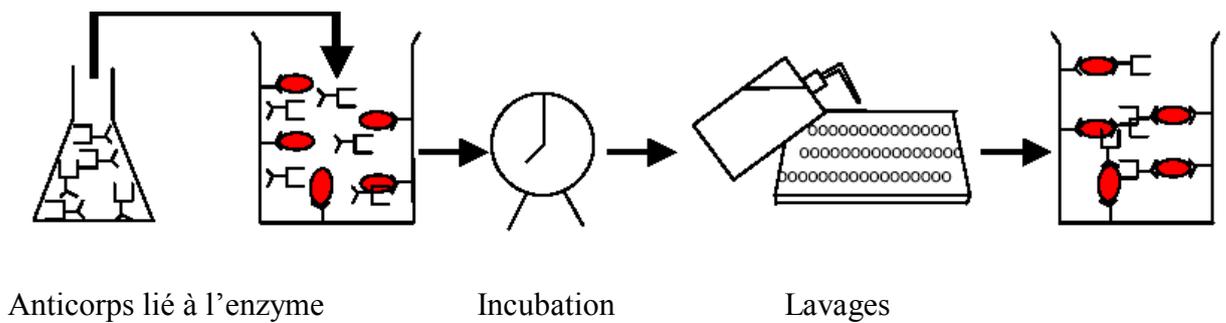
1- RECOUVREMENT DES PUIITS



2- ADDITION DE L'ANTIGÈNE



3- ADDITION DE L'ANTICORPS LIÉ À L'ENZYME



4- ADDITION DU SUBSTRAT DE L'ENZYME ET LECTURE

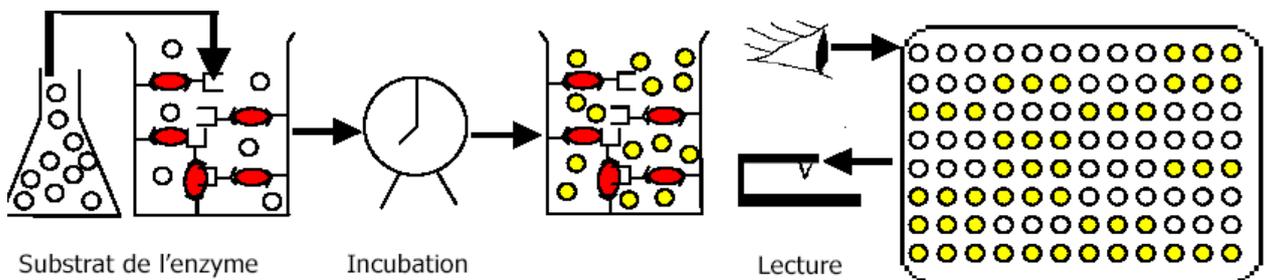


Figure 2.16. Les étapes de la technique ELISA double "sandwich" d'anticorps (DAS) [62]

1.2.7.2 Echantillonnage au niveau de la chambre de culture (labo *In Vitro*)

Après la multiplication de la première génération (F_1) qui consiste à fractionner le vitro plant en autant de fragment, deux entre nœuds de la partie médiane de chaque vitro plant par clone sont prélevées dans la chambre de culture et qui sont repiqué sur un milieu adéquat qui représente l'échantillon à tester (Figure 2.17). Après 3 à 4 semaines de mise en culture, chaque nœud donnera une plantule de 5 à 10 nœuds, donc chaque échantillon est composé de deux vitro plants.

Le premier contrôle a été réalisé en Juillet 2006 (Echantillons prélevés du premier essai culture de méristème seule) et le deuxième en Septembre de la même année (Echantillons prélevés du deuxième essai culture de méristème avec thérapie). Un total de 140 échantillons sont prélevés et testés.

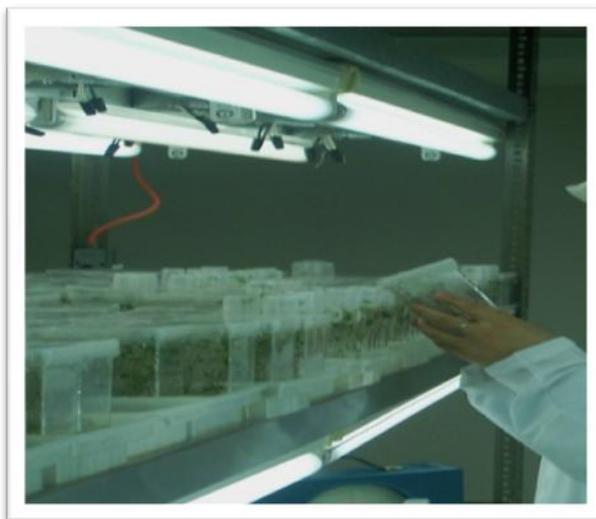


Figure 2.17: Echantillonnage des vitro plants pour le test ELISA dans la chambre de culture

Les étapes de la DAS – ELISA

➤ Anticorps et témoins utilisés

• Anticorps utilisés

Les antisérums (anticorps spécifiques de sensibilisation et anticorps conjugués à la phosphatase alcaline) utilisés pour les tests ELISA sont des antiséra polyclonaux disponibles commercialement.

Les antiséra spécifiques aux PVY, PVA, PVS, PVX et PLRV ont été obtenus de BIOREBA (Switzerland).

• Témoins utilisés

Les témoins positifs et négatifs ont été fournis par BIOREBA dans le même Kit. Les témoins positifs sont des fragments de feuilles de pomme de terre infectées lyophilisées pour les 5 virus cités ci-dessus.

Les témoins négatifs sont des fragments de feuilles saines de pomme de terre lyophilisées.

• les solutions

Des tampons sont fournis avec le kit qui sont : solution de lavage, solution d'extraction (de jus végétal), solution de fixation (pour l'anticorps des tablettes de 1g), tampon de conjugués, tampon de substrat et les pastilles de PNPP (Para-Nitro Phényle Phosphate).

➤ Protocole de la DAS ELISA

Etape 1: Sensibilisation des microplaques avec un anticorps spécifique.

Diluer une tablette du tampon de fixation dans 100 ml d'eau distillée

Diluer les anticorps au 1/1000 dans le tampon de fixation.

Pour une plaque diluer avant utilisation:

Tampon de fixation	6 ml
Anticorps	60 µl

Bien mélanger avant utilisation et ajouter 200 µl de la solution obtenue dans chaque puit de la microplaque. Couvrir les plaques et placer les dans une étuve humide ou au bain marie. Incuber 4h à 30 °C ou une nuit à + 4 °C.

1. a. lavage des plaques : vider les plaques et laver au moins 3 fois avec le tampon de lavage (Figure 2.18).



Figure 2.18: Lavage des plaques avec la solution de lavage.

Etape 2: Dépôt des échantillons, témoin positif et témoin négatif.

La détection des antigènes par la DAS- ELISA demande en général l'extraction de l'antigène du tissu végétal qui le contient par homogénéisation de celui-ci dans un tampon qui empêche la dénaturation de l'antigène au cours de l'extraction et pendant l'incubation ultérieure dans la plaque.

Extraction de l'antigène : Les échantillons de plants sont broyés dans la solution d'extraction à l'aide d'un broyeur à rouleaux (Figure 2.19). Les extraits obtenus pourront être clarifié par décantation et conserver à + 4°C jusqu'au moment du dépôt.

Témoins positif et négatif : les témoins lyophilisés fournis avec le kit sont reconstitué par adition de 1 ml d'eau distillée. Ajouter 200 µl par puit (Figure 2.20). Couvrir les plaques et les placer une nuit pour incubation a + 4 °C.

2. a. laver comme en 1.a mais 2 lavages avec 3 minutes d'incubation dans le tampon de Lavage.



Figure 2.19: Broyage des échantillons à l'aide d'un broyeur à rouleaux.

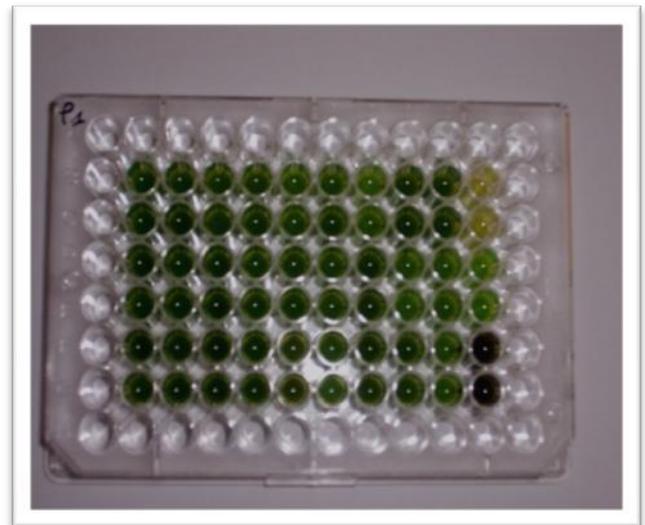


Figure 2.20: Dépôt des extraits des échantillons et les témoins.

Etape 3: Dépôt des anticorps conjugués à l'enzyme.

Diluer le tampon conjugué au 1/10 dans de l'eau distillée.

Diluer au 1/1000 les anticorps conjugués dans le tampon.

Pour une plaque diluer avant utilisation:

Tampon conjugué	6 ml
Anticorps conjugué	60 µl

Bien mélanger avant utilisation et ajouter 200 μ l de la solution obtenue dans chaque puit de la microplaque (Figure 2.21).

Couvrir les plaques et placer les dans une étuve humide ou au bain marie.

Incuber 5 h à 30 °C.

3. a. laver comme en **1.a**



Figure 2.21: Dépôt des anticorps conjugués à l'enzyme

Etape 4: Dépôt de substrat.

Diluer le tampon de substrat au 1/5 dans de l'eau distillée.

Dissoudre les pastilles de substrat pNPP à 1 mg/ml dans le tampon de substrat.

Pour une plaque diluer avant utilisation:

Tampon substrat (incolore)	12 ml
Pastilles de pNPP	12 mg

Attendre la dissolution totale avant utilisation et ajouter 200 μ l de la solution obtenue par puit. Incuber à température ambiante (18 à 25 °C) à l'obscurité.

Observez la réaction et notez le développement de la coloration entre 30 et 120 min, soit visuellement soit avec un photomètre à 405 nm.

Exemple de plaque

PLAQUE N°....

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

TP: Tampon
Echantillons.

T (+): Témoin positif

T (-): Témoin négatif 1.2.....:

➤ Lectures et interprétation des résultats :

L'interprétation des résultats des microplaques, qu'ils soient obtenus par lecture visuelle ou colorimétrique doit se faire par comparaison avec les témoins.

▪ Calcul des absorbances:

Les valeurs des densités optiques (DO) des tampons, témoins et échantillons sont les valeurs brutes diminuées de la DO du substrat.

DO échantillons = DO brute – moyenne des DO des puits substrat.

▪ Interprétation des résultats:

Pour les tests d'anticorps couplés, la présence du complexe antigènes- anticorps-enzyme se traduit par l'hydrolyse du substrat qui donne une réaction colorée.

Pour le test ELISA, dont les lectures sont faites visuellement et mesurent de l'absorption au UV à 405 nm (30 min et 120min après dépôt du substrat), un prélèvement est considéré comme étant positif si la valeur de sa densité optique est supérieur de 2 ou 3 fois à la moyenne des valeurs de la densité optique des témoins négatifs.

2 Phase serre – verre (milieu contrôlé).

2.2 Matériel végétal

2.2.1. Origine du matériel

Les vitro plants de la quatrième génération (F₄) d'origine saine utilisée pour la transplantation dans la serre- verre proviennent de la micro propagation *In Vitro* des 2 variétés Spunta et Désirée (origine est décrite en annexe).

2.3 Méthode de travail

2.3.1 Transplantation sous serre – verre

Après la multiplication, a la quatrième génération (F₄) les vitro plants obtenus ont été transplantés dans un substrat composé d'un tiers (1/3) de sable de rivière et deux tiers (2/3) de tourbe préalablement stérilisé a la chaleur avec un stérilisateur.

A la sortie des boites Magenta, les vitro plants sont nettoyés de l'agar puis repiqués sur le substrat dans des pots d'un diamètre de 25cm /25cm avec une densité de plantation de 6 à 9 vitro plants par pot. Les conditions de croissance dans la serre –verre telles que la température (25°C ± 2°C le jour et 18 °C ± 2°C la nuit), la photopériode, l'intensité de la lumière, les nutriments et l'humidité sont réglées et contrôlées afin de favoriser la première croissance végétative et la tubérisation.

2.3.2. Soins cultureux

2.3.2.1. Irrigation

Les vitro-plants élevés dans une atmosphère saturée à plus au moins 100 % d'humidité (boite magenta) nécessitent durant les 3 premières semaines de leur plantation, une humidité de l'aire importante. Pour cela l'irrigation débute par l'aspersion (l'alimentation se fait par les feuilles et les racines), jusqu'a ce que les racines deviennent bien développées permettant ainsi la reprise et développement

des plantules. L'irrigation par goutte à goutte est ensuite assurée tout le long du cycle végétatif (Figure 2.22).



Figure 2.22: l'irrigation des plants dans la serre -verre par le système goutte à goutte

2.3.2.2. Fertilisation

Le substrat utilisé est riche en matière organique, la fertilisation minérale complémentaire est apportée sous forme liquide par irrigation et pulvérisation foliaire avec des engrais solubles (Activeg 20.20.20 et solupotasse 43 %).

2.3.2.3. Buttage

Lors de la phase d'émission des stolons, le substrat est ajouté en 2 fois (le premier après 20 jours de l'acclimatation et un après 2 mois) jusqu'au remplissage des pots (le même substrat stérilisé).

2.3.2.4. Traitement phytosanitaire

Un calendrier de traitement phytosanitaire préventif est établi et respecté avec un traitement par semaine (traitement insecticide et fongicide). Les traitements insecticides sont réalisés contre les vecteurs qui seraient accidentellement introduits dans la serre.

2.3.2 Contrôle visuel et diagnostic sérologique par la technique ELISA

La culture en serre verre est soumise quotidiennement à un contrôle macroscopique des symptômes typiques des maladies virales des virus recherchés (PLRV, PVA, PVS, PVY et PVX). Après 3 mois de transplantation, les jeunes plantes en croissance active et non nécrosées ont subi un échantillonnage en visant les feuilles de la partie médiane du plant.

Les échantillons de feuilles en nombre de 54 échantillons sont transférés au laboratoire dans des sachets de congélation pour leur effectuer les analyses sérologiques contre le PLRV, PVX, PVA, PVS, et PVY. Le test a été réalisé durant le mois de Mars.

2.3.3 Récolte des mini - tubercules G0

A la récolte en Avril, les minis tubercules sont arrachés manuellement, la récolte est traitée avec une bouillie fongicide le Curzate MZ68. La conservation ne dura que 2 mois puisque cette récolte sera plantée en arrière saison durant le mois d'Août.

Pour l'interruption du repos végétatif, nous avons utilisé une méthode chimique par trempage des minis tubercules dans une solution de GA3 (Acide Gibbérellique) pendant 5 minutes (Figure2.23).



Figure 2.23: les mini tubercules récoltées de la serre – verre.

3 Phase plein champ (milieu naturel).

3.3 Matériel végétal

3.3.1 Origine du matériel :

Les tubercules des deux variétés Désirée et Spunta utilisés pour la plantation en culture d'arrière saison en génération G_0 pour la production de la G_1 et plantation de G_1 en culture de saison pour la production de la G_2 sont de même origine que ceux utilisés pour la phase laboratoire (origine en annexe).

3.4 Étapes du travail

3.4.1 Plantation

Plantation de la G_0 pour produire la G_1 : la plantation a été réalisée en culture d'arrière saison, le 15 Août 2006 sur une superficie de 2,05 ha. La densité de plantation était de 0,25 m entre plants et 0,75 m entre ligne. Chaque clone a été planté à part.

Plantation de la G_1 pour produire la G_2 : la plantation a été réalisée en culture de saison, le 5 Avril 2007 avec les mêmes paramètres de la G_0 sur une superficie de 8,60 ha.

3.4.2 Soins phytosanitaires

Les traitements devront être toujours en préventifs avec des produits (de contact, et systémiques) tous les huit jours en associant les produits (fongicides et insecticides), tout en ciblant le puceron en priorité et la teigne en fin de culture c'est la procédure utilisés par tout les producteurs de pomme de terre.

3.4.3 Dynamique de l'activité des populations de pucerons.

L'activité des populations de pucerons ailés au niveau des parcelles de multiplication constitue un des facteurs principaux de la diffusion des infections à virus dans les cultures de pomme de terre. La mesure de cette activité est donc nécessaire pour comprendre ou expliquer au moins une partie des phénomènes d'infection. Dans le cas d'études épidémiologiques des virus non persistants tel que le virus Y, c'est la fraction ailée des populations de pucerons qui s'avère la plus intéressante.

Les techniques de mesures visent à donner une indication plus générale de l'abondance des pucerons au niveau de la parcelle.

Ces informations peuvent être obtenues par la capture d'échantillons des populations ailées de pucerons dans des systèmes de capture par bac piège jaune contenant de l'eau additionnée d'un mouillant [63], disposé au niveau de la parcelle. Les pucerons attirés dévient leur vol pour y atterrir et rester piégés, incapable de reprendre leur vol en raison du mouillant.

La méthode de travail est la même pour les deux saisons de culture. Le dispositif est mis en place le 18 Août 2006 pour la culture d'arrière saison avec 6 pièges jaunes et le 9 Avril 2007 pour la culture de saison avec 12 pièges à une hauteur de 70cm de sol (figure 2.24).

Les prélèvements sont effectués une fois par semaine, les pucerons récoltés à l'aide d'une pince sont placés directement dans des tubes à essai contenant de l'alcool à 70°.

Les échantillons prélevés sont ensuite étiquetés puis ramenés au laboratoire où ils sont grossièrement triés des autres insectes. L'identification est réalisée au niveau de l'Institut National de Protection des Végétaux (INPV) de Constantine, sous loupe binoculaire et des clefs d'identifications [64, 65, 66]. Les espèces prises en compte sont les 5 espèces les plus fréquentes et régulièrement rencontrées sur pomme de terre qui sont *Myzus persicae* (puceron vert de

pêcher), *Macrosiphum euphorbiae* (puceron vert et rose de la pomme de terre), *Aphis fabae* (puceron noire de la fève), *Aphis nasturtii* (puceron de Nerprun) et *Aphis gossypii* (puceron du melon et du coton)



Figure 2.24: Bac jaune pour le piégeage des pucerons sur la parcelle de pomme de terre

3.4.4 Epuration et estimation de taux de viroses.

L'épuration est l'étape fondamentale pour la production de plants, elle débute de la végétation jusqu'à la date de défanage. Elle consiste en l'arrachage des pieds étrangers et non conformes à la variété, des pieds chétifs, des repousses et des pieds atteints de maladies à virus dès l'apparition des symptômes, des pieds atteints de *Jambes noire*, de *Rhizoctone* et de *verticilliose*. L'arrachage doit être complet aucun tubercule ne doit rester en terre et évacuer hors du champ dans des sacs pour être brûlés. Donc l'épuration repose sur 3 règles d'or : Commencer tôt, faire plusieurs passages et contrôler les pucerons.

L'épuration s'étale sur tout le cycle de la culture dès que les plants ont atteint 15 cm. Nous avons essayé d'estimer le taux de plants épurés présentant des symptômes viraux et évalués le taux de viroses sur les deux saisons de cultures.

4 Protocole expérimental

L'étude expérimentale que nous avons menée est réalisée selon le protocole décrit dans :

La figure 2.25 pour de la première partie Culture de méristèmes pour les deux variétés Désirée et Spunta.

La figure 2.26 pour la deuxième partie concernant la culture de méristèmes associée à la thermothérapie pour les deux variétés Désirée et Spunta.

5 Suivi et paramètres observés.

Au niveau du laboratoire (*In vitro*):

Tous les tubes contaminés sont éliminés

- ✱ Taux de contamination des cultures (en pourcentage) : le nombre d'explants contaminés par rapport au nombre total d'explants mis en culture avec ou sans thermothérapie.
- ✱ Le taux de reprise (pourcentage) : le nombre de tous les méristèmes qui en repris par rapport au nombre total de méristèmes mis en culture avec ou sans thermothérapie.
- ✱ Taux de nécrose des cultures (en pourcentage) : le nombre d'explants nécrosés par rapport au nombre total d'explants mis en culture avec ou sans thermothérapie.
- ✱ Taux de perte des tubercules après la thermothérapie (taux des tubercules utilisés après thermothérapie).
- ✱ Taux d'assainissement (en pourcentage) : nombre de plants sains par rapport au nombre total de plants testés.

Au niveau de la serre verre:

- ✱ Taux d'assainissement (en pourcentage) : nombre de plants sains par rapport au nombre total de plants testés (dans la serre verre)

Au niveau du plein champ:

- ✱ Taux de pucerons vecteur de virus: nombre de pucerons piégés durant tout le cycle végétative (en fonction de la saison de culture).
- ✱ Taux de virose : nombre de plants épurés présentant des symptômes viraux par rapport au nombre total plantés (en fonction de la variété et de la saison de culture).

6 Traitement des données

L'analyse statistique des données est basée sur la comparaison de l'Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance avec $\alpha = 5\%$. Les résultats obtenus sont également représentés sous forme de graphique à l'aide du logiciel Excel 2003.

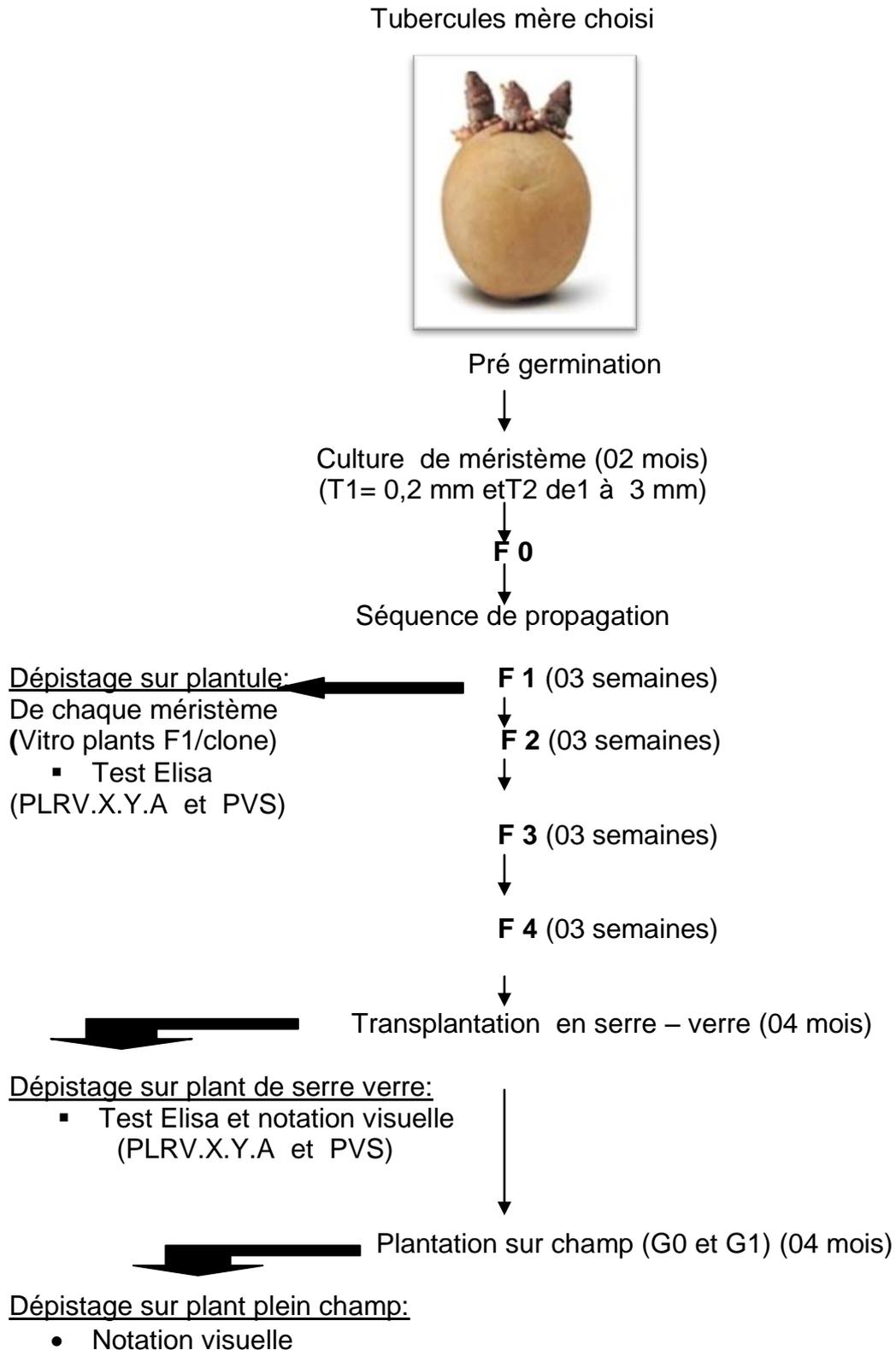


Figure 2.25: Protocole expérimental de la première partie : culture de méristèmes
Pour les variétés Désirée et Spunta

CHAPITRE 3 PARTIE RESULTATS ET DISCUSSION

1. Phase laboratoire.

1.1 Culture de méristèmes.

1.1.1. Taux de reprise.

Les pourcentages de reprise des méristèmes après 8 semaines de mise en culture ont été de 80% et 90% respectivement pour la variété Désirée et Spunta.

Concernant la taille des méristèmes, les résultats montrent que pour la variété Spunta, les méristèmes de taille comprise entre 1 à 3 mm (T_2) ont présenté un plus grand taux de reprise (92%) par rapport aux méristèmes de petite taille de 0,2 mm de diamètre (T_1) (88%), alors que pour la variété Désirée il n'y a pas de différence significative entre les 2 tailles avec un taux de 80 % de reprise (Figure 3.27).

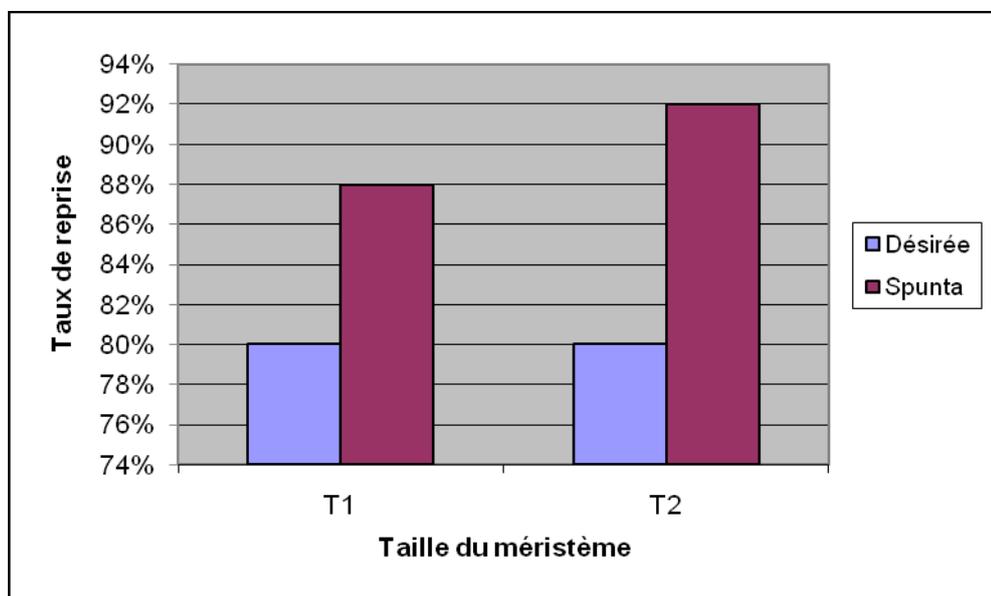


Figure 3.27 : Effet taille du méristème sur le taux de reprise

1.1.2. Taux de contamination.

Pour cet essai, un problème de contamination a été enregistré, la variété Désirée a été la plus sensible avec 15% d'infection alors que la variété Spunta a résisté avec moins de 5% d'infection (Figure 3.28). Selon les résultats obtenus, le taux de contamination des plantes augmente avec la taille de l'explant.

En effet pour la variété Désirée, le taux de contamination des méristèmes passe de 10% pour les méristèmes de petite taille (T_1) à 20% pour ceux de taille plus grande (T_2).

Alors que pour la variété Spunta, nous n'avons pas enregistré une différence significative pour les deux tailles, le même taux a été obtenu (17%) (Figure 3.29).

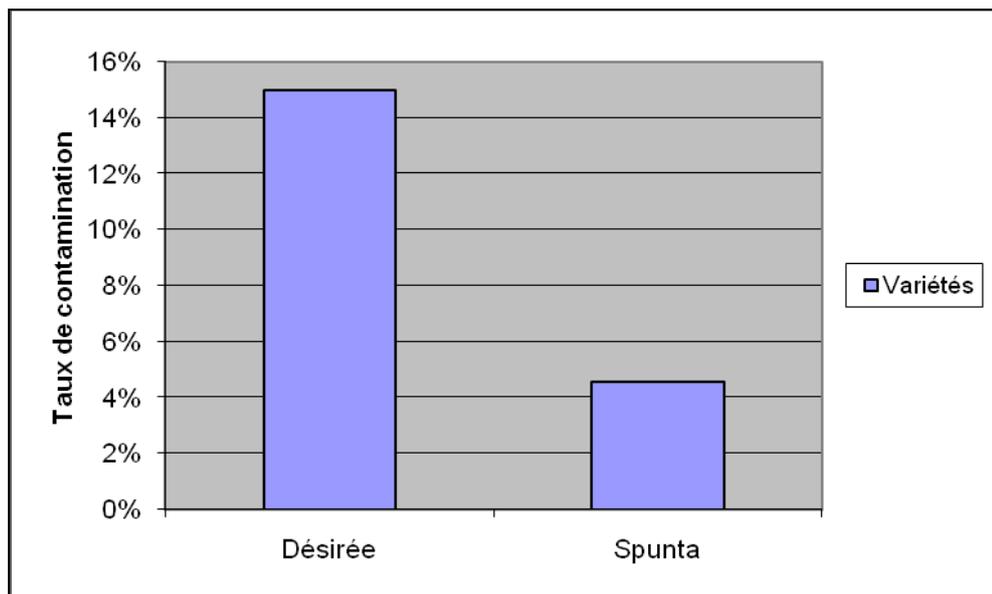


Figure 3.28 : Effet variétés sur le taux de contamination

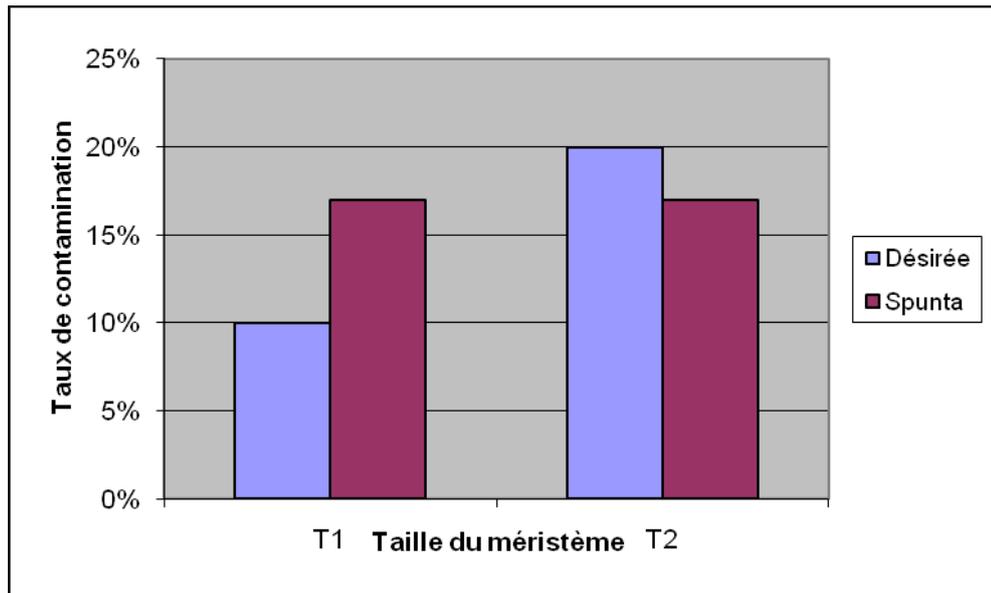


Figure 3.29 : Effet taille du méristème sur le taux de contamination

1.1.3. Taux de nécrose.

D'après les résultats obtenus, le taux de nécrose dépend de la taille de l'explant prélevé, en effet pour la variété Désirée, le taux de nécrose des méristèmes est de 12 % pour les méristèmes de petite taille (T_1) et diminue à 4 % pour ceux de taille plus grande (T_2). Alors que pour la variété Spunta le taux passe de 8 % pour la taille (T_1) à 4 % pour la taille (T_2) (Figure 3.30).

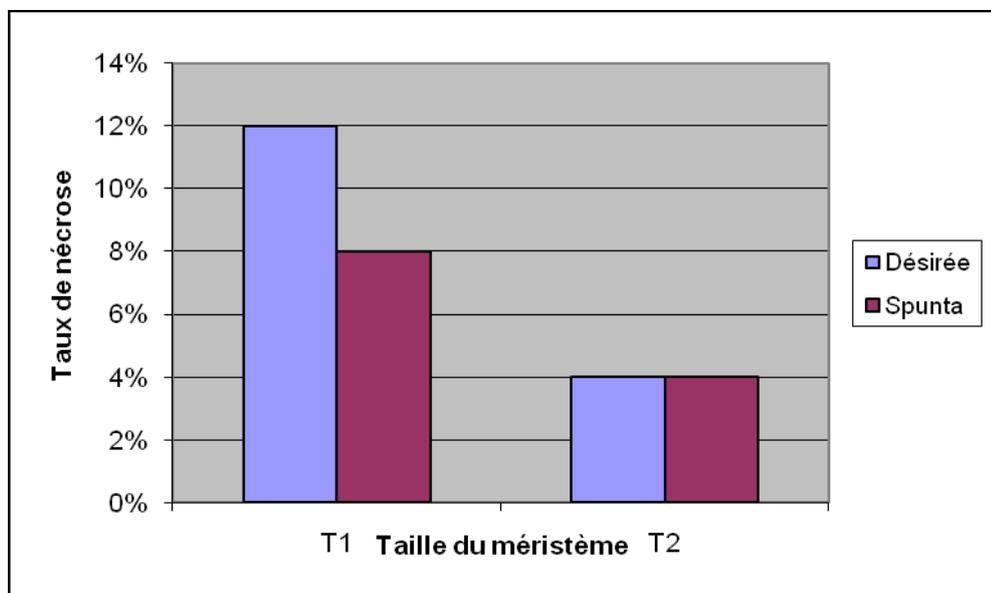


Figure 3.30 : Effet taille du méristème sur le taux de nécrose

1.2. Culture de méristèmes associée à la thermothérapie

Dans cette partie et pour les deux variétés étudiées après thermothérapie, un taux de perte important a été enregistré. La variété Spunta a été la plus sensible avec 48% de perte des tubercules, alors que la variété Désirée a plus au moins résisté avec 40% de pertes (Figure 3.31)

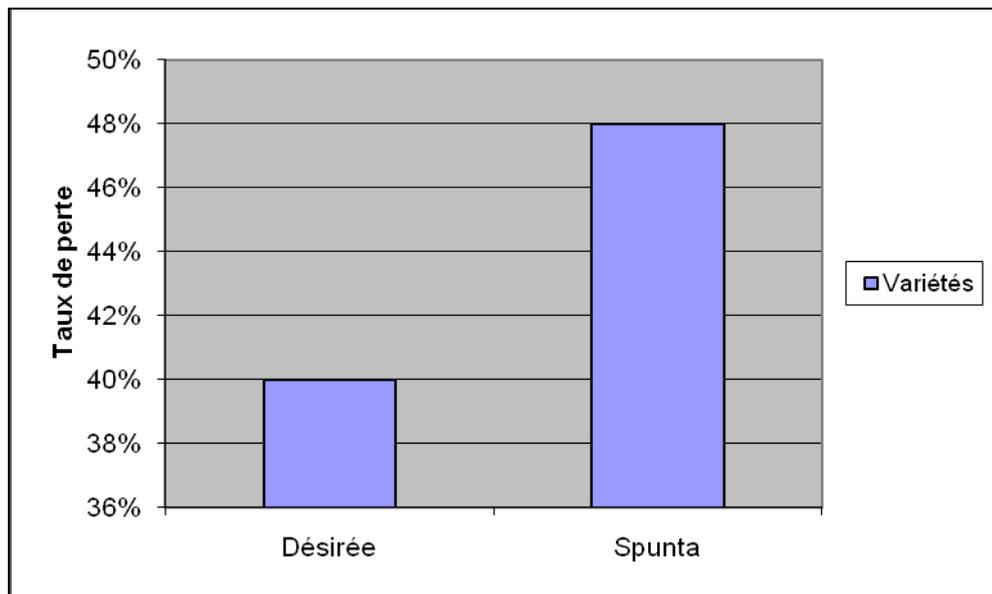


Figure 3.31 : Effet thermothérapie sur le taux de perte des tubercules.

1.2.1. Taux de reprise

1.2.1.1. Effet variété

Sur la totalité des méristèmes mis en culture, le taux de régénération le plus important (80%) a été obtenu avec la variété désirée à partir des méristèmes de taille T_2 , alors que la variété Spunta n'a enregistré qu'un taux de 50% avec la taille T_1 (Figure 3.32).

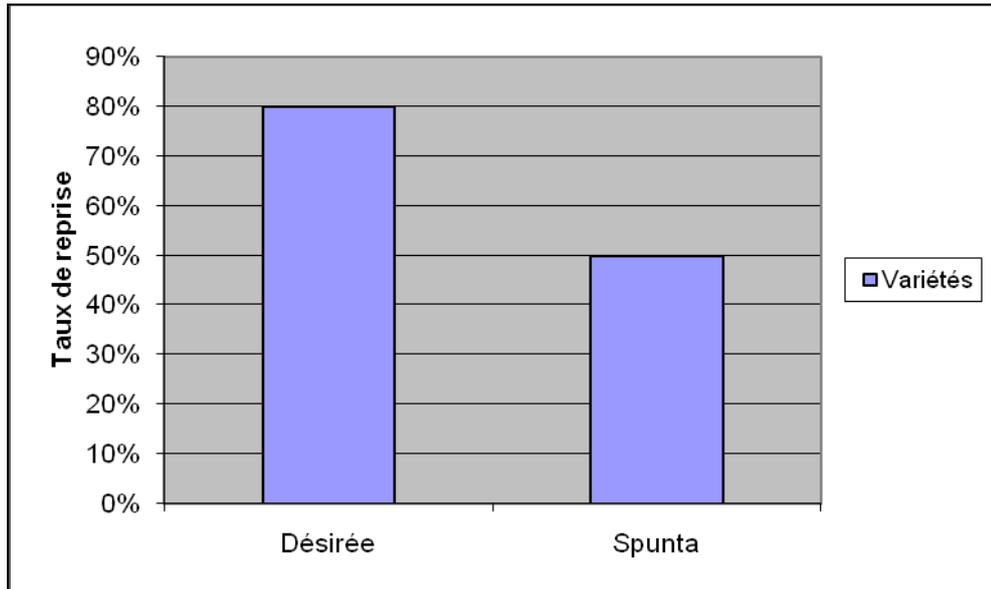


Figure 3.32 : Effet variétés sur le taux de reprise.

1.2.1.2. Effet taille de méristèmes

Selon les résultats obtenus, le pourcentage de régénération des plantes augmente avec la taille de l'explant. En effet, le taux de survie des méristèmes passe de 60% pour les méristèmes de grande taille T_1 à 80% pour ceux de taille plus petite T_2 pour la variété Désirée, alors que pour la variété Spunta le taux de reprise passe de 50% pour la taille T_1 à 75% pour la taille T_2 (Figure 3.33).

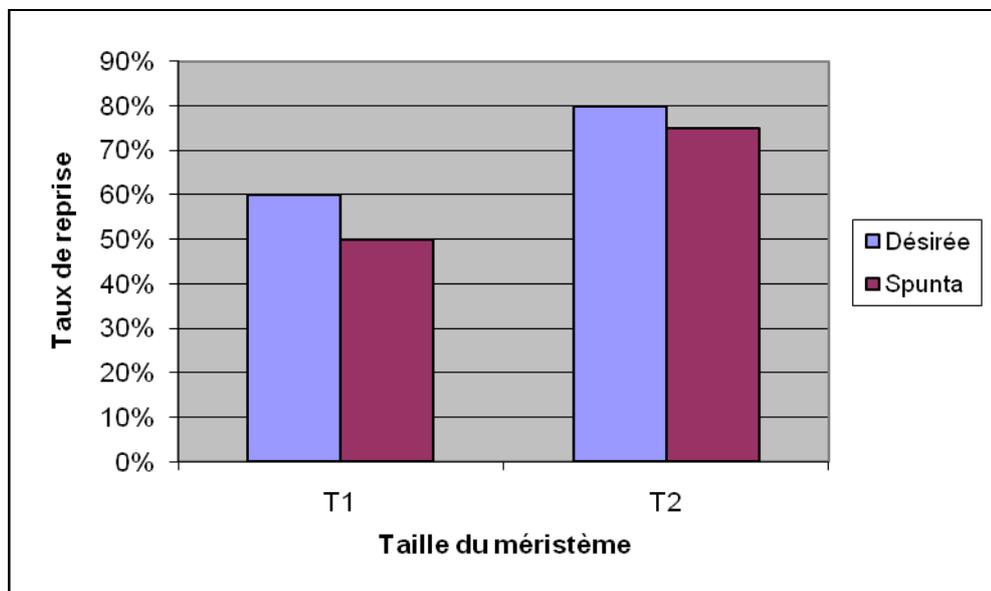


Figure 3.33 : Effet taille du méristème combiné à la thermothérapie sur le taux de reprise

1.2.1.3. Effet thermothérapie

Pour l'effet de la thermothérapie les résultats présentent une diminution du taux de survie des méristèmes provenant des tubercules ayant subi un traitement à la chaleur préalable à la culture avec 66% par rapport à ceux qui ne l'ont pas subi (85%) (Premier essai) (Figure 3.34). La thermothérapie appliquée diminue donc le taux de régénération des variétés étudiées.

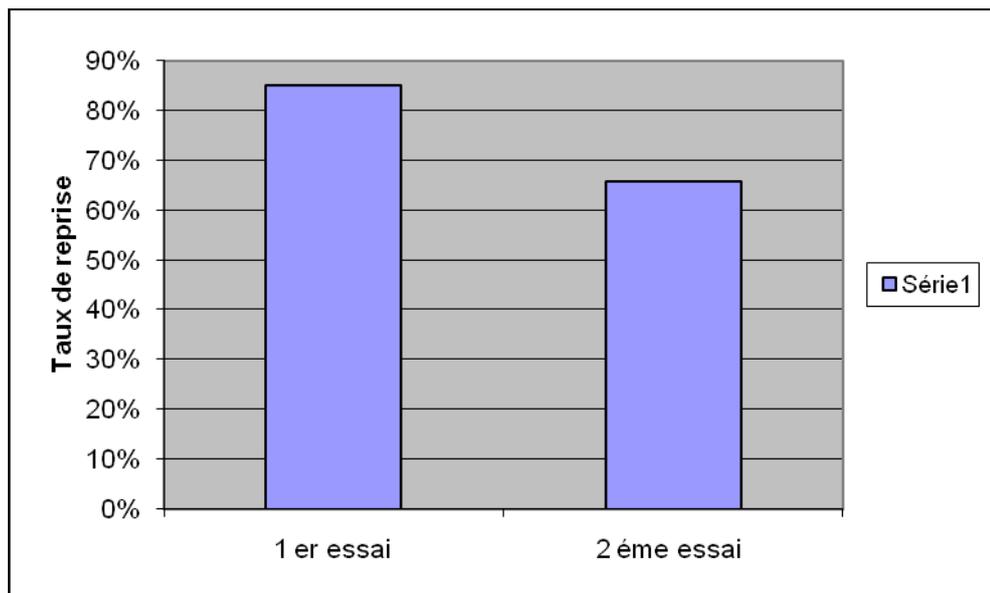


Figure 3.34 : Effet des deux essais sur le taux de reprise

1.2.2. Taux de contamination

Le problème de contamination est aussi présent dans cet essai, le pourcentage de contamination augmente avec la taille de l'explant pour la variété Désirée qui passe de 8% pour les méristèmes de petite taille T_1 à 16% pour ceux de plus grande taille T_2 , alors que pour la variété Spunta il n'y a pas une différence significative entre les deux tailles (4%) (Figure 3.35).

En outre, il a été observé que la thermothérapie a contribué à réduire ces contaminations. En effet les méristèmes issus des tubercules traités à la chaleur ont présenté un taux de contamination moins important (de 4 à 16%) que ceux n'ayant pas subi ce traitement (de 10 à 20%).

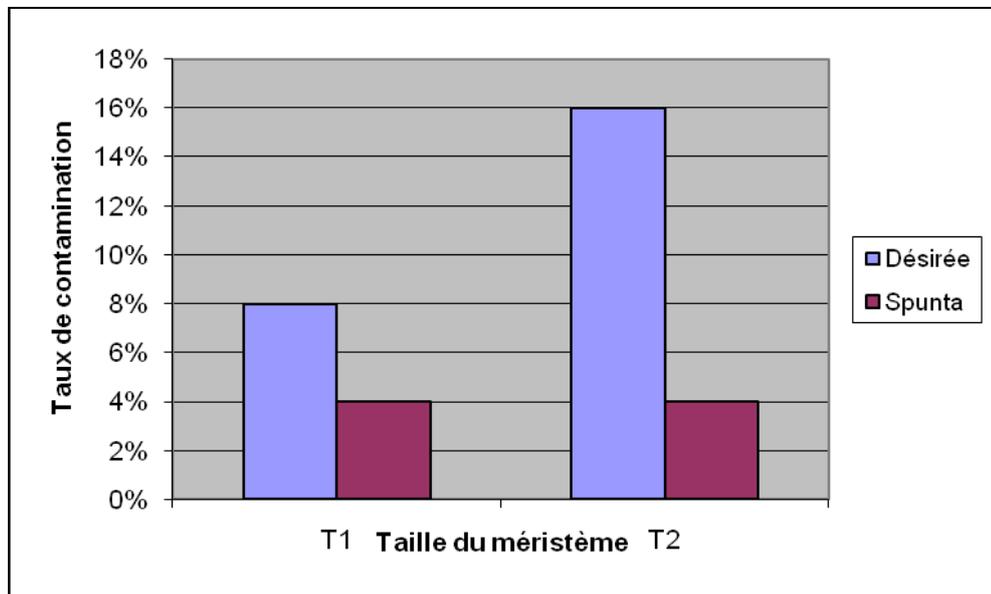


Figure 3.35 : Effet taille du méristème et thermothérapie sur le taux de contamination

1.2.3. Taux de nécrose

La thermothérapie appliquée augmente le taux de nécrose, en effet pour la variété Spunta le taux passe de 34% pour la taille (T_1) à 9% pour la taille (T_2). Alors que pour la variété Désirée un taux de 30 % de nécrose était obtenu uniquement avec des méristèmes de petite taille (T_1). (Figure 3.36).

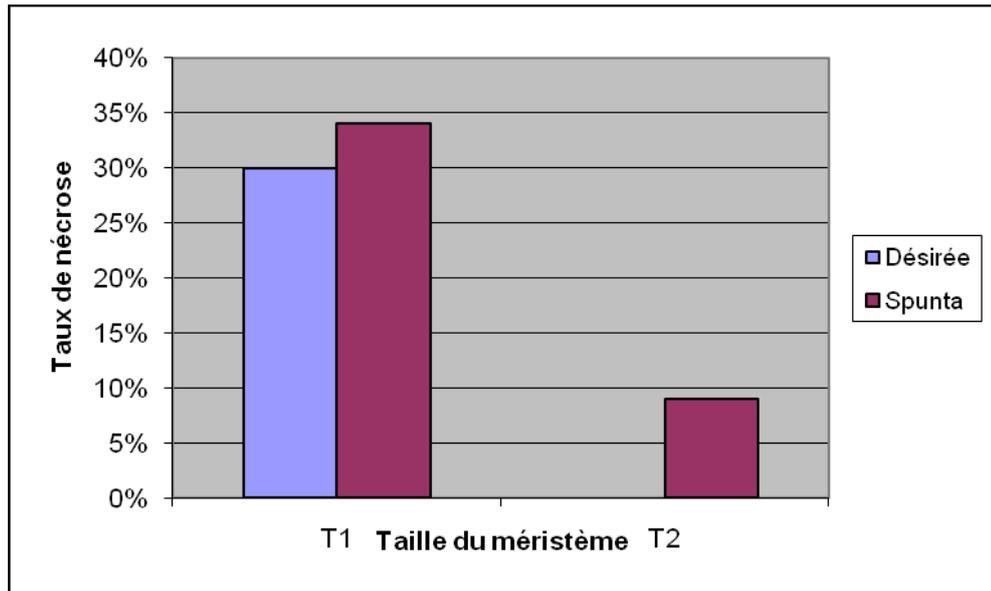


Figure 3.36 : Effet taille du méristème et thermothérapie sur le taux de nécrose.

1.3. Assainissement

Le contrôle de la présence des virus chez les individus multipliés *in-vitro* a été réalisé au moyen du test ELISA.

Selon la réglementation les tubercules de la classe A peuvent héberger un taux proche de 6%. Cela justifierait donc le recours à la culture de méristèmes pour la régénération de populations saines.

1.3.1. Effet variété

La variété Désirée et Spunta étudiées dans le premier essai ont donné respectivement 67.5% et 35.55% de vitro plants indemne des virus testés. Rappelons que pour cet essai nous n'avons pas combiné la thermothérapie à la culture de méristèmes (Tableau 3.6)

Tableau 3.6 : Taux d'assainissement (%) obtenue avec les deux essais

Variété	EN/ET		Taux d'assainissement %	
	1 ^{er} essai	2 ^{eme} essai	1 ^{er} essai	2 ^{eme} essai
Spunta	16/45	12/15	35,55	80
Désirée	27/40	8/14	67,5	57,14

EN : Echantillons Négatives

ET : Echantillons Totale testées.

Pour le deuxième essai culture de méristème couplée à la thermothérapie, les résultats du contrôle ELISA réalisé sur des vitro plants après 3 semaines de multiplication ont révélé que la variété Spunta présente 80% de vitro plants sains contre 57,14% pour la variété Désirée.

1.3.2. Effet taille du méristème

Après le contrôle ELISA des vitro plants issue du premier essai, nous avons obtenu 75% de vitro plants sains de l'ensemble des virus pour la variété Désirée, provenant des méristèmes de taille T_1 contre 60% pour celle de taille T_2 . Alors que la variété Spunta un taux de 40,90% de vitro plants sains est obtenus issue des méristèmes de taille T_1 par rapport à ceux issus d'explant de plus grandes taille T_2 (30,43%) (Tableau 3.7).

Tableau 3.7 : Taux d'assainissement (%) obtenue avec les 2 tailles du méristème.

Variété	EN/ET		Taux d'assainissement %	
	T_1	T_2	T_1	T_2
Spunta	9/22	7/23	40,90	30,43
Désirée	15/20	12/20	75	60

EN : Echantillons Négatives

ET : Echantillons Totale testées.

1.3.3. Effet thermothérapie

L'application de la culture de méristème seule reste limitée en général pour l'élimination des virus de la pomme de terre. Nous avons constaté que la culture de méristème seul de nos échantillons sans l'associer à la thermothérapie a donné uniquement 50,58% d'assainissement pour l'ensemble des virus et variétés

de pomme de terre (tableau 3.8), alors que ceux associés à la thermothérapie a donné un pourcentage de 68,96% de vitro plants sains.

Tableau 3.8 : Taux d'assainissement (%) obtenue avec les deux essais

Essai	EN/ET	Taux d'assainissement %
1 ^{er} essai	43/85	50,58
2 ^{eme} essai	20/29	68,96

EN : Echantillons Négatives

ET : Echantillons totale testées.

Il a été constaté que les meilleurs taux d'assainissement sont obtenus par la combinaison de la culture des méristèmes de taille T_1 avec thermothérapie de l'ordre de 83,33% contre 77,77% de ceux obtenue avec les méristèmes de plus grande taille T_2 pour la variété Spunta. Alors que pour la variété Désirée 65,50 % de vitro plants sains sont obtenus avec les méristèmes de taille T_2 contre 50 % obtenus avec la taille T_1 . En effet, le prélèvement de méristèmes de taille égale à 0,2 mm sur des pomme de terre préalablement maintenues à 37 °C pendant 4 semaines a produit 50% et 83,33% de vitro plants saines respectivement pour la variété désirée et Spunta (Figure 3.37).

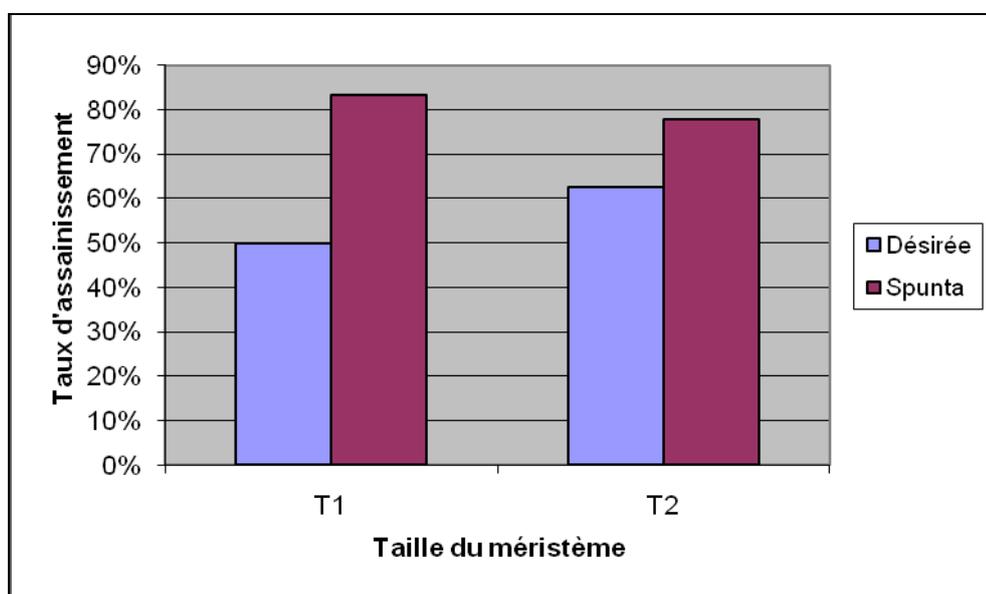


Figure 3.37 : Effet taille du méristème et thermothérapie sur le taux d'assainissement.

1.3.4. Effet type du virus

Les résultats du test ELISA montrent que des échantillons ont répondu positivement en présence des anticorps dirigés contre les 5 virus étudiée malgré qu'ils aient subi une culture de méristème seule ou combinée à un traitement à la chaleur.

Tableau 3.9 : Taux d'échantillons virosés (%) obtenue pour les deux essais

Essai	Infection simple					Infection double et/ou mixte
	PLRV	PVA	PVY	PVS	PVX	Complexe viral
1 ^{er} essai	11,76 %	7,06 %	9,41 %	4,71 %	2,35 %	14,11 %
2 ^{ème} essai	-	-	10,34 %	3,45 %	-	17,24 %

- : Echantillons sains.

Les résultats de chaque virus séparément montrent que le PLRV a été facilement éliminé chez les individus ayant subits la thérapie, alors qu'il est présent avec un taux de 11,76% des vitro plants issus de culture de méristème seul. Le même cas avec le PVA, 7,06% de pousse infectés ont été obtenu pour le 1^{er} essai.

Pour le PVY, nous avons obtenus 10,34% et 9,41% de vitro plants viroses respectivement issues de méristèmes ayant et n'ayant pas subi la thérapie. Le PVS un taux de 4,71 % de vitro plants viroses ont été obtenu issue de culture de méristème seul et 3,45% de vitro plants issu de méristème subi la thérapie.

La culture de méristème seul à donné un taux de 2,35% de vitro plants infectés de PVX qui a été éliminé chez les individus subi la thérapie. Des taux de 14,11% et 17,24% de vitro plants viroses ont été obtenu respectivement du 1^{er} essai et 2^{ème} essai et due à une infection viral double et ou mixte.

2. Phase serre – verre (milieu contrôlé).

Le test ELISA réalisés sur les plants de la serre-verre après 3 mois de culture, consiste à vérifier et à confirmer l'état sanitaire des vitro plants déjà testés et répondu négativement au test.

Le test ELISA effectué sur les 54 échantillons provenant de clones régénérer *in vitro*, n'a décelé aucun virus. Donc l'élimination des virus à été réaffirmé sur des plants bien développés et les mini tubercules produits en serre sont indemnes.

3. Phase plein champ (milieu naturel).

3.1. Evolution des captures d'ailes sur pomme de terre d'arrière saison année 2006.

Le nombre moyen d'individus ailés capturés dans les pièges pour toutes les espèces récoltés dès l'installation de la pomme de terre d'arrière saison jusqu'à la récolte soit du 15 Août au 21 Novembre 2006 est données en Appendice D.

Les résultats nous montrent que le nombre moyen d'individus par piège et pour toutes les espèces confondus était de 722.34 ailés. L'espèce dominante était *Aphis fabae* avec 545.99 individus, soit 75.59 % des captures globales, *Aphis gossypii* et *Myzus persicae* était respectivement représentées par des taux 14.37 % et 9.65 % ces espèces était les plus rencontrées durant cette saison de culture (figure 3.38). Les deux espèces restantes était représentés par de faibles taux 0.78 % pour *Macrosiphum euphorbiae* et 0.02 % pour *Aphis nasturtii*.

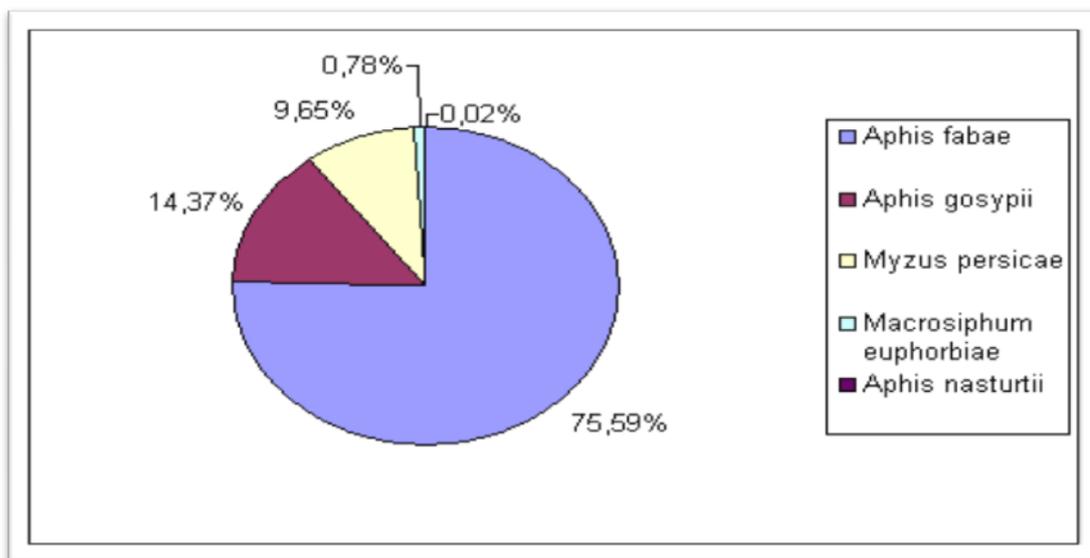


Figure 3.38 : Pourcentages des captures sur la culture d'arrière saison (2006).

L'analyse de la courbe (Figure 3.39), nous montre qu'il existe deux périodes de vol. La première commence à partir de la Mi- Août et se termine le 17 Octobre, et la deuxième commence à partir de la fin Octobre et atteint son minimum le 21 Novembre.

Au cours de la première période, nous avons noté des captures de faible amplitude. Ces derniers ont commencé à partir du mois d'Août qui est caractérisé par des températures élevées et une sécheresse prolongée. Le vol pendant cette période est caractérisé surtout par des fluctuations plus ou moins importantes, le maximum 23,33 est obtenu le 19 Septembre, les captures diminuent par la suite pour atteindre un minimum de 4,75 ailés le 17 Octobre.

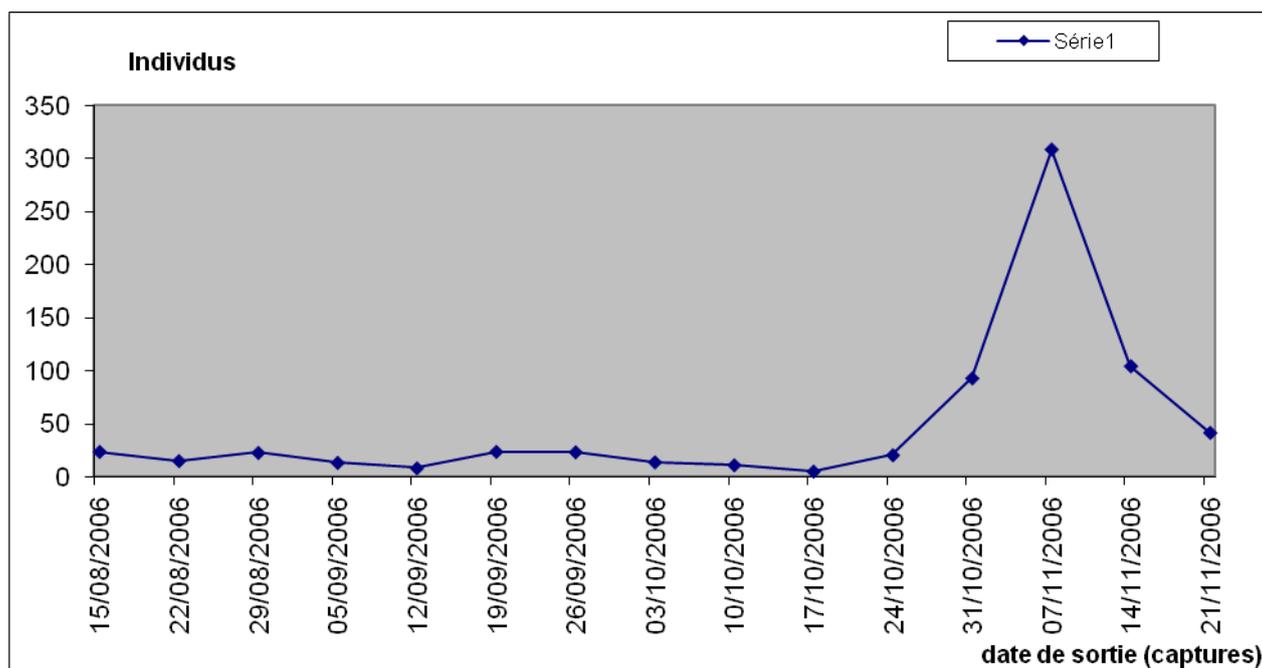


Figure 3.39: Fréquence de vol global des espèces aphidiennes capturées sur pomme de terre d'arrière saison.

Pour les fluctuations des vols enregistrés pendant la culture d'arrière saison durant la première période (mi-août à mi-octobre) peuvent être expliqués par l'incidence des facteurs climatiques, surtout les températures élevées notées en mois d'août et les premières semaines du mois de Septembre et les précipitations enregistrées au cours du mois de Septembre et Octobre.

Pour la deuxième période (fin Octobre à fin Novembre), nos résultats montre que le nombre d'ailés pièges est élevé par rapport à la première période. Les captures ont commencé à progresser dès la dernière semaine du mois d'Octobre. Le maximum est noté le 7 Novembre avec une moyenne de 308,01 ailés.

Les captures diminuent par la suite pour atteindre une moyenne de 41,27 ailés le 21 Novembre, car après cette date il y'avait attaque de gelée début de récolte et fin de prélèvement des pucerons.

3.2. Evolution des captures d'ailes sur pomme de terre de saison (année 2007).

Les résultats des captures globales des pucerons récoltés dans les pièges jaunes sont représentés en Appendice D, les résultats des 14 semaines de piégeages ont montré qu'il existe des périodes d'activité de vol plus ou moins importantes suivant les différentes espèces.

Les premières captures sont obtenues la première semaine du mois d'Avril, le maximum fût obtenu vers la fin du même mois avec 34 ailés et de 32 ailés vers la fin du mois de Mai. Après cette date nous avons noté une régression des effectifs jusqu'à la date de récolte (Figure 3.40).

Le nombre total moyen par piège pour toutes les espèces confondus est de 138,21 ailés. L'espèce dominante est *Aphis fabae* avec 55,15 individus, soit 39,90 % suivi de *Macrosiphum euphorbiae* avec 32,03 individus, soit 23,17 %. *Myzus persicae*, *Aphis gossypii* et *Aphis nasturtii* sont représentées respectivement par des pourcentages de l'ordre de 21,92 %, 11,96% et 3,03 % (Figure 3.41).

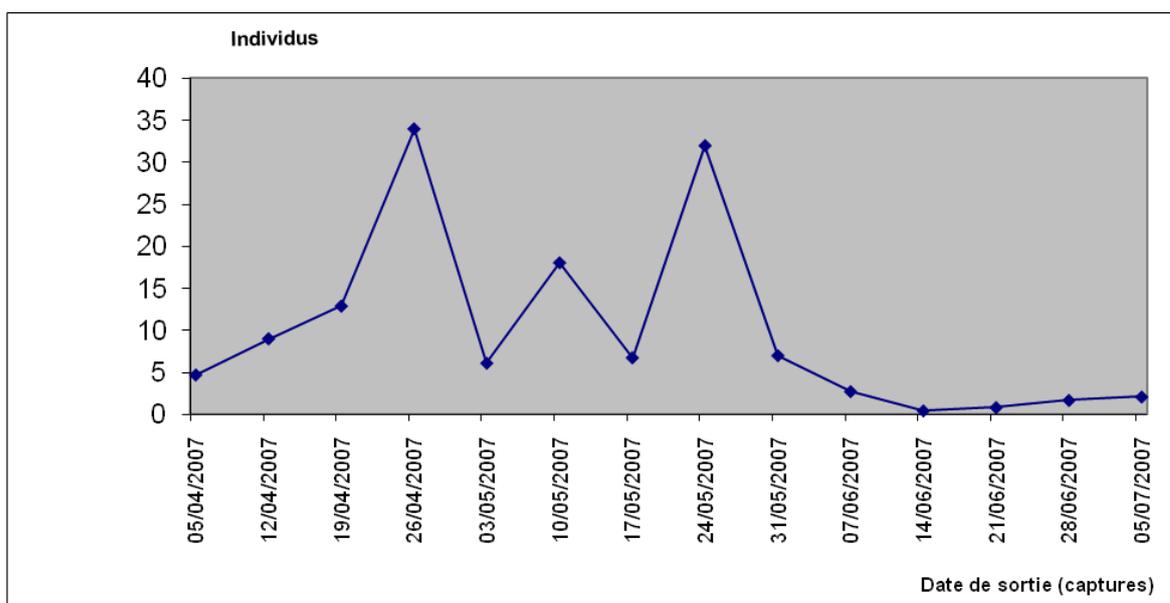


Figure 3.40: Fréquence de vol global des espèces aphidiennes capturées sur pomme de terre de saison.

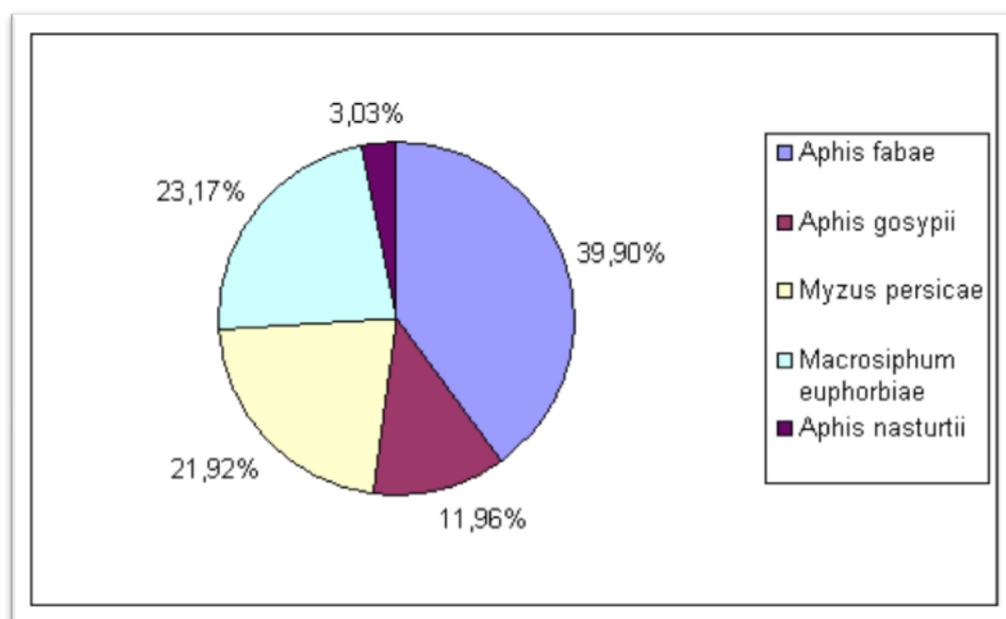


Figure 3.41 : Pourcentages des captures sur la culture de saison (2007).

3.3. Epuration et estimation de taux de viroses

Nous avons constaté des infections importantes avec un taux de 0,15 % dans les productions de plants de première génération (culture d'arrière saison) réalisées au départ de mini-tubercules produits en serre contrôlée ne contenant aucune infection (Tableau 3.10). Donc nous considérons que l'origine de la contamination se trouve à l'extérieur de ces parcelles.

Tableau 3.10 : Taux de viroses estimées dans la parcelle en culture d'arrière saison G 0 pour la production de la G 1

Variété	Superficie (ha)	Nombre de plants épurés	Taux en % (*)	Symptômes
Spunta	1,06	131	0,23	Mosaïque légère
Désirée	0,99	34	0,064	
Total	2,05	165	0,15	

* : Plants épurés/ total plants plantés

Alors que pour la culture de saison production de la deuxième génération un taux de viroses plus élevée à été enregistré avec 3,38 % (Tableau 3.11). Ce taux est dû peut être aux sources d'infection externe par les vecteurs ou bien par une contamination primaire provenant d'un plant mère infecté.

Tableau 3.11 : Taux de viroses estimées dans la parcelle en culture de saison G 1 pour la production de la G 2

Variété	Superficie (ha)	Nombre de plants épurés	Taux en % (*)	Symptômes
Spunta	4,04	12406	5,75	Mosaïques légères à frisolées, gaufrage nette et parfois nécrosés
Désirée	4,56	3088	1,27	
Total	8,60	15494	3,38	

* : Plants épurés/ total plants plantés

4. DISCUSSION

4.1. Culture de méristème et thérapie

La présente étude a mis en évidence la difficulté de régénérer des plantules à partir des méristèmes de petite taille avec 0,2 mm par rapport à ceux de plus grande taille entre 1 à 3 mm. Les résultats obtenus montrent que les méristèmes de plus grande taille sont les plus adéquats pour la régénération de nos variétés.

Ceci rejoint les observations de BINIAM et al [67], qui préconisent des méristèmes de plus de 0,5 mm de diamètre. De même, ZRYD et al [68] ont trouvé que la pomme de terre infectée par le PVX, uniquement 10 % des méristèmes excisés inférieurs à 0,1 mm de diamètre se sont développés et dont la plupart étaient dépourvue de virus.

Dés que l'on augmente la taille de prélèvement, le pourcentage de reprise augmente et peut atteindre 80% à 92 % mais les risques de contaminations par les virus augmentent considérablement. Il est évident qu'il est préférable d'obtenir quelques bons clones sains que de nombreux clones qu'il faudra éliminer par la suite.

Cependant, selon LEPOIVRE et SEMAL [69] l'augmentation de la taille de l'explant diminue sensiblement le pourcentage de plantes assainies.

Le traitement thermique à 37°C pendant 4 semaines a influencé négativement la régénération des méristèmes en diminuant le taux de reprise des variétés étudiées de 85 % à 66 %. Ces observations s'avèrent être en accord avec celles rapportées par BINIAM et al [67], qui ont obtenu 45 % de reprise lorsque le matériel est traité à 37°C pendant 2 semaines contre 36 % de régénération pour une période de traitement qui est prolongée à 4 semaines.

ZRYD et al [68], soulignent que le pourcentage d'élimination du PVX passe de 50 % après 8 semaines de traitement à presque 100 % après 18 semaines, ils concluent que plus longue est la période à laquelle le matériel a été traité plus

élevé le pourcentage de plants sains obtenus et plus faible est le taux de régénération des méristèmes mis en culture.

La diminution du taux de survie des méristèmes ayant subi un traitement préalable à la chaleur, pourrait être expliquée selon LE et al [70], par le fait que d'éventuelles blessures pourraient être occasionnées aux minuscules dômes translucide, lors de l'extraction et le traitement par la chaleur aurait effectivement pu ralentir leur croissance, rendant ainsi le développement des méristèmes difficile.

4.2. Assainissement

En ce qui concerne l'assainissement, les résultats obtenus montrent que notre matériel appartenant à la classe A, réagi positivement en présence des anticorps dirigé contre le virus PLRV, PVY, PVA, PVX et PVS et que ce matériel étaient infecté avec une combinaison de deux ou trois virus.

Le pourcentage de vitro plants assainis varie avec la taille du méristème prélevé, le type de virus et la plante hôte. Le succès de l'éradication virale est inversement proportionnel à la taille du méristème [71].

La comparaison des résultats sérologiques pour les deux tailles de méristèmes prélevés montre une relation entre la taille de l'explant et le taux de virus éliminé. Le risque de conserver le virus s'accroît rapidement avec l'augmentation de la taille de l'explant. Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de la concentration en particules virales en fonction de la distance par rapport à l'apex, la zone limite d'extension du virus correspondrait à la zone d'insertion du dernier primordium foliaire; le dôme apical en étant dépourvu [68].

Des effets similaires de la taille de méristème sur l'élimination des virus et la régénération ont été trouvés chez la pomme de terre par MERLET et al, [72]. Par ailleurs, l'éradication de chaque virus séparément a donné des résultats acceptables avec la taille T1 de 0,2 mm, car selon ZRYD et al [68],

Des interactions peuvent exister entre les virus dans le cas d'infections multiples qui peuvent conduire à des interprétations apparemment contradictoires. Toute fois, le PVX lorsqu'il est en infection simple, peut être facilement éliminé par la culture de méristèmes, il en est de même en cas d'infection double par le PVA et PVX. Au contraire, en présence d'une infection mixte par le PVY, PVM et le PVS, la culture de méristèmes même après traitement thermique, ne permet rarement l'élimination du PVX alors que la majorité des plantes obtenues sont débarrassée des virus PVY, PVM et PVS [73].

La faculté relative de l'assainissement par culture de méristèmes dépendra de l'agent pathogène en cause. Chez la pomme de terre, les virus suivants peuvent être éliminés par ordre de difficulté croissante, le PLRV, PVA, PVY, PVX et PVS [57].

Afin d'améliorer le taux d'obtention de plants de pomme de terre sains, plusieurs auteurs associent la culture de méristèmes au traitement à la chaleur (thermothérapie) du matériel de départ [74, 75, 76, 73, 67, 77, 78].

Dans notre cas, il s'est avéré bénéfique de combiner culture de méristèmes et thermothérapie pour augmenter les pourcentages d'assainissement de nos variétés. Pour nos variétés les meilleurs résultats d'assainissement 80% ont été obtenus en combinant la thermothérapie à la culture de méristèmes de taille 0,2 mm (T1).

Nos résultats étaient en accord avec ceux d'autres travaux [72, 67], qui confirment l'efficacité de l'association des deux méthodes pour l'éradication de différents virus de la pomme de terre. Selon BINIAM et al [67], la combinaison de la thermothérapie (4 semaines à 37°C) à la culture de méristèmes augmente le pourcentage de plants assainis des virus PLRV, PVA et PVX de 35 % à 45 % avec des méristèmes de taille plus de 0,5 mm.

Toutefois, les résultats d'assainissement obtenus après thermothérapie restent insuffisants vu le nombre des clones sains obtenus. Cela peut s'expliquer notamment par le taux d'élimination des virus qui étaient faible même après

excision des méristèmes de tubercules ayant subi la thermothérapie, ceci peut être dû à la difficulté en excisant les méristèmes sur des tubercules germés, et que ces derniers continuaient à se développer dans l'incubateur.

Egalement la déshydratation extrême causée par la chaleur a rendu l'excision des méristèmes très difficile et la plus grande partie des tissus avoisinants contenant les particules virales ont été peut-être inclus. Selon MACDONALD [79], les variétés hâtives continuent à germer après 12-14 semaines à 32-35 °C.

Une plante est considérée saine que si elle est indemne de l'ensemble des virus à la fois. Nous avons constaté que les résultats de l'élimination de l'ensemble des virus testés sont plus faibles par rapport à l'assainissement de chaque virus séparément.

D'après nos résultats les 5 virus ont bien réagi à la culture de méristèmes d'une façon générale mais pour nos variétés la Spunta a été la plus facile à assainir.

Le PLRV a été éliminé après le traitement thermique, la proportion d'extirpation du PLRV est accrue avec l'augmentation de la période de traitement. Les résultats de l'éradication du PLRV sont en accord avec les résultats obtenus par FERNOW et al [74] et MERLET et al [72]. Ces mêmes auteurs utilisent la thermothérapie pour éliminer le PLRV des tubercules avant leur plantation.

Selon MERLET et al [72], un séjour de 3 mois à 37 °C permet de guérir des boutures du virus de l'enroulement. La thermothérapie n'a pas éliminé le PVY et le PVS de quelques plantes même soumises à la thermothérapie. Les résultats obtenus par STACE-SMITH et MELLOR, [75] confirment nos résultats, c'est-à-dire que les auteurs ont trouvé tous les virus PVS et PVY très stables et difficiles à enlever des plantes de pomme de terre par thermothérapie seule.

4.3. Evolution des captures d'ailes sur pomme de terre d'arrière saison et de saison

Dans la région étudiée, Les populations de pucerons ainsi que la dynamique de leur vol est relativement semblable pour les deux saisons de culture. L'initiation des vols au printemps débute généralement au mois d'avril et celle d'été débute vers la mi-août. Nos résultats rejoint ceux trouvés par des études réalisées au niveau de la région d'étude, durant une période allons de 1988 à 2003 avec des différences dans le taux des captures causés par les variations climatiques et autres variables de chaque année.

Nos observations ont, en outre, montré que les bacs jaunes disposés dans les cultures procurent une meilleure image de l'activité de certaines espèces, il s'agit de l'activité d'espèces telles que *Myzus persicae*, celle du groupe des *Aphis* et *Macrosiphum euphorbiae*. Selon ROBERT et al [80], les pièges jaunes est les plus susceptibles d'intégrer les phases actives du comportement des insectes au moment de la contamination des cultures.

ROBERT [81], rapporte que les pucerons qui colonisent abondamment les plantes à la levée seront capables de disséminer les virus même si leur aptitude à la transmission est faible.

Myzus persicae est considérée comme le puceron le plus dangereux pour les cultures en général, car il est très polyphage et est vecteur de plusieurs dizaines de virus économiquement dommageables. La pomme de terre est un hôte habituel pour ce puceron qui est capable de l'infecter aussi bien avec le virus de type persistant le PLRV qu'avec les virus non persistant comme le virus Y.

Pour *Aphis fabae*, la pomme de terre n'est pas un hôte privilégié mais ce puceron en visite volontiers les cultures auxquelles il est capable d'inoculer les virus non persistants comme le virus Y [82].

Pour *Macrosiphum euphorbiae*, dans les parcelles de pomme de terre, il est capable de transmettre le virus Y mais aussi celui de l'enroulement [83].

Les captures de *Myzus persicae* et *Macrosiphum euphorbiae* dès le début de la saison de culture indique que la pomme de terre est exposée à une infection virale précoce. En plus une transmission effectuée précocement aura pour conséquence une diffusion systématique des virus à tous les tubercules de la descendance [81]. Selon ce dernier c'est le vol de dissémination de *Myzus persicae* qui est le plus préjudiciable à l'état sanitaire des cultures.

Les pucerons possèdent les seuils de température pour leur développement les plus bas et les taux de reproduction les plus élevés. Ils sont très sensibles aux changements de températures [84]. Les basses températures par exemple, peuvent affecter de différentes manières la survie des pucerons à l'hiver directement en les tuant, ou indirectement en réduisant leur faculté de reproduction, leur longévité, en modifiant leur relations avec la plante hôte, en réduisant leur capacité à se mouvoir vers de nouvelles sources nutritives [85].

Les captures globales sont plus élevées dans la culture de pomme de terre de saison, ceci peut être dû aux conditions climatiques avant et au cours du cycle de culture de pomme de terre.

4.4. Epuration et taux de viroses

La mise en évidence des relations existant entre l'activité des populations de pucerons ailés et la qualité virologique des productions de plant peut s'envisager au niveau de la parcelle, elle vise à expliquer globalement la qualité des lots de plants par l'observation des plants présentant des symptômes typique.

L'épuration est inefficace envers les *Carlavirus* du fait du manque d'extériorisation des symptômes d'infections par le PVS et extériorisation partielle du PVM [86].

Les symptômes les plus répandus dans les parcelles (les deux saisons de cultures) est ceux de une ou deux tiges atteintes en général assez facile à voir, une mosaïque légère et faible à de mosaïque plus sévère frisolée et parfois des nécroses nervaires à la face inférieure des feuilles. C'est les symptômes les plus fréquents associés au virus Y.

Cette situation résulte principalement du mode de transmission « non persistant » qui facilite énormément sa dissémination dans les cultures et rend la lutte difficile, acquisition et inoculation très rapides par des piqûres d'essai, pas de latence, peu de spécificité quant au vecteur donc la transmission est très rapide (quelques minutes).

Ces caractéristiques ont un effet considérable sur l'efficacité de la lutte chimique habituellement menée de façon intensive dans les cultures de plants par l'emploi des insecticides. Selon COLLAR et al, [87], l'efficacité des insecticides vis-à-vis des pucerons est généralement évaluée par leur capacité à entraîner la mort de ces derniers. L'effet potentiel de leur application sur la dissémination des virus dans les cultures est rarement considéré.

BOITEAU et SINGH [88] rapportent l'absence d'efficacité d'application de l'insecticide imidaclopride sur la dissémination du virus Y dans une culture de pomme de terre, (en Algérie imidaclopride est la matière active d'un produit appelé Confidor 200 SL produit de Bayer distribuer par plusieurs représentants Algériens et couramment utilisés).

Selon ROLOT [12], le problème des insecticides réside essentiellement dans les délais d'action de l'insecticide permettant au puceron de procéder à de multiples piqûres d'infection entre le moment où il est entré en contact avec le produit et le moment où il succombe à son action.

La gamme large de traitements insecticides utilisés sont efficaces que pour éviter la propagation des virus persistants comme le PLRV, dont les particules ne sont infectieuses qu'après un certain temps de séjours à l'intérieur des pucerons,

par contre les virus non persistants (virus Y, A et S) qui sont immédiatement transmissibles après acquisition, les insecticides ne sont pas suffisamment rapides pour prévenir des contaminations externes à la parcelle.

Les pucerons ayant le temps de disséminer le virus avant d'être tué, les insecticides limitent par contre les populations aphidiennes dans la parcelle [85].

L'emploi des insecticides de façon intensive et peu raisonnée soulève le problème des résistances. De nombreux phénomènes de résistance des pucerons à l'égard des grandes familles d'insecticides (Organophosphorés, Carbamates, Pyrethrinoïdes) ont été décrits dans la littérature [12]. Des produits des mêmes familles sont utilisés dans notre pays.

RONGAI et al, [90] trouvent dans ce phénomène de résistance une explication à l'accroissement subit des infections virales dans les cultures de plants de pomme de terre.

En effet cet accroissement est en relation avec l'explosion des populations de l'espèce *Aphis gossypii*, explosion constatée après traitement des cultures à l'aide de l'insecticide Pirimicarbe par l'augmentation de 30% de sa faculté reproductive, d'autres cas de résistance, notamment de *Myzus persicae* [91] d'*Aphis nasturtii* et de *Macrosiphum euphorbiae* [92].

CONCLUSION

Au terme de ce travail, nous espérons avoir initié une étude préliminaire pour la régénération des tubercules de la pomme de terre virosés par la production de plants sains.

Ainsi et dans nos conditions expérimentales, la probabilité de régénérer des plantes augmente avec la taille de l'explant. Toutefois, la régénération des méristèmes avec un primordium foliaire (0,2 mm) s'avère acceptable avec un pourcentage de 80 à 88 %.

Alors que, les explants méristématiques comprenant 2 ou 3 primordia foliaire (de 1 à 3 mm) semblent plus adéquats pour la régénération d'un taux élevé de méristèmes (80 à 92 %). Quant aux taux d'assainissement, il diminue lorsque la taille de l'explant augmente. Ainsi, l'ensemble des virus dépistés chez les variétés étudiées est éliminé chez 57 % des vitroplants de pomme de terre régénérés à partir de méristèmes ne dépassant pas 0,2 mm.

Chez la pomme de terre la combinaison des techniques de culture de méristèmes et de thermothérapie augmente le pourcentage de vitroplants assainis par rapport à l'utilisation d'une seule de ces méthodes. Aussi, pour l'ensemble des virus testés, le prélèvement d'explants ne dépassant pas 0,2 mm sur des tubercules préalablement maintenus à 37° C pendant 4 semaines produit les meilleurs taux d'assainissement avec près de 80 % de vitroplants assainis.

Les premiers résultats sérologiques nous ont permis de constater que le matériel de départ utilisés appartenant à la classe A, réagissent positivement en ELISA pour les 5 virus à savoir, le PLRV, le PVA, le PVY, le PVS et le PVX.

De plus nous avons révélé que, le PLRV est plus facilement éliminé par rapport aux autres virus, et que la variété Spunta a été la plus facile à assainir.

La culture de méristèmes est donc le point d'initiation de toute culture *in vitro* soucieuse de multiplier des plantes saines et conformes au matériel de départ. A cet effet, des tests de détection sévères doivent être mis en place pour contrôler l'état sanitaire des plants obtenus.

La technique ELISA par sa simplicité, sa rapidité, sa capacité à être automatisée et à traiter de grandes séries d'échantillons, serait la plus commode pour le contrôle virologique des plants de pomme de terre régénérées par culture de méristèmes.

Le schéma d'assainissement de plants de pomme de terre mise au point dans le présent travail a donné des résultats satisfaisants. Désormais l'assainissement et la multiplication rapide de la pomme de terre par culture de méristèmes et thermothérapie peuvent être appliqués et exploités à l'échelle nationale et ceci, en vue de la mise au point d'un prototype d'unités de contrôle et de production de semences de base. Néanmoins, certains aspects devraient faire l'objet d'études complémentaires (Taille de méristèmes, thermothérapie, multiplication, identification et caractérisation moléculaire de tous les virus présents dans les variétés étudiées et autres, comportement et suivi au champ des plants assainis,....etc.).

Bien qu'issus de tissus sains, les clones régénérés par culture de méristèmes ne sont pas résistants aux virus. Ils peuvent se réinfecter une fois placés au champ et il est impératif de les protéger des contaminations afin de conserver les améliorations qui leur ont été apportées. Car les pucerons ailés sont responsables de la diffusion des infections virales dans les cultures de pomme de terre. La connaissance des caractéristiques de ces populations est non seulement une nécessité qui contribue à la compréhension du problème spécifique des infections virales mais elle peut également donner des indications susceptibles d'orienter le choix des stratégies de production

La dynamique de vol est pratiquement semblable pour les 2 saisons de cultures, les vols de pucerons sont majoritairement composés d'espèces capables de transmettre les virus les plus dangereux tels que le PVY.

Pour cela un schéma de sélection sanitaire devrait être mis en place pour l'obtention de semences de qualité :

- Choix de matériel de départ : soit des tubercules appartenant à une classe supérieure (les premières générations) avec peu ou pas d'infection ou bien un tubercule choisi dans un lot a priori sain puis subit une série de tests divers (ELISA, contrôle visuels,...) pour vérifier l'absence de toute infection.
- Réaliser un conservatoire *in vitro* (collection de lot sain *in vitro*) : le maintien des cultivars de pomme de terre peut se faire soit sous forme de micro - plants ou micro - tubercules, car ce cultivar conservé peut nous procurer non seulement un moyen sur et pratique pour faire face à tout incident pouvant conduire à la perte de matériel au cours de conservation, ou lors de sa sortie en plein champ et cela dans le contexte d'un approvisionnement en matériel de base de haute qualité à tout moment de l'année et sans passer de la culture de méristèmes ainsi de la thermothérapie.
- Les cultures de multiplication de pomme de terre sont soumises à l'activité des vecteurs de la levée au défanage. De cette information relative à la dynamique des vols dans la région, certaines mesures techniques visant une réduction du risque d'infection des cultures de multiplication peuvent être proposées et qui est très utilisées en Europe, qui est l'utilisation de plants prégermés pour les plantations : Le stade physiologique ainsi artificiellement avancé réduit la longueur du cycle végétatif de la plante, accélère l'évolution vers le stade de tubérisation ainsi que l'avènement de la maturité. Au moment de l'accroissement important des vols, les plantes

se trouvent dans un état moins sensible aux infections et sont proches de l'opération visant la destruction du feuillage (défanage).

- Une autre mesure sanitaire concernant la production des premières générations de plants dans de petites parcelles consisterait à les installer au milieu de grandes parcelles de multiplication de classe inférieure : le risque d'introduction du virus dans la petite parcelle devient alors minime, la grande parcelle située tout autour jouant le rôle de filtre vis-à-vis des contaminations d'origine externe.
- Choix de l'environnement : les parcelles de plants doivent être si possible placées à une exposition et un microclimat défavorables aux pucerons et surtout bien isolées des cultures de consommation.
- Epurer tôt : l'essentiel des contaminations se fait généralement au début de la végétation, alors les épurations doivent être précoces, complètes et répétées (les symptômes apparaissent échelonnés).
- Réaliser des traitements de protection : non seulement avec les insecticides mais aussi tester différentes stratégies de lutte basées sur l'utilisation des huiles minérales, dans le but de vérifier leur efficacité contre la dissémination des virus transmis selon le mode non persistant. Puisque le PVY constitue le problème essentiel dans nos productions de plants et les insecticides sont peu efficaces pour limiter la dissémination du virus Y, dans les cultures de plants. Leur usage dans ce cadre reste toutefois considéré comme indispensable. Car c'est en 1962 que BRADLEY et al. [93], ont pour la première fois, montré l'action des huiles sur la transmission du virus Y de la pomme de terre. Depuis, l'utilisation des huiles paraffiniques pour lutter contre la dissémination des virus non persistants, dont le virus Y dans les cultures de plants de pommes de terre, s'est développée de manière plus ou moins intensive dans le monde. Si elles constituent, depuis 15 ans, un moyen basique de lutte contre le virus Y dans les cultures de plants dans certains pays de l'Europe de l'Ouest (France, Belgique et Pays-Bas). Wang

et pirone [94] ont mis en évidence une interférence entre l'huile minérale et la rétention du virus dans les stylets, ce qui pourrait empêcher l'acquisition du virus lors des piqûres d'essais.

- Défaner efficacement : un défanage rapide évite des contaminations tardives sur une végétation qui n'est plus protégée et dont les repousses restent sensibles à des contaminations par des vols de pucerons.

Enfin après affinage éventuel de la méthodologie, l'étape suivante serait consacrée au passage direct à la production intensive.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

PLRV	: Potato Leafroll Virus
PVY	: Potato Virus Y
PVA	: Potato Virus A
PVS	: Potato Virus S
PVX	: Potato Virus X
PVM	: Potato Virus M
TRV	: Tobacco Rattle Virus
PMTV	: Potato Mop Top Virus
TBRV	: Tomato Black Ring Virus
TNV	: Tobacco Necrosis Virus
AMV	: Alfalfa Mosaic Virus
CMV	: Cucumber Mosaic Virus
TSWV	: Tomato Spotted Wilt Virus
PYDV	: Potato Yellow Dwarf Virus
APMV	: Andean Potato Mottle Virus
PVX	: Potato Virus X
TRSV	: Tobacco Ring Spot Virus
PBRV	: Potato Black Ring Spot Virus
PVT	: Potato Virus T
APLV	: Andean Potato Latent Virus
Ha	: Hectare
INRA	: Institut National de Recherche Agricole
PM	: Poids Moléculaire
ARN	: Acide Ribonucléique
Da	: Daltons
nm	: Nano mètre
VPg	: Viral protein genome linked
KDa	: Kilo Daltons
ORF	: Open Reading Frame (Cadre Ouvert de Lecture)
Kb	: Kilo bases ou 1000 bases
TGB	: Triple Gène Bloc
ITCV	: International Committee for the Taxonomy of Viruses
G	: Grossissement
ng	: Nano gramme
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
DAS-ELISA	: Double Antibody Sandwich ELISA
TAS- ELISA	: Triple Antibody Sandwich ELISA
DO	: Densité Optique
UV	: Ultra Violet
T1	: Méristème de taille (0,2mm)
T2	: Méristème de taille de 1 à 3 mm
PNPP	: Para Nitro Phényle Phosphate

APPENDICE B

LES CARACTERISTIQUES DES VARIETES

Caractéristiques de la variété désirée.

Les caractéristiques	Description
Généralités:	
Origine génétique:	Issue de croisement (Urgenta x Depesche), réalisé par ZPC Hollande en 1951.
Maturité:	mi-saison à tardive.
Caractéristiques botaniques:	
Plants:	Courte à moyen, vigoureux, tiges épaisses non ramifiées.
Feuille:	Vert- gris mat, ouvertes, rigides et pétioles entièrement rouges – pourpre.
Tubercules:	Longs à ovales, moyens à gros, peau rouge et lisse, yeux superficiels à mi- profonds et chair jaune pâle.
Germe:	Cylindriques, base rose, fortement pigmentés.
Caractéristiques agronomiques:	Variété à rendement élevé, de calibre uniforme, bonne résistance aux crevasses de croissance, cœur creux, blessures internes et externes, repos végétatif assez court, bonne conservation et densité moyenne.
Réaction aux maladies:	
Immune :	Gale verruqueuse (race 1).
Résistante:	Moucheture du tubercule.
Bonne résistance:	Virus Y, mildiou sur tubercules et jambe noire.
Modérément résistante:	Virus A et X, pourriture sèche fusarienne.
Modérément sensible:	Mildiou sur feuillage, enrroulement.
Sensible:	Gale commune.

(Source: agence canadienne d'inspection des aliments, variété de pomme de terre, 2005)

Caractéristiques de la variété Spunta.

Les caractéristiques	Description
Généralités:	
Origine génétique:	Issue de croisement (Béa x U.S.D.A 96-95).
Maturité:	Demi – précoce.
Caractéristiques botaniques:	
Plants:	Taille haute, port dressé et type rameux.
Feuilles:	Vert Franc, peu divisée, foliole moyenne limbe cloqué.
Tubercules:	Oblong allongé, régulier, yeux très superficiels, peau jaune.
Germes:	Violet, conique, pilosité moyenne.
Caractéristiques agronomiques:	Variété vigoureuse, très productive, à tubérisation relativement précoce, donnant de gros tubercules réguliers, de forme allongée, mais à faible teneur en matière sèche, faible aptitude à la conservation et repos végétatif moyen.
Réaction aux maladies:	
Mildiou de feuillage:	Moyennement sensible.
Mildiou de tubercule:	Moyennement sensible.
Galle verruqueuse:	Non attaquée.
Gale commune:	Assez sensible.
Virus A, Y et Enroulement :	Respectivement résistante, assez peu sensible et sensible.

(<http://WWW.Google.fr/> fiche descriptive de variété de pomme de terre).

APPENDICE C

Milieu de Murashige et Skoog (1962) = MS

Macroéléments (mg/l)	NH₄ NO₃	1650
	KNO₃	1900
	CaCL₂ H₂O	440
	MgSO₄ 7H₂O	370
	KH₂ PO₄	170
Microéléments (mg/l)	H₃BO₃	6,2
	MnSO₄ 4H₂O	22,3
	ZnSO₄ 7 H₂O	8,6
	KI	0,83
	Na₂ MoO₄ 2H₂O	0,25
	CuSO₄ 5H₂O	0,025
	CoCl₂ 6H₂O	0,025
Fer (mg/l)	FeSO₄ 7H₂O	27,85
	Na₂ EDTA	37,25
Vitamines (mg/l)	Myo-inositol	100
	Acide nicotinique	0,5
	Pyridoxine- HCl	0,5
	Thiamine – HCl	0,1
	Glycine	2,0

APPENDICE D

Evolution des captures des individus ailés dans les pièges jaunes placés dans la Parcelle de la pomme de terre d'arrière saison (Moyenne /piège)

Date de sortie	Espèces					Total
	<i>Aphis fabae</i>	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	<i>Aphis nasturtii</i>	
15 Août	4.83	17.50	0.83	0.16	0	23.32
22 Août	4.14	6.71	3.83	0	0	14.68
29 Août	0.66	10.50	11	0.16	0	22.32
5 Septembre	7	5.20	0.80	0	0	13
12 Septembre	2	5.13	0.71	0	0	7.84
19 Septembre	2.33	12	9	0	0	23.33
26 Septembre	2.28	10.14	10.50	0	0	22.92
3 Octobre	4.85	3.85	4.85	0	0	13.52
10 Octobre	5.85	3.28	1.57	0	0	10.7
17 Octobre	3.50	0.50	0.75	0	0	4.75
24 Octobre	10.85	6.28	2.85	0.14	0	20.12
31 Octobre	77.85	9	3.85	1.85	0	92.55
7 Novembre	287	7.74	12.85	0.28	0.14	308.01
14 Novembre	95	3.71	5.16	0.14	0	104.01
21 Novembre	37.85	2.28	1.14	0	0	41.27
Total	545.99	103.82	69.69	2.73	0.14	722.37
%	75.59	14.37	9.65	0.78	0.02	100 %

Evolution des captures des individus ailés dans les pièges jaunes placés dans la parcelle de la pomme de terre de saison (Moyenne /piège)

Date de sortie	Espèces					Total
	<i>Aphis fabae</i>	<i>Aphis gossypii</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Macrosiphum euphorbiae</i>	<i>Aphis nasturtii</i>	
5 Avril	1,75	0,20	0,75	1,5	0,5	4,7
12 Avril	2,7	1,75	0,86	3,4	0,3	9,01
19 Avril	2	3,5	4,3	2,60	0,5	12,9
26 Avril	6,8	4,2	12,4	10,6	0	34
3 Mai	2,5	0,3	3,3	0	0	6,1
10 Mai	11,6	0	4,66	1,8	0	18,06
17 Mai	3	0	1,5	2,25	0	6,75
24 Mai	16,2	3,8	2	7,6	2,4	32
31 Mai	6,2	0,14	0,33	0,33	0	7
7 Juin	0,6	0,5	0,28	1,42	0	2,72
14 Juin	0,14	0	0	0,28	0	0,42
21 Juin	0,66	0	0	0,15	0	0,81
28 Juin	0,5	0,57	0	0,10	0,5	1,67
5 Juillet	0,5	1,57	0	0	0	2,07
Total	55,15	16,53	30,3	32,03	4,2	138,21
%	39,90	11,96	21,92	23,17	3,03	100

APPENDICE E

PREMIER ESSAI : culture de méristème seule

Taux de reprise (%) obtenue avec les deux tailles du méristème

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	80 ± 0,16 *	80 ± 0,16
Spunta	88 ± 0,13	92 ± 0,10

* Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$)

Taux de contamination (%) obtenue avec les deux tailles du méristème

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	10 ± 0,12 *	20 ± 0,16
Spunta	17 ± 0,14	17 0,14

*Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$)

Le taux de nécrose (%) obtenue avec les deux tailles du méristème

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	12 ± 0,13 *	4 ± 0,077
Spunta	8 ± 0,10	4 ± 0,077

Taux d'assainissement (%) obtenue avec les deux tailles du méristème

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	75 ± 0,19 *	60 ± 0,21
Spunta	41 ± 0,20	31 ± 0,18

*Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$)

DEUXIEME ESSAI : culture de méristème combiné à thérapie

Taux de reprise (%) obtenue avec les deux tailles du méristème combiné à thérapie

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	60 ± 0,30 *	80 ± 0,25
Spunta	50 ± 0,28	75 ± 0,25

* Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$)

Taux de contamination (%) obtenue avec les deux tailles du méristème combiné à thérapie

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	8 ± 0.16 *	16 ± 0.2
Spunta	4 ± 0.21	4 ± 0.21

* Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$)

Taux de nécrose (%) obtenue avec les deux tailles du méristème combiné à thérapie

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	30 ± 0,28 *	0
Spunta	34 ± 0,26	9 ± 0,15

* Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$)

Taux d'assainissement (%) obtenue avec les deux tailles du méristème combiné à thérapie

Variétés	Tailles du méristème	
	Taille T ₁ = 0,2 mm	Taille T ₂ < 3 mm
Désirée	50 ± 0,40 *	63 ± 0,34
Spunta	84 ± 0,29	78 ± 0,27

* Ecart type après calcul de l'intervalle de confiance ($\alpha = 5\%$)

REFERENCES

1. Kadour, N., « Contribution à l'étude des principaux pucerons vecteurs de virose de la pomme de terre dans la région de Guellal Sétif », Mém. Ing. Agro. Institut de biologie Sétif, (1990), 78 p.
2. El Kadri, I., « L'Algérie tente de sortir de la dépendance des fournisseurs étrangers », El- Watan, édition du 26 Décembre, (2005), 3 p.
3. Benlahcen, M., « Recensement des virus de la pomme de terre en Algérie et essai de mise en vue d'une sélection sanitaire », Mém. Ing. Université I.N.A. El Harrache, (1977), 65p.
4. Ait ouada, M., « Etude des modifications cytologiques induites par le virus de la pomme de terre et comparaison chimique du tubercule » Thé. Mag. Agro. Université I.N.A. El Harrache, (1985), 67p.
5. Sadouki, A., « Epidémiologie des maladies à virus de la pomme de terre en Algérie » Mém. Ing. Université I.N.A. El Harrache, (1986), 61p.
6. Louanchi, M., « Contribution à l'étude des virus de la pomme de terre dans la région d'Algérie », Mém. Ing. Université I.N.A. El Harrache, (1988), 51p.
7. Salazar, F.L., « La détection des virus dans la production de plants de pomme de terre », Bull. Info. Tech, (1987), pp.123-129.
8. Educagri application pédagogiques. « Les techniques *in vitro* chez la pomme de terre », 4p, <http://www.educagri.fr/>.
9. CNI., « Comité national interprofessionnel de la pomme de terre ». 21 rue de Madrid, 75008 Paris, <http://www.yahoo.fr/CNI>.
10. FAO., « Le monde de la pomme de terre », (2007), www.FAO.org.

11. Ellissèche, D., « Aspects physiologiques de la croissance et du développement » In La pomme de terre, amélioration, ennemies et maladies utilisations. Rousselle, P., Robert, Y. et Crosnier, J.C., éd. Chap 3, INRA, Paris, (1996), pp. 72-75.
12. Rolot, J., « Analyse des facteurs régulant la dissémination du virus Y de la pomme de terre (PVY) en vue de stratégies de lutte raisonnées », Thé. Doc. Agro, faculté des sciences agronomiques de Gembloux, Belgique, (2005), 252 p.
13. Beemster, A.B.R. et DE Bokx, J.A., « Survey of properties and symptoms » in De bokx, J.A et Van der want, J.P.H Eds, (1987), pp. 84-113.
14. Délécolle, B., « L'observation des virus de plantes au microscope électronique à transmission la DIP- méthode », INRA, Centre de Recherche d'Avignon, Ed, (1996), 67 p.
15. Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstems, E., Estes, M.K., Lemon, S., Mamiloff, J., Mayo, M.A., Mcgeoch, D.J., Pringle, C.R. et Wickener, R., « Virus taxonomy classification and nomenclature of viruses »,VIIth report of the international commitee of taxonomy of viruses, Academic Press, Sandiego, (2000), 1160 p.
16. Brunt, A., « The general properties of potyviruses », Arch, Virol, Suppl, V.5, (1992), pp.3-16.
17. Milne, R.G., « Taxonomy of the rod-shoped filamentous viruses », In the plants virus, V.4, the filamentous plant viruses. Ed. R. G. Milne. Plenum, New York, (1988), pp.3-50.
18. Edwardson , J.R., « Viruses of the potyviridae with non aphid vectors », Arch, Virol, Suppl, V.5, (1992), pp.259-267.

19. Astier, S., Albouy, J., Maury, Y. et Lecoq, H., « Principe de virologie végétale : génome, pouvoir pathogène, écologie des virus », INRA Ed, Versailles, (2001), 444p.
20. Matthews, R.E.F., « Plant virology », 3^{ème} édition, Academic press, Inc, Sandiego, California, (1991). pp.134-145.
21. Dougherty, W.G. et Carrington, J.C., « Expression and function of potyviral gene products », Ann, Rev, Phytopath. V.26, (1988), pp. 123-143.
22. Shukla, D.D. et Ward, E.W., « Structure of potyvirus coat protein and its applications in the taxonomy of the potyvirus group », Virus Res.V.36, (1989), pp.273-314.
23. De Bokx, J.A. et Huttinga, H., « Potato Virus Y », CMI/aab. Description of Plant Viruses, n° 242, (1981), 6p.
24. Kerlan, C., « Maladies à virus In La pomme de terre, amélioration, ennemies et maladies utilisations. Rousselle, P., Robert, Y. et Crosnier, J.C., éd. Chap 6 », INRA, Paris, (1996), pp. 231-251.
25. Nations unies ., « Nécrose superficielle d'origine virale (PTNRD) », commission économique pour l'Europe, France, (2004), 6p.
26. Bartels, R., « Potato Virus A », CMI/aab. Description of Plant Viruses, n° 54, (1971), 3p.
27. Koenig, R., «Carlavirus group», CMI/aab, Description of Plant Viruses, n° 259, (1982), 7p.
28. Koenig, R. et Leseman, D.E., «Potexvirus group», CMI/aab, Description of Plant Viruses, n° 200, (1978), 7p.

29. Koenig, R. et Leseman, D.E., «Potato Virus X», CMI/aab, Description of Plant Viruses, n° 354, (1989), 5p.
30. Wetter, C., «Potato Virus S», CMI/aab, Description of Plant Viruses, n° 60, (1971), 3p.
31. Le plant de pomme de terre français. « Les maladies : le Virus S »,2p, <http://www.google.fr/>.
32. Harrison, B.D., «Potato Leafroll Virus», CMI/aab, Description of Plant Viruses, n° 291, (1984), 6p.
33. Kummert, J. et Semal, J., « Les virus et viroïdes phytopathogènes in traité de pathologie végétale Semal, J. ed . Chap.3 », Ed. Presse Agronomique de Gembloux Belgique, (1989), pp.85-142.
34. Hollings, A. et Brunt, A.A., « Potyvirus group », CMI/aab, Description of Plant Viruses, n° 245, (1981), 7p.
35. De Box, J.A., « Potato virus Y », CMI/aab, Description of Plant Viruses, n° 37, (1981), 3p.
36. Staubli, A., « Sensibilité des variétés de pomme de terre au virus Y nécrogène », fait marquants à la RAC changins, (2004), 13 p.
37. Le plant de pomme de terre français. « Les maladies : le Virus X »,1p, <http://www.google.fr/>.
38. Le plant de pomme de terre français. « Les maladies : le Virus A »,2p, <http://www.google.fr/>.
39. Le plant de pomme de terre français. « Les maladies : le Virus S »,5p, <http://www.google.fr/>.

40. Berrehail, T., « Inventaire des principales viroses de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) et approche épidémiologique des virus à vecteurs aérienne dans la région de Guellal (CNPDP) Sétif », Mém. Ing. Université Mentouri Constantine, (2003), 73p.
41. Salazar, L.F. et Jaya singh, U., « Techniques in plant virology at CIP » the International Potato Center (CIP), Lima, Peru, (2006).4 p. Available at: <http://www.Cipotato.org/training/materials/PVTtechs/plant>.
42. Lê, C.L., Julmi, C., Nowbuth, L., manière, M., Thomas, D., Joffrey de, J.P. et Tschuy, F., « Agroscope RAC changins : 25 ans de culture in-vitro », Revue Suisse Agricole, V.37, n° 3, (2005), pp.133-136.
43. Cornuet, P., « Maladies à virus des plantes cultivées et méthodes de lutte », Ed, INRA, Paris, (1959), 440p.
44. Hahm, Y., Slack, S.A. et Slattery, R.J., « Reinfection of potato seed stocks with potato virus S and potato virus X », Am. Potato. J, V.58, (1980), pp. 117-125.
45. Van der zaag, D.E., « Yield reduction in relation to virus infection In De Bokx, J.A. et Vander Want, J.P.H . Eds », (1987), pp. 146-150.
46. Le coq, H., « La dissémination des maladies à virus des plantes », PHM. Revue. Horticole. V. 365, (1995), pp.13-20.
47. Semal, J. et Vanderveken, J., « Modalités de transmission des phytovirus » In traité de pathologie végétale semal, J., Chap 9 , Ed. Presse Agronomique de Gembloux Belgique, (1989), 621p.

48. Fereres, A., Blua, M.J. et Perring, T.M., « Retention and transmission characteristics of *Zucchini Yellow mosaic virus* by *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* (Homoptera Aphididae) », *J. Econ. Entomol.*, V.85, (1992), pp.759-765.
49. Hébrard, E., Froissart, L.C. et Blanc, S., « Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteur », *virologie.* V.3, (1999), pp.35-48.
50. Pirone, T.P., « Viral genes and products that determine insect transmissibility », *Semin.Virol.* V.2, (1991), pp.81-87.
51. Pirone, I.P. et Blanc, S., « Helper dependent vector transmission of plant viruses », *Ann. Rev. Phytoath* V.34, (1996), pp.227-247.
52. Anonyme, «Principale maladies insectes et nématodes de la pomme de terre », Ed, C.I.P.T. Pérou, (1990), 94p.
53. Le coq, H., « Peut-on lutter efficacement contre les virus des plantes ? », *P.H.M. Revue Horticole* n°419, (2000), pp.22-23.
54. Augé, R., Beauchesne, G., Boccon Gibod, J., Decourtye, L., Dugat, B., Jalouzot, R., Minier, R., Morand, J.Cl., Reymoird, J.P. et Strullu, D.G., « La culture *in-vitro* et ses applications horticoles », 3^{ème} Ed, Paris, (1989), 225p.
55. Morel, G., « Régénération des variétés viroses par la culture de méristèmes apicaux », *Revue Horticole* V.2, n° 261, (1964), pp.733-740.
56. Lindsey, K. et Jones, M.G.K., « Plant biotechnology in agriculture », 57-75, Ed. Prentice Hall, (1990), 233p.

57. Lepoivre, P. et Semal, J., « Culture de tissus et phytopathologie » In traité de pathologie végétale Semal, J., Chap. 16, Ed. Presse Agronomique de Gembloux Belgique, (1989), 621p.
58. Kunkel, L.O., « Peach mosaic not cured by heat treatment », American Journal of Botany, V.23, n°10, (Dec 1936), pp. 683-686.
59. Ng, S.Y.C., Thottapilly, G. et Rossel, H.W., « Tissu culture in disease elimination and micropropagation pp.171-182 » In Thottapilly et al editors biotechnology enhancing research on tropical crops in Africa, Ed. Technical Centre for agricultural and rural cooperation (C.T.A), (1992), 364p.
60. Murashing, T. et Skoog, F., « A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture », Physiol. Plant; V.15, (1962), PP. 473-497.
61. Clark, M.F. et Adams, A.N., « Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses », Journal of Virology V. 34, (1977), pp.475-483.
62. Vézina, L. et Lacroix, M., « Test ELISA », laboratoire de diagnostic en phytoprotection, Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation (MAPAQ), Québec, 6p. <http://www.agrireseau.qc.ca/>
63. Moericke, V., « Uber das farbchender , P firsichblattlaux Myzodes persicae (Sulz) Z tierpsycol, (1950), pp.265-274.
64. Remaudiere, G. et Scoferandez, V., « Clef pour aider à la reconnaissance des ailés de pucerons piégés en région méditerranéen », V.1, Ed. Inst. Pasteur. Parais. Université de Léon. Espana, (1990), 205 p.

65. Macgillivray, M.E., « Les pucerons nuisibles de la pomme de terre au Canada cycle vital et clef d'identifications », service d'info. Agriculture, Canada, (1979), 23 p.
66. Claude Godin, M.Sc. et Guy Boivin, Ph.D., « Guide d'identification des pucerons dans les cultures maraîchères au Québec », Agriculture et Agroalimentaire, Canada, (2002), 31p.
67. Biniam, T. et Tadesse, M., « A survey of viral status on potatoes grown in Eritrea and in vitro virus elimination of a local variety Tsaeda embada », African Journal of Biotechnology, V.7, n°4,(2008), pp.397-403.
68. Zryd, J.P., Brettell, R., Derreudre, J., Duhoux, E., Gaspart, T., Gazeau, C.M., Hoisters, M., Jacobs, M., Monnier, M., Negruti, I., Paskowski, J., Pelletier, J., Potrykus, L., Saul, M.W., Shillito, R.D., Vandenee, G. et Vernade, D., « Cultures de cellules, tissus et organes végétaux , fondements théoriques et utilisations pratiques », Ed. Presses polytechniques romandes, (1988), 308 p.
69. Lepoivre, P. et Semal, J., « Culture de tissus et phytopathologie In traité de pathologie végétale », les presses agronomiques de Gembloux, Belgique, (1989), pp.455-464.
70. Lé, C.L., Pelet, F. et Perko, J., « Assainissement de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.) in thermothérapie et culture de méristèmes », Revue Suisse vitic. Arboric. Hortic. V. 23, N°5, (1991), pp.329-332.
71. Lindsey, A.W. et Alderson, P.G., « Plant tissue culture and its agricultural applications », Ed. Butterworths, London, (1986), 526 p.

72. Merlet, J., Le Hingrat, Y., Ellissèche, D., Crouau, G. et Langlade, P.,
« Production du plant In La pomme de terre, amélioration, ennemies et
maladies utilisations. Rousselle, P., Robert, Y. et Crosnier, J.C., éd. Chap
9 », INRA, Paris, (1996), pp. 419-426.
73. Lê, C.L., « Régénération de la variété de pomme de terre Hernes par
thermothérapie et culture de méristèmes », Revue Suisse Agricole. V.18,
n°6, (1986), pp. 313-315.
74. Fernow, K.H., Peterson, L.C. et Plaisted, R.L., « Thermotherapy of potato
leaf roll », Am. Potato. J, V.39, (1962), pp.445-451.
75. Stace-smith, R. et Mellor, F.C., « Eradication of potato virus X and S by
thermotherapy and axillary bud culture », Phytopathology, V.5, (1968),
pp.199-203.
76. Lê, C.L. et Collet, G.F., « Assainissement de la variété de pomme de terre
Sangema, méthode combinant la thermothérapie *in vitro* et la culture de
méristèmes. Premier résultats », Revue Suisse Agricole. V.17, n°4, (1985),
pp.221-225.
77. Sip, V., « Eradication of potato viruses A and S by thermotherapy and
sprout tip culture », Potato. Res, V.15, (1972), pp. 270-273.
78. Brown, C.R., Kwiatkowski, S., Martin, M.W. et Thomas, P.E., « Eradication
of PVS from potato clones through excision of meristems from *in vitro* heat
treated shoot tips », Am. Potato. J, V.65, (1988), pp. 633-638.
79. Macdonald, D.M., « Heat treatment and meristem culture as a means of
freeing potato varieties from viruses X and S », Potato research, V.16, n°4,
(1973), pp.263-269.

80. Robert, Y., Rabasse, J.M. et Rouze-Jouan, J., « Sur l'utilisation des pièges jaunes pour la capture de pucerons en culture de pomme de terre », Ann. Zool. Anim, Rennes, V. 6, n° 3, (1974), pp. 349-372.
81. Robert, Y., « Recherche sur la biologie et l'écologie des pucerons en Bretagne, application à l'étude épidémiologie sur des viroses de la pomme de terre », Thé. Doc. D'état Sc Nat, Rennes I, (1980), 242 p.
82. Fereres, A., Perez, P., Gemenó, C. et Ponz, F., « Transmission of Spanish pepper-and potato PVY isolates by aphid (Homoptera: Aphididae), vectors epidemiological implications», Environmental Entomology, V. 22, (1993), pp.1260-1265.
83. Derron, J.O. et Goy, G., « importance relative des pucerons ailés les plus fréquent rencontrés sur la pomme de terre comme vecteurs du virus Y (PVYn), compte tenu de leur mobilité », Revue Suisse de l'Agriculture, V. 22, n° 5, (1990), pp.277-281.
84. Yamamura, K. et Kiritani, K., « A simple method to estimate the potential increase in the number of generations under global warming in temperate zones », Applied Entomology and Zoology, V.33, (1998), pp.289-298.
85. Harrington, R., Hullé, M., Pickup, J. et Balle, J., « forecasting the need for early season aphid control geographical variation in the relationship between winter temperature and early season flight activity of *Myzus persicae* In. Monitoring and forecasting to improve crop and environment protection», Association of applied biologists, presidential meeting, abstracts, (1992), pp.8-11.
86. Gabriel, W., « Les Carlavirus de la pomme de terre, virus M et virus S épidémiologie et protection », Potato Research, V.31, (1988), pp.667-680.

87. Collar, J.L., Avilla, C., Duque, M. et Ferers, A., « Behavioral response and virus vector ability of *Myzus Persicae* (Homoptera Aphididae) probing on pepper plants treated with aphicides », *Journal of Economic Entomology*, V.90, n°6, (1997), pp.1628-1633.
88. Boiteau, G. et Singh, R.P., « Field assessment of imidacloprid to reduce the spready of PVY° and PLRV in potato», *American Potato Journal*, V. 76, n° 1 (1999), pp.31-36.
89. Le Hingrat, Y., « protection contre les maladies à virus », *La pomme de terre française*, n° 451 (Mars- Avril 1989), pp. 9194.
90. Rongai, D., Cerato, C., Martelli, R. et Chendini, R., « Aspects of insecticide resistance and reproductive biology of aphis gossypii glover on seed potatoes», *Potato Res*, V.41, (1998), pp. 29-37.
91. French Constant, R.H., Harrington, R. et Devonshire, A.L., « Effet of repeated applications of insecticides to potatoes on numbers of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera : Aphididae) and on the frequencies of insecticides resistant variants », *Crop. Protection* 7, (1988), pp.55-61.
92. Rouzé- Jouan, J. et Giblot Ducray-Bourdin, D., «Virus de l'enroulement de la pomme de terre le point sur les recherches », *la pomme de terre française*, n°521, (2000), pp.38-41.
93. Bradley, R.H.E., Wade, C.V. et Wood, F.A., « Aphid transmission of potato virus Y inhibited by oils », *Virology*, V.18, (1962), pp.327-329.
94. Wang, R.Y. et Pirone, T.P., « Mineral oil interferes with retention of Tobacco Etch potyvirus in the stylets of *Myzus persicae*», *Phytopathology*, V.86, n° 8, (1996), pp. 820-823.